



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Biología

“Caracterización Bioquímica y Fisiológica de las
Rutas de Reparación de Bases Desaminadas de
Bacillus subtilis”

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias

(Biología)

Presenta:

M. en C. Víctor Manuel Ayala García

Director de Tesis:

Dr. Mario Pedraza Reyes

Guanajuato, Gto. Febrero de 2017.

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente me permito hacer constar que el trabajo de tesis titulado: **“Caracterización Bioquímica y Fisiológica de las Rutas de Reparación de Bases Desaminadas de *Bacillus subtilis*”** fue desarrollado en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, en la Universidad de Guanajuato, por el M. en C. Víctor Manuel Ayala García a fin de obtener el título de Doctor en Ciencias (Biología). El proyecto de investigación realizado bajo mi dirección es original y cuenta con la calidad y el rigor científico requeridos.

ATENTAMENTE

Dr. Mario Pedraza Reyes.
Director de Tesis.

Guanajuato, Gto., Febrero de 2017.

El presente trabajo de tesis de Doctorado se realizó en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección del Dr. Mario Pedraza Reyes con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP, 936-2016 y 1090-2016). Víctor Manuel Ayala García agradece la beca otorgada por el CONACyT para la realización de este trabajo.

Parte de este trabajo de tesis se publicó en el artículo:

Ayala-García VM, Valenzuela-García LI, Setlow P, Pedraza-Reyes M. (2016). Aag Hypoxanthine-DNA Glycosylase Is Synthesized in the Forespore Compartment and Involved in Counteracting the Genotoxic and Mutagenic Effects of Hypoxanthine and Alkylated Bases in DNA during *Bacillus subtilis* Sporulation. *J Bacteriol*, **198(24)**, 3345-3354.

Agradecimientos

A **Dios**. Para ti mi más grande agradecimiento por ayudarme en todo momento. Ahora más que nunca no concibo la vida sin tu existencia. Gracias por permitirme concluir esta etapa en mi vida profesional.

Para **Lucy**. Mi compañera de vida, amor y trabajo. Gracias por tus palabras y por tu dedicación. Siempre te estaré agradecido por tu convencimiento para vivir esta experiencia de vida. Eres única.

Victorín, de ti he aprendido tanto en estos cuatro años. Me enseñas a ser paciente, a tener esperanza, a no olvidar que un día fui niño, y lo más importante, me enseñas a ser padre. Doy lo mejor de mí para verte feliz. Tu sonrisa tiene el poder de hacerme olvidar cualquier dificultad.

A mis padres, **Carmen** y **Jesús**. Gracias por su apoyo incondicional, por su gran corazón y sus grandes sacrificios. Siempre les estaré agradecido por todos sus consejos, su cariño y su comprensión. A mis hermanos **Jesús Antonio**, **Carmen Julieta** y **Juan Carlos**. Gracias por todo su apoyo.

Dr. Mario Pedraza Reyes. Parece que fue ayer cuando le pedimos hacer verano científico en su laboratorio. Nunca en ese momento imaginé llegar hasta estas instancias. Gracias por todas sus enseñanzas, por su paciencia y por permitirme ser parte de esa mi segunda casa en Guanajuato, el PERM-Lab. Le agradezco también por su amistad. Usted sabe que en mí siempre encontrará un amigo dispuesto a ayudar.

Familia Pedraza Díaz. Gracias por abrirnos las puertas de su casa. Gracias **Lety** por el apoyo y la comprensión hacia nuestro laboratorio. Usted es parte importante de toda esta ocurrencia.

Fer y Chío. Hicimos un gran equipo. Les agradezco por compartir sus tips y por su alegría. Hacen una súper pareja.

Compañeros del lab. **Karina, Norberto, Norma, Karlita, Nayar, Saúl, Vero, Adry, Vianey, Rubí, Saby, Mariana, Santos, Gera, May, Martha, Susana, Pedro, Hilda, Liz, Gaby, Ángel, Chino**. Gracias por ser mi familia en el lab y hacer de mi estancia una experiencia de aprendizaje académico, pero también personal.

Agradezco el cálido apoyo de mis suegros **Pilla** y **Jaime** y mi cuñado y compadre **Daniel**. Han sido parte importante en este trabajo.

Gracias a **Nayar** y **Claudia**. Su apoyo al llegar a Guanajuato es invaluable.

En especial agradezco a los integrantes de mi comité tutorial, **Dr. Félix Gutiérrez, Dr. Bernardo Franco, Dr. Héctor Mora, Dra. Vianey Olmedo, Dra. Mayra Cuéllar** y **Dr. Luis Briebe**, por sus comentarios y sugerencias para enriquecer el trabajo.

Agradezco también al equipo de trabajo del **Dr. Luis Briebe** y en especial a su técnico **Corina Díaz** del lab 4 en LANGEBIO, por todas las facilidades otorgadas durante mi estancia en su laboratorio.

Agradezco a todos los **profesores del Departamento de Biología**, de cada uno aprendí algo nuevo. Al personal administrativo y de servicio, son parte importante en este trabajo.

Por último, agradezco a la **Universidad de Guanajuato** por prestar sus instalaciones y equipos y al **CONACyT** por el apoyo económico.

Gracias a Todos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
Resumen	1
I. Introducción	2
1.1 Daño al ADN y sus consecuencias	2
1.2 Desaminación de bases en el ADN	3
1.3 Reparación de bases desaminadas	5
1.4 <i>Bacillus subtilis</i> como modelo de estudio	7
1.4.1 Etapas de la esporulación en <i>B. subtilis</i>	7
1.4.2 Regulación de genes durante la esporulación de <i>B. subtilis</i>	12
II. Antecedentes	14
III. Justificación	16
IV. Objetivos	17
4.1 Objetivo General	17
4.2 Objetivos Específicos	17
V. Materiales y Métodos	18
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo	18

5.2 Inducción de la síntesis y purificación de la proteína recombinante YwqL	19
5.3 Ensayos de actividad de YwqL	22
5.4 Determinación de la frecuencia de mutación espontánea o inducida mediante el agente desaminante bisulfito de sodio	24
5.5 Ensayos de β -galactosidasa	25
5.6 Análisis de microscopía de fluorescencia	26
5.7 Experimentos de <i>primer extension</i>	27
5.8 Determinación de la sensibilidad de células esporulantes de <i>B. subtilis</i> al tratamiento con ácido nitroso y metil metano sulfonato	29
5.9 Obtención y preparación de esporas de <i>B. subtilis</i>	30
5.10 Análisis de la resistencia de esporas de <i>B. subtilis</i> al agente desaminante ácido nitroso.	30
5.11 Determinación de la frecuencia de mutación inducida por ácido nitroso y metil metano sulfonato en células esporulantes de <i>B. subtilis</i>	31
5.12 Análisis estadísticos	31
VI. Resultados	33
6.1 Purificación de la proteína recombinante YwqL	33
6.2 YwqL de <i>B. subtilis</i> es capaz de procesar bases desaminadas y sitios AP	35
6.3 El Mg^{2+} es el mejor cofactor metálico para la actividad endonucleasa de YwqL	39
6.4 Posibles enzimas involucradas en completar la reparación por escisión alternativa (AER) iniciada por YwqL	41
6.5 La expresión del gen <i>aag</i> de <i>B. subtilis</i> es detectada principalmente durante la formación de las esporas	44
6.6 La proteína quimérica Aag-YFP es sintetizada sólo dentro del compartimento de la pre-espora	46

6.7 La expresión de <i>aag</i> es dependiente del factor sigma específico de la ARN-polimerasa, σ^G	48
6.8 Determinación del sitio de inicio de la transcripción y de las regiones regulatorias del gen <i>aag</i> de <i>B. subtilis</i>	51
6.9 Aag y YwqL protegen a las células esporulantes de <i>B. subtilis</i> de los efectos citotóxicos y genotóxicos del ácido nitroso	55
6.10 Aag protege a las células esporulantes de <i>B. subtilis</i> de los efectos citotóxicos y genotóxicos del metil metano sulfonato	57
6.11 Aag y YwqL contrarrestan los efectos mutagénicos del ácido nitroso y metil metano sulfonato	60
6.12 Ung, YwqL y Aag contrarrestan los efectos mutagénicos de la desaminación de bases en esporas de <i>B. subtilis</i>	62
VII. Discusión	64
VIII. Conclusiones	72
IX. Perspectivas	73
X. Anexos	74
XI. Referencias	80

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Productos generados por la desaminación de bases en el ADN	4
Figura 2. Comparación de los pasos para el procesamiento de bases desaminadas entre la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación por escisión alternativa (AER)	7
Figura 3. Microfotografías de diferentes etapas del ciclo de vida de <i>B. subtilis</i>	9
Figura 4. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>B. subtilis</i>	11
Figura 5. Vista general del programa de esporulación en <i>B. subtilis</i>	13
Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína His ₆ -YwqL por cromatografía de afinidad metálica en una columna de níquel-agarosa	34
Figura 7. Actividad endonucleolítica de la enzima YwqL de <i>B. subtilis</i>	37
Figura 8. Análisis densitométrico de la actividad de corte por la enzima YwqL respecto al tiempo sobre distintas lesiones en el ADN	38
Figura 9. Efecto de iones metálicos divalentes sobre la actividad endonucleasa de YwqL	40
Figura 10. Frecuencia de mutación Rif ^R de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i>	43
Figura 11. Patrón de expresión del gen reportero <i>lacZ</i> dirigido por el promotor de <i>aag</i> de <i>B. subtilis</i> durante crecimiento y esporulación	45
Figura 12. Localización subcelular de la proteína quimérica Aag-YFP durante la esporulación de <i>B. subtilis</i>	47
Figura 13. Dependencia de σ^G en la expresión de la fusión <i>aag-lacZ</i>	50
Figura 14. Mapa genético del locus <i>aag</i> y determinación de la región promotora del gen <i>aag</i>	53
Figura 15. Análisis de las secuencias consenso de promotores σ^G -dependientes y el promotor encontrado mediante <i>primer extension</i> para <i>aag</i>	54

Figura 16. Sensibilidad de células esporulantes de <i>B. subtilis</i> a ácido nitroso	56
Figura 17. Sensibilidad de células esporulantes de <i>B. subtilis</i> a metil metano sulfonato	58
Figura 18. Frecuencia de mutación espontánea e inducida por agentes desaminantes durante la esporulación de <i>B. subtilis</i> .	61
Figura 19. Dosis letales 90 (DL ₉₀) calculada para esporas de las cepas de <i>B. subtilis</i> silvestre y deficientes en genes de reparación de bases desaminadas	63
Figura 20. Mecanismo propuesto para la reparación por escisión alternativa (AER) iniciada por YwqL en <i>B. subtilis</i>	66

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio	19
Tabla 2. Valores de dosis letal 50 (DL ₅₀) y 90 (DL ₉₀) para ácido nitroso y metil metano sulfonato de células esporulantes de <i>B. subtilis</i> .	50

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μCi	Microcurio
μg	Microgramos
μL	Microlitros
A	Adenina
AAG	Alquil-adenina-glicosilasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AER	Sistema de reparación por escisión alternativa
Amp	Ampicilina
AP-p	Plásmido conteniendo sitios abásicos
ARN	Ácido ribonucleico
BER	Sistema de reparación por escisión de bases
C	Citosina
Cm	Cloranfenicol
D.O.	Densidad óptica
DSM	Medio inductor de la esporulación
DTT	Ditiotreitol
Em	Eritromicina
Endo V	Endonucleasa tipo V
G	Guanina
g	Aceleración de la gravedad
h	Horas
His₆-YwqL	Proteína recombinante YwqL conteniendo una etiqueta de histidinas
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
Kn	Kanamicina
L	Litro

LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido
p	Plásmido
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
Rif	Rifampicina
s	Segundos
SASP	Proteínas ácido-solubles de unión al ADN
Sitio AP	Sitio abásico
T	Timina
t	Tiempo
Tet	Tetraciclina
U	Uracilo
Ung	Uracilo ADN-glicosilasa
U-p	Plásmido conteniendo uracilo
UV	Ultravioleta
WT	Cepa silvestre

Resumen

Tres de las cuatro bases presentes en el ADN contienen grupos amino exocíclicos propensos a perderse en el ambiente metabólico celular o de manera inducida, lo cual genera las bases análogas uracilo, hipoxantina y xantina, que posteriormente pueden dar lugar a la formación de sitios abásicos. Todas estas lesiones tienen propiedades de apareamiento que son diferentes a las de las bases originales, llegando a generar mutaciones potencialmente letales para las células. Diferentes vías de reparación están implicadas en contrarrestar los efectos del daño al material genético permitiendo la supervivencia y proliferación celular. Mediante enfoques genéticos, bioquímicos y moleculares, en este trabajo se estudió la participación de distintas enzimas capaces de remover bases desaminadas y sitios abásicos del genoma de la bacteria esporulante *Bacillus subtilis*. Aquí se encontró que YwqL, una enzima de la familia Endonucleasa V, es capaz de remover *in vitro* todas las bases desaminadas probadas, así como los sitios abásicos, denotando diferencias importantes en el procesamiento de cada lesión y en los cofactores utilizados para su actividad. Un análisis epistático sugirió que ExoA y/o el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER) tienen el potencial para terminar la reparación iniciada por YwqL. Por otra parte, se determinó que la actividad de Aag, una ADN-glicosilasa implicada en reconocer hipoxantina y bases alquiladas, es sumamente importante para proteger el material genético de las esporas en formación durante el proceso de esporulación. En resumen, tanto la endonucleasa V, YwqL como las ADN-glicosilasas Ung y Aag son cruciales en la protección del material genético de esta bacteria durante su crecimiento activo y durante la diferenciación a esporas.

I.- Introducción

1.1 Daño al ADN y sus consecuencias.

La integridad del ADN es esencial para el correcto funcionamiento de cualquier célula, por lo que éstas deben copiarlo y mantenerlo de manera fiel para así asegurar su correcto funcionamiento al transmitirlo a través de las generaciones. El daño al ADN es definido como un grupo heterogéneo de alteraciones químicas y físicas de la doble hélice del material genético que ocurre como consecuencia de la acción de factores metabólicos, físicos y químicos (Friedberg, 2003). Todos los organismos contienen una batería de enzimas de reparación de ADN dedicadas específicamente a reconocer y reparar los daños generados en el genoma durante el tiempo de vida de una célula (Lenhart y col., 2012). En mamíferos se ha estimado que cada célula está sujeta a más de 15,000 lesiones por día (Lindahl y Barnes, 2000) y que la mayoría de las lesiones surgen de fuentes endógenas tales como subproductos altamente reactivos derivados del metabolismo normal de las células (Friedberg y col., 2006). Diferentes enfermedades o inclusive la muerte son consecuencias atribuidas a menudo a fallas en los sistemas de reparación de ADN. En otros organismos como las plantas se conoce que diversos tipos de estrés, los cuales son muy difícil de evitar por la falta de movimiento, afectan constantemente la integridad del ADN y que debido a su naturaleza en donde la fotosíntesis es estrictamente necesaria para la obtención de nutrientes, numerosos tipos de daño son encontrados, destacando aquellos que surgen como productos de exposición a la luz UV (Kimura y Sakaguchi, 2006). En hongos modelo como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito ampliamente diversas enzimas de reparación de ADN y las implicaciones fisiológicas que conllevan la saturación y/o las fallas en las vías de reparación del daño (Prakash y col., 1993; Sinha y Häder, 2002). En células bacterianas se

conoce que la acumulación de mutaciones reduce el buen funcionamiento celular y potencialmente afecta su viabilidad (Funchain y col., 2000; Friedberg y col., 2006;), no obstante, en estos y en otros organismos como los arriba mencionados, la mutagénesis es la materia prima para la evolución pues los cambios en las bases pueden conferir una ventaja selectiva ante la vulnerabilidad a los cambios ambientales (Zinser y Kolter, 1999; Sung y Yasbin, 2002). Es por esto, que los incrementos en las tasas de mutación de los organismos deben ser balanceados cuidadosamente con sistemas de reparación de alta fidelidad para asegurar la preservación del genoma, pero proveyendo la oportunidad de generar diversidad genética (Lenhart y col., 2012).

1.2 Desaminación de bases en el ADN.

La desaminación del ADN es un tipo importante de daño genético que las células deben enfrentar (Yonekura, 2009). Las bases citosina, guanina y adenina contienen grupos amino exocíclicos cuya pérdida a través de reacciones hidrolíticas espontáneas o potenciadas por agentes como el ácido nitroso, bisulfito de sodio, radiación ionizante y luz ultravioleta da como resultado la aparición de las bases análogas uracilo, hipoxantina y xantina respectivamente (Fig. 1), las cuales poseen propiedades de apareamiento distintas a las de las bases originales, provocando mutaciones por transición durante la replicación semiconservativa del ADN (Chen y Shaw, 1993; Chernikov y col., 2007; Hill-Perkins y col., 1986; Shapiro y Pohl, 1968; Shapiro y Shiuey, 1969). En adición a la desaminación de la citosina, el uracilo puede aparecer como una base no canónica en el ADN por una incorporación errónea de bajos niveles de dUTP por la ADN-polimerasa durante la replicación (Friedberg, 2006). Aun cuando en este contexto el uracilo no representa una base

mal apareada, la sustitución de timina por uracilo es una fuente importante de sitios abásicos endógenos con consecuencias potencialmente letales para las células (Barnes y Lindahl, 2004).

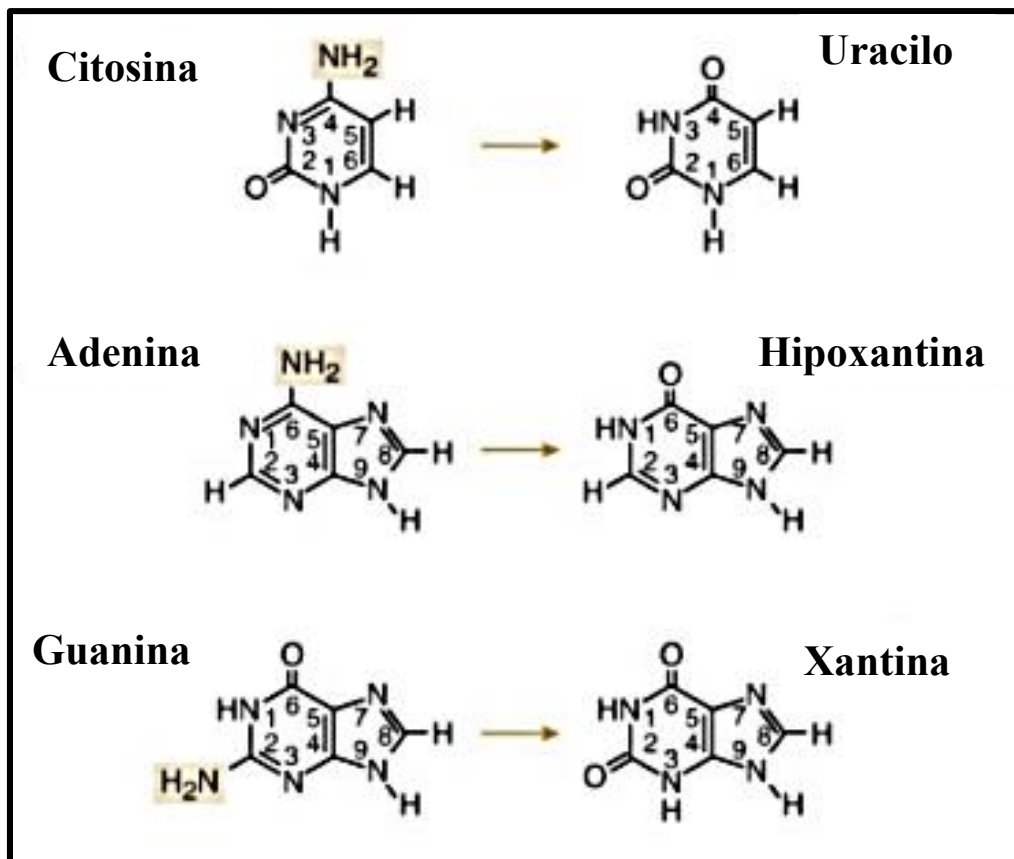


Fig. 1. Productos generados por la desaminación de bases en el ADN. (Tomado de Friedberg y col., 2006).

1.3 Reparación de bases desaminadas.

Los efectos mutagénicos causados por la desaminación de bases pueden ser contrarrestados, para el caso de uracilo e hipoxantina, por el sistema de reparación por escisión de bases (BER) con la participación de ADN-glicosilasas específicas que hidrolizan el enlace N-glicosídico entre la base dañada y la deoxi-ribosa, dejando un sitio abásico (AP) que después es procesado por una AP-endonucleasa, seguido por una ADN-polimerasa y finalmente por una ADN-ligasa (Dalhus y col., 2009).

La enzima uracilo ADN-glicosilasa (Ung) es el principal componente en muchos organismos para remover el uracilo a través de la ruta BER (Lindahl, 1979; Krokan y col., 1997) y existen diferentes tipos de ésta agrupadas en al menos 8 diferentes familias distribuidas en todos los dominios de la vida (Friedberg y col., 2006), siendo la primera de estas enzimas, la descubierta en *Escherichia coli* (Lindahl, 1974), codificada por el gen *ung*.

Para remover hipoxantina existen otras ADN-glicosilasas que dependiendo del organismo reciben una clasificación distinta. Proteínas relacionadas a la familia AlkA en *E. coli* están implicadas en remover hipoxantina y bases alquiladas (Saparbaev y Laval, 1994; Zhao y O'Brien, 2011), las cuales además forman parte de una respuesta inducible conocida como adaptativa o Ada, de las que al menos existen 4 enzimas diferentes (Dalhus y col., 2009). Por otra parte, en eucariotes se han descrito proteínas que no están estructuralmente relacionadas a AlkA pero que pueden procesar tipos muy similares de lesiones como MPG de ratón y AAG en humanos, esta última siendo capaz de reconocer hipoxantina y algunos tipos de bases alquiladas, aunque con marcadas diferencias en la afinidad a cada sustrato dañado (Saparbaev y col., 1995).

Adicional a las actividades de ciertas ADN-glicosilasas, una peculiar enzima, conocida como endonucleasa V (EndoV), con la capacidad de iniciar la remoción de uracilo, hipoxantina, xantina, sitios AP, malos apareamientos entre otras lesiones, ha sido caracterizada en diversos organismos desde hace ya algunas décadas (Cao, 2012). La primera de estas enzimas en caracterizarse pertenece a *E. coli* y fue la quinta endonucleasa conocida en tal microorganismo, siendo codificada por el gen *nfi* (Gates y Linn, 1977; Yao y col., 1994; He y col., 2000). Esta enzima, a diferencia de las ADN-glicosilasas, no remueve la base dañada del azúcar deoxi-ribosa, en su lugar cataliza la incisión del segundo enlace fosfodiéster hacia el extremo 3' después de la lesión en una forma dependiente de Mg^{2+} (Yao y Kow, 1996), por lo que se ha señalado que podría formar parte de una vía alterna de reparación denominada reparación por escisión alternativa o AER (Kow, 2002). Un diagrama de las principales diferencias en la reparación de bases desaminadas por los sistemas BER y AER se esquematiza en la Fig. 2.

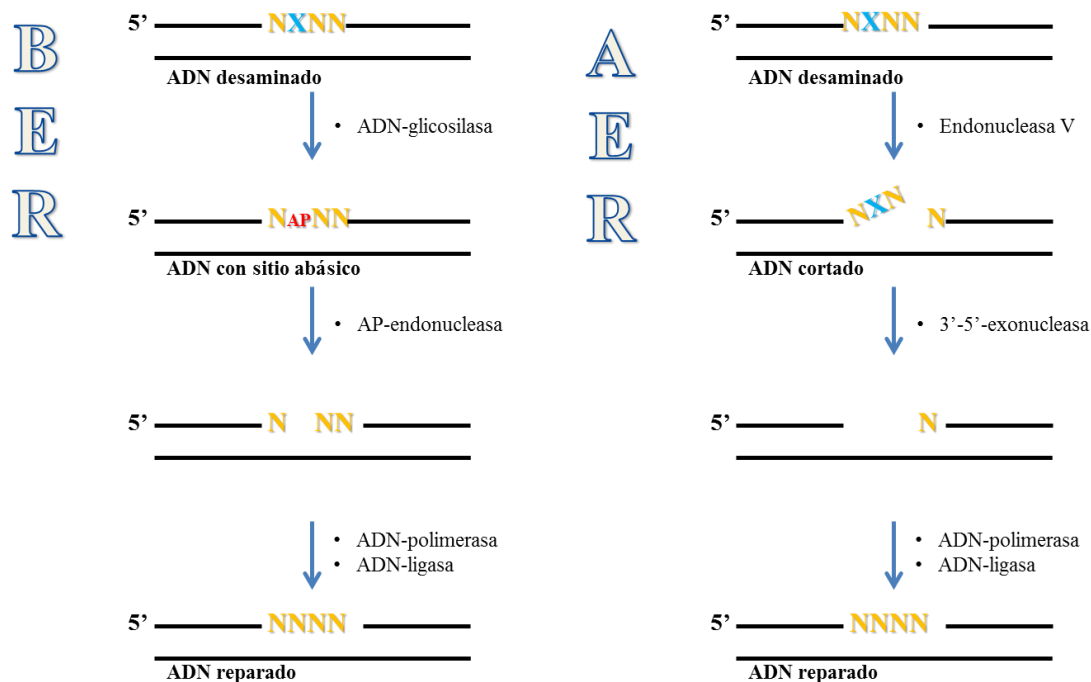


Fig. 2. Comparación de los pasos para el procesamiento de bases desaminadas entre la reparación por escisión de bases (BER) y la reparación por escisión alternativa (AER). (Modificado de Kow, 2002).

1.4 *Bacillus subtilis* como modelo de estudio.

B. subtilis es utilizado como organismo modelo para estudiar el desarrollo y diferenciación celular en procariotes. Es una bacteria Gram positiva y se encuentra principalmente en el suelo, teniendo como característica peculiar la formación de esporas. Esta bacteria es un modelo experimental muy ameno para la manipulación genética y desde hace ya dos décadas se cuenta con la secuencia nucleotídica completa de su genoma (Kunst y col., 1997). Desde hace varios años, la formación de esporas en *B. subtilis* ha servido como modelo de estudio de los mecanismos que controlan el desarrollo, transducción de señales y la expresión de genes (Losick y col., 1986; Grossman, 1995). Los cambios morfológicos que

ocurren durante el proceso de esporulación son el resultado de cambios finamente regulados en la expresión de genes. Diferentes grupos de genes son expresados en cada uno de los compartimentos celulares obedeciendo una cascada de señalización, convirtiendo así a la esporulación en *B. subtilis* en un sistema muy importante para elucidar los mecanismos que controlan la expresión de genes de manera espacio-temporal (Robleto y col., 2012). Se ha propuesto que uno de los principales factores ambientales que dispara la esporulación en *B. subtilis* es la falta de nutrientes en el medio de cultivo o de forma natural en el ambiente; aunque también se ha reportado que el incremento de la densidad celular es capaz de inducir dicho proceso (Losick y col., 1986). Microfotografías de las diferentes etapas del ciclo de vida de *B. subtilis* obtenidas en el laboratorio se muestran en la figura 3.

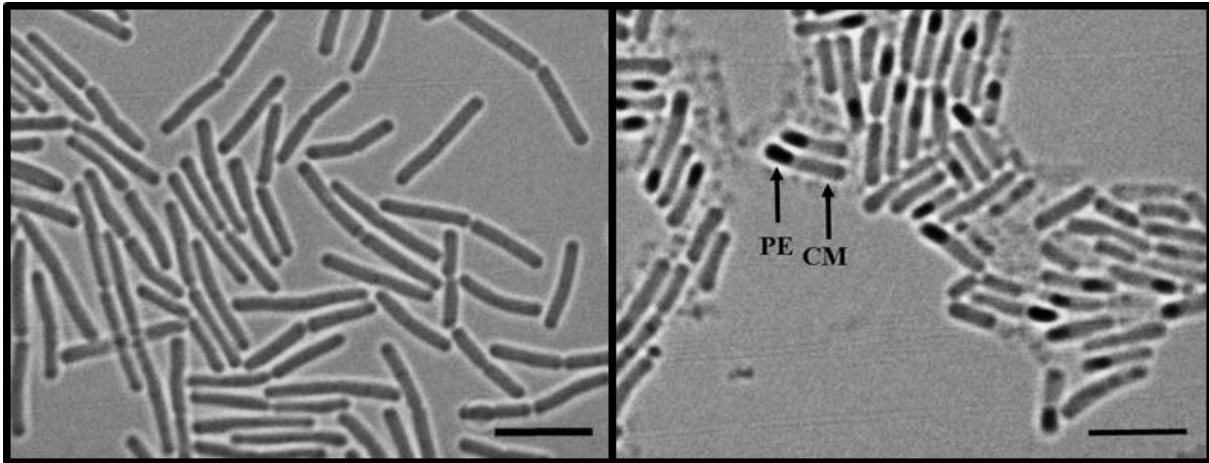


Fig. 3. Microfotografías de diferentes etapas del ciclo de vida de *B. subtilis*. A) **Crecimiento vegetativo.** La cepa de *B. subtilis* 168 se creció en medio rico A3 y se fotografió durante la fase de crecimiento exponencial. B) **Esporulación.** La cepa de *B. subtilis* 168 se indujo a esporular en medio líquido DSM y se fotografió ocho horas después de iniciada la esporulación. Ambas microfotografías se obtuvieron usando un microscopio de contraste de fases. El aumento total es de 1000 veces el tamaño real. PE, pre-espora; CM, célula madre. Barra de escala, 5 μ M.

1.4.1 Etapas de la esporulación en *B. subtilis*.

Una vez iniciada, la esporulación se lleva a cabo en ocho etapas morfológicamente distinguibles que culminan en la formación y liberación de una endospora madura (Fig. 4). Cuando las células entran en el proceso de esporulación, el cromosoma se condensa en un filamento axial; este evento es considerado como el primer estadio de la esporulación (Errington, 1993). La primera manifestación inequívoca de la esporogénesis es la formación de un septo asimétrico, cercano a uno de los polos de la célula en el estadio II de la esporulación (Errington, 1993); este septo divide al esporangio en dos compartimentos de tamaño diferente, conocidos como célula madre y pre-espora, cada uno de los cuales posee un cromosoma completo (Losick y col., 1986; Setlow, 1995). Posteriormente, la pre-espora es envuelta y engullida por la célula madre. Después de una serie de eventos bioquímicos, la pre-espora es cubierta por una gran cantidad de capas externas y, a su vez, la célula madre sufre lisis, trayendo como consecuencia la liberación de la espora madura al medio ambiente (Errington, 1993).

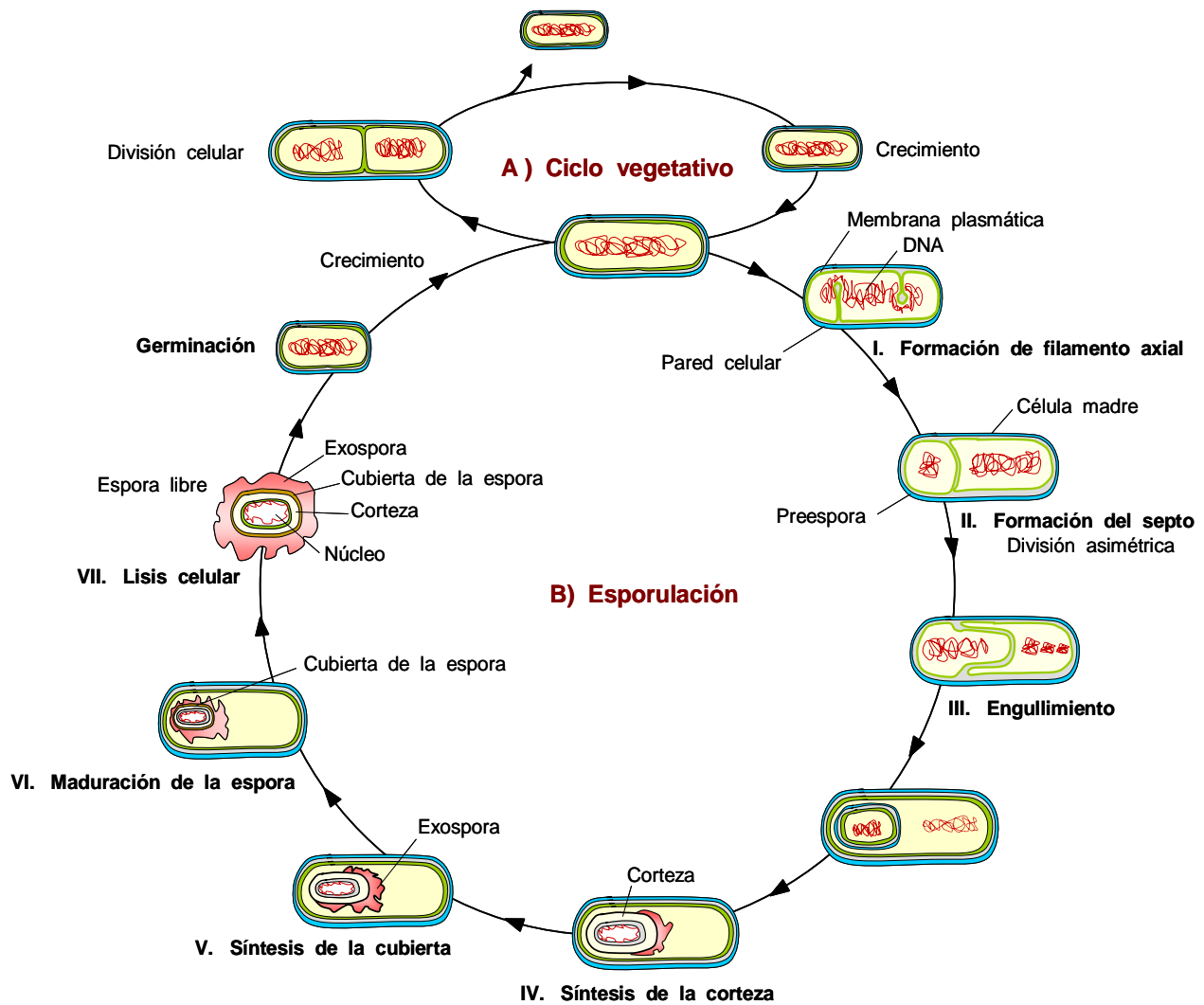


Fig. 4. Representación esquemática del ciclo de vida de *B. subtilis*. A) Ciclo de vida vegetativa. B) Ciclo de esporulación. (Modificado de Errington, 1993).

1.4.2 Regulación de la expresión de genes durante la esporulación de *B. subtilis*

Durante todo el proceso de esporulación tiene lugar una expresión diferencial de genes en los dos compartimentos que conforman el esporangio: la célula madre y la pre-espora. Tales diferencias están dadas por el control espacio-temporal de distintos factores sigma (σ) de la ARN-polimerasa que son específicos para cada compartimento (De Hoon y col. 2010). En células vegetativas no diferenciadas pero que ya contienen dos moléculas del ADN genómico, el factor de transcripción Spo0A y el factor σ^H inician el proceso de esporulación promoviendo la aparición de un septo celular asimétrico que divide a la célula en la célula madre y la pre-espora. La formación del septo asimétrico también resulta en un atrapamiento de una molécula de ADN genómico en la pre-espora. El factor sigma específico σ^F completa la translocación hacia la pre-espora del ADN genómico atrapado en el septo. El factor σ^F también dirige la transcripción de genes que median el engullimiento de la pre-espora por la célula madre. Después del engullimiento, la expresión requerida para la formación de la corteza de la espora es dirigida por σ^E desde la célula madre. σ^E También detona la activación de σ^G durante la maduración de la espora. σ^G Coordina la expresión de genes para la protección y reparación del ADN, así como la expresión tardía en la célula madre mediante la activación de σ^K . σ^K A su vez dirige la formación de las proteínas que forman parte de la cubierta de la espora, la lisis celular y la liberación de la espora madura (Robledo y col., 2012). Una ilustración de los factores sigma mencionados junto con sus compartimentos específicos durante la esporulación se resume en la Fig. 5.

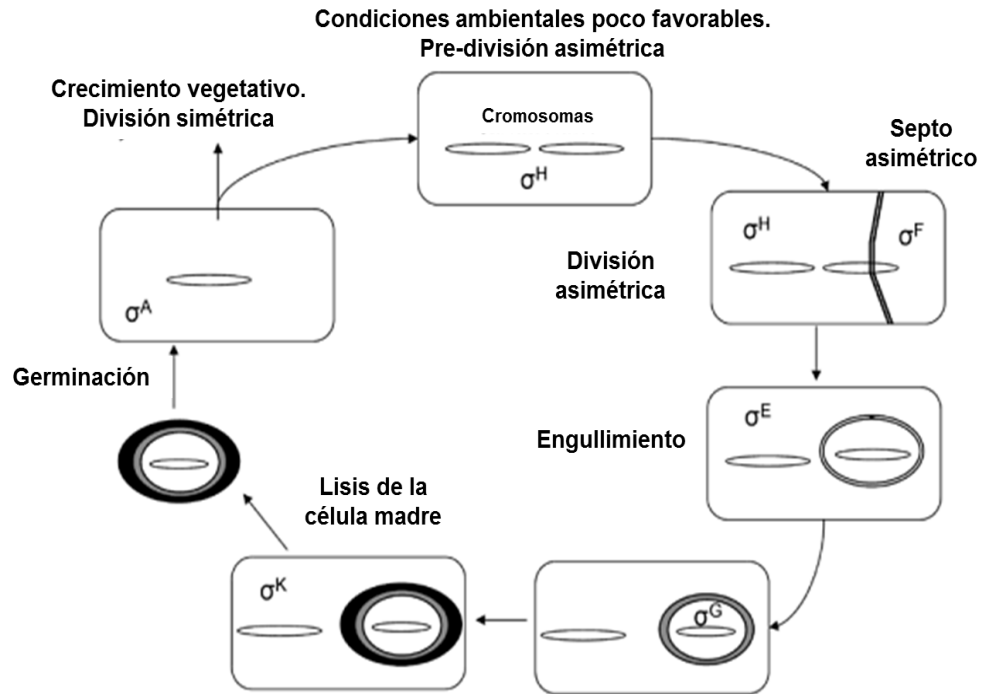


Fig. 5. Vista general del programa de esporulación en *B. subtilis*. La expresión génica es temporal, específica de compartimento y mediada por factores sigma. (Modificado de De Hoon y col., 2010).

II. Antecedentes

En estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo, una cepa de *B. subtilis* deficiente en el gen *ung*, que codifica para la única uracilo ADN-glicosilasa en esta bacteria, incrementó solo alrededor de dos veces la frecuencia de mutación espontánea respecto a la cepa parental silvestre (López-Olmos y col., 2012). Lo anterior fue sorprendente dado que a diferencia de *E. coli*, que contiene más de una de esta familia de enzimas, el que solo exista un gen codificante para Ung en *B. subtilis* sugería que su falta volvería drásticamente mutagénicas a las células ante la imposibilidad para remover uracilo incorporado o producto de desaminación en el ADN, lo cual no ocurrió (López-Olmos y col., 2012). Lo anterior permitió sugerir que otras vías estaban implicadas en la reparación de uracilo en este microorganismo. Haciendo una búsqueda en el genoma de *B. subtilis* se encontró que el producto del gen *ywqL* (EC 3.1.21.7) comparte homología significativa con la enzima endonucleasa V (Nfi) de *E. coli*, siendo 31% idéntica y 51% similar a ésta proteína. La pérdida del gen *ywqL* incrementó de forma significativa la frecuencia de mutación respecto a la mutante nula en *ung*, lo cual fue potenciado cuando las células fueron tratadas con bisulfito de sodio, un agente desaminante de la citosina (López-Olmos y col., 2012). Tanto *ung* como *ywqL* se expresan durante crecimiento vegetativo y esporulación, y los datos obtenidos a partir del análisis de cepas mutantes indican que contribuyen a reducir los efectos mutagénicos resultantes de la desaminación de bases durante todo el ciclo de vida de *B. subtilis* (López-Olmos y col., 2012).

Posteriormente, una enzima recombinante YwqL sintetizada de forma inducible en *E. coli* mostró actividad endonucleasa *in vitro* contra ADN plasmídico que contenía uracilos o sitios abásicos, lo cual no ocurrió cuando un plásmido sin daño fue ofrecido como sustrato,

concordando con el papel endonucleasa V propuesto para esta proteína (Ayala-García, 2012). Además, esporas de *B. subtilis* deficientes en *ung*, *ywqL* o ambos, fueron más sensibles ante la desaminación de bases causada por bisulfito de sodio y/o ácido nitroso respecto a la cepa silvestre (Ayala-García, 2012). Incluso, células carentes de los genes arriba mencionados provenientes de esporas mutagenizadas por agentes desaminantes disminuyeron su capacidad de terminar eficientemente el programa diferenciativo de esporulación, indicando un alto grado de daño en su genoma (Ayala-García, 2012).

Por otro lado, adicional a las actividades de Ung y YwqL para procesar uracilo, se ha descrito en *B. subtilis* una ADN-glicosilasa con la capacidad de procesar *in vitro*, hipoxantina y bases alquiladas, siendo codificada por el gen *yslJ* (EC 3.2.2.20). Ésta enzima fue renombrada a raíz de su caracterización bioquímica como Aag, debido a las características estructurales y de especificidad de sustrato que comparte con la enzima del mismo nombre en humanos; no obstante, fue encontrado que *in vitro*, Aag de *B. subtilis* remueve hipoxantina del ADN diez veces más rápido que su contraparte humana (Aamodt y col., 2004). Sin embargo, a pesar de la importancia que esta enzima representa en el contexto de la remoción de bases desaminadas, su patrón de expresión espacio-temporal no ha sido determinado, lo cual hace difícil relacionar en cual etapa del ciclo de vida de *B. subtilis* podría estar ejerciendo su función.

III. Justificación

La evidencia genética previa generada en nuestro laboratorio, demostró que la reparación de ADN desaminado en *B. subtilis* procede principalmente a través de una vía de reparación por escisión alternativa (AER) iniciada por la endonucleasa V, YwqL. Sin embargo, los aspectos de la relación estructura/función, incluyendo el rango de lesiones reconocido por esta endonucleasa, así como los factores que posteriormente completan ésta vía de reparación son actualmente desconocidos.

Para eliminar hipoxantina, *B. subtilis* utiliza principalmente a YwqL; no obstante, existe evidencia bioquímica que muestra que Aag (YxIJ), una ADN-glicosilasa que opera sobre purinas alquiladas puede también procesar hipoxantina. Los mecanismos moleculares que regulan la expresión espacio-temporal de *aag* en *B. subtilis* aún necesitan ser investigados.

La elucidación de estas preguntas fundamentales nos permitirá entender con mayor precisión la manera en la cual *B. subtilis* previene los efectos citotóxicos y genotóxicos que resultan de la pérdida de grupos amino de su material genético.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo General

Establecer el papel bioquímico y fisiológico de las rutas de reparación de bases desaminadas en *B. subtilis*.

4.2 Objetivos Específicos

- 1) Elucidar el espectro de lesiones que YwqL (Endo V) puede procesar, así como los componentes que completan la vía de reparación iniciada por YwqL.
- 2) Determinar el patrón de expresión espacio-temporal del gen *aag* (*yxkJ*), que codifica para una hipoxantina ADN-glicosilasa.
- 3) Investigar el papel fisiológico de Aag durante el ciclo de vida de *B. subtilis*.
- 4) Establecer el papel de YwqL, Ung y Aag en la resistencia de esporas de *B. subtilis* al estrés promovido por agentes desaminantes.

V. Materiales y Métodos

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas y los plásmidos usados en este estudio se enlistan en la **Tabla 1**. Los procedimientos para la transformación y aislamiento de ADN plasmídico se realizaron como se describió previamente (Boylan y col., 1972; Sambrook y col., 1989). El medio rutinario para el crecimiento de las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* fue LB líquido (Miller, 1972), el cual contiene: NaCl, 5 g/L; peptona biotriptasa, 10g/L; extracto de levadura, 5 g/L. Este medio fue suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico cuando se requirieron placas con medio sólido. Cuando fue necesario, se agregaron al medio: tetraciclina (Tet) 15 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 5 µg/mL, eritromicina (Em) 5 µg/mL, kanamicina (Kn) 10 µg/mL y/o ampicilina (Amp) 100 µg/mL. Para la obtención de esporas de *B. subtilis* se utilizó medio DSM el cual contiene: Bacto® caldo nutritivo, 8 g/L; KCl, 13.41 mM; MgSO₄·H₂O, 1mM; CaCl₂·H₂O, 0.5 mM; MnCl₂·4H₂O, 0.01 mM; FeSO₄, 0.001 mM (Schaeffer y col., 1965), suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico cuando se requirió de forma sólida. Para la realización de los ensayos de frecuencia de mutación durante crecimiento vegetativo, los cultivos de las cepas de *B. subtilis* se crecieron en medio Difco® antibiótico no. 3 (Caldo Penassay) el cual contiene: extracto de carne de res, 1.5 g/L; extracto de levadura, 1.5 g/L; peptona biotriptasa, 5 g/L; dextrosa, 1 g/L; NaCl, 3.5 g/L; K₂HPO₄, 3.68 g/L; KH₂PO₄, 1.32 g/L (Difco Laboratories, Detroit, MI). Los cultivos líquidos se incubaron a 37°C con agitación vigorosa a 250 rpm.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas	Genotipo	Fuente
<i>B. subtilis</i>		
168 (WT)	Tipo silvestre, <i>trpC2</i>	Stock del laboratorio
WN118	<i>sigGΔI</i>	Sun y col., 1989
PS356	Δ <i>sspAB</i>	Mason y col., 1988
PERM383	Δ <i>exoA</i> Tc ^R	Salas-Pacheco y col., 2005.
PERM640	Δ <i>ung::lacZ</i> Em ^R	López-Olmos y col., 2012.
PERM791	Δ <i>ywqL::lacZ</i> Em ^R	López-Olmos y col., 2012.
PERM793	Δ <i>ung::lacZ</i> Δ <i>ywqL::lacZ</i> Em ^R Cm ^R	López-Olmos y col., 2012.
PERM985	Δ <i>uvrA</i> Cm ^R	Ramírez-Guadiana y col., 2013.
PERM1165	Δ <i>polX::lacZ</i> Cm ^R	Barajas-Ornelas y col., 2014.
PERM1212	Δ <i>ywqL::lacZ</i> Δ <i>polX::lacZ</i> Em ^R Cm ^R	Este estudio (pPERM115→ PERM791)
PERM1213	Δ <i>ywqL::lacZ</i> Δ <i>exoA</i> Em ^R Tc ^R	Este estudio (PERM791→ PERM383)
PERM1214	Δ <i>ywqL::lacZ</i> Δ <i>uvrA</i> Em ^R Cm ^R	Este estudio (PERM791→ PERM985)
PERM1224	Δ <i>ung</i> Δ <i>ywqL::lacZ</i> Tc ^R Em ^R	Ambriz-Aviña, 2016.
PERM1246	Δ <i>aag::lacZ</i> Em ^R	Este estudio (pPERM1243→168)
PERM1247	Δ <i>sspAB</i> Δ <i>aag::lacZ</i> Em ^R	Este estudio (pPERM1243→ PS356)
PERM1254	Δ <i>sspAB</i> Δ <i>ung::lacZ</i> Em ^R	Este estudio (PERM640→PS356)
PERM1255	Δ <i>sspAB</i> Δ <i>ywqL::lacZ</i> Em ^R	Este estudio (PERM79→ PS356)
PERM1256	Δ <i>sspAB</i> Δ <i>ung::lacZ</i> Δ <i>ywqL::lacZ</i> Em ^R Cm ^R	Este estudio (PERM793→ PS356)
PERM1286	<i>aag::yfp</i> Cm ^R	Este estudio (pPERM1283→ 168)
PERM1322	<i>sigGΔI</i> Δ <i>aag::lacZ</i> Cm ^R	Este estudio (pPERM1318→ WN118)
PERM1323	Δ <i>ung</i> Δ <i>ywqL::lacZ</i> Δ <i>aag::lacZ</i> Tc ^R Em ^R Cm ^R	Este estudio (pPERM1318→ PERM1224)

PERM1341	Δ sspAB Δ ung Δ ywqL:: <i>lacZ</i> Δ aag:: <i>lacZ</i> Tc ^R Em ^R Cm ^R	Este estudio (PERM1323 → PS356)
PERM1374	<i>sigG</i> Δ I Δ aag:: <i>lacZ</i> Cm ^R [pDG148; P _{spac} - vacío Km ^R]	Este estudio (pDG148 → PERM1322)
PERM1375	<i>sigG</i> Δ I Δ aag:: <i>lacZ</i> Cm ^R [pDG298; pDG148::P _{spac} - <i>sigG</i> Km ^R]	Este estudio (pDG298 → PERM1322)
PERM1388	Δ sspAB Δ ung:: <i>lacZ</i> Δ aag:: <i>lacZ</i> Em ^R Cm ^R	Este estudio (pPERM1318 → PERM1254)
PERM1389	Δ sspAB Δ ywqL:: <i>lacZ</i> Δ aag:: <i>lacZ</i> Em ^R Cm ^R	Este estudio (pPERM1318 → PERM1255)
PERM1456	Δ ypcP:: <i>lacZ</i> Cm ^R	Este estudio (pPERM1453 → 168)
PERM1457	Δ ywqL:: <i>lacZ</i> Em ^R Δ ypcP:: <i>lacZ</i> Cm ^R	Este estudio (pPERM1453 → PERM791)
<i>E. coli</i>		
PERM843	DH5 α conteniendo el vector pQE30	Stock del laboratorio.
PERM1071	XL10-Gold conteniendo el vector pQE30 con el marco de lectura abierto del gen <i>ywqL</i> de <i>B. subtilis</i> . Amp ^R	Ayala-García, 2012.
Plásmidos		
pDG148	Vector auto-replicativo para <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> . Contiene un promotor P _{spac} inducible por IPTG. Km ^R	Stock del laboratorio.
pDG298	pDG148 con una copia del gen <i>sigG</i> bajo el control del promotor P _{spac} . Km ^R	Nicholson <i>et al.</i> 1989
pMUTIN4	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> . Crea una fusión del fragmento clonado con el gen <i>lacZ</i> . Amp ^R Em ^R	BGSC

pMUTIN4-cat	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> . Crea una fusión del fragmento clonado con el gen <i>lacZ</i> . Cm ^R	Barajas-Ornelas y col., 2014.
pSG1187	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> . Crea una fusión del fragmento clonado con la proteína amarilla fluorescente (YFP). Cm ^R	BGSC
pPERM1152	pMUTIN4-cat con un fragmento interno del gen <i>polX</i> . Cm ^R	Barajas-Ornelas y col., 2014.
pPERM1243	pMUTIN4 con un fragmento interno del gen <i>aag</i> . Amp ^R Em ^R	Este estudio.
pPERM1283	pSG1187 conteniendo en fase el marco de lectura abierto del gen <i>aag</i> . Amp ^R Cm ^R	Este estudio.
pPERM1318	pMUTIN4-cat con un fragmento interno del gen <i>aag</i> . Cm ^R	Este estudio.
pPERM1453	pMUTIN4-cat con un fragmento del gen <i>ypcP</i> . Cm ^R	Este estudio.

*A→B, indica que la cepa “B” se transformó con ADN de la Fuente “A”.

BGSC, Bacillus Genetic Stock Center

5.2 Inducción de la síntesis y purificación de la proteína recombinante YwqL.

La cepa de *E. coli* PERM1071, obtenida previamente (Ayala-García, 2012) con la capacidad de sobreproducir a la proteína YwqL de *B. subtilis* con una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino terminal, se creció en 1L de medio LB suplementado con Amp, Tet y Cm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O. _{600nm}) de 0.5. La expresión

de *ywqL* se indujo durante 3 h a 28°C mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Promega; Madison, WI) a una concentración final de 0.25 mM. Las células se colectaron por centrifugación (5000 x g, 10 min, 4°C) y se lavaron dos veces con 50 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y 0.03% de Tween® 20 (regulador de lisis) y se resuspendieron finalmente en 50 ml del mismo regulador. Para liberar su contenido, la suspensión celular se suplementó con 0.2 mg/L de lisozima y se sonicó aplicando 15 pulsos de 30 s a una amplitud de 90% usando un sonicador Vibra-Cells® VCX 130PB (Sonics. Newtown, CT). El homogenado se centrifugó 10 min a 5000 x g a una temperatura de 4 °C para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se cargó en una columna empacada con 5 ml de ácido Ni-nitrilotriacético (NTA) acoplado a esferas de agarosa (QIAGEN Inc; Valencia, CA), la cual previamente se equilibró con regulador de lisis. La columna se lavó con 750 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 20 mM y 0.03% de Tween® 20 (regulador de lavado). La proteína unida a la resina se eluyó con 5 mL Tris-HCl 50 mM (pH 7.5) conteniendo NaCl 300 mM, imidazol 300 mM, DTT 5mM y 0.03% de Tween® 20 (regulador de elución), recolectando fracciones de 0.5 mL en este último paso. Alícuotas (30 µl) del homogenado celular y del sobrenadante, así como de las fracciones unidas a la columna se analizaron en geles de poliacrilamida–SDS al 12% (SDS-PAGE) para evaluar la inducción, así como la pureza de la proteína obtenida como se describió previamente (Laemmli, 1970).

5.3 Ensayos de actividad de YwqL.

La capacidad de YwqL para iniciar la remoción de lesiones en el ADN se probó como se describe líneas abajo. Alícuotas conteniendo 1×10^{-7} M de una sonda de ADN de cadena sencilla de 19 pb (5'-GCACCGACXGAGGCGACG) conteniendo ya sea uracilo,

hipoxantina, xantina o un sitio abásico (AP) en la posición 10 indicada por X subrayada, se marcó en el extremo 5' de la cadena con γ -ATP [^{32}P] en una reacción de 50 μL que incluía 1 μL (10 unidades) de la enzima PNK (New England Bio-Labs, Ipswich, MA), 5 μL de regulador 10X PNK (A), 0.5 μL de γ -ATP [^{32}P] (250 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) y agua, incubada a 37°C durante 30 minutos. La marca radiactiva no incorporada se retiró utilizando el kit comercial QIAquick® nucleotide removal (QIAGEN Inc; Valencia, CA) resuspendiendo finalmente el oligonucleótido marcado en 50 μL de agua libre de nucleasas. Alícuotas conteniendo 5 μL de la sonda de cadena sencilla marcada radiactivamente fue hibridada con su cadena complementaria (5'CGTCGCCTCYGTCCGGTGC; donde Y subrayada se sustituyó por A (adenina) como base complementaria a uracilo y sitio AP, por T (timina) como base complementaria a hipoxantina y por C (citosina) como base complementaria a xantina a una concentración final de 1×10^{-8} M en un volumen de hibridación de 50 μL conteniendo Tris-HCl (pH 7.5) 5mM suplementado con MgCl_2 0.5mM (regulador de alineamiento). La mezcla se calentó durante 5 min a 95°C y se enfrió lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Alícuotas conteniendo 1×10^{-9} M del ADN de doble cadena con la lesión se usaron como sustrato para la proteína YwqL purificada y ajustada a una concentración final de 100 nM. A la mezcla de reacción se adicionaron a una concentración final BSA 1X, DTT 1mM y Tris-HCl (pH 7.5) 5mM. Como cofactor para la actividad enzimática, la reacción se suplementó ya sea con MgCl_2 , MnCl_2 , o EDTA, todos a una concentración final de 5mM. Como control positivo de corte, alícuotas con 1×10^{-9} M del ADN de doble cadena conteniendo uracilo se procesó con 10 unidades de uracilo ADN-glicosilasa (Ung) de *E. coli* obtenida de forma comercial (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) con el fin de retirar el uracilo, seguido del tratamiento con 10 unidades de la endonucleasa IV (AP-endonucleasa) de *E. coli* obtenida comercialmente (New England Biolabs, Ipswich, MA); dicho control generó un producto de

corte de 10 bases (Salas-Pacheco y col., 2003), con el cual fue posible comparar los productos de corte generados al tratamiento con YwqL. Las reacciones se incubaron a 37°C y se tomaron muestras de 10 µL a diferentes tiempos las cuales se diluyeron 1:1 (v/v) con regulador de paro que contenía formamida 95%, EDTA 20mM y azul de bromofenol 0.03%. Alícuotas (5 µL) fueron separadas mediante electroforesis desnaturizante utilizando un gel de urea 8M y poliacrilamida al 16% en una cámara de secuenciación. Después de la electroforesis el gel se expuso durante al menos 12 h a una pantalla Kodak Storage Phosphor Screen GP y se reveló la imagen en un escáner Bio-Rad Personal Molecular Imager. El análisis densitométrico de los productos de reacción se realizó utilizando el software ImageJ 1.47n (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

5.4 Determinación de la frecuencia de mutación espontánea o inducida mediante el agente desaminante bisulfito de sodio.

La frecuencia de mutación espontánea de las cepas de *B. subtilis* 168 (tipo silvestre), PERM791 ($\Delta ywqL$), PERM1165 ($\Delta polX$), PERM383 ($\Delta exoA$), PERM985 ($\Delta uvrA$), PERM1456 ($\Delta ypcP$), PERM1212 ($\Delta ywqL \Delta polX$), PERM1213 ($\Delta ywqL \Delta exoA$), PERM1214 ($\Delta ywqL \Delta uvrA$) y PERM1457 ($\Delta ywqL \Delta ypcP$), se determinó como se describió previamente por López-Olmos y col., en el 2012. Esencialmente las cepas se crecieron durante 24h a 37°C en medio líquido A3 suplementado con los antibióticos correspondientes. Para calcular la frecuencia de mutación inducida por desaminación, las cepas se crecieron en medio líquido A3 hasta una D.O._{600nm} de 0.5, a partir de aquí el cultivo celular se dividió en dos, dejando una parte como control no inducido y suplementando la segunda parte con bisulfito de sodio a una concentración final de 0.25mM (partiendo de una solución de concentración 1M). Ambos cultivos se crecieron a 37°C durante 12 horas. Después de la incubación las células

se lavaron con PBS 1X estéril (NaCl, 8 g/L; KCl, 0.2 g/L; Na₂HPO₄, 1.44 g/L; KH₂PO₄, 0.24 g/L) y se resuspendieron en 1 mL del mismo regulador. Alícuotas de 100 µL de la suspensión celular se sembraron sobre seis placas de medio LB suplementadas con 10 µg/mL de rifampicina. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h, y se contaron las colonias resistentes a rifampicina. El número total de células en el cultivo bacteriano, utilizado para calcular la frecuencia de mutación a rifampicina, se determinó mediante dilución seriada y cuenta viable en placas de LB. Las colonias se contaron a las 24 h después de la incubación. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con tres réplicas cada uno.

5.5 Ensayos de β-galactosidasa.

Las cepas de *B. subtilis* conteniendo fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* se crecieron ya sea en medio líquido A3 (para promover crecimiento vegetativo) o en medio líquido DSM (para promover esporulación) a 37°C. Alícuotas de 1 mL de células se cosecharon por centrifugación (17 900 x g, 1 min) durante crecimiento vegetativo y durante esporulación. Las pastillas celulares se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20°C hasta la determinación de la actividad de β-galactosidasa. Para tal fin, cada pastilla celular se resuspendió en 640 µL de regulador Z (Na₂HPO₄•7H₂O, 60mM; NaH₂PO₄•H₂O, 40mM; NaCl, 10mM; MgSO₄•7H₂O, 40mM; 2-mercaptoetanol, 50mM; pH 7). Posteriormente, las células se rompieron con 160 µL de lisozima (2.5 mg/mL) disuelta en regulador Z y se incubaron por 1h a 37°C. Después de la incubación se adicionaron 10µL de Tritón X-100 al 10% (v/v). Enseguida, se adicionaron 160 µL de una solución de orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosido (ONPG, 4mg/mL) incubando la reacción a 30°C hasta observar el desarrollo de una coloración amarilla. La reacción se detuvo adicionando 400 µL de Na₂CO₃ 1M, y se determinó el orto-nitro-fenolato a una longitud de onda de 420nm. La actividad

endógena de la cepa parental se restó a todas las muestras analizadas. La fracción celular resistente a lisozima proveniente de las etapas de esporulación T₄-T₈ (considerando a T₀ el tiempo en el cual la curva de crecimiento y la de la fase estacionaria se interceptan) fue sujeta a remoción de cubiertas de las esporas (Nicholson y Setlow, 1990). Después de esto se lavaron 5 veces con regulador TS (Tris-HCl 25mM (pH 7.5), NaCl 0.1M) y se trataron nuevamente con lisozima para determinar los niveles de β-galactosidasa ahora correspondiente a la fracción de pre-esporas que perdieron las cubiertas. La actividad enzimática se expresó en unidades de Miller, para lo cual cada unidad se define como 1 unidad de enzima que hidroliza 1 μmol de sustrato por minuto por unidad de absorbencia celular inicial a 600 nm. (Miller, 1972).

5.6 Análisis de microscopía de fluorescencia.

B. subtilis conteniendo la fusión *aag::yfp* se propagó en medio líquido DSM para inducir la esporulación. El colorante FM4-64 (5 μg/mL) se añadió a las células en esporulación desde la etapa T₁ con el fin de teñir las membranas de los esporangios. En los tiempos indicados, muestras de 0.5 mL del cultivo se cosecharon, centrifugaron (17 900 x g, 1 min) y resuspendieron en 50 μL de medio fresco DSM. Alícuotas de 5 μL de la suspensión celular concentrada se inmovilizaron sobre agarosa (20 mg/mL) puesta sobre un portaobjetos y sellada con un cubreobjetos previo al análisis microscópico. La microscopía de fluorescencia se realizó con un microscopio ZEISS AxioScope A1 equipado con una cámara AxioCam ICc1. Las imágenes adquiridas se ajustaron solo para brillo y contraste con el software AxioVision V4.8.2. Los tiempos de exposición fueron típicamente de 2s para Aag-YFP y de 0.5s para FM4-64.

5.7 Experimentos de *Primer extension*

El extremo 5' del ARN mensajero del gen *aag* de *B. subtilis* se determinó mediante experimentos de *primer extension* con el fin de identificar el sitio de inicio de la transcripción de *aag*. Para tal fin, se colectaron muestras en la etapa T₆ de un cultivo de la cepa de *B. subtilis* 168 (WT) en esporulación y durante la fase exponencial de un cultivo de la cepa PERM1375, ésta última suplementada con IPTG a una concentración final de 1mM para inducir la expresión del gen *sigG* y colectando las muestras celulares 3 horas después de la adición del inductor. El ARN total se aisló como previamente se reportó por Mason y col., en 1988. Esencialmente 40 mL de cada cultivo recolectados en las etapas antes mencionadas se centrifugaron a 14 160 x g por 2 min a 4°C, desechando rápidamente el sobrenadante, congelando las pastillas con nitrógeno líquido y liofilizándolas por 24 h. Las células liofilizadas se colocaron en tubos de microcentrífuga, añadiendo un agitador magnético y 100 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro para romper con agitación durante un periodo de 1 a 2 min. Posteriormente, el homogenado se resuspendió en 1.05 mL de GMGUTCN (sal de sodio de N-laurilsarcocina, 20 mM; citrato de sodio, 25mM; antiespumante A, 0.3%; β-mercaptoetanol, 50 mM; tiocianato de guanidina, 6M; pH 7), se calentó por 1 min a 42°C y se mezcló en un agitador vórtex hasta disolver. Además, se añadieron 0.45 mL de GMGUT (sal de sodio de N-laurilsarcocina, 20 mM; citrato de sodio, 25mM; antiespumante A, 0.3%; β-mercaptoetanol, 50 mM; pH 7) y se centrifugó por 3 min a 19 817 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un tubo de rotor TL-100 libre de ARNasas conteniendo 0.6 mL de CsCl (CsCl, 5.7M; EDTA, 100mM) y se centrifugó durante 3 h a 62 242 x g a temperatura ambiente. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se colocó el tubo de forma invertida por 10 min. La pastilla se resuspendió

en 400 μL de ETS (EDTA, 1mM; Tris, 10mM; SDS, 0.2%; pH 7) pasando la solución periódicamente por una punta de micropipeta para resuspenderlo. Se hizo una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) y se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga. El ARN se precipitó durante toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 40 μL de acetato de sodio 3M estéril y 1 mL de etanol absoluto. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 μL de agua estéril libre de nucleasas. La concentración del ARN fue calculada determinando la absorbencia a 260 nm en un espectrofotómetro, considerando que 1 unidad de absorbencia es igual a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN.

Cuarenta μg del ARN total de cada muestra se hibridó con un oligonucleótido de 20 bases (5'-TAGCCTGACGCTGTGCCTTC-3') complementario al ARNm del gen *aag* en las posiciones +103 a +122 relativo al marco de lectura abierto de dicho gen. El oligonucleótido fue marcado radiactivamente en su extremo 5' de la misma forma en que se describió en la sección 5.3. La extensión del oligonucleótido fue iniciada con 40 unidades de transcriptasa reversa M-MLV ARNasa H⁻ (Promega, Madison, WI). La posición de los productos de extensión se determinó al compararlos con una reacción de secuenciación generada con el mismo oligonucleótido marcado de 20 bases y un producto de PCR de 1kb que comprende desde la posición -412 hasta la posición +588 relativo al marco de lectura abierto del gen *aag*, usando el kit Thermo Sequenase Dye Primer Manual Cycle Sequencing (Affymetrix-USB, Cleveland, OH). Los productos de extensión y la escalera de secuenciación fueron separados mediante electroforesis desnaturalizante en un gel de secuenciación conteniendo 8 M urea y 6% de poliacrilamida. Los resultados fueron visualizados como se describió en la sección 5.3.

5.8 Determinación de la sensibilidad de células esporulantes de *B. subtilis* al tratamiento con ácido nitroso y metil metano sulfonato.

La sensibilidad de células esporulantes a ácido nitroso (HNO_2) o metil metano sulfonato (MMS) se determinó mediante curvas dosis-respuesta para las cepas WT (168), PERM791 ($\Delta ywqL$), PERM1246 (Δaag) y PERM1385 ($\Delta ywqL \Delta aag$). Para lo anterior, células de cada cepa se indujeron a esporular en medio DSM líquido, se colectaron por centrifugación ($5\ 000 \times g$, 10 min) 4.5 h después del inicio de la esporulación ($T_{4.5}$), se lavaron dos veces con PBS 1X y finalmente se ajustaron a una $D.O_{600nm}$ de 1.0. Alícuotas de 2 mL de la suspensión celular se trataron con diferentes concentraciones de ácido nitroso (0, 2.5, 5 o 7.5 mM) preparado como se describió previamente (Tennen y col., 2010) o metil metano sulfonato (0, 30, 60 o 90 mM) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X y la viabilidad celular se determinó por realizar diluciones seriadas, de las cuales se sembraron alícuotas sobre placas de medio LB, se incubaron durante 12 h a 37°C y se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC).

Después de obtener las curvas dosis respuesta, alícuotas de 2 mL de células de las cepas descritas en esta sección en la etapa $T_{4.5}$ de esporulación, lavadas y ajustadas a una $D.O_{600nm}$ de 1.0 se trataron durante 1 h, a temperatura ambiente y en agitación con la dosis letal 50 (DL_{50}) de ácido nitroso o metil metano sulfonato calculada para la cepa 168 (WT) (Tabla 2). Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS 1X, se hicieron diluciones seriadas y alícuotas de 10 μL de cada dilución se sembraron en placas de medio LB, se incubaron durante 12 h a 37°C y finalmente las placas se fotografiaron en un fotodocumentador Gel-Doc EZ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

5.9 Obtención y preparación de esporas de *B. subtilis*.

Esporas de las cepas *B. subtilis* PERM409 ($\Delta sspAB$), PERM1247 ($\Delta sspAB \Delta yxlJ$), PERM1254 ($\Delta sspAB \Delta ung$), PERM1255 ($\Delta sspAB \Delta ywqL$), PERM1256 ($\Delta sspAB \Delta ung \Delta ywqL$), PERM1388 ($\Delta sspAB \Delta ung \Delta yxlJ$), PERM1389 ($\Delta sspAB \Delta ywqL \Delta yxlJ$) y PERM1341 ($\Delta sspAB \Delta ung \Delta ywqL \Delta yxlJ$) se prepararon en placas de medio NSM sin antibióticos, incubadas durante al menos 7 días a 37°C, cosechadas, lavadas diariamente durante 10 días y almacenadas en agua como se describió previamente (Nicholson y Setlow en 1990) hasta alcanzar mínimamente un nivel de esporas del 95% respecto a células vegetativas, esto último siendo cotejado al microscopio de contraste de fases en distintos campos.

5.10 Análisis de la resistencia de esporas de *B. subtilis* al agente desaminante ácido nitroso.

Alícuotas conteniendo 1×10^8 esporas/ml se resuspendieron en distintas concentraciones (0, 25, 50, 75 y 100 mM) de ácido nitroso el cual se preparó como se describió previamente (Tennen y col., 2000) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después del tratamiento, las esporas se lavaron 3 veces con PBS 1X y se resuspendieron finalmente en 1 mL de agua estéril. Para el análisis de la sobrevivencia de esporas a los diferentes tratamientos, se realizaron diluciones seriadas de las esporas tratadas usando PBS 1X y se sembraron en placas de medio LB. Las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C y se calculó el porcentaje de sobrevivencia con respecto al cultivo de cada cepa que no fue tratada con el agente desaminante.

5.11 Determinación de la frecuencia de mutación inducida por ácido nitroso y metil metano sulfonato en células esporulantes de *B. subtilis*.

Veinte mL de un cultivo de células para cada una de las cepas descritas en la sección 5.8 en la etapa T_{4.5} de esporulación se colectaron por centrifugación (5000 x g, 10 min), se lavó la pastilla celular con PBS1X y finalmente se resuspendió en 10 mL de PBS 1X. Cada suspensión celular se dividió en dos partes, suplementando una con la dosis letal 50 (LD₅₀) de ácido nitroso o metil metano sulfonato calculada para cada cepa como se describió en la sección 5.8 (Tabla 2) y dejando la segunda parte de la suspensión de células como control sin tratamiento. El volumen final se ajustó a 10 mL con PBS 1X para ambas partes y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Después de la incubación las células se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en 1 mL del mismo regulador. Alícuotas de 100 µL de cada suspensión celular se sembraron sobre seis placas de medio LB suplementadas con 10 µg/mL de rifampicina. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h, y se contaron las colonias resistentes a rifampicina. El número total de células en el cultivo bacteriano, utilizado para calcular la frecuencia de mutación a rifampicina, se determinó mediante diluciones seriadas y cuenta viable en placas de LB. Las colonias se contaron a las 24 h después de la incubación. Estos experimentos se realizaron al menos tres veces con tres réplicas cada uno.

5.12 Análisis estadísticos.

Diferencias entre las tasas de procesamiento de YwqL para las diferentes lesiones probadas y entre las dosis letales obtenidas al tratar las células con ácido nitroso y MMS se calcularon mediante análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) seguido de una prueba

de Tukey con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Diferencias entre la tasa de mutagénesis obtenida para cada cepa tratada con bisulfito de sodio, ácido nitroso y/o MMS se calcularon mediante una prueba U de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Todas las pruebas se realizaron utilizando una licencia del software Minitab 17.

VI. Resultados

6.1 Purificación de la proteína recombinante YwqL.

Previamente se sugirió que la proteína YwqL de *B. subtilis*, la cual tiene similitud con la enzima Nfi de *E. coli* siendo 31% idéntica y 51% similar a esta enzima, posee propiedades de endonucleasa V, ya que fue capaz de procesar *in vitro* ADN plasmídico conteniendo uracilos y sitios AP (Ayala-García, 2012). A pesar de la evidencia bioquímica anterior, datos genéticos reportados por nuestro grupo de trabajo sugieren que YwqL podría ser capaz de iniciar la reparación de otras lesiones en el ADN (López-Olmos, 2012). Con el fin de evaluar la capacidad de YwqL para procesar distintas lesiones en el ADN, como bases desaminadas y sitios AP, se implementaron ensayos de reparación *in vitro* con la proteína purificada con el fin de esclarecer tal incógnita. La obtención y caracterización de la cepa de *E. coli* PERM1071 fue precedente a este estudio, la cual produce de forma heteróloga a la proteína recombinante His₆-YwqL de *B. subtilis* y cuyas condiciones para la elución de tal proteína en forma soluble fueron también establecidas (Ayala-García, 2012). Un extracto libre de células de esta cepa obtenido como se describió en *Materiales y Métodos* se pasó por una columna de níquel-agarosa, retirando las proteínas unidas de forma inespecífica con distintos lavados y eluyendo a la proteína de interés con una alta concentración de imidazol. Los diferentes extractos obtenidos se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12%. El resultado de la Fig. 6 permite mostrar en distintas fracciones (carriles 6-13), la obtención de una proteína con un alto grado de pureza y con la masa molecular de ~32 kDa, predicha para la proteína YwqL. Los ensayos subsecuentes en donde se empleó a esta proteína se realizaron con las fracciones obtenidas en las eluciones 11, 12 y 13 de esta purificación.

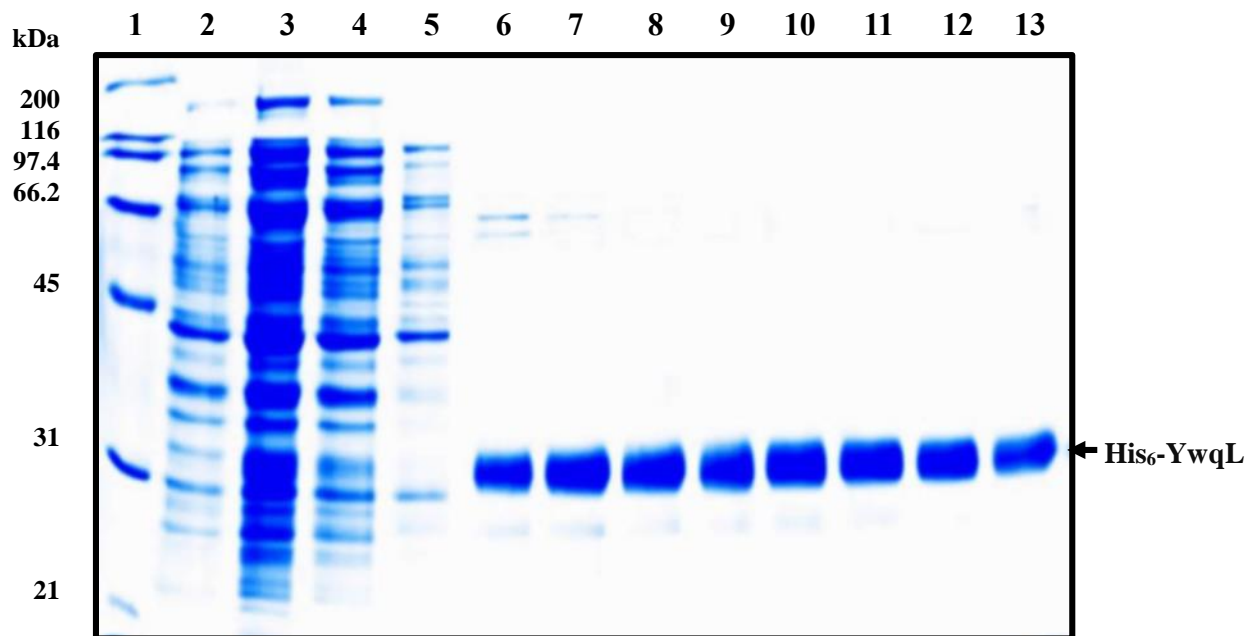


Fig. 6. Análisis por SDS-PAGE de la purificación de la proteína His₆-YwqL por cromatografía de afinidad metálica en una columna de níquel-agarosa. Los extractos libres de células de un cultivo inducido con IPTG de la cepa *E. coli* PERM1071 se purificaron en una columna de Ni-agarosa. Carril 1, marcadores de amplio rango de peso molecular de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA); carril 2, extracto celular no inducido; carril 3, extracto celular inducido; carril 4, proteínas no unidas a la columna; carril 5, proteínas unidas inespecíficamente eluidas en el lavado; carriles 6 al 13, His₆-YwqL purificada eluida con 300 mM de imidazol.

6.2 YwqL de *B. subtilis* es capaz de procesar bases desaminadas y sitios AP.

Los experimentos para determinar la capacidad de YwqL en procesar distintas lesiones se llevaron a cabo incubando independientemente a la proteína purificada a una concentración final de 100 nM con cuatro sondas de ADN marcado radiactivamente conteniendo uracilo, hipoxantina, xantina o un sitio abásico a una concentración final de $1 \times 10^{-9} \text{M}$. Para este caso, la reacción se suplementó con MgCl_2 como cofactor metálico de la enzima. Los resultados en la Fig. 7 muestran que YwqL tiene la capacidad de procesar todos los sustratos probados, y además lo hace de la forma propuesta para enzimas del tipo Endo V, es decir, hidrolizando el segundo enlace fosfodiéster ubicado en el extremo 3' después de la lesión. Lo anterior se dedujo al comparar el producto de corte principal de YwqL con el producto generado en el control positivo (Ung + Endo IV), siendo el primero mayor en aproximadamente una base (11 nucleótidos). Sin embargo, se observaron marcadas diferencias en los cortes realizados por ésta endonucleasa, pues dependiendo de la lesión, se observaron otros productos de corte secundarios. Cuando la sonda de ADN con hipoxantina y xantina fue procesada por YwqL, se observó un producto adicional al mayoritario de 9 nucleótidos (Fig. 7). Para investigar las cinéticas de degradación de la endonucleasa YwqL sobre el ADN con las diferentes lesiones probadas, se realizó un análisis de los productos generados por la enzima respecto al tiempo de incubación. Para ello, se cuantificó por densitometría la desaparición de los sustratos radiactivos empleados respecto al tiempo. El resultado del estudio densitométrico mostró que existen diferencias en el procesamiento de cada lesión por parte de YwqL (Fig. 8A). Un análisis estadístico realizado a partir de los datos de la fracción de procesamiento al tiempo final de la incubación (45 min) colectados de tres diferentes experimentos reveló que uracilo, hipoxantina y el sitio AP son procesados con la misma eficiencia (más del 80%), sin embargo, se encontraron diferencias importantes

en el procesamiento de xantina, ya que, para el mismo tiempo de incubación, la sonda de ADN conteniendo esta lesión apenas fue procesada en un 30% (Fig. 8B). Para descartar la participación de enzimas endógenas de *E. coli* que pudieran co-purificar con la enzima recombinante YwqL, un control adicional se realizó haciendo pasar un extracto libre de células de la cepa *E. coli* PERM843 (transformada con el vector vacío pQE30) por una columna de níquel-agarosa, lavando y eluyendo con las mismas condiciones de purificación para la enzima His₆-YwqL. 5 µL de la elución número 11 se incubaron durante 15, 30 o 45 min con la sonda de ADN conteniendo las lesiones arriba descritas en una concentración final de 1×10^{-9} M. Como se muestra en la figura anexo 1, ningún corte fue promovido utilizando esta estrategia, por lo que los productos de corte observados en la figura 7 son debido al procesamiento realizado por la proteína recombinante YwqL y no a algún contaminante del huésped heterólogo.

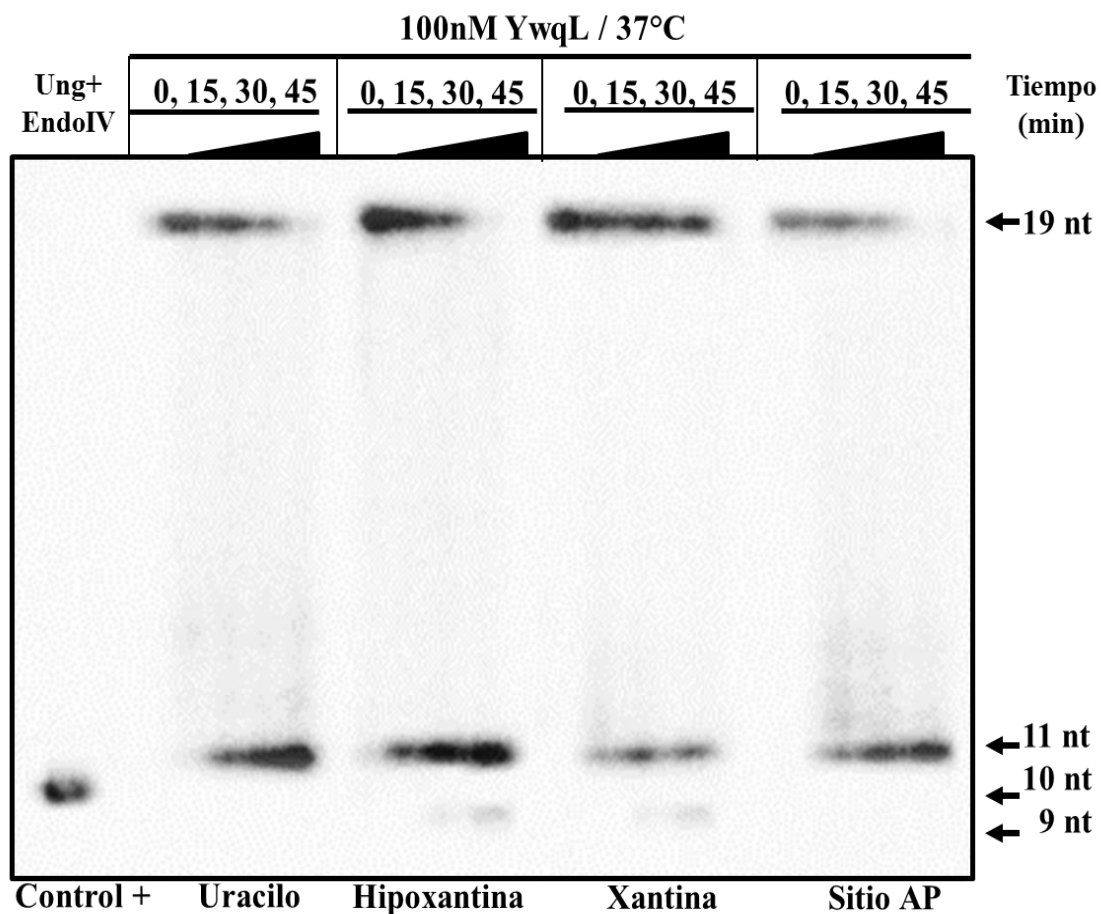


Fig. 7. Actividad endonucleolítica de la enzima YwqL de *B. subtilis*. Se realizaron reacciones para promover el corte de ADN conteniendo las lesiones uracilo, hipoxantina, xantina o sitio AP usando a la proteína YwqL (100 nM) y 1×10^{-9} M de sustrato marcado radiactivamente incubadas a los tiempos de 15, 30 y 45 minutos. Un control positivo de corte fue implementado al tratar la sonda de ADN conteniendo uracilo con Ung seguido del tratamiento con Endo IV. Los productos de las reacciones se separaron mediante electroforesis desnaturizante y la actividad enzimática fue revelada tras la exposición de las muestras radiactivas en una pantalla de autoradiografía. El experimento es representativo de al menos tres pruebas realizadas.

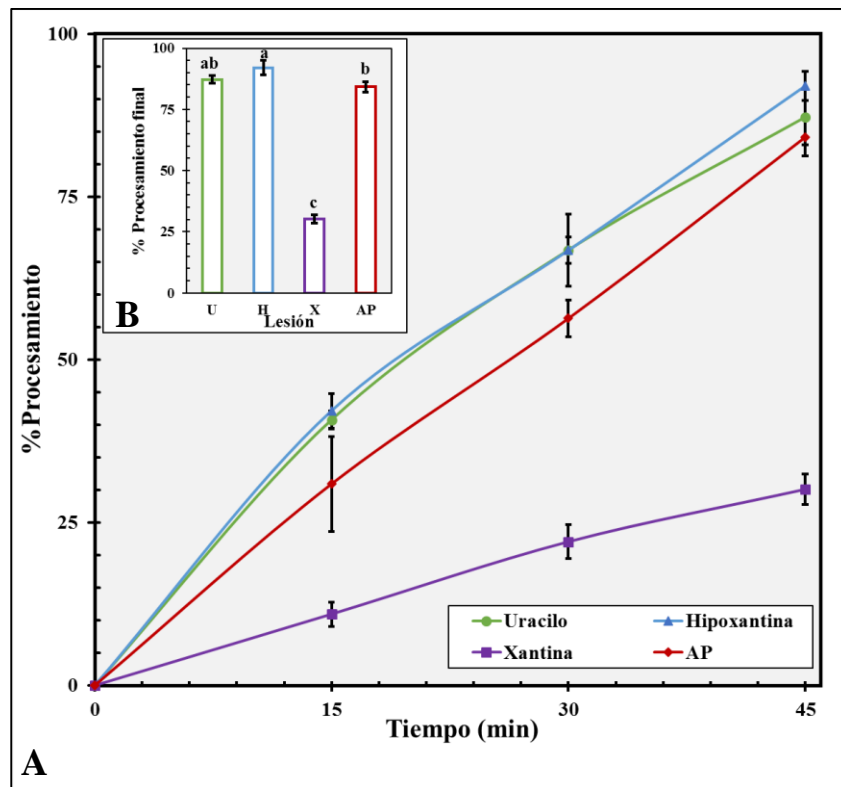


Fig. 8. Análisis densitométrico de la actividad de corte por la enzima YwqL respecto al tiempo sobre distintas lesiones en el ADN. A) La disminución de la cantidad de sustrato respecto al paso del tiempo se estimó mediante análisis densitométrico de las bandas de 19 nt ilustradas en la Fig. 7, utilizando el software Image J. B) Análisis estadístico de los productos de corte generados por YwqL para cada lesión probada en A) al final de la incubación (45 min). Cada barra representa la media de los datos colectados de tres experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar. Las letras sobre las barras indican valores con diferencias estadísticamente significativas entre las distintas lesiones probadas como se determinó por un análisis de varianza de un solo factor seguido de una prueba de Tukey. ($P < 0.05$). U, uracilo; H, hipoxantina; X, xantina; AP, sitio abásico.

6.3 El Mg^{2+} es el mejor cofactor metálico para la actividad endonucleasa de YwqL.

Ya que enzimas del tipo endonucleasa V como YwqL requieren iones metálicos divalentes para su actividad (Cao, 2012), se examinó el corte de las lesiones antes mencionadas usando los iones metálicos Mg^{2+} y Mn^{2+} (Fig. 9). En la ausencia de iones metálicos, YwqL parece no cortar en el sitio específico que fue propuesto en la sección anterior, es decir hacia el segundo enlace fosfodiéster 3' después de las lesiones probadas, en su lugar se pueden observar posibles cortes inespecíficos (Fig. 9, EDTA). YwqL es más específica para cortar todas las lesiones cuando se utilizó Mg^{2+} como cofactor, ya que al tiempo de reacción probado para este experimento (2 h), la enzima fue capaz de procesar todo el sustrato, generando los productos de corte que corresponden al modo de operación descrito para esta enzima (Fig. 9, Mg^{2+}). Cuando se usó Mn^{2+} como cofactor, se detectó actividad endonucleasa V, aunque en menor grado de especificidad, para uracilo, hipoxantina y el sitio AP, y en menor medida para xantina (Fig. 9, Mn^{2+}). Estos resultados sugieren que la actividad endonucleasa V de YwqL requiere de Mg^{2+} para ser estrictamente específica.

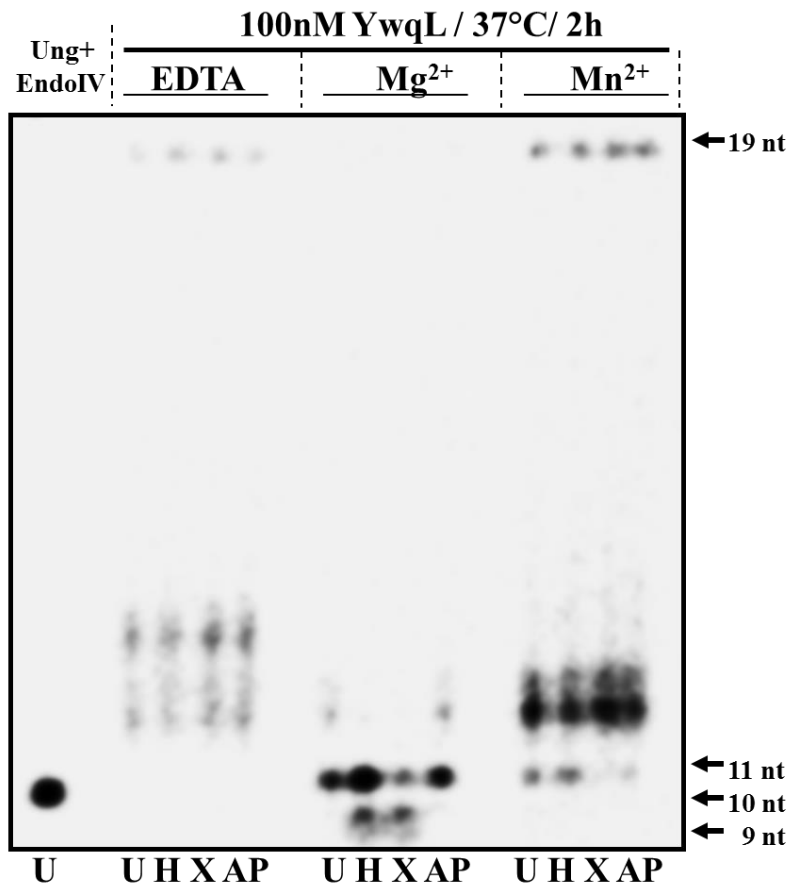


Fig. 9. Efecto de iones metálicos divalentes sobre la actividad endonucleasa de YwqL. Las reacciones de corte fueron realizadas utilizando a la proteína YwqL a una concentración final de 100 nM, 1×10^{-9} M del ADN sustrato y ya sea $MgCl_2$, $MnCl_2$ o EDTA a una concentración final de 5mM.

6.4 Posibles enzimas involucradas en completar la reparación por escisión alternativa (AER) iniciada por YwqL.

Datos experimentales genéticos y bioquímicos han sugerido que la reparación iniciada por enzimas del tipo endonucleasa V es terminada de manera fiel y eficiente (He y col., 2000; López-Olmos y col., 2012), no obstante, a la fecha no se conocen con exactitud las enzimas que secuencialmente completan la reparación. En la bacteria hipertermófila *Thermotoga marítima* se ha sugerido que la propia endonucleasa V podría generar un segundo corte hacia el lado 5' después de la lesión, lo cual podría permitir que la reparación terminara tan sólo con la acción de una ADN-polimerasa I y una ADN-ligasa (Mi y col., 2011). Para *E. coli* se ha sugerido que una actividad 3'→5' exonucleasa como la realizada por Xth (exonucleasa III) podría remover algunos nucleótidos incluido el que presenta el daño, lo cual permitiría la subsecuente acción de una ADN-polimerasa, terminando la reparación por la ADN-ligasa (Friedberg y col., 2006). Basados en los antecedentes anteriores, se decidió investigar en nuestro modelo de estudio cual o cuales enzimas están involucradas en seguir la ruta de reparación una vez que YwqL la ha iniciado. Para este fin, seleccionamos algunas enzimas con actividad de 3'→5' exonucleasa conocida que podrían ser candidatas a participar en la ruta AER, incluyendo la ADN-polimerasa PolX (Baños y col., 2008; Baños y col., 2010; Barajas-Ornelas y col., 2014), la AP-endonucleasa ExoA (Chou y Cheng, 2003), la proteína YpcP con posible actividad “flap”-endonucleasa (Fukushima y col., 2007) y finalmente las enzimas que conforman el sistema de reparación por escisión de nucleótidos o NER (Aravind y col., 1999). Mutantes nulas en los genes que codifican a las proteínas candidatas fueron obtenidas ya sea en su forma sencilla y en combinación con la deficiencia del gen *ywqL* (Tabla 1), esto con el fin de analizar la epistasis

de los genes en estudio al tratamiento con un agente desaminante como el bisulfito de sodio (BS), el cual desamina la citosina a uracilo (Chen y Shaw, 1993).

Por tal razón, la frecuencia de mutación espontánea e inducida por BS se midió con la generación de colonias resistentes a rifampicina de las cepas de *B. subtilis* 168 (tipo silvestre), $\Delta ywqL$, $\Delta polX$, $\Delta exoA$, $\Delta uvrA$, $\Delta ypcP$, $\Delta ywqL polX$, $\Delta ywqL exoA$, $\Delta ywqL uvrA$ y $\Delta ywqL ypcP$.

Los resultados muestran que para todas las cepas mutantes, la frecuencia de mutación aumenta en todos los casos respecto a la cepa silvestre dependiendo del genotipo cuando no se induce desaminación por BS (Fig. 10, barras blancas), no obstante, en este caso es de mayor interés comparar la frecuencia de mutación inducida por BS de la cepa interrumpida en el gen *ywqL* con aquellas en las que se interrumpieron o deletaron los genes candidatos (*polX*, *exoA*, *uvrA* y *ypcP*) en este fondo genético, en el entendido de que si los dos genes probados participan en una misma vía de reparación, la frecuencia de mutación inducida debería ser muy similar a la exhibida por la cepa mutante sencilla en *ywqL*. Para este último caso, los resultados mostraron que respecto a la cepa deficiente en *ywqL* existe un aumento drástico en la frecuencia de mutación de las dobles mutantes *ywqL polX* y *ywqL ypcP* cuando se trata a las células con BS, indicando que posiblemente ni PolX ni YpcP forman parte de la misma vía de reparación iniciada por YwqL (Fig. 10, barras naranjas). No obstante, cuando se trata a las dobles mutantes *ywqL exoA* y *ywqL uvrA*, ambas cepas tienen estadísticamente la misma frecuencia de mutación que la cepa mutante sencilla en *ywqL*, lo cual podría indicar una coparticipación de YwqL con ExoA o con el sistema NER una vez que se inicia el primer evento de la reparación (Fig. 10, barras naranjas). De ser así, una ADN-polimerasa y la ADN-ligasa tendrían el potencial de terminar la reparación tras la acción de las enzimas propuestas.

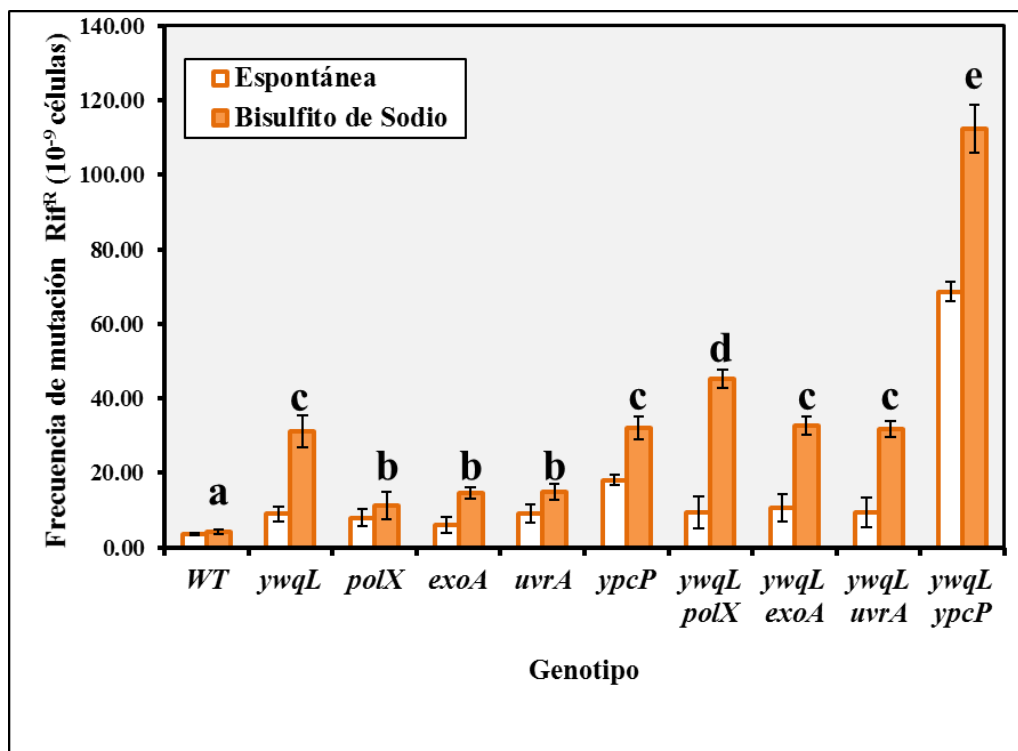


Fig. 10. Frecuencia de mutación Rif^R de diferentes cepas de *B. subtilis*. La tasa de mutación de cada cepa se determinó por su resistencia a rifampicina en respuesta al tratamiento con (barras blancas) o sin (barras naranjas) bisulfito de sodio. Cada barra representa la media de los datos colectados de tres diferentes experimentos y las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Las letras sobre las barras que representan las cepas que fueron tratadas con bisulfito de sodio (barras naranjas) indican diferencias estadísticamente encontradas mediante una prueba U de Mann-Whitney. ($P < 0.05$).

6.5 La expresión del gen *aag* de *B. subtilis* es detectada principalmente durante la formación de las esporas.

Como fue mostrado previamente por Aamodt y col., (2004), Aag de *B. subtilis* es capaz de remover eficientemente hipoxantina del ADN *in vitro*; sin embargo, el patrón de expresión espacio-temporal de *aag* durante el ciclo de vida de *B. subtilis* es desconocido. Para investigar este aspecto, se utilizó a la cepa de *B. subtilis* PERM1246, la cual contiene una fusión transcripcional *aag-lacZ*. Primeramente, se analizó la expresión de *aag* durante crecimiento exponencial y fase estacionaria, creciendo las células en medio líquido A3, observando niveles bajos de actividad de β -galactosidasa dirigida por *aag* durante todo el ciclo de vida de *B. subtilis* (Fig. 11A). Adicionalmente, se analizó la expresión de *aag* en un medio que induce eficientemente la esporulación de esta bacteria. Para este propósito, la cepa PERM1246 se creció en medio líquido DSM y muestras cosechadas durante toda la cinética de esporulación se evaluaron para su actividad de β -galactosidasa. A este respecto se encontró que, durante la esporulación, dentro del compartimento de la célula madre se mantienen niveles muy bajos de la actividad del gen reportero, similar a lo observado durante el crecimiento vegetativo (Fig. 11A y B); no obstante, dentro del compartimento de la pre-espora, se detectó que la expresión del gen reportero incrementó paulatinamente, alcanzando su máximo durante las últimas etapas de la esporulación (T_8) (Fig. 11B). Estos resultados sugieren que *aag* es expresado principalmente durante el proceso de esporulación dentro del compartimento de la pre-espora.

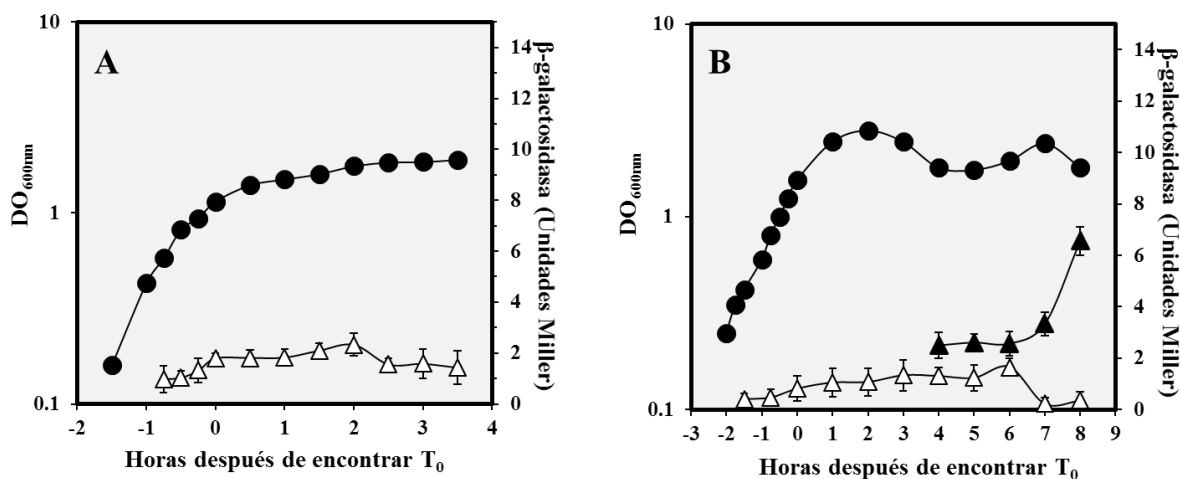


Fig. 11. Patrón de expresión del gen reportero *lacZ* dirigido por el promotor de *aag* de *B. subtilis* durante crecimiento y esporulación. A) Actividad β-galactosidasa dirigida por *aag* durante crecimiento vegetativo. La cepa PERM1246 se creció en medio A3, midiendo la densidad óptica (●). Las células se colectaron a los tiempos indicados y se determinaron los niveles de β-galactosidasa (Δ). B) Actividad β-galactosidasa dirigida por *aag* durante esporulación. La cepa PERM1246 se indujo a esporular en DSM, midiendo la densidad óptica (●). Las células se colectaron a los tiempos indicados y los niveles de β-galactosidasa se determinaron separadamente tanto en la célula madre (Δ) como en la pre-espora (▲) mediante fraccionamiento celular. Los resultados son el promedio de los valores obtenidos en tres experimentos independientes ± la desviación estándar (barras de error) de la actividad β-galactosidasa específica.

6.6 La proteína quimérica Aag-YFP es sintetizada sólo dentro del compartimento de la pre-espora.

Para investigar si *aag* es transcrito dentro de la espora en desarrollo, analizamos la síntesis de una proteína quimérica Aag-YFP durante la esporulación utilizando la cepa de *B. subtilis* PERM1286 la cual contiene una fusión transcripcional y traduccional en fase entre *aag* y *yfp* integrada en el locus nativo del gen *aag*. Las membranas celulares fueron teñidas con el colorante FM4-64 a fin de distinguir más fácilmente los compartimentos de las células esporulantes. Muestras recolectadas en la etapa T₂ de la esporulación y examinadas por microscopia de fluorescencia mostraron que en ese estadio no existe la síntesis de la proteína quimérica Aag-YFP; sin embargo, en muestras obtenidas después de los tiempos T_{4.5}, T₆ y T₈, la señal fluorescente emitida por la proteína reportera YFP fue observada, principalmente asociada con la preespora, pero no en la célula madre (Fig. 12). Estos resultados sugieren que *aag* es expresado solamente durante la esporulación y exclusivamente dentro del compartimento de la espora en formación en las últimas etapas de este proceso diferenciativo, apoyando los resultados obtenidos al utilizar β -galactosidasa como sistema reportero (Fig. 11B).

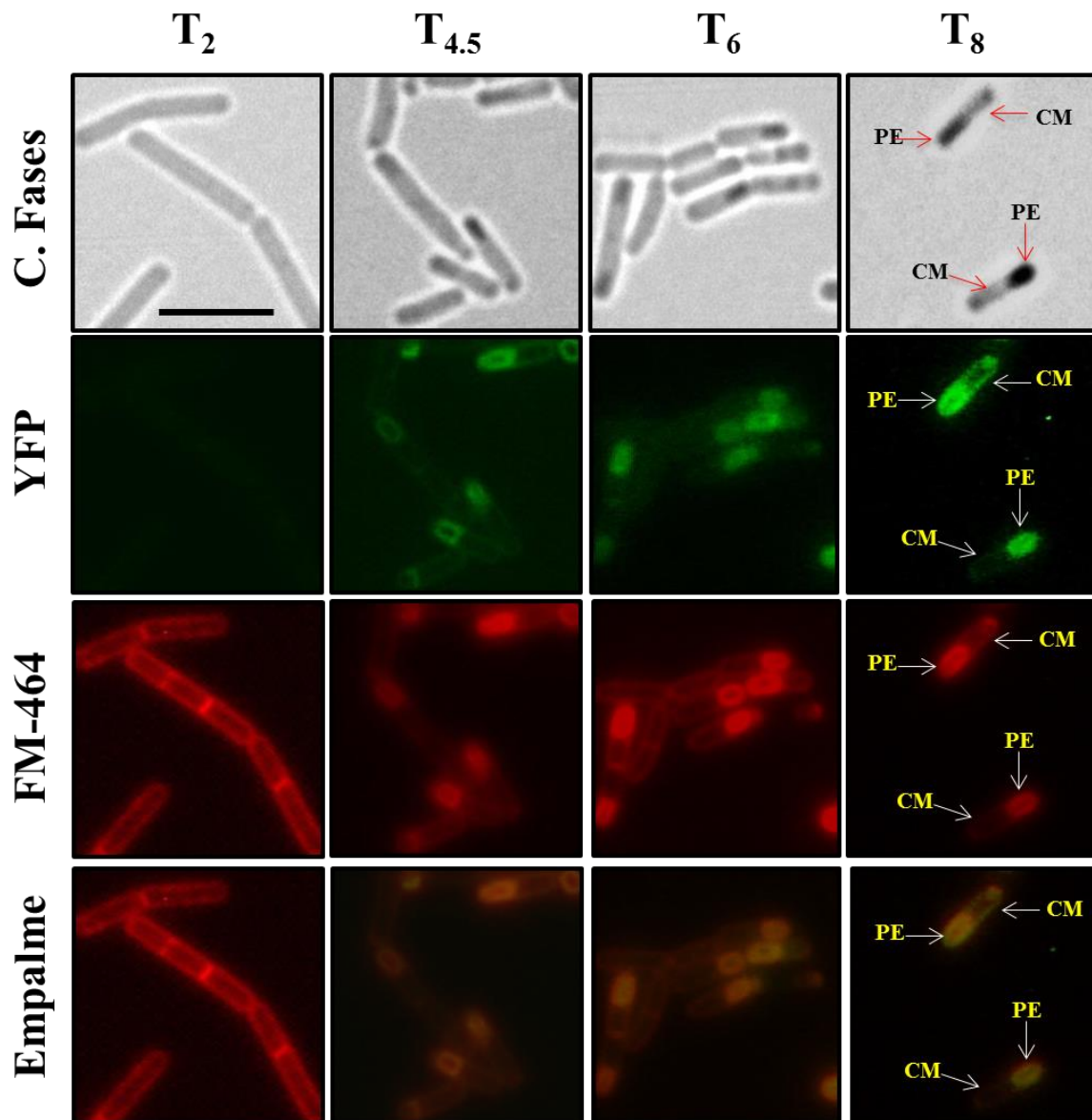


Fig. 12. Localización subcelular de la proteína quimérica Aag-YFP durante la esporulación de *B. subtilis*.

La cepa *B. subtilis* PERM1286 con la fusión traduccional en fase *aag-yfp* se creció e indujo a esporular en DSM líquido y se tiñeron las membranas con FM4-64 a partir de 1 h de iniciada la esporulación. Muestras obtenidas a las 2, 4.5, 6 y 8 h después del inicio de la esporulación fueron analizadas por microscopía de contraste de fases (C. Fases) y microscopía de fluorescencia para cada canal (YFP y FM4-64). Un empalme de las imágenes de YFP y FM4-64 para cada tiempo es ilustrado. Barra de escala, 5 μ m. CM, célula madre; PE, pre-espora.

6.7 La expresión de *aag* es dependiente del factor sigma específico de la ARN-polimerasa, σ^G .

Como se observó en los ensayos transcripcionales y experimentos de microscopía de fluorescencia descritos en secciones anteriores, la síntesis de Aag sigue un patrón de producción enteramente a nivel de pre-espora. Estos resultados permitieron especular que la expresión de *aag* debería ser dependiente de un factor de transcripción que solamente fuera activo durante la esporulación tardía y dentro de la espora en desarrollo. El proceso de esporulación en *B. subtilis* es una tarea finamente controlada por una red regulatoria transcripcional en donde los principales participantes son los factores sigma (Errington, 1993; Hillbert y Piggot, 2004). Los compartimentos específicos en donde cada factor sigma actúa han sido extensivamente estudiados, donde σ^F y σ^G controlan, secuencialmente, la expresión de genes dentro de la preespora (Losick y Stragier, 1992; Hilbert & Piggot, 2004). Promotores con secuencias consenso para cada factor sigma han sido previamente descritos (Haldenwang, 1995) permitiendo analizar la dependencia de tales factores de transcripción mediante bioinformática, siendo algunas veces corroborado experimentalmente por diversos enfoques genéticos y moleculares (Steil y col., 2005, Wang y col., 2006). A pesar de que derivado de un análisis bioinformático se propuso una secuencia promotora para *aag* (Aamodt y col., 2004), no se sugirió cual factor sigma es el responsable de dirigir su transcripción. Para contestar experimentalmente esta pregunta, se generó una cepa con la fusión *aag-lacZ* en un fondo genético deficiente en el factor σ^G de la ARN-polimerasa (PERM1322), esta cepa fue inducida a esporular y la actividad de β -galactosidasa dirigida por *aag* fue determinada. Como se esperaba, la expresión de *aag* dentro de la pre-espora fue

casi abatida en la cepa $\Delta sigG$, aun cuando la expresión dentro de la célula madre mantuvo niveles bajos (Fig. 13A).

Para apoyar la idea de que la expresión de *aag* es dependiente de un factor σ^G funcional, una copia del gen *sigG* fue complementado *in trans* bajo el control del promotor *Pspac* inducible por IPTG. Para este fin, la cepa PERM1322 se transformó con el plásmido pDG298 (Sun y col., 1989), resultando en la cepa PERM1375. Una transformación adicional de la cepa PERM1322 fue realizada con el plásmido pDG148 (vector vacío) para utilizarse como control, obteniendo así la cepa PERM1374. Ambas cepas, PERM1374 y PERM1375 fueron propagadas en medio líquido A3 añadiendo el inductor IPTG cuando la D.O._{600nm} alcanzó el valor de 0.5 en cada cultivo. La inducción en la síntesis de *sigG* en células creciendo en forma exponencial resultó en la activación de la expresión de *aag* determinada por la actividad de β -galactosidasa, ya que los niveles obtenidos para la actividad del gen reportero fueron más altos que aquellos que se encontraron en la cepa con el promotor nativo de *aag* (Fig. 13B).

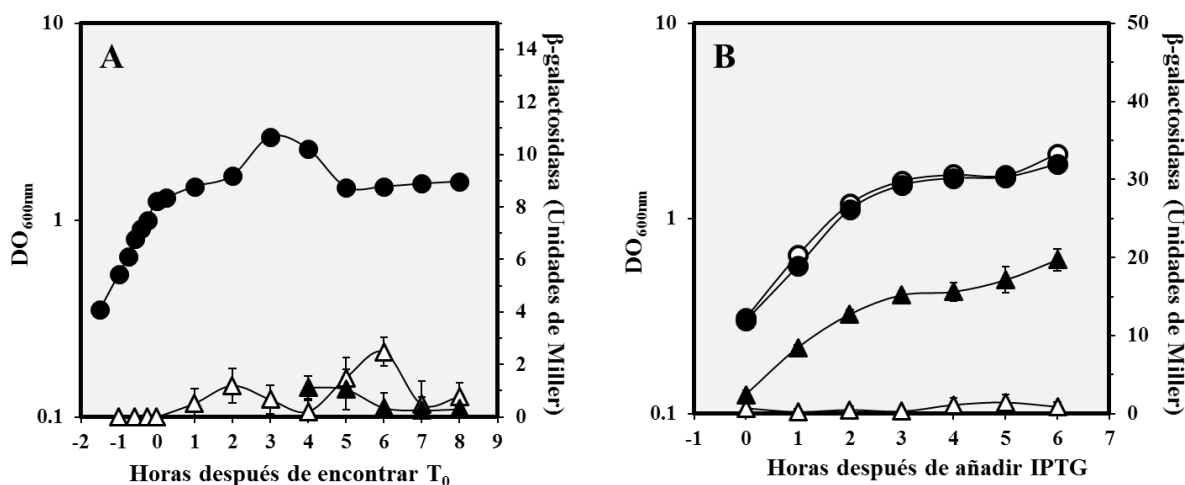


Fig. 13. Dependencia de σ^G en la expresión de la fusión *aag-lacZ*. A) Actividad β -galactosidasa de la fusión *aag-lacZ* durante la esporulación en una cepa de *B. subtilis* Δ *sigG*. *B. subtilis* conteniendo una fusión *aag-lacZ* en un fondo genético deficiente en *sigG* se indujo a esporular en DSM, registrando la densidad óptica (●). La actividad de β -galactosidasa se determinó separadamente tanto en la célula madre (Δ) como en la pre-espora (▲) mediante fraccionamiento celular. B) Actividad β -galactosidasa de la fusión *aag-lacZ* por sobreexpresión del gen *sigG* durante crecimiento exponencial. *B. subtilis* conteniendo una fusión *aag-lacZ* en un fondo genético deficiente en *sigG* conteniendo ya sea al vector con *Pspac::sigG* (●) o al vector vacío (○) se crecieron en medio A3 e indujeron con IPTG 1mM a una densidad óptica de 0.5. Las células se colectaron a los tiempos indicados. La actividad de β -galactosidasa se determinó para la cepa complementada con *sigG* (▲) o no complementada (Δ). Los resultados son el promedio de los valores obtenidos en tres experimentos independientes \pm la desviación estándar (barras de error) de la actividad β -galactosidasa específica.

6.8 Determinación del sitio de inicio de la transcripción y de las regiones regulatorias del gen *aag* de *B. subtilis*.

Resultados descritos líneas arriba apoyan la noción de que la transcripción de *aag* es regulada por el factor σ^G ; sin embargo, fue de interés complementar este resultado analizando la secuencia del promotor de *aag* y relacionar el resultado con secuencias consenso reportadas para cada factor sigma (Haldenwang, 1995). El arreglo genético del locus *aag* revela que este gen es flanqueado río arriba por el gen *katX*, el cual codifica la principal catalasa en esporas dormantes cuya transcripción se da en forma divergente respecto a *aag* (Bagyan y col., 1998), y río abajo por el gen *yxzF* cuyo producto es una proteína de función desconocida, conformando un operón bi-cistronico con *aag* (Fig. 14 A). El hecho de que *katX* sea transcrito en forma opuesta a *aag* sugiere y se ha predicho que éste último tiene su propio promotor (Bagyan y col., 1998), por lo que consideramos relevante describir experimentalmente las regiones -35 y -10 del promotor de *aag*. Para tal fin, se realizaron experimentos de *primer extension* para identificar el extremo 5' del ARNm originados desde río arriba de la secuencia codificante de *aag*. Los experimentos se llevaron a cabo con ARN total aislado de las cepas de *B subtilis* 168 y PERM1375. Los resultados mostrados en la Fig. 14 B (carril 1) revelaron la síntesis de un producto de extensión localizado a 69 pb río arriba del codón de inicio de *aag* a partir de muestras de ARN obtenidas de células esporulantes de la cepa silvestre. Tal producto de extensión se observó también cuando muestras de ARN de la cepa PERM 1375 creciendo exponencialmente y suplementadas con IPTG para inducir la expresión de *sigG* se usaron para la extensión (Fig. 14 B, carril 2). Estos resultados confirman que la expresión de *aag* es regulada por el factor σ^G de la ARN-polimerasa, lo cual se observó

durante el proceso de esporulación o durante crecimiento logarítmico en una forma inducida de la expresión del factor transcripcional σ^G .

Una comparación de la secuencia consenso para los factores sigma de la ARN-polimerasa que son activos dentro de la pre-espora (Haldenwang, 1995) con la secuencia de la región promotora de *aag* obtenida por *primer extension* mostró que las regiones -35 y -10 del promotor de *aag* se encuentran conservadas para el factor σ^G , aunque con algunas diferencias importantes. (Fig. 15A). No obstante, al hacer la comparación de las secuencias de 61 promotores de distintos genes de *B. subtilis* descritos como σ^G -dependientes (Fuente: DBTBS, Apéndice 2) y los nucleótidos en las cajas -35 y -10 obtenidas por *primer extension* para el promotor del gen *aag*, se observa que la región -35 es menos conservada que la región -10 para estos promotores (Fig. 15B).

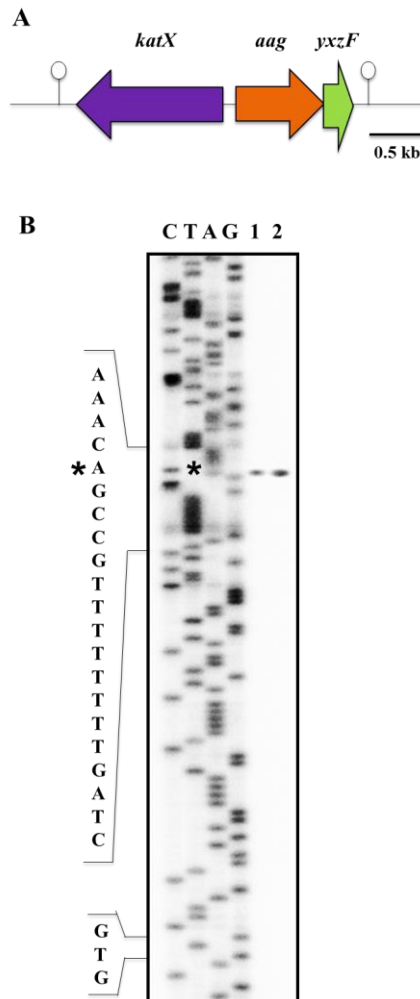
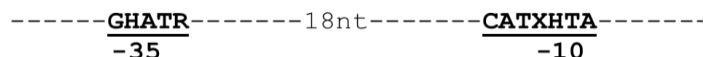


Fig. 14. Mapa genético del locus *aag* y determinación de la región promotora del gen *aag*.

A) Esquematización de la posición del locus *aag* en el genoma de *B. subtilis*. Arreglo genético de *aag* (naranja) ilustrado entre *katX* (morado) y *yxzF* (verde) en el genoma de *B. subtilis*. El gen *aag* es co-transcrito con *yxzF* formando un operón bi-cistronico. El gen *katX* es transcrito divergentemente río arriba respecto a *aag*. Estructuras *hairpin* denotan terminadores transcripcionales hipotéticos. El dibujo es a escala. **B) Análisis por primer extension para determinar el inicio transcripcional de *aag*.** El ARN total se aisló de células esporulantes de *B. subtilis* 168 (etapa T₆, carril 1) crecidas en DSM o de células vegetativas de la cepa PERM1375 suplementada con IPTG (3 horas después de la adición de IPTG, carril 2). La extensión de los oligonucleótidos se realizó utilizando 40 unidades de transcriptasa reversa M-MLV. El asterisco señala la posición del producto de extensión relativo a la secuencia de nucleótidos (carriles C, T, A y G) indicando la posición del sitio de inicio de la transcripción de *aag*. El triplete GTG indica el codón de inicio del marco de lectura abierto de *aag*.

A Secuencia consenso para promotores σ^G -dependientes:



Secuencia del promotor de *aag*:

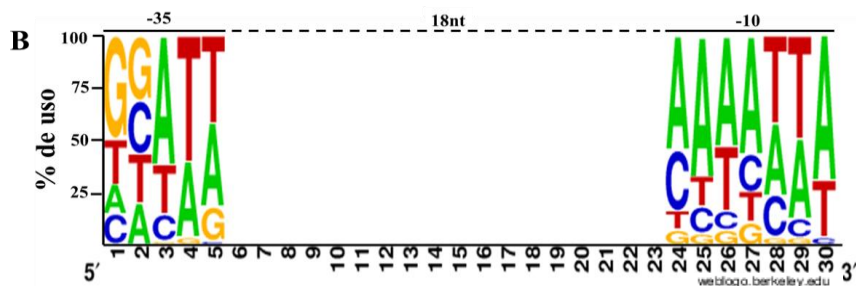


Fig. 15. Análisis de las secuencias consenso de promotores σ^G -dependientes y el promotor encontrado mediante *primer extension* para *aag*. **A)** Comparación de las secuencias consenso previamente reportadas para promotores σ^G (Haldenwang, 1995) con la secuencia de la región promotora del gen *aag* deducida a partir de los datos de *primer extension* (Fig. 14 B). Empates perfectos son indicados en negritas. La posición del sitio de inicio de la transcripción es indicada con un asterisco. H, A o C; R, A o G; X, A o T. **B)** Comparación de las secuencias -35 y -10 de 61 promotores σ^G -dependientes de *B. subtilis*. Las secuencias se muestran como logos de secuencia en donde la altura de las letras indica el porcentaje en el cual cada nucleotido (G,A,T y C) es encontrado en los diferentes promotores que previamente se determinaron como dependientes del factor de transcripción σ^G (Fuente: DBTBS; a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information). Web logo creado en <http://weblogo.berkeley.edu/>. (Crooks y col., 2004).

6.9 Aag y YwqL protegen a las células esporulantes de *B. subtilis* de los efectos citotóxicos y genotóxicos del ácido nitroso.

El patrón de expresión específico de pre-espora exhibido por el gen *aag* permitió sugerir que su producto podría tener una participación en la reparación de ADN durante la esporulación. Para investigar esta hipótesis, células esporulantes de las cepas de *B. subtilis* 168 (WT) y PERM1246 (Δaag) se colectaron 4.5 h después de iniciada la esporulación y se trataron con diferentes dosis de ácido nitroso (HNO_2), un agente que promueve la desaminación de adenina a hipoxantina (Shapiro y Pohl, 1968). Notablemente, las células deficientes en Aag fueron ligeramente más susceptibles al tratamiento con ácido nitroso en comparación con la cepa silvestre (Fig. 16 A y B), no obstante, un análisis estadístico reveló diferencias significativas entre los valores para la dosis letal 90 (DL_{90}) calculados para ambas cepas, no así entre los valores calculados para la dosis letal 50 (DL_{50}) (Tabla 2). La falta de grandes diferencias observadas entre las cepas mencionadas al ser tratadas con ácido nitroso, sugirió la existencia de vías adicionales en el procesamiento de bases desaminadas en el ADN promovidas por éste agente de daño. De acuerdo con esta idea, células esporulantes deficientes en el gen *ywqL* (PERM791) resultaron ser más sensibles que la cepa deficiente en *aag* al ser tratadas con ácido nitroso (Fig. 16 A y B; Tabla 2). De forma importante, la cepa doble mutante en *aag* y *ywqL* (PERM1385) no incrementó su susceptibilidad al ácido nitroso respecto a la cepa deficiente de *ywqL* (Fig. 16 A y B; Tabla 2). En conjunto, estos resultados sugieren que YwqL tiene una participación más importante que Aag en eliminar hipoxantina del ADN de *B. subtilis* durante la esporulación.

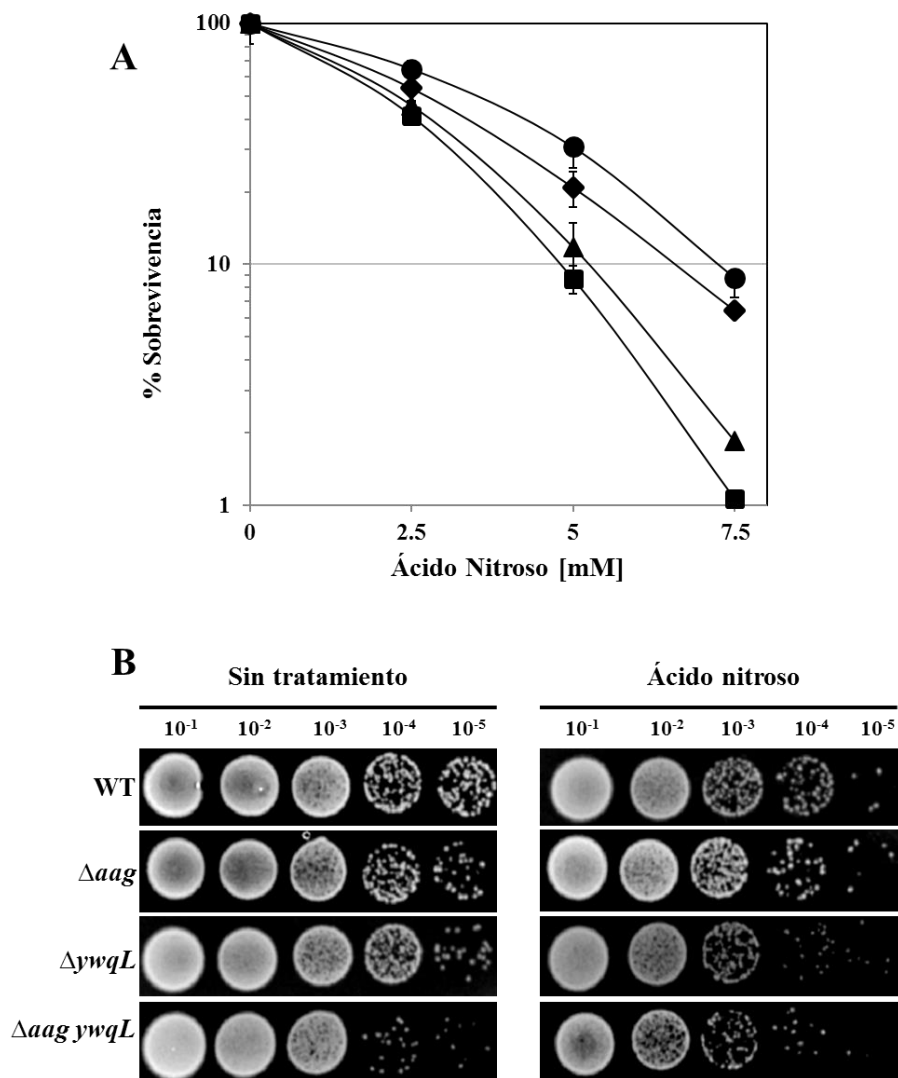


Fig. 16. Sensibilidad de células esporulantes de *B. subtilis* a ácido nitroso. (A) Sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* WT (●), Δaag (◆), $\Delta ywqL$ (▲) y $\Delta aag ywqL$ (■) en respuesta al tratamiento con ácido nitroso (HNO_2). Células de las distintas cepas se indujeron a esporular en DSM líquido, se trataron después de 4.5 h de iniciada la esporulación con diferentes concentraciones de ácido nitroso y se determinó la cuenta viable para calcular las curvas dosis-respuesta. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Resistencia de las cepas WT, Δaag , $\Delta ywqL$ y $\Delta aag ywqL$ después de la exposición a ácido nitroso. Células de las distintas cepas se indujeron a esporular en DSM líquido, se trataron después de 4.5 h de iniciada la esporulación con la DL_{50} de ácido nitroso para la cepa WT (calculada de la curva dosis-respuesta del panel A, Tabla 2), se lavaron con PBS, se sembraron sobre medio LB sólido y finalmente se fotodocumentaron.

6.10 Aag protege a las células esporulantes de *B. subtilis* de los efectos citotóxicos y genotóxicos del metil metano sulfonato.

En adición al procesamiento de hipoxantina, Aag también puede remover las bases alquiladas 3-metil adenina (3-mA) y 3-metil guanina (3-mG) del ADN (Aamodt y col., 2004). Por lo tanto, se comparó la capacidad de células esporulantes de las cepas de *B. subtilis* 168 (WT) y de las deficientes en los genes *aag* y/o *ywqL* para sobrevivir al tratamiento con el agente alquilante metil metano sulfonato (MMS). De manera interesante, la falta de Aag, pero no de YwqL sensibilizó de forma importante a las células esporulantes al tratamiento con MMS, y tal efecto no incrementó en células deficientes de ambas proteínas de reparación (Fig. 17 A y B, Tabla 2). Estos resultados y los mostrados en la figura 16, tomados de manera conjunta, sugieren que, *in vivo*, Aag está involucrada primariamente en eliminar bases alquiladas del ADN durante el desarrollo de la esporulación.

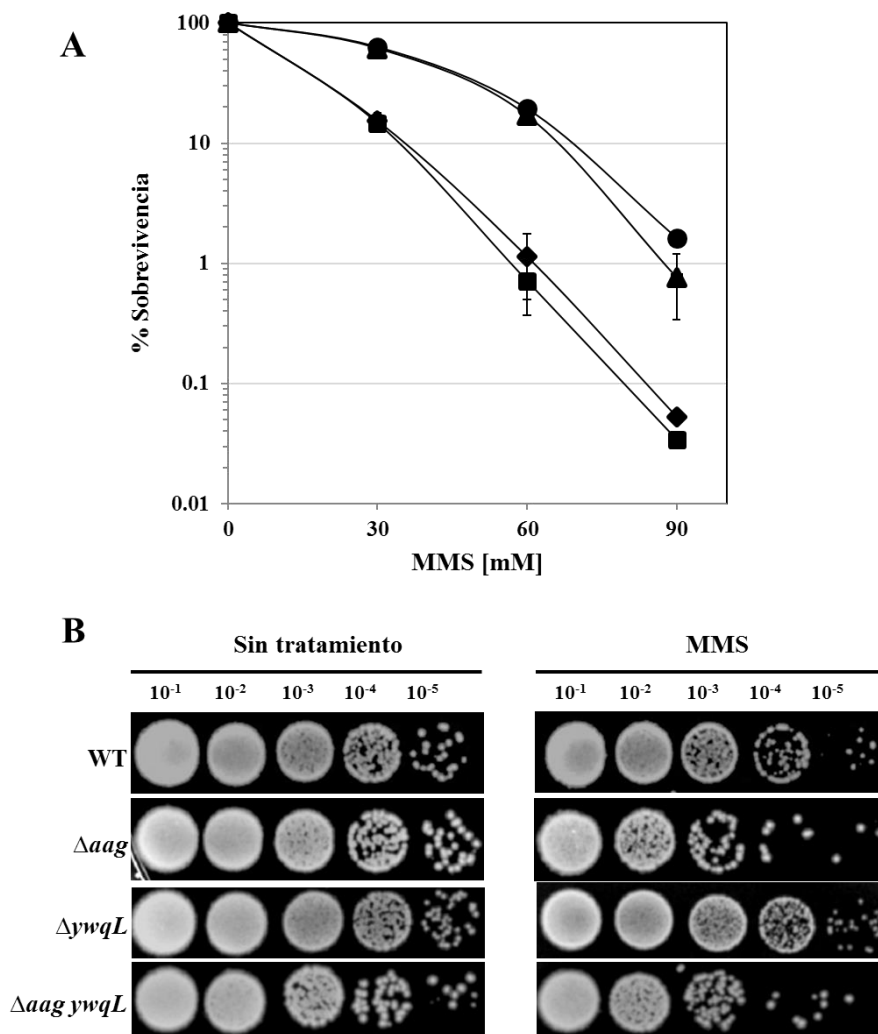


Fig. 17. Sensibilidad de células esporulantes de *B. subtilis* a metil metano sulfonato. (A) Sobrevivencia de las cepas de *B. subtilis* WT (●), Δaag (◆), $\Delta ywqL$ (▲) y $\Delta aag ywqL$ (■) en respuesta al tratamiento con metil metano sulfonato (MMS). Células de las distintas cepas se indujeron a esporular en DSM líquido, se trataron después de 4.5 h de iniciada la esporulación con diferentes concentraciones de metil metano sulfonato y se determinó la cuenta viable para calcular las curvas dosis-respuesta. Los resultados son expresados como la media \pm la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. (B) Resistencia de las cepas WT, Δaag , $\Delta ywqL$ y $\Delta aag ywqL$ después de la exposición a metil metano sulfonato. Células de las distintas cepas se indujeron a esporular en DSM líquido, se trataron después de 4.5 h de iniciada la esporulación con la DL_{50} de ácido nitroso para la cepa WT (calculada de la curva dosis-respuesta del panel A, Tabla 2), se lavaron con PBS, se sembraron sobre medio LB sólido y finalmente se fotodocumentaron.

Tabla 2. Valores de dosis letal 50 (DL₅₀) y 90 (DL₉₀) para ácido nitroso y metil metano sulfonato de células esporulantes de *B. subtilis*.

Cepa	HNO ₂ (mM)		MMS (mM)	
	DL ₅₀	DL ₉₀	DL ₅₀	DL ₉₀
Wt (168)	3.47±0.11 ^a	7.49±0.06 ^a	38.86±0.30 ^a	71.20±0.57 ^a
PERM1246 (Δaag)	2.92±0.05 ^a	6.82±0.09 ^b	15.16±0.17 ^b	32.69±0.37 ^b
PERM791 ($\Delta ywqL$)	2.17±0.09 ^b	5.14±0.10 ^c	37.93±0.61 ^a	69.49±0.67 ^a
PERM1385 ($\Delta aag ywqL$)	1.90±0.06 ^b	4.80±0.08 ^c	14.94±0.31 ^b	32.47±0.40 ^b

Los valores de dosis letal se representan como la media \pm el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes. a, b y c, en subíndices, indican diferencias estadísticamente significativas las cuales se determinaron por un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey ($P < 0.05$).

6.11 Aag y YwqL contrarrestan los efectos mutagénicos del ácido nitroso y metil metano sulfonato.

Debido al importante papel que juegan Aag y YwqL en la protección del ADN durante la esporulación, resultó interesante conocer si estas enzimas están involucradas en prevenir los efectos mutagénicos promovidos por el ácido nitroso y el metil metano sulfonato en dicha etapa de diferenciación. Para tal fin, células esporulantes de las cepas de *B. subtilis* WT (168) y de las deficientes en *aag* y/o *ywqL* se trataron con la DL₅₀ de ácido nitroso o MMS (calculada para cada cepa, Tabla 2), se dejó como control un cultivo sin agente de daño y se determinó la frecuencia de mutación de colonias resistentes a rifampicina (Rif^R) para cada cepa. Con respecto a la cepa silvestre, la deficiencia en Aag o YwqL de forma individual no incrementó la frecuencia de mutación espontánea; sin embargo, este parámetro aumentó significativamente cuando ambos genes, *aag* y *ywqL*, se interrumpieron en el genoma de esta bacteria (Fig. 18). El tratamiento con ácido nitroso incrementó de forma importante la tasa de mutagénesis de todas las cepas probadas, sin embargo, el efecto se observó máximo en las cepas que contenían las deficiencias en Aag y YwqL (Fig. 18 A). En marcado contraste, el metil metano sulfonato propició un gran efecto mutagénico en las células esporulantes de las cepas *aag* y *aag ywqL*, pero no en la cepa deficiente de *ywqL* (Fig. 18 B). En general, tanto Aag como YwqL parecen participar contrarrestando los efectos mutagénicos promovidos por factores que dañan el ADN de células esporulantes mediante la desaminación y la alquilación de las bases.

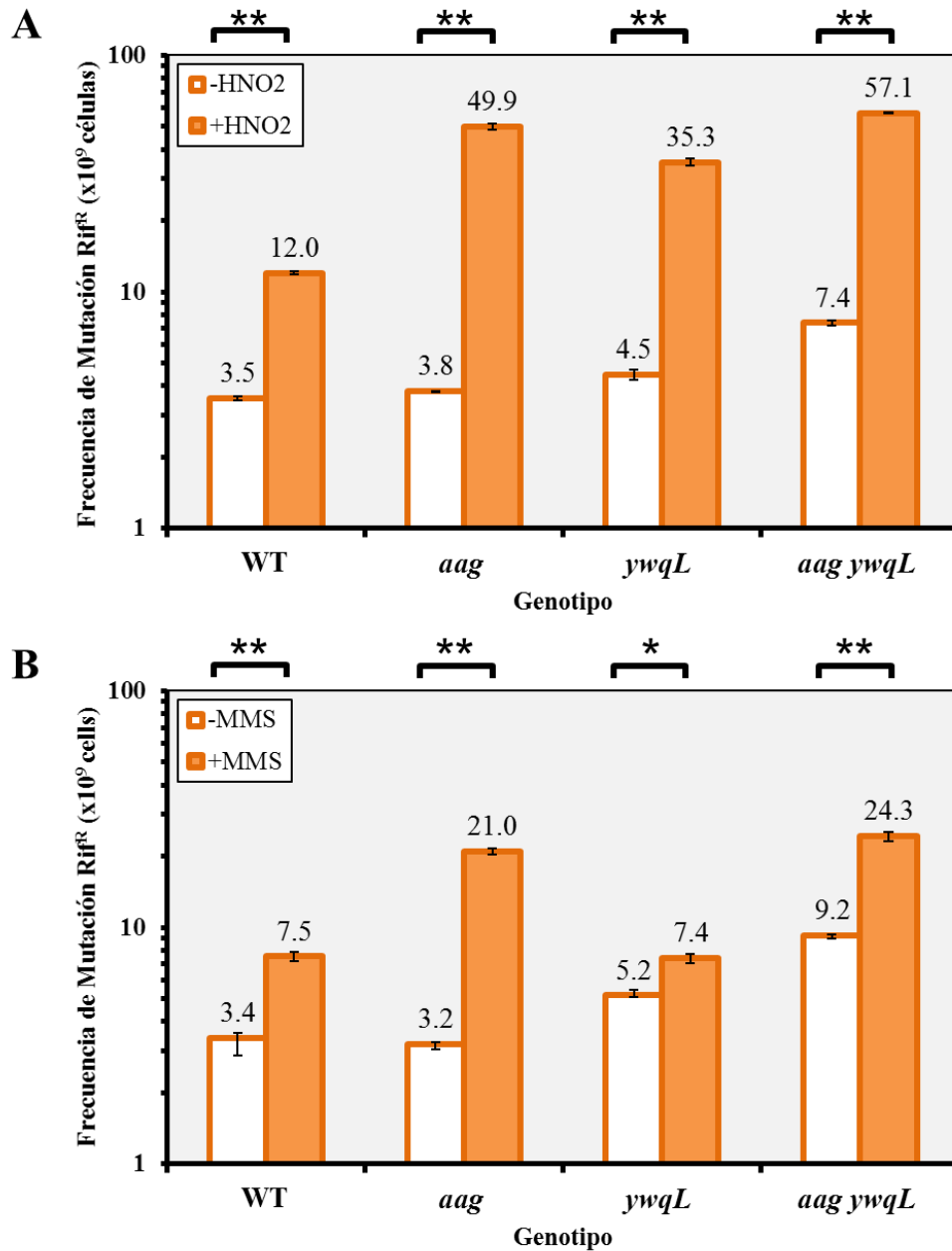


Fig. 18. Frecuencia de mutación espontánea e inducida por agentes desaminantes durante la esporulación de *B. subtilis*. Células de las diferentes cepas se indujeron a esporular en DSM líquido y se trataron 4.5 h después de iniciada la esporulación con la DL_{50} de HNO₂ (A) o MMS (B) para cada cepa. La tasa de mutación fue estimada por el número de células, tratadas (+) o no (-) con el agente de daño, que crecieron en rifampicina respecto a la cuenta viable. Cada barra representa la media de los datos colectados en tres experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas calculadas mediante una prueba de “U” de Mann-Whitney. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

6.12 Ung, YwqL y Aag contrarrestan los efectos mutagénicos de la desaminación de bases en esporas de *B. subtilis*.

Como se reportó previamente en nuestro grupo de trabajo, tanto *ung* como *ywqL* mantienen niveles transcripcionales durante la esporulación de *B. subtilis* (López-Olmos y col., 2012); además, en este trabajo se determinó que Aag se sintetiza principalmente en dicho proceso de diferenciación, por lo que fue de interés determinar la capacidad de las diferentes enzimas de reparación de bases desaminadas estudiadas aquí en proteger el ADN de esporas de *B. subtilis*. Para esto se utilizaron diferentes cepas deficientes en ya sea *ung*, *ywqL* y *aag* solas o con diferentes combinaciones dobles y triples, para medir su susceptibilidad a la desaminación generada por ácido nitroso. El nivel de susceptibilidad fue asignado determinando la DL₉₀ para cada una de las cepas. Las esporas de *B. subtilis* se han utilizado durante mucho tiempo para estudiar su supervivencia a diferentes factores ambientales. Éstas cuentan con diferentes características que las vuelven más resistentes que las células vegetativas como lo es el bajo contenido de agua, la propia arquitectura de la spora, pero sobre todo las proteínas α/β SASP que se unen fuertemente al ADN y evitan que éste sea propenso al daño (Pedraza-Reyes y col., 2012). Es por eso que en estos experimentos usamos cepas deficientes en las proteínas α/β SASP para poder evaluar directamente los efectos causados por la desaminación. Los resultados mostraron que YwqL juega un papel determinante en proteger el ADN de las esporas ante la desaminación de bases, no obstante, la combinación en la inactivación de los genes *ung/ywqL*, *ywqL/aag* y *ung/ywqL/aag* sensibilizó aún más a las esporas de ésta bacteria ante el tratamiento con ácido nitroso respecto a la inactivación simple de *ywqL*, destacando así el papel antimutagénico de Ung y de Aag (Fig. 19).

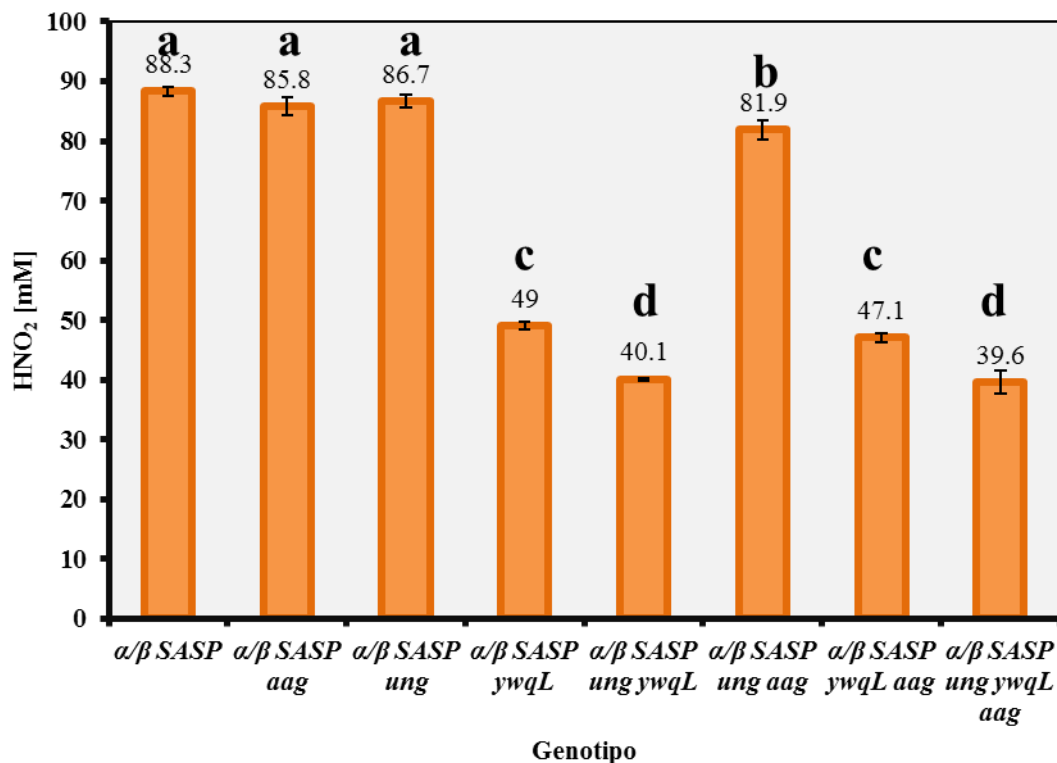


Fig. 19. Dosis letales 90 (DL₉₀) calculada para esporas de las cepas de *B. subtilis* silvestre y deficientes en genes de reparación de bases desaminadas. 1×10^8 esporas/mL se trataron con concentraciones ascendentes de ácido nitroso y se determinó su viabilidad en placas de medio LB para determinar su sobrevivencia. Cada barra representa la media de los datos colectados en tres diferentes experimentos con tres réplicas cada uno. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas determinadas por un análisis de varianza de un factor seguido de una prueba de Tukey. ($P < 0.05$)

VII. Discusión

Constantemente, todas las especies están expuestas a agentes que alteran la estructura química de su material genético. Si dichas alteraciones no son corregidas, se pueden generar mutaciones, las cuales pueden llegar a ser letales para las células (Clancy, 2008). De no ser este el caso, la acumulación de mutaciones puede incrementar la variabilidad genética, siempre y cuando no se alcance un nivel crítico en el cual los organismos no puedan sobrevivir (Earl y col., 2007), es aquí donde los sistemas de reparación de ADN juegan un papel primordial en mantener el equilibrio entre la mutación y la diversidad genética.

La desaminación de las bases en el ADN representa un potencial toxicológico para la integridad de esta molécula. La pérdida del grupo amino de la citosina, la adenina y la guanina puede ocurrir en condiciones fisiológicas vía una reacción hidrolítica, dando como resultado bases análogas mutagénicas como el uracilo, la hipoxantina y la xantina (Shapiro, 1981). Si estas lesiones no son reparadas, pueden generar mutaciones por transición a partir de la segunda ronda de replicación (Duncan y Weiss, 1982).

Al ser una bacteria del suelo, *B. subtilis* está constantemente expuesta a especies reactivas de nitrógeno causadas por oxidación o reducción del óxido nítrico (Fang, 2004), lo cual es resultado de la desnitrificación que realizan diferentes microorganismos (Choi y col., 2006), siendo esto un potente detonador de la desaminación de bases (Shapiro y Pohl, 1968). Además, la reanudación del metabolismo aeróbico durante la germinación puede promover una amplia gama de especies reactivas de oxígeno (Ibarra y col., 2008; Campos y col., 2014) las cuales pueden potencialmente promover la oxidación y desaminación de las bases del ADN (Chernikov y col., 2007).

Estudios previos han revelado la participación en *B. subtilis* de dos vías que reparan las bases desaminadas presentes en el ADN. El sistema de reparación por escisión de bases (BER) mediante la acción de ADN glicosilasas como la uracilo ADN-glicosilasa, que actúa removiendo el uracilo (López-Olmos, 2012); y la hipoxantina/alquil-adenina ADN-glicosilasa que remueve hipoxantina y purinas alquiladas (Aamodt y col., 2004). El segundo sistema de reparación es conocido por emplear un mecanismo de escisión alternativo (AER), donde se sugiere que las bases desaminadas y otras lesiones se pueden remover haciendo uso de una endonucleasa V.

Recientemente se ha evidenciado mediante un enfoque genético, el papel fisiológico de YwqL, una enzima del tipo endonucleasa V, sugiriendo su participación en la remoción de uracilo y posiblemente otras bases desaminadas (López-Olmos y col., 2012); y a nivel bioquímico, en el antecedente más directo a este trabajo se observó que la proteína YwqL purificada fue capaz de procesar *in vitro* ADN plasmídico conteniendo uracilos y sitios AP (Ayala-García, 2012), constituyendo la primera evidencia de la preferencia multi-sustrato reportadas anteriormente para enzimas de este tipo (Gates y Linn, 1977; Huang y col., 2002; Feng y col., 2005; Mi y col., 2012).

Con el fin de evaluar de una forma más fina el espectro de lesiones que YwqL puede procesar, diferentes sondas de ADN marcado radiactivamente conteniendo las lesiones uracilo, hipoxantina, xantina y sitios AP fueron probadas como sustrato para la enzima purificada. Como se muestra en la Fig. 6, YwqL fue capaz de procesar todas las lesiones, aunque al parecer con ciertas diferencias en el reconocimiento del daño y su procesamiento, lo cual es sugerido por los productos de corte generados para cada lesión. Al parecer, el uracilo y los sitios AP son procesados por YwqL mediante un mismo mecanismo generando

un corte del lado 3' de la lesión, por lo que otra actividad enzimática que remueva el pequeño fragmento conteniendo el daño sería requerida. Sorprendentemente, cuando YwqL corta ADN con hipoxantina o xantina, lo hace generando un corte en los extremos aledaños que flanquea la lesión, lo cual dejaría un extremo 3'OH libre para que una ADN-polimerasa incluya las bases correctas y la ADN-ligasa pueda terminar la reparación. Un diagrama del posible mecanismo de reparación fue construido a partir de estos resultados experimentales (Fig. 20).

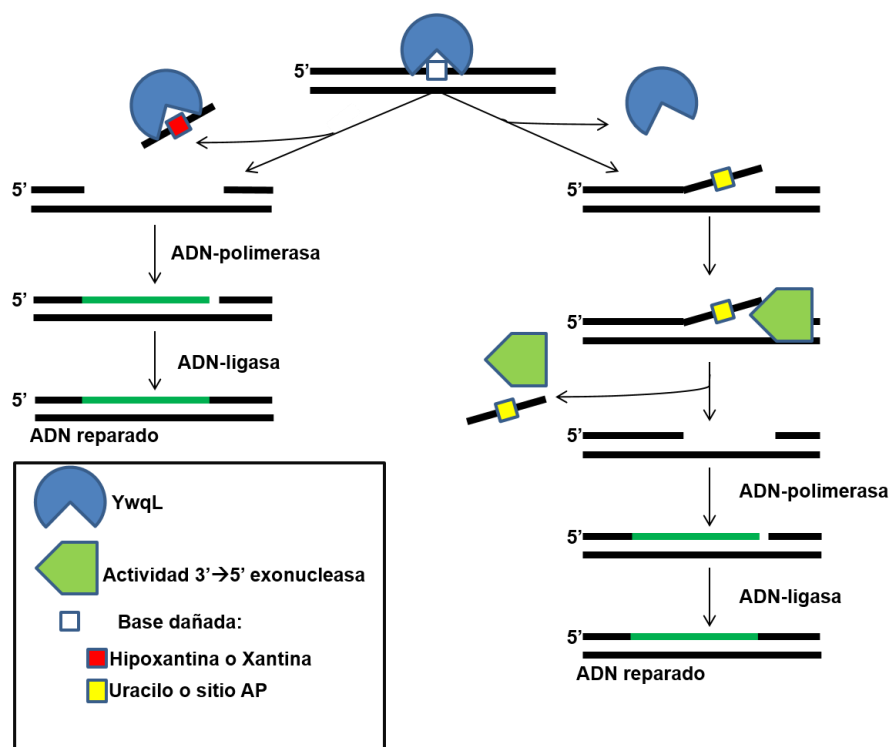


Fig. 20. Mecanismo propuesto para la reparación por escisión alternativa (AER) iniciada por YwqL en *B. subtilis*. Una vez que YwqL reconoce la lesión, para el caso de hipoxantina o xantina, ésta enzima realiza un corte a cada lado de la base dañada removiéndola por completo, permitiendo que la reparación termine con una ADN-polimerasa y ADN-ligasa. Cuando uracilo o un sitio AP son reconocidos por YwqL, ésta realiza un único corte del lado 3' a la lesión, por lo que una actividad 3'→5' exonucleasa es todavía necesaria para remover por completo el daño y que la reparación termine exitosamente.

La cuantificación de la cantidad de sustrato cortado al transcurrir el tiempo (Fig. 8) indica que, *in vitro*, YwqL procesa con la misma afinidad uracilo, hipoxantina y los sitios AP y en mucho menor medida al ADN conteniendo xantina, resaltando así la capacidad de esta enzima para iniciar la reparación de una amplia gama de sustratos de forma eficiente. No obstante, aún se necesitan estudios para determinar si otras lesiones como malos apareamientos o bases oxidadas son también sustrato para YwqL. Recientes publicaciones han surgido a fin de elucidar los mecanismos que rigen la relación estructura-función para enzimas del tipo Endo V, aunque esto se ha limitado únicamente al procesamiento de hipoxantina (Mi y col., 2011, Zhang y col., 2015). A este respecto se sabe que similar a lo que ocurre en otras enzimas de reparación, la base dañada es atraída de la hélice del ADN por una rotación de 90°. Para bloquear la base dañada en la bolsa de reconocimiento, EndoV inserta el anillo de una tirosina como base subrogada en el espacio que dejó la hipoxantina. Tal tirosina forma parte de una “cuña” compuesta de cuatro aminoácidos; prolina, tirosina, isoleucina y prolina (motivo PYIP) (Dalhus y col., 2009; Cao, 2012; Zhang y col. 2015). En YwqL dicha cuña se encuentra a partir de la posición 86 (en la secuencia aminoacídica) y no tiene conservado el tercer y cuarto aminoácido, ya que en lugar de isoleucina y prolina, se encuentran valina y alanina (PYVA) (Anexo 3); y es justamente este motivo el encargado de sensar distorsiones en el ADN debido a su capacidad de embonar en el surco menor y separar los apareamientos entre las bases si existe una lesión. Por tales diferencias, es necesario investigar si los cambios en los aminoácidos en la bolsa de reconocimiento de YwqL respecto a la de otras endonucleasas V interfieren en la identificación de la lesión.

Otra característica importante para la actividad de esta enzima es una triada de aminoácidos compuesta por dos aspartatos y un glutamato (motivo DED), la cual es

responsable de coordinar un ión metálico y de llevar acabo el corte del enlace fosfodiéster. Dicha triada está conservada en YwqL y la forman los aminoácidos mencionados en las posiciones D46, E95 y D109 (Anexo 3). Como en la mayoría de las endonucleasas, YwqL necesita de iones que sirvan de cofactor para la actividad enzimática, por lo que dos metales divalentes fueron probados para ser utilizados por esta enzima, encontrando que Mg^{2+} en mayor medida que Mn^{2+} permiten realizar el corte del enlace fosfodiéster, aunque al usar este último algunas inespecificidades fueron encontradas (Fig. 9). A este respecto, se ha especulado que las inespecificidades en el corte por parte de Endo V al suplementarse con Mn^{2+} son dependientes de la concentración de dicho metal, la cual podría activar un supuesto segundo sitio de coordinación de unión a metal, siendo inespecífica a bajas concentraciones (> 5 mM) (Hitchcock y col., 2004).

Si bien en este estudio se han encontrado datos muy valiosos que indican que YwqL puede iniciar la reparación de diferentes daños, es evidente que para las lesiones uracilo y sitio AP, otras enzimas deben seguramente estar involucradas en la remoción por completo de tales daños del ADN. Como se describió en la sección 6.4, un análisis epistático para determinar la posible interacción entre YwqL y otras enzimas de reparación indicó que la AP-endonucleasa ExoA con su actividad de 3'→5' exonucleasa tiene el potencial para remover la lesión que previamente procesó YwqL, aunque no se descarta que tal distorsión en la doble hélice pueda ser reconocida y procesada por los componentes del sistema NER (Fig. 11). Actualmente se están realizando en nuestro laboratorio los estudios con las proteínas presuntamente implicadas.

Dentro del procesamiento específico para hipoxantina, se sabe que la remoción del genoma de esta lesión es una tarea crítica para el mantenimiento de la información genética

a la cual las células se deben enfrentar (Yonekura y col., 2009). A este respecto, diferentes enzimas microbianas con la capacidad de remover no sólo hipoxantina, sino también bases alquiladas han sido caracterizadas, agrupándose como parte de una familia que encabeza la proteína AlkA de *E. coli* (Mielecki y col., 2015) y otras más relacionadas a la alquil-adenina ADN-glicosilasa (AAG) de humano, en algunas de las cuales se ha revelado su capacidad para remover hipoxantina con gran eficiencia (Saparbaev y Laval, 1994). En este trabajo hemos estudiado el patrón de expresión de *aag*, que codifica un homólogo de la proteína AAG de humano y que previamente se demostró *in vitro* su capacidad preferente en la remoción de hipoxantina (Aamodt y col., 2004). Aquí encontramos mediante distintos enfoques experimentales que esta enzima está implicada en proteger el genoma de la espora en formación de los efectos mutagénicos de la desaminación y la alquilación de la adenina (Fig. 16, 17 y 18) y que la transcripción del gen *aag* y la síntesis de su producto proteico se dan durante etapas tardías del proceso diferenciativo de esporulación dentro del compartimento de la pre-espora (Fig. 11 y 12).

El proceso de transcripción durante la esporulación es una tarea orquestada por diferentes factores sigma de la ARN-polimerasa y la expresión de los genes de pre-espora es controlada por la acción secuencial de los factores σ^F y σ^G (Robleto y col., 2012). Cuando la transcripción de *aag* fue determinada en una cepa deficiente en *sigG*, los niveles de transcrito encontrados previamente en la preespora desaparecieron por completo, sugiriendo que la expresión de *aag* es regulada positivamente por dicho factor transcripcional. Es importante notar que mientras *katX* se transcribe divergentemente en relación a *aag* (Fig. 14 A), ambos genes comparten la misma región en la que la ARN-polimerasa puede iniciar la transcripción. Experimentalmente se ha sugerido que *katX* requiere un factor σ^F activo para ser expresado

(Bagyan y col., 1998), razón por la cual no descartamos la posibilidad de que la transcripción de *aag* pueda ser también regulada por σ^F , ya que niveles discretos en la actividad de β -galactosidasa dirigida por el promotor de *aag* en la cepa con el fondo genético $\Delta sigG$ pero proficiente en *sigF* fueron encontrados durante las etapas T₄-T₅ de la esporulación (Fig. 13 A). Sin embargo, la expresión de *aag* fue completamente restaurada cuando una copia del gen *sigG* fue complementada e inducida a transcribir durante el crecimiento vegetativo de la cepa deficiente en *sigG* (Fig. 13 B). Lo anterior nos motivó a proponer que *aag* es un nuevo miembro de la familia de genes que pertenecen al regulón σ^G en *B. subtilis*. De acuerdo con esta observación, el análisis por *primer extension* demostró experimentalmente que *aag* posee un promotor específico que podría funcionar con el factor de transcripción σ^G de la ARN-polimerasa (Figs. 14 B y 15 A). Estudios de transcriptómica reportados previamente no han considerado a *aag* como parte del regulón σ^G (Nicolas y col., 2012), sin embargo, nuestros resultados sugieren fuertemente que en efecto este gen es parte de la familia de genes que son preferencialmente expresados en el compartimento de la pre-espora. El hecho de que *aag* sea expresado en la pre-espora revela la importancia para *B. subtilis* de proteger su material genético de la desaminación y alquilación de bases durante la esporulación y probablemente durante las etapas tempranas en el retorno al crecimiento vegetativo de las esporas de esta bacteria.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y a los reportados por López-Olmos y col., en el 2012 se conoce que tanto *aag*, *ung* y *ywqL* son expresados durante la esporulación, por lo cual se propone que los tres genes anteriores están implicados en proteger a las esporas de la desaminación de bases. Para abordar este punto, se realizaron experimentos en los que esporas de *B. subtilis* deficientes en los genes *aag*, *ung*, y *ywqL*

fueron tratadas con ácido nitroso, el cual induce la desaminación de todas las bases (Sidorkina y col., 1997). Los resultados de este tratamiento mostraron que no existe diferencia significativa entre la cepa parental y las deficientes en *aag* y *ung*. Mientras que una doble mutante *ung aag* si lo es, aunque discretamente. No obstante, la sola interrupción de *ywqL* sensibilizó considerablemente a las células al ser tratadas con el ácido nitroso, mientras que al añadir la mutación en *aag* a la cepa deficiente en *ywqL* esta significancia no cambió. Finalmente, una triple mutante en *ung*, *ywqL* y *aag* fue todavía más sensible al tratamiento con ácido nitroso. Todo esto nos lleva a concluir que YwqL es la enzima que juega el papel más importante en remover las bases desaminadas, pudiéndose explicar quizás porque en el sistema AER, que inicia esta proteína, se pueden eliminar las tres bases que produce el estrés por especies reactivas de nitrógeno, mientras que las ADN-glicosilasas estudiadas solo son específicas para un solo tipo de base dañada, además de que existen diferencias en los patrones de expresión pues mientras que *ywqL* y *ung* se expresan en crecimiento vegetativo y esporulación, la transcripción de *aag* es específica de la pre-espora.

VIII. Conclusiones

- i) YwqL inicia la reparación por escisión alternativa (AER) cuando uracilo, hipoxantina, xantina o sitios AP se encuentran en el ADN.

- ii) La hipoxantina ADN-glicosilasa es sintetizada durante la esporulación tardía dentro del compartimento de la pre-espora y su expresión es dependiente del factor de transcripción σ^G de la ARN-polimerasa.

- iii) Aag y YwqL contribuyen a la protección de la integridad del ADN durante la esporulación de *B. subtilis*.

- iv) YwqL es el componente principal que contrarresta la desaminación de bases generada en esporas de *B. subtilis*.

IX. Perspectivas

- i) Cristalizar a YwqL en complejo con ADN dañado conteniendo las diferentes lesiones que se demostraron reconoce esta enzima en este estudio.
- ii) Evaluar la capacidad de YwqL para procesar ADN con otros tipos de lesiones como bases oxidadas, bifurcaciones, entre otras.
- iii) Determinar la posible interacción de YwqL con otras proteínas de reparación de ADN como UvrC del sistema NER, MutS y/o MutL del sistema de reparación de bases mal apareadas.

X. Anexos

Anexo 1.

Un extracto de *E. coli* conteniendo el plásmido vacío pQE30 tratado con las condiciones de purificación de His₆-YwqL no tuvo actividad de corte sobre las sondas de ADN con las lesiones probadas.

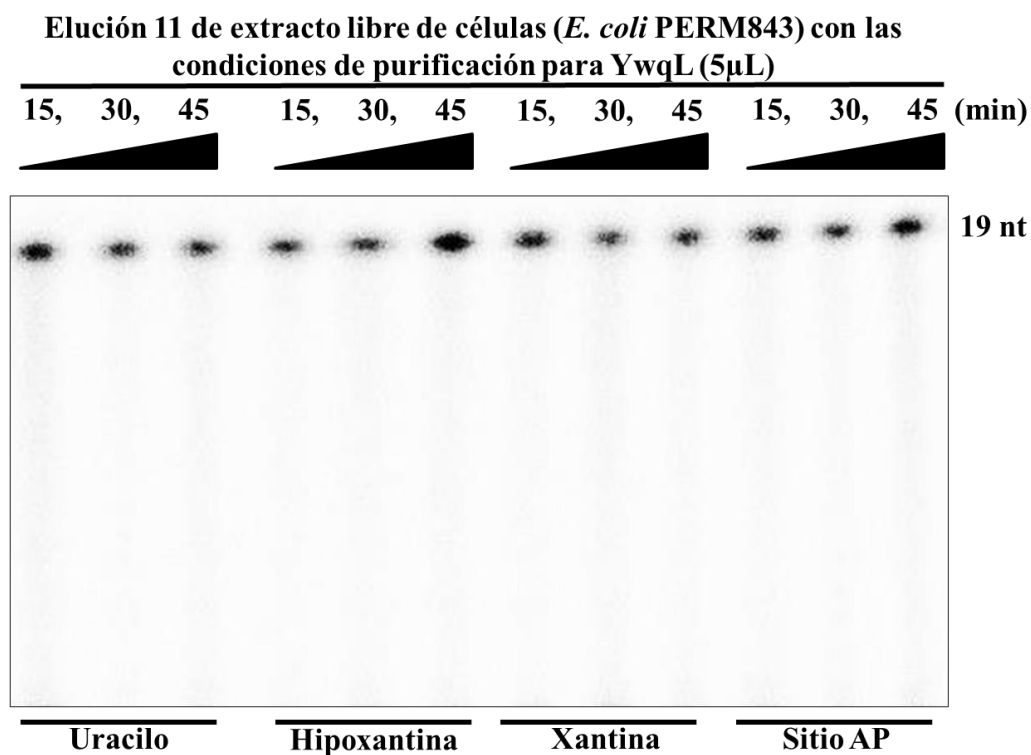


Fig. Anexo 1. Control negativo con un extracto de *E. coli* sometido a las condiciones de purificación establecidas para YwqL. Se realizaron reacciones control para promover el corte de ADN conteniendo las lesiones uracilo, hipoxantina, xantina o sitio AP usando el extracto libre de células de la cepa PERM843 sometido al proceso de purificación (5 µL) y 1×10^{-9} M de sustrato marcado radiactivamente incubadas a los tiempos de 15, 30 y 45 minutos. Los productos de las reacciones se separaron mediante electroforesis desnaturalizante y la actividad enzimática fue revelada tras la exposición de las muestras radiactivas en una pantalla de autoradiografía. Ninguna actividad de corte fue observada en todas las condiciones probadas.

Anexo 2.

Genes y sus secuencias promotoras de *B. subtilis* regulados por el factor σ^G de la ARN polimerasa. Las cajas -35 y -10 de la región promotora se muestran en rojo. Fuente: DBTBS; a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. (<http://dbtbs.hgc.jp/>)

Gen Regulado	Secuencia de unión	Evidencia experimental
<i>bofC</i>	ATAAAACGGTTAAGCAGTAGCCTCTTTGGTCAAACATAATC ATAAACG	Gomez M & Cutting SM (1997): PE RG
<i>csgA</i>	ATTTTTCGCGTATGGATTTTCCTATTTTAGCAAGCTATAG GGTAAAGATAGCA	Shchepetov M, et al. (1997): DB RG
<i>dacF</i>	GGCGTATAAAACCATCACGCTTGGAATAAAAGGA T	Schuch R & Piggot PJ (1994): DB RG OV
<i>exoA</i>	ND	Salas-Pacheco JM, et al. (2005): NB RG DB
<i>gerAA</i>	CACAGTATATCATTTTTTAACAGGAAAGATAACCTCTA C	Feavers IM, et al. (1990): RG PE
<i>gerBA</i>	TTTTCTCGATAAGAATAATTCTCTTTTTTGATACAAATT AATAAAAACCGTC	Corfe BM, et al. (1994): PE
<i>gerD</i>	GTTATGTATAATTCCAAACAGATGAATCATATTAAGGTA AGACAAGTATGTGAAAGGA	Kemp EH, et al. (1991): RG DB OV PE RO
<i>gerKA</i>	TAATGCATAATCTCAATTTTAAAAGGAAGAATATGAGAA AACGACAAGGAAAGG	Igarashi T & Setlow P (2006): 5'-RACE-PCR, RT-PCR, DB OV DP
<i>glcU</i>	TTCCGGCGAATAATCACAAATTCCAGCCAAAATAACA GCAAATAC	Rather PN & Moran CP Jr (1988): PE, promoter mutation
<i>gpr</i>	TTTAGCATGATTTATTTCAGCAAATGGCAACAATATAGGTA CT	Sussman MD & Setlow P (1991): RG PE DB OV, in-vitro transcription
<i>rsfA</i>	ND	Juan Wu L, et al. (2000): RG DB OV
<i>sigG</i>	GCAGTGCATATTTTCCCACCCAAGGAGATACTTAACGTT GTACAGCAGCTCCTGTAGG	Sun DX, et al. (1991): PE RG
<i>sleB</i>	AAAGAGTGTATAAAAATAACCTCGTTACAGAAAATACGA TTACACTT	Moriyama R, et al. (1999): NB PE HB DB
<i>splA</i>	TTTTTTCATAAGTAAGGGTATAGAAGGACACAATAACAT GGCT	Pedraza-Reyes M, et al. (1994): RG DB OV PE RO Pedraza-Reyes M, et al. (1997): SDM RG
<i>splB</i>	TACAACTCATATCCTTCCGCCTAGTGAGAAAAGTAAACGT TAGTA	Pedraza-Reyes M, et al. (1994): RG DB OV PE Pedraza-Reyes M, et al. (1997): DB RG OV
<i>spoIVB</i>	CAGTTATAAATAAGCCGTCAGAAGGCAAAATTAATGAT GTA	Gomez M, et al. (1996): PE DB RG
<i>spoVAA</i>	GATGAATGAGAACAATAATCGAACCCATACTACATATAT AACCACCGAAAGATGGTGA	Moldover B, et al. (1991): PE Sun DX, et al. (1989): DB RG
<i>spoVT</i>	GGTGTATATTACATTTGATGTGACGGATACTAATTCAAG	Bagyan I, et al. (1996): RG DB OV PE
<i>sspA</i>	TTCTGAATGAGCCATGTGTTTGACACATTCTATACTCA CAAGGAGGTGA	Nicholson WL, et al. (1989): PE RO, nuclease protection
<i>sspB</i>	CTCCGATGATTTTCCGGCCATTTAACATAATACGTAGT AACAAAGC	Fajardo-Cavazos P, et al. (1991): PE, promoter mutations, RG Nicholson WL, et al. (1989): PE RO
<i>sspC</i>	GCGTGTATAAATTAATAATCTCTCCATAATATGATTCA AACAAAG	Nicholson WL, et al. (1989): nuclease protection, RO
<i>sspD</i>	GCCAGCATAAATAAACCCGTATATTTCAAATAAATACG CGTTAAG	Nicholson WL, et al. (1989): nuclease protection, RO
<i>sspE</i>	AGAGGAATAGCTATACGATCACCTGCACATTCTAATGACC GTGGAGGTGA	Fajardo-Cavazos P, et al. (1991): PE, promoter mutations, RG

		Nicholson WL, et al. (1989): PE, nuclease protection, RO Sun DX, et al. (1989): RO, nuclease protection, SDS-PAGE, RG, RNAP purification, in-vitro transcription
<i>sspF</i>	TTT AACGAAA GTTCCATCTGATTTAA CAAAAGAT AAAAACA GTCACATATTA	Stephens MA, et al. (1984): S1 DP RG DB
<i>sspH</i>	TAAAG GCATA CTTCCTTCAGGAAATGGAA ACGTTA TGTATT GA	Cabrera-Hernandez A, et al. (1999): PE RG
<i>sspI</i>	AGAACAGC ACATA AATAAACAGGTGCAGGGT TAGAATAT ACGTATTA	Cabrera-Hernandez A & Setlow P (2000): PE
<i>sspI</i>	ACATGAT GTTATT TATATCGCAAGAACAGC ACATAATA AAAC CAGGTGC	Cabrera-Hernandez A & Setlow P (2000): PE
<i>sspJ</i>	TATCC GCATA AATTTTTCAGGAAAAAG GCATCTTA AAACAT GTA	Bagyan I, et al. (1998): DB OV PE RG
<i>sspK</i>	TAACGCT TTATT ACGTGGTGTCTCCATATA ACTAACCTTAC GTCCTC	Cabrera-Hernandez A & Setlow P (2000): PE
<i>sspL</i>	AAAA GAATT AAATCTTGATCATTGGTT CATCCTA ATGGCG AGGTGAAC	Cabrera-Hernandez A, et al. (1999): PE RG DB OV
<i>sspM</i>	AAAAAT GTATG ATCCTCCTCATTAATGCA ACGATACTT GTGAGGA	Cabrera-Hernandez A & Setlow P (2000): PE
<i>sspN</i>	GTAT TCATG TTTACCCTCCTTTTGAG AAACCTA TCTGTTG AGGAGGGATAAA	Cabrera-Hernandez A, et al. (1999): PE DB OV RG
<i>sspO</i>	GCTCT TCATA TAAACAATAAAAGAAGCCAT TATTATG AT TGAGGTGAT	Cabrera-Hernandez A & Setlow P (2000): PE
<i>ybaK</i>	AATTCGG GCATT GTTTCATCATCCAAACCT CAAAATA ATC GGTAAAA	Sekiguchi J, et al. (1995): PE NB DB
<i>yckD</i>	TTAT GCATA AAAAATACAAGGCAGCA AAACATA TGAAAA ATAGGATTGGAGGAATAAAATGGATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>ydfR</i>	GACAG AATG AACCGACTGCCTTTCGGAT TATATTA AAATTGC GATTGGCCGGAAGAAAAGCCAATCCCATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>ydfS</i>	CGAA CAATA TTTTTGGTATAGATGGA TATATTA AGCCAAA CAATGATAGCA	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yfiS</i>	ND	Fukushima T, et al. (2002): RG NB
<i>yfkD</i>	ND	Kuwana R, et al. (2002): SDS-PAGE, RG
<i>yhcN</i>	TTTGCAT GCATA AATTAAGCCAGTTAGAAA AACTATA AG TAAAGTG	Bagyan I, et al. (1998): PE DB OV RG
<i>yhcQ</i>	TTCT GCATA AATACACGGCAGACTGAC CAAAATAC AGCT GATCTGAAAAAAAGGAGGAATTCGGTTTTG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yhcV</i>	CCCT TTTTA ACGGCTCGTGTCTGAA CATACTA ATGATTG AAAGGGGTGCTGACAATG	Kuwana R, et al. (2002): SDS-PAGE, RG Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yisY</i>	ND	Kuwana R, et al. (2002): SDS-PAGE, RG
<i>yitG</i>	CGCT GAATA AACGAAGCCATCAGGG CATTCTA AGCAGA AGAAAAGGAGTGTGCTCTGAGATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>ykvV</i>	AAG GGATG ATAAAGGAACAGCAGGGG CAAGCTA ATTGAA AAGC	Imamura D, et al. (2004): NB PE RG, immunoblot analysis
<i>ylaI</i>	ND	Kuwana R, et al. (2002): SDS-PAGE, RG
<i>yndD</i>	ACGA ACATA AAAAATAGGTATACGGG AAAAATA ATCCTA TTAGAGA	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yoaR</i>	AAAT ACATC AAAGGATAAGCGGCTGTT CATACTA ATGATT GGGAGGTAAACCGACTTATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yoZQ</i>	AAGT GCATG AATACCTGCCAACAG ACAGAATA AAGAAGA GTTGATATT	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>ypzA</i>	GGT ACATAA ATTTCAAAAAAACTCTG CAAAATA ATGGCG GAGGTGTTTTTTGTTG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yqfS</i>	AGCCT GGGTAT AAAAAGAAAATGAGCT TATGAGAT GGGAGA AAATCA	Úrtiz-Estrada N, et al. (2003): PE NB RT-PCR
<i>yraG</i>	TTCT GATGCTT CAACTTCATTTCCGGG AAATGTA ACGTTG ATAAAAGGAGGTTACATCAATATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yrrD</i>	CAT CGTATG AGTCTAAGGCGCAAAGCA AAACCTA AAGCCT GTTCAACAAAAGGTG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yteA</i>	TTAT GAAAGT TTCTCAGCGATCTGTT CATACTA AAAGGTAT GCATCACAGAGAAACGAGGCGATCACATTG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yuzA</i>	GCAT GATATAG ATTCTCCAATATGC CAATCTA TAACTGT TTAATAAATTCATGGAGGAGGTTGCAAAACATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR

<i>yvaB</i>	GACAGAATAATCATTATGCATCTGTATGATAATAATTGAT GTGTGATTTTTAAAAACGAAAGGGCTGGTAAAAATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yvdP</i>	ND	Kuwana R, et al. (2002): SDS-PAGE, RG
<i>yvdQ</i>	GAAACATAAATGTTCCCTCCGCTTGGGCACGTTATGAAATG TGCAATATTGAATATGGGAGGAGAATGAGCATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yveA</i>	AGCGTATTCTCTGTTACATATTGGGCATTGTAAGGAATA TAAGG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>yvjB</i>	GATTACATGAAATCTCCATCCTTTACATATACTATCTCTAG GTTTTGGTAAAG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR
<i>ywhE</i>	TTCTGCGATGTTTAAAAACGATCTTTTTTCTCATAATAGT AGAAA	Pedersen LB, et al. (2000): RG PE
<i>yxeD</i>	GACGGAATTCTTTTCATTCAAGTTGCATGATAATACCGA CTCACGCAATCGATACATGGAGGGATCATTATG	Wang S, et al. (2006): AR, Race-PCR

Anexo 3.

Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de enzimas Endo V de diferentes organismos.

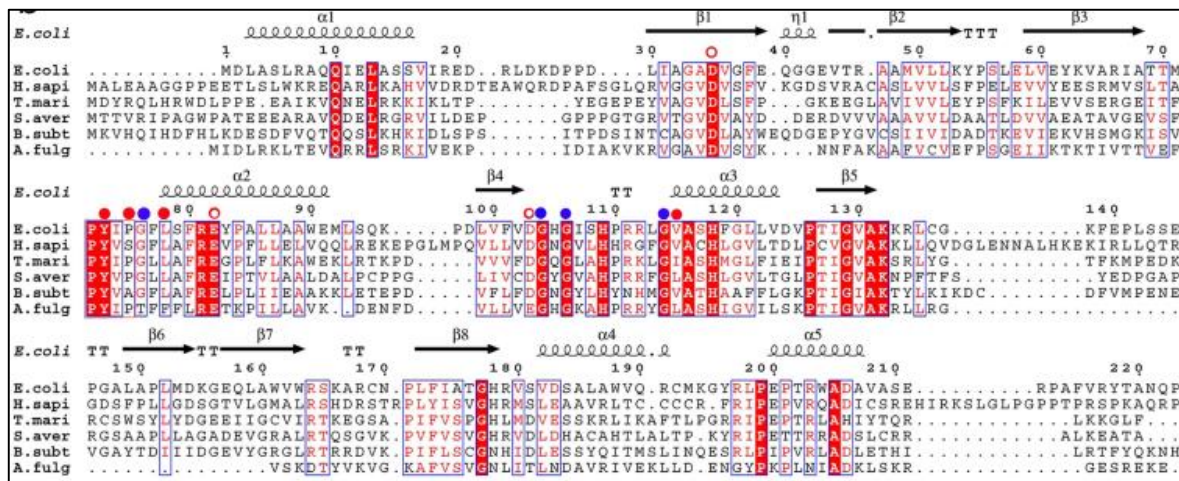


Fig. Anexo 3. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de distintas endonucleasas V. Las secuencias comparadas pertenecen (en orden descendente) a *E. coli*, *H. sapiens*, *T. maritima*, *S. avermitilis*, *B. subtilis* y *A. fulgidus*. Los círculos cerrados en rojo indican los residuos hidrofóbicos que forman la bolsa de reconocimiento para hipoxantina. Los círculos cerrados en azul representan los residuos de glicina esenciales para la formación de puentes de hidrogeno con la base dañada. Los círculos abiertos en rojo indican el motivo DED de unión a Mg^{2+} . Residuos idénticos entre las diferentes enzimas son resaltados con barras en rojo. Residuos similares se resaltan con cajas en azul. Tomado de Zhang y col., 2015.

XI. Referencias

- **Aamodt RM, Falnes PO, Johansen RF, Seeberg E, Bjørås M (2004).** The *Bacillus subtilis* counterpart of the mammalian 3-methyladenine DNA glycosylase has hypoxanthine and 1,N6-ethenoadenine as preferred substrates. *J Biol Chem*, **279(14)**, 13601-13606.
- **Ámbriz-Aviña V (2016).** Mutagénesis asociada a la transcripción en poblaciones de células de *Bacillus subtilis* sin división y deficientes de reparación de ADN. Tesis de doctorado. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto.
- **Ayala-García VM (2012).** Expresión heteróloga y papel de la endonucleasa V (YwqL) en la resistencia de esporas de *B. subtilis* al estrés producido por la desaminación de DNA. Tesis de Maestría. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto.
- **Bagyan I, Casillas-Martínez L, Setlow P (1998).** The katX gene, which codes for the catalase in spores of *Bacillus subtilis*, is a forespore-specific gene controlled by sigmaF, and KatX is essential for hydrogen peroxide resistance of the germinating spore. *J Bacteriol*, **180(8)**, 2057-2062.
- **Baños B, Lázaro JM, Villar L, Salas M, de Vega M (2008).** Characterization of a *Bacillus subtilis* 64-kDa DNA polymerase X potentially involved in DNA repair. *J Mol Biol*, **384(5)**, 1019-1028.
- **Baños B, Villar L, Salas M, de Vega M (2010).** Intrinsic apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease activity enables *Bacillus subtilis* DNA polymerase X to recognize, incise, and further repair abasic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107(45)**, 19219-19224.
- **Barajas-Ornelas RC, Ramírez-Guadiana FH, Juárez-Godínez R, Ayala-García VM, Robleto EA, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M (2014).** Error-prone processing of apurinic/aprimidinic (AP) sites by PolX underlies a novel mechanism that promotes adaptive mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **196(16)**, 3012-3022.
- **Barnes DE, Lindahl T (2004).** Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet*, **38**, 445-476.
- **Boylan RJ, Mendelson NH, Brooks D, Young FE (1972).** Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J Bacteriol*, **110(1)**, 281-290.

- **Campos SS, Ibarra-Rodríguez JR, Barajas-Ornelas RC, Ramírez-Guadiana FH, Obregón-Herrera A, Setlow P, Pedraza-Reyes M (2014).** Interaction of apurinic/aprimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *J Bacteriol*, **196(3)**, 568-578.
- **Cao W (2012).** Endonuclease V: an unusual enzyme for repair of DNA deamination. *Cell Mol Life Sci*, **70(17)**, 3145-3156.
- **Chen H, Shaw BR (1993).** Kinetics of bisulfite-induced cytosine deamination in single-stranded DNA. *Biochem J*, **32(14)**, 3535-3539.
- **Chernikov AV, Gudkov SV, Shtarkman IN, Bruskov VI (2007).** Oxygen effect in heat-induced DNA damage. *Biophysics*, **52(2)**, 185-190.
- **Choi PS, Naal Z, Moore C, Casado-Rivera E, Abruna HD, Helmann JD, Shapleigh JP (2006).** Assessing the impact of denitrifier-produced nitric oxide on other bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **72(3)**, 2200-2205.
- **Chou KM, Cheng YC (2003).** The exonuclease activity of human apurinic/aprimidinic endonuclease (APE1). Biochemical properties and inhibition by the natural dinucleotide Gp4G. *J Biol Chem*, **278(20)**, 18289-18296.
- **Clancy S (2008).** DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. *Nature Education* 1(1).
- **Crooks GE, Hon G, Chandonia, JM, Brenner SE. (2004).** WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*, **14(6)**, 1188-1190.
- **Dalhus B, Laerdahl JK, Backe PH, Bjørås M (2009).** DNA base repair--recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiol Rev*, **33(6)**, 1044-1078.
- **Dalhus B, Arvai AS, Rosnes I, Olsen ØE, Backe PH, Alseth I, Gao H, Cao W, Tainer JA, Bjørås M (2009).** Structures of endonuclease V with DNA reveal initiation of deaminated adenine repair. *Nat Struct Mol Biol*, **16(2)**, 138-143.
- **De Hoon MJ, Eichenberger P, Vitkup D (2010).** Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol*, **20(17)**, 735-745.

- **Duncan BK, Weiss B (1982).** Specific mutator effects of ung (uracil-DNA glycosylase) mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **151(2)**, 750-755.
- **Earl AM, Losick R, Kolter R (2007).** *Bacillus subtilis* genome diversity. *J Bacteriol*, **189(3)**, 1163-1170.
- **Errington J (1993).** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev*, **57(1)**, 1-33.
- **Fang FC (2004).** Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Rev Microbiol*, **2(10)**, 820-832.
- **Feng H, Klutz AM, Cao W (2005).** Active site plasticity of endonuclease V from *Salmonella typhimurium*. *Biochem*, **44(2)**, 675-683.
- **Friedberg EC (2003).** DNA damage and repair. *Nature*, **421**, 436-440.
- **Friedberg EC, Walker GC, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006).** DNA Repair and Mutagenesis, 2nd. edn. American Society of Microbiology. Washington, DC.
- **Fukushima S, Itaya M, Kato H, Ogasawara N, Yoshikawa H (2007).** Reassessment of the in vivo functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *J Bacteriol*, **189(23)**, 8575-8583.
- **Funchain P, Yeung A, Stewart JL, Lin R, Slupska MM, Miller JH (2000).** The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness. *Genetics*, **154(3)**, 959-970.
- **Gates FT 3rd, Linn S (1977).** Endonuclease V of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **252(5)**, 1647-1653.
- **Grossman AD (1995).** Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet*, **29**, 477-508.
- **Haldenwang WG (1995).** The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev*, **59(1)**, 1-30.
- **He B, Qing H, Kow YW (2000).** Deoxyxanthosine in DNA is repaired by *Escherichia coli* endonuclease V. *Mutat Res*, **459(2)**, 109-114.
- **Hilbert DW, Piggot PJ (2004).** Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68(2)**, 234-262.
- **Hill-Perkins M, Jones MD, Karran P (1986).** Site-specific mutagenesis in vivo by single methylated or deaminated purine bases. *Mutat Res*, **162(2)**, 153-163.

- **Hitchcock TM, Gao H, Cao W. (2004).** Cleavage of deoxyoxanosine-containing oligodeoxyribonucleotides by bacterial endonuclease V. *Nucleic Acids Res*, **32(13)**, 4071-4080.
- **Huang J, Lu J, Barany F, Cao W (2002).** Mutational analysis of endonuclease V from *Thermotoga maritima*. *Biochem*, **41(26)**, 8342-8350.
- **Ibarra JR, Orozco AD, Rojas JA, López K, Setlow P, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M (2008).** Role of the Nfo and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, **190(6)**, 2031-2038.
- **Kimura S, Sakaguchi K (2006).** DNA repair in plants. *Chem Rev*, **106(2)**, 753-766.
- **Kow YW (2002).** Repair of deaminated bases in DNA. *Free Radic Biol Med*, **33(7)**, 886-893.
- **Krokan HE, Standal R, Slupphaug G (1997).** DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*, **325 (1)**, 1-16.
- **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S y 141 autores (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390(6657)**, 249-256.
- **Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- **Lenhart JS, Schroeder JW, Walsh BW, Simmons LA (2012).** DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **76(3)**, 530-564.
- **Lindahl T (1974).** An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **71(9)**, 3649-3653.
- **Lindahl T (1979).** DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/aprimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **22**, 135-192.
- **Lindahl T, Barnes DE (2000).** Repair of endogenous DNA damage. En Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. Vol. 65, pp. 127-134. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **López-Olmos K, Hernandez MP, Contreras-Garduno JA, Robleto EA, Setlow P, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M (2012).** Roles of endonuclease V, uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA base-deamination-induced mutagenesis. *J Bacteriol*, **194(2)**, 243-252.

- **Losick R, Stragier P (1992).** Crisscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature*, **355(6361)**, 601-604.
- **Losick R, Youngman P, Piggot PJ (1986).** Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet*, **20**, 625-669.
- **Mason JM, Fajardo-Cavazos P, Setlow P (1988).** Levels of mRNAs which code for small, acid-soluble spore proteins and their *lacZ* gene fusions in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res*, **16**:6567–6583.
- **Mi R, Abole AK, Cao W (2011)** Dissecting endonuclease and exonuclease activities in endonuclease V from *Thermotoga maritima*. *Nucleic Acids Res*, **39(2)**, 536-544.
- **Mielecki D, Wrzesinski M, Grzesiuk E (2015).** Inducible repair of alkylated DNA in microorganisms. *Mutation research Reviews in mutation research*, **763**, 294-305.
- **Miller, JH (1972).** Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Página 433.
- **Nicholson WL, Sun, DX, Setlow, B, Setlow, P (1989).** Promoter specificity of sigma G-containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: identification of a group of forespore-specific promoters. *J Bacteriol*, **171(5)** 2708-2718.
- **Nicholson WL, Setlow P (1990).** Sporulation, germination and outgrowth, p 391–450. En Harwood CR, Cutting SM (ed), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Sussex, England
- **Nicolas P, Mader U, Dervyn E, Rochat T, Leduc A, Pigeonneau N, Bidnenko E, Marchadier E, Hoebeke M, Aymerich (2012).** Condition-dependent transcriptome reveals high-level regulatory architecture in *Bacillus subtilis*. *Science*, **335(6072)**, 1103-1106.
- **Prakash S, Sung P, Prakash L (1993).** DNA repair genes and proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **27(1)**, 33-70.
- **Pedraza-Reyes M, Ramírez-Ramírez N, Vidales-Rodríguez LE, Robleto EA (2012).** Mechanisms of bacterial spore survival. En *Bacterial spores, current research and applications*. Capítulo 6, páginas 73-87. Caister academic press. Norfolk, UK.

- **Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Ornelas RC, Ayala-García VM, Yasbin RE, Robleto E, Pedraza-Reyes M (2013).** Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Mol Microbiol*, **90(5)**, 1088-1099.
- **Robleto EA, Martin HA, Pepper AM, Pedraza-Reyes M (2012).** Gene regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*. En *Bacterial spores, current research and applications*. Capitulo 2, páginas 9-17. Caister academic press. Norfolk, UK.
- **Salas-Pacheco JM, Urtiz-Estrada N, Martínez-Cadena G, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M. (2003).** YqfS from *Bacillus subtilis* is a spore protein and a new functional member of the type IV apurinic/aprimidinic-endonuclease family. *J Bacteriol*, **185(18)**, 5380-5390.
- **Salas-Pacheco JM, Setlow B, Setlow P, Pedraza-Reyes M (2005).** Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage. *J Bacteriol*, **187(21)**, 7374-7381.
- **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- **Saparbaev M, Kleibl K, Laval J (1995).** *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N6-etheno adenine when present in DNA. *Nucleic Acids Res*, **23(18)**, 3750-3755.
- **Saparbaev M, Laval J (1994).** Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91(13)**, 5873-5877.
- **Schaeffer P, Millet J, Aubert JP (1965).** Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **54**, 704-711.
- **Setlow P (1995).** Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu Review Microbiol*, **49**, 29-54.
- **Shapiro R (1981).** Damage to DNA caused by hydrolysis. En *Chromosome Damage and Repair*. p.3-12. Plenum Publishing Corp., New York.
- **Shapiro R, Pohl SH (1968).** The reaction of ribonucleosides with nitrous acid. Side products and kinetics. *Biochem*, **7(1)**, 448-455.

- **Shapiro R, Shiuey SJ (1969).** Reaction of nitrous acid with alkylaminopurines. *Biochim Biophys Acta*, **174(1)**, 403-405.
- **Sidorkina O, Sapparbaev M, Laval J (1997).** Effects of nitrous acid treatment on the survival and mutagenesis of *Escherichia coli* cells lacking base excision repair (hypoxanthine-DNA glycosylase-ALK A protein) and/or nucleotide excision repair. *Mutagen*, **12(1)**, 23-28.
- **Sierro N, Makita Y, De Hoon MJL, Nakai K (2008).** DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic Acids Res.* **36** (Database issue):D93-D96.
- **Sinha RP, Häder DP (2002).** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*, **1(4)**, 225-236.
- **Steil L, Serrano M, Henriques AO, Volker U (2005).** Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, **151(2)**, 399-420.
- **Sun DX, Stragier P, Setlow P (1989).** Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, **3(2)**, 141-149.
- **Sung HM, Yasbin RE (2002).** Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **184(20)**, 5641-5653.
- **Tennen R, Setlow B, Davis KL, Loshon CA, Setlow P (2000).** Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *J App Microbiol*, **89(2)**, 330-338.
- **Wang ST, Setlow B, Conlon EM, Lyon JL, Imamura D, Sato T, Setlow P, Losick R, Eichenberger P (2006).** The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, **358(1)**, 16-37.
- **Yao M, Hatahet Z, Melamede RJ, Kow YW (1994).** Deoxyinosine 3' endonuclease, a novel deoxyinosine-specific endonuclease from *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci*, **726**, 315-316.
- **Yao M, Kow YW (1996).** Cleavage of insertion/deletion mismatches, flap and pseudo-Y DNA structures by deoxyinosine 3'-endonuclease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **271(48)**, 30672-30676.

- **Yonekura SI, Nakamura N, Yonei S, Zhang-Akiyama QM. (2009).** Generation, biological consequences and repair mechanisms of cytosine deamination in DNA. *J Radiat Res*, **50**,19–26.
- **Zhang Z, Jia Q, Zhou C, Xie W. (2015).** Crystal structure of *E. coli* endonuclease V, an essential enzyme for deamination repair. *Sci Rep*, **5**.
- **Zhao B, O'Brien PJ (2011).** Kinetic mechanism for the excision of hypoxanthine by *Escherichia coli* AlkA and evidence for binding to DNA ends. *Biochem*, **50(20)**, 4350-4359.
- **Zinser ER, Kolter R (1999).** Mutations enhancing amino acid catabolism confer a growth advantage in stationary phase. *J Bacteriol*, **181(18)**, 5800-5807.