

SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA Y HETERÓLOGA DE LA DNA FOTOLIASA DE *ESCHERICHIA COLI*

Estrada Ramirez, Juan Carlos (1), Corona Bautista, Saúl Uriel (2), Pedraza Reyes, Mario (2).

1 [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo] | jcer.92@gmail.com

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

Resumen

La luz ultravioleta (UV) tiene el potencial de impactar el ADN de los seres vivos provocando lesiones, conocidas como dímeros de pirimidina (CPDs). Distintos organismos, pero no los humanos, poseen una enzima especializada capaz de reconocer y revertir dichas lesiones, denominada ADN fotoliasa. Dicha actividad es codificada en el gen *phr* de *Escherichia coli*, la capacidad de fotorreactivación de esta enzima es estrictamente dependiente de la presencia de los cofactores FADH y 5,10-MTHF. Con el propósito de generar cantidades abundantes de esta proteína, potencialmente útil en el tratamiento de lesiones pre-cancerígenas inducidas por la luz solar se implementó una estrategia para generar una construcción capaz de sobreexpresar homológamente el gen *phr* en *E. coli*.

Abstract

Ultraviolet light (UV) impact the genome of all living forms generating DNA lesions termed cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs). Many organisms, but not the humans, possess a protein that specifically recognize and revert these lesions named DNA photolyase. This enzyme requires two chromophores, i.e., FADH and 5-10-MTHF to exhibit photoreactivation activity and is encoded in the *phr* gene of *Escherichia coli*. With the purpose of generating high amounts of this enzyme, potentially useful in the treatment of pre-carcinogenic lesions promoted by solar light, a strategy was implemented to generate a construct to overexpress in a homologous genetic background the *phr* gene of *E. coli*.

Palabras Clave

phr; Luz UV; dímeros pirimidínicos de ciclobutano (CPDs); ADN fotoliasa.

INTRODUCCIÓN

La radiación ultravioleta (UV) de la luz solar puede inducir daños en el ADN. La luz ultravioleta-C (UV-C) es retenida por la ozono; sin embargo la luz ultravioleta-B (UV-B) incide sobre la superficie de la tierra y los organismos son blancos potenciales de este factor [1]. Por lo tanto, la capacidad de percibir adecuadamente y responder a los efectos dañinos de la luz solar es esencial para el crecimiento, desarrollo y evolución de los mismos [2]. Las principales lesiones causadas por la luz UV-B son los dímeros pirimidínicos de ciclobutano (CPDs) [1], los cuales se forman por una cicloadición [2+2] usualmente entre timinas [3, 4].

Las ADN fotoliasas son enzimas que revierten directamente el enlace covalente que se ha formado entre las dos pirimidinas adyacentes restableciendo los monómeros originales de pirimidina [1]. Esta clase de enzimas pertenecen a la gran familia de fotoliasas/criptocromos las cuales se encuentran ampliamente distribuidas en los tres reinos de la vida [1] (pero no en los mamíferos placentarios, por ejemplo, humanos) [3], y estas se pueden dividir en 3 clases según su función: CPD-fotoliasa (Clase I) y (6-4)PP-fotoliasa (clase II), por último están los criptocromos que no son propiamente una fotoliasa [1,5].

El criterio para saber si se trata de una fotoliasa está basado en la similitud de su secuencia de aminoácidos, aunque la clase I y II son notablemente diferentes en su secuencia de aminoácidos ambas se reconocen y reparan el mismo tipo de lesión del ADN. Las fotoliasas de clase I se encuentran en muchos microorganismos, mientras que las de clase II se han identificado principalmente en organismos superiores, pero también en arqueobacterias, eubacterias y algas unicelulares [6].

El mecanismo de reparación denominado fotorreactivación es activado por luz visible en el rango 330-480 nm. La primer CPD-fotoliasa en ser identificada fue la proteína Phr de *Escherichia coli*; esta proteína de 49 kDa [1] contiene dos cofactores: 5,10-metiltetrahidrofolato (MTHF) que absorbe cerca del 90% de la luz visible, mientras el flavin adenín dinucleótido en su forma reducida (FADH⁻) revierte catalíticamente el daño [7,8].

El mecanismo de fotorreactivación ocurre en dos etapas:

- i) Se forma un complejo entre la enzima y el dímero. Este paso no requiere de luz, pero es dependiente de temperatura, pH y fuerza iónica.
- ii) Monomerización de los CPDs en una reacción que es activada por la luz visible. Un periodo prolongado de exposición a la luz fotorreactivadora permite la liberación de la enzima, la cual podrá participar en la formación de nuevos complejos de fotorreactivación [7].

En el presente trabajo reportamos el diseño molecular y obtención de una cepa de *E. coli* Rosetta conteniendo una construcción para sobreexpresar al gen *phr* de *E. coli* DH5 α .

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos, oligonucleótidos y medios de crecimiento

En la tabla 1 se muestra las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio. El medio de cultivo empleado para lograr el crecimiento y propagación de las cepas fue Luria-Bertani (LB) [9].

Tabla 1. Cepas y plásmidos usados en este estudio

Cepa o plásmido	Descripción	Referencia
PERM100	<i>E. coli</i> DH5 α .	Cepario del Lab. del Dr. M. Pedraza-Reyes.
PERM1156	<i>E. coli</i> Rosetta; Cm ^R .	Cepario del Lab. del Dr. M. Pedraza-Reyes.
PERM1528	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo la construcción pJET1.2/blunt con el ORF del gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> DH5 α ; Amp ^R .	Este estudio
PERM1536	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo la construcción pET28b con el ORF del gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> DH5 α ; Kn ^R .	Este estudio

PERM1537	<i>E. coli</i> Rosetta conteniendo la construcción pET28b con el ORF del gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> DH5 α ; Cm ^R , Kn ^R .	Este estudio
pJET1.2/blunt	Vector de clonación; Amp ^R	Fermentas
pPERM1325	pET28b, Vector de expresión; Kn ^R	Cepario del Lab. del Dr. M. Pedraza-Reyes.
pPERM1528	pJET1.2/blunt con ORF del gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> .	Este estudio
pPERM1536	pET28b conteniendo el ORF del gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> DH5 α insertado entre los sitios de restricción XhoI y NcoI; Kn ^R .	Este estudio

Amplificación del gen *phr* de *E. coli*

Se utilizó como templado el ADN genómico de *E. coli* DH5 α y los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2 para lograr amplificar un fragmento de 1661 bp conteniendo el ORF del gen *phr*. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador y se empleó Vent DNA polimerasa, en este caso, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (New England BioLabs). La obtención del producto de deseado de PCR se corroboró en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Tabla 2. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Descripción
372	CGGGATCCATG ACTACCCATCT GGTCTG	Oligonucleótido directo para amplificar el gen <i>phr</i> de <i>E. coli</i> , con sitio de corte BamHI
373	ATCAGTACCAG TCCTACAC	Oligonucleótido reverso para amplificar el gen <i>Phr</i> de <i>E. coli</i> con sitio de corte BamHI

Construcción del vector y transformación de células competentes

Para generar el plásmido pPERM1528 se utilizó el producto de PCR y el vector pJET1.2/blunt y para

la construcción del plásmido pPERM1536 se liberó el gen *phr* del plásmido pPERM1528 con las enzimas de restricción XhoI y NcoI, así mismo se cortó el plásmido pPERM1325 con las mismas enzimas de restricción, posteriormente se llevó a cabo la ligación de *phr* en el vector pET28b.

La preparación de las células de *E. coli* competente se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell [9]. Las células transformantes fueron seleccionadas mediante un marcador de resistencia a Ampicilina, Kanamicina o Cloranfenicol y Kanamicina conforme a lo descrito en la Tabla 1 y corroboradas por restricción con XhoI y NcoI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del gen *phr* de *E. coli*

Para obtener en grandes cantidades el gen de interés, *phr*, se siguió el protocolo de amplificación descrito anteriormente. En la Figura 1 se puede observar la obtención de un fragmento mayoritario de 1661 pb, correspondiente con el tamaño esperado.

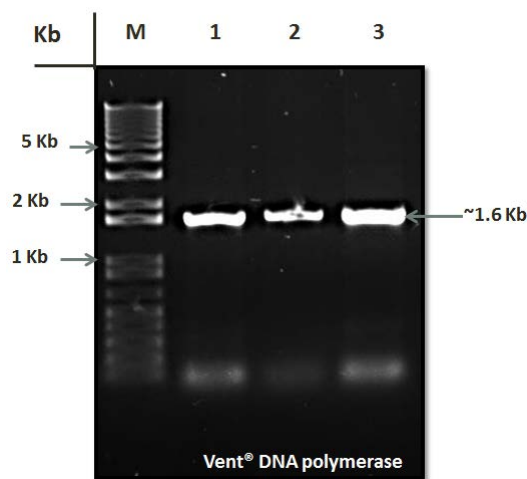


Figura 1. Gel de Agarosa al 1%, en el cual se observan productos de la amplificación del gen *phr*, a distintas temperaturas de alineamiento; en todos los casos se observa un producto mayoritario de aproximadamente 1661 bp. M, marcadores de peso molecular, 1, 2 y 3 representan la reacción de amplificación a diferentes temperaturas, 60, 63 y 66 °C respectivamente.

Construcción del vector y transformación de células competentes

Siguiendo el protocolo ya descrito en Materiales y Métodos, el producto de amplificación de PCR se clonó en pJET1.2/blunt. Una colonia transformante de *E. coli* conteniendo la construcción de interés, Figura 2, fue verificada mediante análisis de restricción con las enzimas *Nco*I y *Xho*I. El patrón de restricción esperado se muestra en la Figura 3.

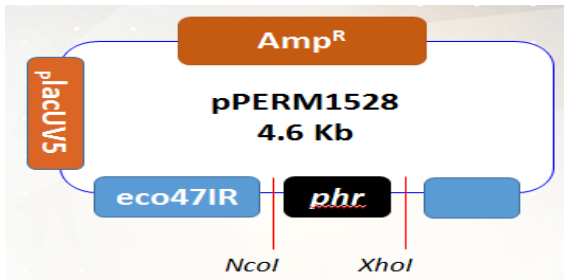


Figura 2. Construcción del plásmido pPERM1528 conteniendo el gen *phr* clonado en pJET1.2/blunt.

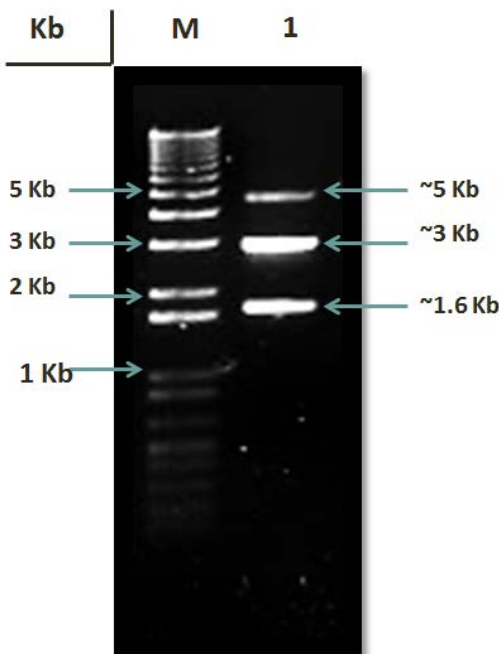


Figura 3. Análisis de la restricción del plásmido pPERM1528 utilizando las enzimas *Nco*I y *Xho*I, observándose la liberación del fragmento del gen de *phr* (1661 bp), pJET1.2/blunt vacío (~3000 pb) y también se observa plásmido sin cortar (~5000 pb).

A continuación el ORF de *phr* liberado de pPERM1528 con las enzimas *Nco*I y *Xho*I se ligó en el vector pET28b como se describió en Materiales y Métodos. Distintas colonias transformantes conteniendo la construcción correcta (pPERM1536; Figura 4), se muestran en la Figura 5.

Finalmente, el plásmido pPERM1536 se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta (PERM1537), un huésped que puede expresar y traducir apropiadamente genes con codones raros. Estudios posteriores nos permitirán verificar la capacidad de estas transformantes para sobreexpresar y producir altas cantidades de enzima Phr.

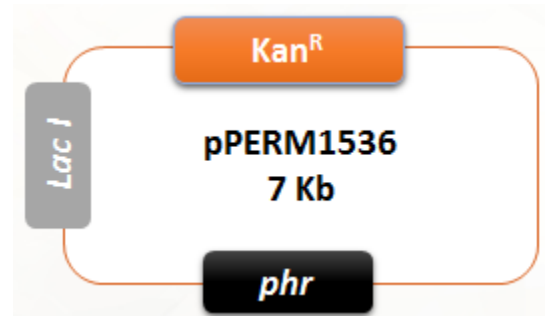


Figura 4. Construcción del plásmido pPERM1325 conteniendo el gen *phr* y utilizando el vector pET28b.

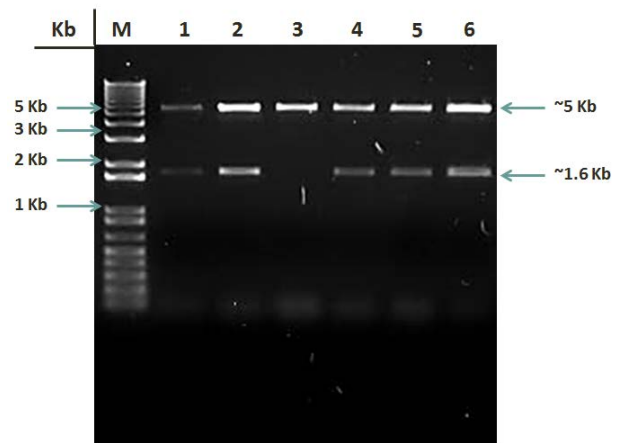


Figura 5. Análisis de la restricción del plásmido pPERM1536 utilizando las enzimas *Xho*I y *Nco*I, observándose la liberación del gen Phr (1661 bp) y el vector pPERM1325 (~5300 bp).

CONCLUSIONES

Se diseñó una construcción para sobreexpresar de manera homóloga del gen *phr* de *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CONACYT (Grants 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (Grants 602-2015, 936-2016 and 1090-2016). Juan Carlos Estrada Ramirez agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de su estancia de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Goosen, N., Moolenaar, G. F. (2008). Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair*, 7: 353-379.
- [2] Oliveri, P., et al. (2014). The cryptochrome/photolyase family in aquatic organisms. *Marine Genomics*, 14: 23-37.
- [3] Brettel, Klaus., Byrdin, M. (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology*, 20:693-701.
- [4] Decome, L., et al. (2005). Evaluation of photolyase (Photosome®) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79: 101-108.
- [5] Sancar, G. B. Sancar, A. (2006). Purification and characterization of DNA photolyases. *Methods in Enzymology*, Vol. 408. (pp. 121-156).
- [6] Okafuji, A., et al. (2010). Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases. *DNA Repair*, 9: 495-505.
- [7] Vélez-Colmenares, J.J., et al. (2012). New kinetic model for predicting the photoreactivation of bacteria with sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117: 278-285.
- [8] Xu, L., Zhu, G. (2010). The Roles of several residues of *Escherichia coli* DNA photolyase in the highly efficient photo-repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Journal of Nucleic Acids*, 1: 1-7.
- [9] Sambrook J. y Russel D. W., (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y.