

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FISIOLÓGICA DE MUTANTES DE *BACILLUS SUBTILIS* DEFICIENTES EN LOS SISTEMAS DE REPARACIÓN DE DNA UNG, YWQL Y MMR

Valtierra-Vargas Lucia Sabina (1), Ayala-García Víctor Manuel (2), Pedraza-Reyes Mario (2)

1 Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | l.sabinavv@gmail.com

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

Resumen

Se ha reportado que el ácido nitroso (HNO_2) desamina las bases nitrogenadas citosina, adenina y guanina dando lugar a las bases análogas uracilo, hipoxantina y xantina respectivamente, las cuales son altamente mutagénicas y deben ser reparadas eficientemente. Tal reparación se da por diferentes vías; el sistema de reparación por escisión de bases (BER), la vía de reparación por escisión alternativa (AER) y el sistema de reparación de bases erróneamente apareadas (MMR). Aquí investigamos la posible interconexión entre YwqL y el sistema MMR así como la participación de Ung, usando como modelo de estudio a *Bacillus subtilis*. Células deficientes de los sistemas antes mencionados fueron tratadas con HNO_2 y calculada su supervivencia. Nuestros resultados sugieren que MMR es altamente eficiente reconociendo malos apareamientos promovidos por HNO_2 pues una mutante carente de *mutSL* fue dramáticamente afectada por HNO_2 . Interesantemente, la interrupción de YwqL (una endonucleasa del sistema AER) en el fondo *mutSL* afectó positivamente la viabilidad celular al tratamiento con HNO_2 . Estos resultados sugieren que la actividad fosfohidrolítica de YwqL dependiente de bases desaminadas sobre el DNA podría propiciar la entrada del sistema MMR para corregir las lesiones promovidas por la pérdida de grupos amino del material genético.

Abstract

It has been reported that nitrous acid (HNO_2) deaminates the nucleobases cytosine, adenine and guanine generating the analogous bases uracil, hypoxanthine and xanthine respectively, which are highly mutagenic and must be promptly repaired before replication. Such repair may operate through distinct repair mechanisms; including, the base excision repair system (BER), the alternative excision repair pathway (AER) and presumably through the mismatch repair system (MMR). Here we investigated the possible interconnection between YwqL (an endonuclease of AER) and MMR system (MutS-L) as well as the participation of the uracil DNA glycosylase (Ung), using *Bacillus subtilis* as study model. *B. subtilis* cells deficient for YwqL, Ung and/or MutSL were treated with HNO_2 and the fraction of survivors was calculated by viable counts. Overall, our results suggest that MMR is highly efficient recognizing mismatches promoted by HNO_2 because a mutant lacking *mutSL* was dramatically affected by HNO_2 . Interestingly, disruption of *ywqL* (AER) in the *mutSL* background increased cell viability to HNO_2 treatment. These results suggest that base-deamidated-dependent phosphohydrolytic activity of YwqL could promote the entry of MMR system to process DNA lesions promoted by the loss of amino groups in the genetic material of *B. subtilis*.

Palabras Clave

Bacillus subtilis; Reparación de DNA; Desaminación; Ácido Nitroso.

INTRODUCCIÓN

El DNA es la molécula que almacena la información genética de toda célula viva, por lo tanto su estabilidad e integridad son esenciales [1]. Sin embargo, se encuentra sujeta al ataque de condiciones ambientales como la luz ultravioleta, radiación de ionización, óxido de nitrógeno (NO) y ácido nitroso (NO₂) entre otros, que pueden alterar su naturaleza física y química. Para contrarrestar los daños que se puedan generar, se activan diversos mecanismos como la inducción de la transcripción de genes, los diferentes mecanismos de reparación y en el peor de los casos, la muerte celular [2].

En este estudio estamos interesados específicamente en un tipo de daño al DNA como es la desaminación de las bases citosina, adenina y guanina que dan origen a las bases análogas uracilo, hipoxantina y xantina respectivamente, que de no ser eliminadas provocan mutaciones por transición durante la replicación [2].

En nuestro laboratorio se ha reportado que las bases desaminadas se pueden reparar por tres vías: el Sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER), el Sistema de Reparación Alternativa (AER) y el Sistema de Reparación de Bases Erróneamente Apareadas (MMR) [3].

En *Escherichia coli* la enzima Endonucleasa V (Nfi) se encuentra involucrada en la vía AER, que es estrictamente dependiente de MgCl₂; la cual no actúa como una DNA glicosilasa típica, sino que cataliza la incisión del segundo enlace fosfodiéster hacia el extremo 3' de la lesión, generando extremos 3' OH y 5' fosfato [4]; Nfi es capaz de reconocer una amplia variedad de lesiones de DNA que no tienen similitud evidente, por lo que es considerada una enzima promiscua [5]. Un homólogo de ésta enzima en *Bacillus subtilis* es YwqL y se ha demostrado que junto con Ung contrarresta los efectos mutagénicos de la desaminación de bases [3][6].

Por otra parte, el sistema MMR participa en la corrección de errores introducidos durante la replicación del DNA. Esta ruta de reparación ha sido altamente conservada durante la evolución; las proteínas MutS y MutL involucradas en el reconocimiento del mal apareamiento de las bases y reparación de los mismos, han sido identificadas en bacterias, levaduras y mamíferos [7]. En *B.*

subtilis MutS es el “sensor” que reconoce el mal apareamiento, mientras que MutL es el “conector”, que une a las proteínas restantes en la vía para permitir la reparación eficiente de errores en la replicación de *B. subtilis* [8].

Estudios previos han revelado que la inactivación genética del Sistema MMR en células de *B. subtilis* incrementan la tasa de mutagénesis [9]. Más recientemente se observó que YwqL es capaz de remover *in vitro* uracilo, hipoxantina, xantina y sitios AP del DNA [Ayala-García, datos no publicados]. Todos estos antecedentes resaltan la importancia de éstas enzimas para la protección del DNA de *B. subtilis*.

Debido a la capacidad de YwqL para reconocer e iniciar la reparación de distintas lesiones en el DNA es de interés conocer qué otros componentes pueden completar dicho mecanismo, por lo que aquí estudiamos si el sistema MMR está involucrado en continuar la reparación que YwqL ha iniciado al encontrar una base desaminada en el DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Las cepas utilizadas para este estudio de *B. subtilis* se muestran en la Tabla 1. Todas las cepas fueron obtenidas en nuestro laboratorio y son derivadas de la cepa silvestre *B. subtilis* 168.

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

Cepa	Genotipo	Fuente
168	Tipo silvestre	Stock del Laboratorio
PERM640	Δung	López-Olmos; 2012
PERM791	$\Delta ywqL$	López-Olmos; 2012
PERM739	$\Delta mutSL$	Pedraza Reyes; 2004
PERM737	$\Delta ung mutSL$	López-Olmos; 2012
PERM804	$\Delta ywqL mutSL$	López-Olmos; 2012
PERM820	$\Delta ung ywqL mutSL$	López-Olmos; 2012

La estrategia experimental consistió en crecer cada cepa en medio PAB, midiendo el aumento en

la densidad celular hasta encontrar una densidad óptica (D.O.) de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm tiempo en el cual las células se lavaron con PBS y se ajustaron a un D.O. de 1. Alicuotas de 1 mL de la suspensión celular se trataron durante 1 hora con concentraciones incrementales de ácido nitroso el cual fue preparado como fue descrito previamente [10], dejando el correspondiente control sin tratar. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS y finalmente se realizaron diluciones seriadas para sembrar en placas de medio LB y determinar su viabilidad a las 12 horas de incubación a 37°C. La susceptibilidad fue evaluada sembrando diluciones seriadas en placas de LB y determinando la Dosis Letal 90 (DL₉₀) a partir de las curvas dosis-respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo la estrategia descrita, se comparó el grado de susceptibilidad de las diferentes cepas al tratamiento con el agente HNO₂, en referencia a la cepa silvestre (WT).

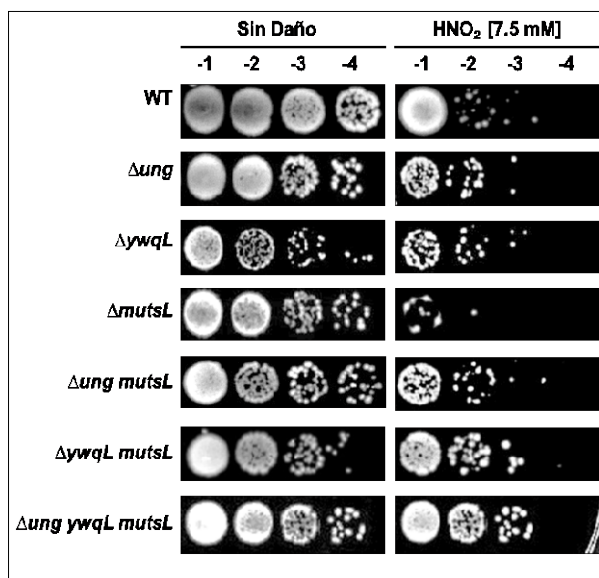


Figura 1 Susceptibilidad de cepas de *B. subtilis* con distintos genotipos al tratamiento con HNO₂.

Los resultados preliminares mostraron que la mutante *ung* fue más susceptible respecto a la cepa WT, seguida de *ywqL* (Fig. 1).

Sin embargo en la cepa *mutSL* se observó el efecto más drástico, ya que el tratamiento con el agente propició una alta tasa de muerte en esta mutante (Fig. 1).

Sorpresivamente, la triple mutante, *ung ywqL mutSL* no mostró un incremento significativo en su susceptibilidad al agente desaminante respecto a las cepas deficientes en *Ung/MutSL* y *YwqL/MutSL* (Fig. 1). Los valores preliminares de las DL_{90s} al tratamiento con HNO₂ (datos no mostrados) sustentan los resultados mostrados en la Figura 1.

En conjunto los resultados obtenidos a la fecha, sugieren que, i) el sistema MMR juega un papel relevante en procesar el daño genotóxico generado por la desaminación de bases, y, ii) existe una cooperación entre *MutS-L* y las proteínas *YwqL* y *Ung* durante la eliminación de bases desaminadas del material genético de *B. subtilis*.

CONCLUSIONES

- 1) En células de *B. subtilis* con un crecimiento activo, el sistema *MutS-L* (MMR) contrarresta los efectos nocivos de la desaminación de bases.
- 2) El procesamiento de bases desaminadas a través de *YwqL* y *Ung* que resultan en la formación de roturas de cadena sencilla podrían promover eventos de reparación dependientes del sistema *MutS-L*.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- [1] Birkhäuser Verlag AG (2009). Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Germany Berlin. Andreas Luch Editor. Volume 99. 111.
- [2] Friedberg EC, Walker GC, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006). DNA Repair and Mutagenesis, 2nd. edn. American Society of Microbiology. Washington, DC.

- [3] López-Olmos, K., Hernández, M.P., Contreras-Garduño, J.A., Robleto, E.A., Setlow, P., Yasbin, R.E., Pedraza-Reyes, M. (2012). Roles of endonuclease V, uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA base-deamination-induced mutagenesis. *Journal of bacteriology* 194, 243-252
- [4] Lindahl T: An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1974, 71(9):3649-3653.
- [5] Cao W (2012). Endonuclease V: an unusual enzyme for repair of DNA deamination. *Cellular and molecular life sciences*, 70(17), 3145-3156.
- [6] Ayala-García. (2012). Tesis de Maestría. 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. Universidad de Guanajuato Gto. p. 1-39.
- [7] Modrich, P., Lahue R. (1996). Mismatch Repair in Replication Fidelity, Genetic Recombination, and Cancer Biology. *Annual Reviews Biochemistry* 1996 .65.101-133.
- [8] Lenhart J.S., Schroeder W. J., Walsh W. B., Simmons A. L. (2012). DNA Repair and Genome Maintenance in *Bacillus subtilis*. *Journals ASM*. 76, 530-531; 545; 547-449.
- [9] Pedraza-Reyes M., Yasbin E. R. (2004). Contribution of the Mismatch DNA Repair System to the Generation of Stationary-Phase-Induced Mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 136. 6485-6491.
- [10] Tennen, R., Setlow, B., Davis, K. L., Loshon, C. A., & Setlow, P. (2000). Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 330-338.