

OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN GÉNICA PARA LA SOBREEXPRESIÓN HOMÓLOGA DEL GEN *YHDA* DE *BACILLUS SUBTILIS*

Díaz Trujano Rocio Rubí (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (2)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato| rubiz_14@hotmail.com]

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

Resumen

La toxicidad del Cr (VI) que contamina al medio ambiente es de gran preocupación por sus efectos mutagénicos y teratogénicos. La biotransformación de Cr(VI) a su forma insoluble Cr(III) por microorganismos de vida libre, es considerada como una estrategia eficiente en el tratamiento de desechos contaminados con dicho metal. El gen *yhdA* de *Bacillus subtilis* codifica para una proteína que pertenece a un grupo de enzimas denominado “Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH”, estas reducen el Cr(VI) a Cr(III) sin generar subproductos parcialmente reducidos que son citotóxicos y genotóxicos. En el presente trabajo se utilizaron herramientas moleculares para generar una cepa transformante de *B. subtilis* portando una construcción para sobreproducir la proteína YhdA. Esta cepa recombinante tiene el potencial de ser utilizada en la remediación de efluentes acuosos contaminados con el altamente tóxico ion Cromato.

Abstract

The toxicity of Cr(VI) that pollutes the environment is of great concern for its mutagenic and teratogenic effects. The biotransformation of Cr(VI) to its insoluble Cr(III) form by soil microorganisms is considered an efficient strategy to treat wastes contaminated with this metal. The *yhdA* gene from *Bacillus subtilis* encoding a protein that belongs to a group of enzymes called “NADPH dependent Flavin Mononucleotide Oxide Reductase”. These enzymes can reduce Cr(VI) to Cr(III) without producing partially reduced subproducts that are cytotoxic and genotoxic. In the present work we used molecular tools to design a *B. subtilis* strain bearing a genetic construct to overproduce the YhdA protein. This recombinant strain has the potential to be employed to remediate water effluents contaminated with the highly toxic chromate ion.

Palabras Clave

Bacillus subtilis; gen *yhdA*, sobreexpresión homóloga; cromo (VI)

INTRODUCCIÓN

La contaminación por cromo (Cr) en los mantos acuíferos del planeta, amenaza al medio ambiente, plantas y animales [1]. La toxicidad de este elemento es de gran preocupación por sus potenciales efectos mutagénicos y teratogénicos. El Cr existe en una gama de estados de valencia, de -4 a +6 [2]. En el medio ambiente se encuentran mayoritariamente como Cr(III) el cual no es tóxico, por su carácter insoluble. Sin embargo, altas concentraciones de Cr(III) resultan potencialmente peligrosas para la salud humana; ya que este prevalece en aguas residuales ricas en compuestos orgánicos que lo pueden oxidar a su forma hexavalente (Cr(VI)). Esta forma del metal, es mucho más tóxica por su capacidad de permear las barreras celulares y propiciar mutagénesis, carcinogénesis y/o muerte celular [2,3].

Debido a la insolubilidad de Cr(III), que facilita su precipitación y extracción, se ha considerado la biotransformación de Cr(VI) a Cr(III) como un procedimiento alternativo para el tratamiento de desechos contaminados con dicho metal.

Tradicionalmente se utilizan procesos físico-químicos para reducir las concentraciones de cromo hexavalente a niveles permisibles, sin embargo los costos para el equipo y la operación son muy elevados para el tratamiento a alta escala [4]. Una alternativa es el uso de microorganismos capaces de reducir el Cr(VI) [5].

En la actualidad se apuesta a la búsqueda de determinantes resistentes al cromo en microorganismos, aplicando la bioinformática. Entre los determinantes de resistencia al ion cromato existentes en bacterias, resaltan las "cromato reductasa", enzimas que catalizan la conversión directa de cromo hexavalente a cromo trivalente sin generar productos indeseables como el Cr(V).

Recientemente, una enzima de dicha clase, codificada por el gen *chrR*, ha sido descrita en la bacteria intestinal *Escherichia coli* [6,7]. Se demostró que una línea celular modificada genéticamente para sobreexpresar el gen *chrR* fue capaz incrementar su resistencia a los efectos tóxicos promovidos por Cr(VI), resaltando la

potencial aplicación de esta enzima en aspectos de biorremediación y biomedicina [8].

En estudios previos se describió que *B. subtilis* presenta una respuesta adaptativa al ion cromato [9]. Además, se demostró que dicha bacteria posee la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) [9]. Estas evidencias experimentales sustentan fuertemente la hipótesis de la existencia de enzimas con actividad de cromato reductasa en esta bacteria. De acuerdo con esta noción, se realizó un análisis de bioinformático, el cual mostro que en el genoma de esta bacteria existe el gen *yhdA* cuyo producto predicho mostró 63% de homología con la proteína ChrR de *E. coli* antes descrita. YhdA pertenece a un grupo de proteínas denominado "Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH". Como se mencionó líneas arriba, ChrR de *E. coli* un integrante de esta familia, es eficiente en reducir el Cr(VI) a Cr(III) sin generar subproductos parcialmente reducidos que son citotóxicos y genotóxicos.

En conjunto estos antecedentes permiten plantear la aplicación de herramientas moleculares para el diseño racional de una cepa de *B. subtilis* capaz de sobre producir la proteína YhdA, para su aplicación en la biorremediación de efluentes acuosos contaminados con cromato y otros iones metálicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas y plásmidos que se utilizaron en este estudio se listan en las Tabla 1 y 2, respectivamente.

Para el crecimiento y propagación de las diferentes cepas tanto de *B. subtilis* como de *E. coli* se empleó el medio Luria-Bertani (LB). Las células competentes de *E. coli* DH5- α y XL10- Gold se prepararon en medio LB.

Para llevar *B. subtilis* al estado fisiológico de competencia, se emplearon los medios: GMI y GMII. Las cepas se crecieron a 37 °C en medio sólido y/o líquido con agitación constante ajustado a 250 rpm.

La densidad óptica (DO) de los cultivos líquidos se determinó a 590 nm. Cuando se requirió, los medios fueron suplementados con los siguientes antibióticos: Ampicilina (Amp) 50 µg/mL y Kanamicina (Kn) 25 µg/mL.

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

CEPA	GENOTIPO O FENOTIPO	REFERENCIA
PERM 100	<i>E. coli</i> DH5-α	Ceparío PERM Lab
PERM 118	<i>E. coli</i> DH5-α + pDG148, Amp ^R , Kn ^R (<i>B. subtilis</i>)	Ceparío PERMLab
PERM YB 130	<i>E. coli</i> XL10-Gold, Kn ^R	Ceparío PERMLab
PERM 110	<i>B. subtilis</i> 1A751 eglS Δ102, bglTT/bglS ΔEV npr apr his	Ceparío PERMLab
PERM 1525	<i>E. coli</i> DH5-α conteniendo el plásmido pJET 1.2 mas el ORF del gen <i>yhdA</i> (722pb) Amp ^R	Este estudio
PERM 1533	<i>B. subtilis</i> 1A751 conteniendo el plásmido pDG148 mas el ORF del gen <i>yhdA</i> (722pb) Kn ^R	Este estudio

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pDG148	Vector de expresión con origen de replicación en <i>E. coli</i> Amp ^R y <i>B. subtilis</i> , Kn ^R .	Sun, Stragier, & Setlow, 1989
pJET 1.2	Vector de clonación; Amp ^R	Thermo Scientific, 2015
pPERM1525	pJET 1.2 + ORF del gen <i>yhdA</i> , Amp ^R	Este estudio
pPERM1533	pDG148 + ORF del gen <i>yhdA</i> , Kn ^R	Este estudio

Caracterización molecular de las cepas transformantes de *E. coli* y *B. subtilis*

Para corroborar la presencia de la construcción en las colonias una vez que estas fueron seleccionadas por su resistencia al antibiótico correspondiente, se realizó una reacción de restricción de DNA plasmídico y se comprobó con el tamaño de las bandas obtenidas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Replicación in vitro y clonación del gen *yhdA* de *B. subtilis*

El gen *yhdA* se amplificó mediante PCR usando como templado el DNA genómico de la cepa silvestre de *B. subtilis*, los oligonucleótidos 751 (GCAAGCTTATGAACATGTTAGTCAATGGC) y 752 (GCGTCCGACTACAGAGGACGTTTGTATC), conteniendo sitios de corte HindIII y Sall, respectivamente. Para la amplificación óptima del gen se utilizó un gradiente de temperatura en la etapa de alineamiento. Los productos de las reacciones se analizaron en un gel de agarosa al 1.3 %. En la Figura 1. se observa la obtención de un producto mayoritario de alrededor de 700 pb, correspondiente con el tamaño esperado del marco de lectura del gen *yhdA*, a la temperatura de 60 °C. El producto de PCR fue separado y purificado en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

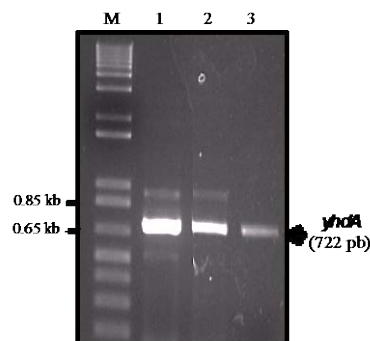


Figura 1. Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1.3% de los amplicones del gen *yhdA* de *B. subtilis*. Carriles 1 y 2, temperatura de alineamiento de 58 y 60 °C respectivamente; Carril 3, gen *yhdA* purificado de un gel de agarosa.

Generación de una construcción para la sobreexpresión del gen *yhdA*

El gen *yhdA* de *Bacillus subtilis* purificado se ligó en el vector de clonación pJET 1.2 mediante la adición de T4-DNA ligasa. El resultado de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α ; se seleccionaron colonias resistentes amplicilina. La confirmación de la construcción se realizó mediante análisis de restricción de mini-preparaciones de DNA plasmídico. El patrón esperado en las bandas demostró la obtención de la construcción de interés a la cuál se le denominó pPERM1525 (Fig. 2).

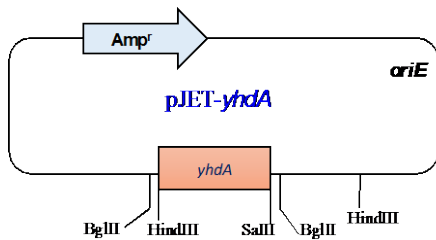


Figura 2. Mapa de la construcción pJET-*yhdA* (pPERM1525).

Para expresar el gen *yhdA* en *B. subtilis* se utilizó el vector de expresión pDG148. El gen *yhdA* se liberó del pPERM1525 y se ligó en los sitios HindIII y Sall de pDG148; el producto de la ligación se introdujo por transformación a células competentes de la cepa *E. coli* XL10-Gold.

Se eligieron algunas colonias transformantes para extraer el DNA plasmídico, el cual se digirió con HindIII/BamHI y HindIII para corroborar la obtención de la construcción de interés. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 3. Se obtuvieron las bandas de restricción esperadas; a la construcción generada se le denominó pPERM1533.

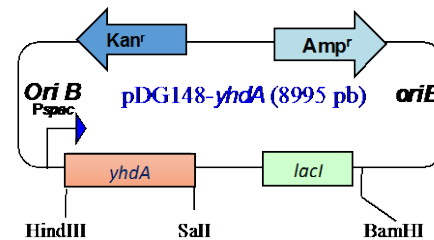
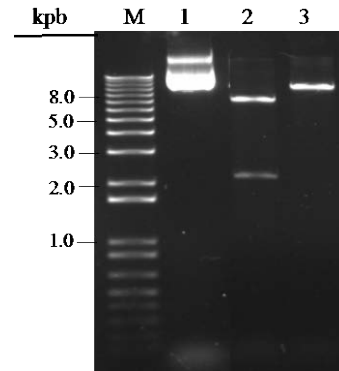


Figura 3. Análisis de restricción para corroborar la identidad del plásmido pPERM1533 (pDG148-*yhdA*) en un gel de agarosa al 1%. Arriba) Carril 1, patrón del plásmido sin cortar; carril 2 y 3, patrón de restricción del plásmido cortado con las enzimas HindIII y BamHI (2112 pb, 6884 pb) y HindIII (8995 pb) respectivamente. Abajo) Mapa de restricción parcial de pPERM1533.

Obtención de una cepa recombinante de *B. subtilis* portando el plásmido de expresión pPERM1533.

La construcción pPERM1533 se utilizó para transformar células competentes de *B. subtilis* 110. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en presencia de Kanamicina. Para corroborar la presencia de la construcción pPERM1533 se eligió al azar una clona para extraer DNA plasmídico y tratarlo con las enzima de restricción EcoRI y PstI. Los resultados del análisis se muestran en la figura 4. Estos resultados mostraron la obtención de la cepa de *B. subtilis* portando la construcción para sobreexpresar el gen *yhdA*; a esta cepa se le denominó *B. subtilis* PERM1533.

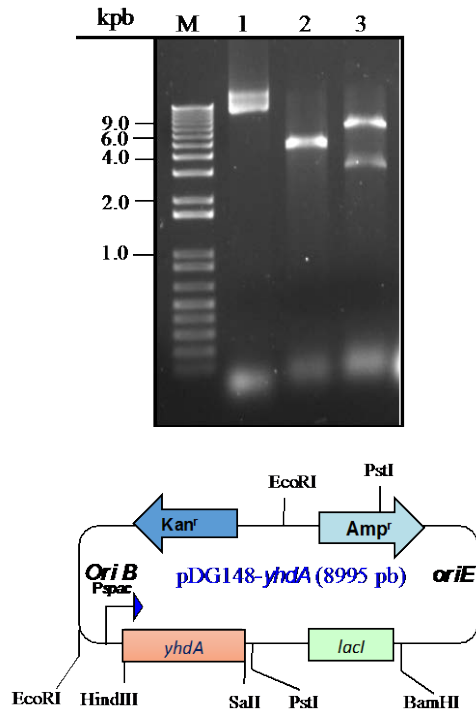


Figura 4. Análisis de restricción para corroborar la identidad del plásmido pDG148-*yhdA* (pPERM1533) en un gel de agarosa al 1%. Arriba) Carril 1, patrón del plásmido; carril 2 y 3, patrón de restricción del plásmido cortado con las enzimas EcoRI (4296 pb, 4692 pb) y PstI (2907 pb, 5772 pb) respectivamente. Abajo) Mapa de restricción de la construcción pPERM1533, aislada de *B. subtilis*.

CONCLUSIONES

Con la aplicación de herramientas moleculares se obtuvo una cepa de *B. subtilis* portando una construcción para sobre expresar al gen *yhdA*.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

- [1] Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 335-347.
- [2] Cheung, K.H., & Ji-Dong Gu. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59: 8-15.
- [3] Quievryn, G., Peterson, E., Messer, J., & Zhitkovich, A. (2003). Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI)/ ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry* 42: 1062-1070.
- [4] Mañunga, T., Gutiérrez, H. M., Rodríguez-Victoria, J. A., & Villareal-Díaz, A. (2010). Treatment of COD analysis liquid wastes generated in environmental laboratories. *ingeniería e investigación*, 30: 51-61.
- [5] Campos, J., Martínez-Pacheco, M., & Cervantes, C. (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. Strain. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68: 203-208.
- [6] Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., Keyhan, M., and Matin, A. 2004. Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70: 873-882.
- [7] Park CH, Gonzalez CF, Ackerley DF, Keyhan M, Matin A. Molecular engineering of soluble bacterial proteins with chromate reductase activity. In: Hinchey RE, Porta A, Pellei M, editors. Remediation and reuse of contaminated sediments. Proceedings of the First International Conference on Remediation of Chlorinated Sediments Volume S1-3. Columbus (Ohio): Battelle Press; 2002. pp. 103-11.
- [8] Liu X, Wu G, Zhang Y, Wu D, Li X, Liu P. 2015. Chromate Reductase YieF from *Escherichia coli* enhances hexavalent chromium resistance of human HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 11892-11902
- [9] Santos-Escobar F, Gutiérrez-Corona F and Pedraza-Reyes M. 2014. Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system (GO) in counteracting hexavalent chromium-promoted-oxidative DNA damage. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 5943- 5502.