

LA GERMINACIÓN DE LAS ESPORAS DE *BACILLUS SUBTILIS* ACTIVA LA RESPUESTA CELULAR DE DAÑO AL MATERIAL GENÉTICO

Regalado García, Ana Gabriela (1), Valenzuela García, Luz Idalia (2), Pedraza Reyes, Mario (2)

1 [Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ag.regaladogarcia@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [keich_863@hotmail.com; pedrama@ugto.mx]

Resumen

La integridad del genoma en los organismos se encuentra en constante amenaza por diversos agentes que dañan el ADN. La presencia de mecanismos que detectan el daño y detienen la progresión del ciclo celular activa respuestas celulares que inducen regulones genéticos cuyos productos eliminan las lesiones de ADN contrarrestando sus efectos citotóxicos y genotóxicos. *Bacillus subtilis* es una bacteria del suelo que tiene la capacidad de formar esporas bajo condiciones de estrés nutricional. Las esporas se caracterizan por ser altamente resistentes a factores ambientales potencialmente nocivos al ADN y al ser metabólicamente inertes son incapaces de eliminar el daño durante esta etapa. Cuando las condiciones nutricionales son óptimas, las esporas de *B. subtilis* germinan activando su metabolismo permitiendo la transcripción y replicación para poder dividirse. El retorno exitoso de las esporas, al crecimiento vegetativo, depende en gran medida de la integridad del genoma, por lo que en estudios recientes se ha demostrado que la proteína “checkpoint” DisA juega un papel importante en este proceso. En el presente estudio se generaron cepas de *B. subtilis* para investigar si las condiciones metabólicas que enfrentan las esporas alteran la estructura primaria de su genoma, y si dicho estrés activa la respuesta SOS.

Abstract

Several agents that injure DNA constantly threaten genome integrity in organisms. DNA lesions are detected by checkpoint proteins, which stop cell cycle progression and activate genetic regulons to counteract such damage. Under growth-limiting conditions, the soil bacterium *Bacillus subtilis* activates a developmental pathway to generate spores. Spores are highly resistant to a number of physical and chemical DNA damaging factors but are metabolically inert; therefore, incapable to eliminate genetic damage. When nutritional conditions are optimal, *B. subtilis* spores reassume vegetative growth through a developmental pathway termed germination/outgrowth. During return to life, the outgrowing spores activate protein synthesis, transcription and replication before proceeding with cell division. The successful return of spores to vegetative growth depends on the integrity of its genome integrity. Recent studies have demonstrated that the checkpoint protein DisA plays a central role in this process. In this study, we generated *B. subtilis* strains deficient on DisA and distinct repair proteins to investigate whether the metabolic conditions confronted by outgrowing spores disturb its genome integrity and if this stress activates de the bacterial SOS response.

Palabras Clave

Genoma; DisA; NER; TCR; respuesta SOS

INTRODUCCIÓN

La importancia de la estabilidad del ADN asegura la transferencia confiable de la información genética de una generación a otra, en todas las especies. Existen factores ambientales y propios de la célula que pueden dañar el material genético como calor, agentes químicos, luz UV, productos del metabolismo celular, etc. Los daños que sufre el ADN afectan la replicación y con ello la división celular; además, pueden provocar mutaciones potencialmente perjudiciales o letales para las células. Debido a esto, los organismos poseen mecanismos de reparación del ADN que permiten contrarrestar los efectos citotóxicos y genotóxicos de dichos daños. [1, 2]

Para hacer frente al estrés nutricional y sobrevivir a las condiciones severas del ambiente, *B. subtilis*, una bacteria gram-positiva no patógena, activa un proceso de diferenciación que culmina en la formación de una célula especializada en estado latente llamada espora [3, 4, 5, 6].

Las esporas son resistentes al calor, radiación, desecación, pH extremos y agentes tóxicos. El metabolismo de las esporas se encuentra latente y no exhibe actividad enzimática, por lo tanto, el daño en el ADN de la espora no puede ser reparado, acumulando lesiones durante este periodo de latencia [2, 5].

Cuando las condiciones del ambiente son favorables, la espora regresa a crecimiento vegetativo mediante el proceso de germinación y eclosión reanudando su actividad metabólica [6].

La acumulación de lesiones en el ADN durante el periodo de dormancia puede ser potenciado por la entrada de agua al centro de la espora y la activación del metabolismo aeróbico durante el proceso de germinación/eclosión, conduciendo a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden generar sitiosapurínicos-apirimidínicos (AP) y rupturas de doble cadena y de cadena sencilla [6]. Ha sido demostrado que el procesamiento de daño al ADN promovido por especies reactivas de oxígeno en esporas durante la germinación/eclosión, requiere componentes de las rutas de reparación de

escisión de bases (BER) y nucleótidos (NER) como también de RecA [7].

Se ha reportado que la proteína DisA escanea el cromosoma de las esporas de *B. subtilis* durante el regreso a crecimiento vegetativo en búsqueda de lesiones promovidas por ROS. En presencia de lesiones oxidativas en el ADN, DisA detiene la replicación y retarda la eclosión dando tiempo para que se repare el genoma de la espora antes de que progrese hacia crecimiento vegetativo.[8]. Hasta ahora el mecanismo por el cual DisA detiene la replicación para reclutar las proteínas de reparación en esta etapa diferenciativa no está completamente descrito.

En estudios recientes, se encontró que la falta de proteínas de reparación como UvrA y Mfd en conjunto con DisA tiene efectos mutagénicos en el ADN [9], por lo que resulta de interés conocer si las lesiones que producen mutagénesis en ausencia de estas proteínas de reparación son capaces de activar la respuesta SOS en las células durante el proceso de eclosión. En el presente trabajo, describimos el proceso de obtención de cepas que contienen el promotor de RecA, el regulador positivo de la respuesta SOS [3], fusionado a la proteína fluorescente GFP [12] para monitorear la inducción de la respuesta SOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se describen las cepas y plásmidos utilizados en este estudio. El crecimiento de las cepas se realizó en medio Luria-Bertani (LB). Cuando se requirió, este medio fue suplementado con almidón al 1% o con los siguientes antibióticos: Ampicilina (Amp) 100 ug/mL, Espectinomicina (Spc) 100 ug/mL, Eritromicina (Em) 5 ug/mL, Cloramfenicol (Cm) 5 ug/mL, Tetraciclina (Tc) 15 ug/mL.

La preparación de células competentes de *B. subtilis* y su transformación con ADN se llevó a cabo según el método descrito por Boylan y col. [10]. La obtención de ADN plasmídico y el análisis electroforético de ADN en geles de agarosa se realizaron con técnicas estándar [11]. El ensayo de α -amilasa se llevó a cabo mediante el método descrito por Harwood y col. [13].

Tabla 1: Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Genotipo y descripción	Referencia
pPERM1237	pDR111 conteniendo la construcción P_{recA} - <i>gfpmut3a</i> Amp^r Spc^f	Stock del laboratorio
PERM1342	$\Delta uvrA::cm$ $\Delta disA::em$ Cm^r Em^f	Stock del laboratorio
PERM1460	$\Delta mfd::tc$ Tc^f	Stock del laboratorio
PERM1461	$\Delta uvrA::cm$ Cm^r	Stock del laboratorio
PERM733	$\Delta disA::lacZ$ Em^f	Stock del laboratorio
PERM1549	Tipo silvestre <i>trpC2</i> , revertante de la cepa 168 $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Spc^R	En este estudio
PERM1550	$\Delta disA::em$ $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Em^R Spc^R	En este estudio
PERM1548	$\Delta uvrA::cm$ $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Cm^f Spc^f	En este estudio
PERM1559	$\Delta uvrA::cm$ $\Delta disA::eri$ $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Cm^f Em^f Spc^f	En este estudio
PERM1561	$\Delta mfd::tc$ $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Tc^f Spc^f	En este estudio
PERM1560	$\Delta mfd::tc$ $\Delta disA::em$ $amyE::P_{recA}$ - <i>gfpmut3a</i> Tc^f Em^f Spc^f	En este estudio
PERM1570	Tipo silvestre <i>trp*</i> , revertante de la cepa 168 $amyE::vacío$ Spc^f	En este estudio
PERM1571	$\Delta disA::eri$ $amyE::vacío$ Em^f Spc^f	En este estudio
PERM1529	$\Delta uvrA::cm$ $amyE::vacío$ Cm^f Spc^f	En este estudio
PERM1530	$\Delta uvrA::cm$ $\Delta disA::em$ $amyE::vacío$ Cm^f Em^f Spc^f	En este estudio
PERM1135	$\Delta mfd::tc$ $amyE::vacío$ Tc^f Spc^f	Stock de laboratorio.

PERM 1646	$\Delta mfd::tc$ $\Delta disA::em$ $amyE::vacío$ Tc^f Em^f Spc^f	En este estudio
-----------	--	-----------------

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de cepas conteniendo la fusión *Prec-gfpmut3a*

Para estudiar la activación de la respuesta SOS, a partir de la cepa PERM1237 [12], se extrajo el plásmido que contiene el gen reportero *gfp* bajo el control del promotor del gen *recA*. (Fig. 1)

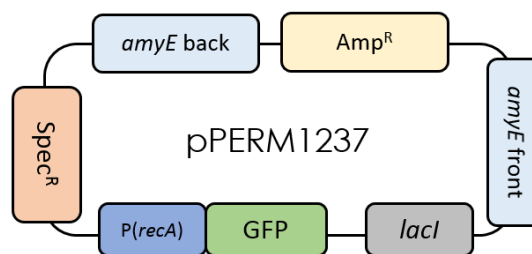


Figura 1. Plásmido conteniendo el gen *gfpmut3a* bajo el control del promotor *recA*.

El plásmido pPERM1237 se introdujo por transformación a células competentes de las cepas PERM451, PERM1504, PERM1461 y PERM1342 (Tabla 1). La fusión *PrecA-gfpmut3a* se integró en el genoma de *B. subtilis* interrumpiendo el locus *amyE* mediante un evento de doble recombinación homóloga (Fig. 2) generando las cepas PERM1549, PERM1550, PERM1548 y PERM 1559 (Tabla 1). De forma simultánea el vector pDR111 vacío transformó en los mismos fondos genéticos para obtener las cepas PERM1570, PERM1571, PERM1529 y PERM1530 (Tabla 1).

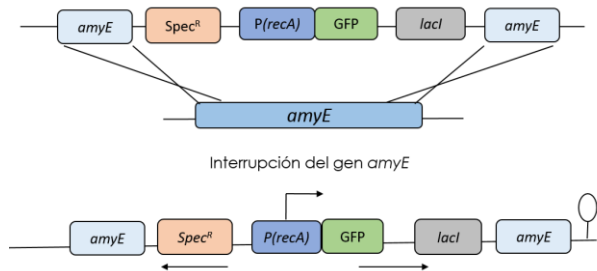


Figura 2: Integración de la fusión *PrecA-gfpmut3a* en el locus *amyE* del genoma de *B. subtilis*.

Para obtener las mutantes *mfd* y *mfd disA* con la fusión *PrecA-gfpmut3a*, el gen *mfd* fue interrumpido en las cepas PERM1549 (WT *amyE::P_{recA}-gfpmut3a*) y PERM1550 (Δ *disA::em amyE::P_{recA}-gfpmut3a*). A la par, este gen se interrumpió en el fondo genético de la cepa PERM1571 para obtener la cepa 1646. El evento de doble recombinación homóloga que interrumpió al gen *mfd* se muestra en la Figura 3.

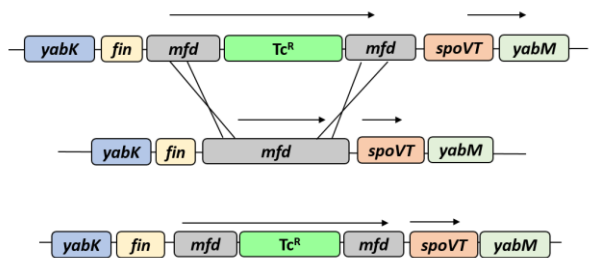


Figura 3: Estrategia para la interrupción del gen *mfd* en las cepas PERM1549, PERM1550 y PERM1571

Caracterización molecular y fenotípica de las cepas generadas.

La construcción pPERM1237 contiene fragmentos de homología con el gen codificante de la α -amilasa *amyE*, lo cual permite la integración de la construcción en este locus, interrumpiendo el gen y conduciendo a la pérdida de la capacidad de la cepa para degradar el almidón. De esta manera se analizó la integración de la construcción en el locus de interés en las distintas cepas obtenidas como se muestra en la figura 4.

Fondo genético	WT	Δ <i>disA</i>	Δ <i>uvrA</i>	Δ <i>uvrA</i> <i>disA</i>
Control positivo	PERM451	PERM1504	PERM1461	PERM1342
<i>P_{recA}-gfpmut3a</i>	PERM1549	PERM1550	PERM1548	PERM1559
pDR111 vacío	PERM1570	PERM1571	PERM1529	PERM1530

Figura 4: Ensayo de α -amilasa. En la primera fila, en los controles positivos se observa el halo de degradación del almidón por la actividad de α -amilasa. En las siguientes filas, no se observó degradación del almidón por la integración de la fusión *PrecA-gfpmut3a* en el locus *amyE*.

Una vez comprobada la interrupción del locus *amyE*, continuamos la caracterización molecular mediante un análisis de PCR utilizando el par de oligonucleótidos 424 y 425 (Tabla 2) que amplifican el gen *gfp*, generando una banda de 744 pb en las colonias transformantes, mostradas en la Figura 5.

Tabla 2: Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Descripción
424	CTTGCATGCCTGCA GGAGATTTATTTG	Oligonucleótido reverso para amplificar el ORF del gen <i>gfpmut3a</i> a partir del plásmido pAD123.
425	GCGCTAGCATGAGT AAAGGAGAAGAAC	Oligonucleótido directo para amplificar ORF del gen <i>gfpmut3a</i> del plásmido pAD123.
294	CGCTCGAGCGTTGA TGAAATGGTTTG	Oligonucleótido reverso para amplificar el ORF del gen <i>mfd</i> con sitio de restricción para la enzima BamHI.
456	GCGAATTCGTGAAG GCTTGTGAGGCT	Oligonucleótido directo para amplificar río arriba del promotor del gen <i>fin</i> .

Para la corroboración de las mutantes de *mfd* en el fondo WT con la fusión *PrecA-gfpmut3a* integrada,

se analizaron colonias transformantes mediante un análisis de PCR utilizando los oligonucleótidos 456 y 294 (Tabla 2) que amplifican una banda de 5800 pb demostrando la correcta interrupción de *mfd* por el casete de tetraciclina Figura 6.

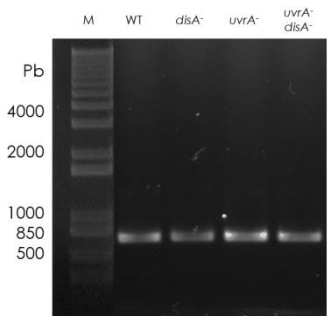


Figura 5: Análisis de PCR en un gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan los marcadores y en los siguientes se aprecia el amplicón correspondiente al gen *gfp*

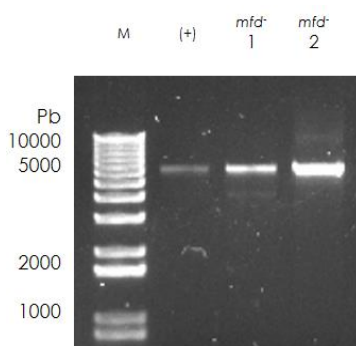


Figura 6: Análisis de PCR en un gel de agarosa al 1%, en el primer carril se encuentran los marcadores, el segundo corresponde al control positivo de la cepa PERM1460, el tercer y cuarto carril pertenecen a las clonas transformantes.

CONCLUSIONES

Se generaron cepas que contienen la fusión *PrecA-gfpmut3a* deficientes en *disA*, *uvrA* y/o *mfd* para el análisis de la respuesta SOS durante la etapa de germinación/eclosión.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo apoyado por CONACYT (Subsidios: 205744 and 221231) y UGTO.

REFERENCIAS

- [1] Snyder, L., Champness, W. (2007). Molecular genetics of bacteria. Washington, DC: ASM.
- [2] Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of applied microbiology*, 101(3), 514-525.
- [3] Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W., & Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 76(3), 530-564.
- [4] Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., & Albertini, A. M. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249.
- [5] Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, 1(2), 117-126.
- [6] Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556.
- [7] Ibarra, J. R., Orozco, A. D., Rojas, J. A., López, K., Setlow, P., Yasbin, R. E., & Pedraza-Reyes, M. (2008). Role of the Nfo and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of bacteriology*, 190(6), 2031-2038.
- [8] Campos, S. S., Ibarra-Rodríguez, J. R., Barajas-Omelas, R. C., Ramírez-Guadiana, F. H., Obregón-Herrera, A., Setlow, P., & Pedraza-Reyes, M. (2014). Interaction of apurinic/apyrimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *Journal of bacteriology*, 196(3), 568-578.
- [9] Valenzuela-García L. I. (2017) Interacción de DisA con proteínas involucradas en la reparación de DNA y/o replicación y sus efectos en la germinación/eclosión de esporas. Tesis de Doctorado. Universidad de Guanajuato.
- [10] Boylan, R. J., Mendelson, N. H., Brooks, D., & Young, F. E. (1972). Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *Journal of Bacteriology*, 110(1), 281-290.
- [11] Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- [12] Ramírez-Guadiana, F. H., Barajas-Omelas, R.C., Corona-Bautista, S. U., Setlow, P., & Pedraza-Reyes, M. (2016). The RecA-dependent SOS response is active and required for processing of DNA damage during *Bacillus subtilis* sporulation. *PLoS one*, 11 (3), e0150348.
- [13] Harwood, C. R., & Cutting, S. M. (1990). *Molecular biological methods for Bacillus*. Wiley.