

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE UNA OXIDOREDUCTASA EN UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Bacillus subtilis*.

Plasencia Pérez Diana Elizabeth (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (3)

1 [Ingeniería Bioquímica, Universidad Autónoma de Coahuila] | [Dirección de correo electrónico: diana.plasencia@uadec.edu.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: noramram@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [Dirección de correo electrónico: pedrama@ugto.mx]

Resumen

El uso industrial indiscriminado de compuestos derivados del cromo (Cr), ha ocasionado un incremento de este metal en el medio ambiente. El Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, siendo las especies trivalente (III) y hexavalente (VI) las formas más estables y abundantes. El Cr(VI) es considerado altamente tóxico, para las bacterias por su alta solubilidad en agua, lo que le permite atravesar con facilidad las envolturas celulares. La interacción del Cr(VI) con compuestos reductores que genera especies reactivas de oxígeno (ERO) en el interior celular con consecuencias genotóxicas y citotóxicas. Estudios previos mostraron que la oxidorreductasa OxB posee una alta capacidad de reducir el Cr(VI) y de incrementar su resistencia de *B. subtilis* a los efectos nocivos del ion cromato. En el presente trabajo se construyó una cepa para investigar las bases moleculares involucradas en este mecanismo de protección.

Abstract

Industrial applications of chromium (Cr) derived compounds has generated environmental pollution with this heavy metal, which can exist in different oxidation states, including Cr(III) and Cr(VI). Cr(VI) is water-soluble possessing the ability of permeates the cell envelopes and react with intracellular reducing compounds, thus producing reactive oxygen species (ROS) with cytotoxic and genotoxic consequences. Previous studies revealed that the oxidoreductase OxB possess a high capability of reducing Cr(VI) and conferring protection to *B. subtilis* from the noxious effects of Cr(VI). The present work was aimed to generate a recombinant strain of *B. subtilis* to investigate the molecular basis involved in this protecting mechanism.

Palabras Clave

B. subtilis, Cr(VI), estrés oxidativo, mutagénesis, OxB.

INTRODUCCIÓN

El uso industrial indiscriminado de compuestos derivados del cromo (Cr), ha ocasionado un incremento substancial de este metal en el medio ambiente [1,2]. El Cr existe en estados de oxidación que van de -2 a +6, siendo las especies trivalente (III) y hexavalente (VI) las formas más estables y abundantes [1]. Los efectos biológicos del Cr varían de acuerdo con su estado de oxidación [3]. El Cr(VI) es considerado altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y mutagénico en bacterias, ya que es altamente móvil y soluble en agua, lo que le permite atravesar con facilidad las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células utilizando el transportador de sulfato, debido a su analogía química con este ion [3,4,5]. En contraste el Cr(III) es considerado menos tóxico que el Cr(VI) debido a su tendencia de formar complejos insolubles en agua [5]. Se ha propuesto que los efectos tóxicos del Cr(VI) son una consecuencia de su reducción intracelular a Cr(III), incrementando la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el ion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidróxilo ($OH\cdot$) [6]. Las ERO promueven una variedad de lesiones en el ADN, entre ellas la 8-oxo-G que es altamente mutagénica [7]. En varios microorganismos los efectos mutagénicos de la 8-oxo-G son contrarrestados por el sistema de guanina oxidada (GO) [7]. Este sistema está compuesto por las proteínas MutM, MutY y MutT; los dos primeros son responsables de evitar los efectos mutagénicos del 8-oxo-G una vez instalado en el ADN, mientras que la última proteína tiene un papel preventivo, hidrolizando los precursores de ADN y ARN oxidado de los depósitos de nucleótidos [8]. *B. subtilis* posee un sistema GO completo; además de YtkD y MutT, ortólogos del nucleótido difosfohidrolasa MutT de *E. coli* [9, 10], su genoma contiene genes que codifican las proteínas MutM y MutY [11]. En 2014 Santos y col., demostraron que células de *B. subtilis* que carecen de un sistema GO son significativamente más sensibles al tratamiento con Cr (VI) que las células de la cepa silvestre (WT), sugiriendo que el daño oxidativo al ADN está involucrado en los efectos nocivos de este oxianion [7].

En lo que respecta a la reducción del Cr por microorganismos, la búsqueda se centra en identificar determinantes de resistencia al ion cromato, principalmente aquellas enzimas capaces de catalizar la reducción de Cr(VI) a Cr(III) de manera directa, sin generar intermediarios indeseables como el Cr(V). *Bacillus subtilis* presenta una respuesta adaptativa al ion cromato, además de poseer la capacidad de reducir el Cr(VI) a Cr(III) [7]. En estudios recientes demostró que la oxidoreductasa OxB presente en esta bacteria mostró 63% de homología con la proteína ChrR de *Escherichia coli*, la cual representa a la cromato reductasa mejor descrita hasta ahora [12]. OxB pertenece a un grupo de proteínas denominado "Flavin Mononucleótido Oxido Reductasas dependientes de NADPH" [11], mismo grupo al que pertenece ChrR. La sobreexpresión del gen *yhdA* en una cepa recombinante de *B. subtilis* incrementó su resistencia a los efectos nocivos del ion cromato [13], además de mostrar una capacidad mejorada para reducir Cr(VI), tanto en presencia como en ausencia del donador de electrones NADPH y en comparación con una cepa control que solo contenía el vector pDG148 [12]. De igual manera se encontró que la proteína recombinante His10-oxrB posee una eficiente actividad de cromato reductasa in vitro. [13].

En conjunto estos antecedentes permiten plantear la aplicación de herramientas moleculares para el diseño racional de una cepa de *B. subtilis* carente del sistema GO e investigar si la sobreexpresión de dicha proteína *oxrB* en este fondo genético protege a este microorganismo de los efectos genotóxicos producidos por el ion cromato.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas y el plásmido que se utilizó en este estudio se listan en la tabla 1. Para el crecimiento y propagación de las cepas de *B. subtilis* se empleó el medio Luria-Bertani (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: Cloranfenicol (Cm) 5mg/ml, Espectinomicina (Sp) 25mg/ml, Tetraciclina (Tc) 5mg/ml y Knamicina (Kn) 25mg/ml.

Preparación y transformación de células competentes y construcción de la cepa triple mutante $\Delta ytkd$, $\Delta mutM$, $\Delta mutY$.

La preparación de células competentes de *B. subtilis* y su transformación con ADN genómico fue realizada de acuerdo con el método descrito por Boylan y col. [14]. Para generar la mutante GO, se aisló el DNA genómico de la cepa PERM 602 para generar la cepa PERM 1700 (Tabla 1). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a Cm, Sp y Tc.

Tabla 1: Cepas y plásmidos empleadas en este estudio

CEPA	GENOTIPO O FENOTIPO	REFERENCIA
PERM 110	<i>B. subtilis</i> 1A751: apr bglT/ bglS Δ EV eglS Δ 102 his npr	Ceparío PERM Lab
PERM 602	PERM451 <i>mutY</i> :Sp, <i>mutM</i> :Tc Sp ^R Tc ^R	Ceparío PERM Lab
PERM 1700	<i>B. subtilis</i> 1A751 $\Delta ytkd$:Cm Cm ^R .	Ceparío PERM Lab
PERM 1699	<i>B. subtilis</i> 1A751 $\Delta ytkd$:Cm, $\Delta mutM$:Tc, $\Delta mutY$:Sp Cm ^R Sp ^R Tc ^R	Este estudio
PERM 1703	<i>B. subtilis</i> 1A751 $\Delta ytkd$:Cm, $\Delta mutM$:Tc, $\Delta mutY$:Sp con plásmido pDG148 <i>oxrB</i> Cm ^R Sp ^R Tc ^R Kn ^R	Este estudio
pPERM1557	pDG148 + ORF del <i>genoxrB</i> insertado entre los sitios de corte Sall y HindIII, Kn ^R	Ceparío PERM Lab
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

Obtención y Caracterización Molecular de las de la cepa PERM1703

Para corroborar la presencia de la construcción que sobreexpresa al gen *oxrB* en los fondos genéticos de interés se utilizaron dos criterios. La capacidad de conferir resistencia a las colonias transformantes, así como el análisis de restricción de mini preparaciones de la construcción en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Análisis de la frecuencia de mutación mediante el fenotipo de resistencia a Rifampicina.

Las frecuencias de mutación de resistencia a rifampicina Rif^R de células de *B. subtilis* se determinó de la siguiente manera. A partir de cultivos de cada cepa crecidos toda la noche, se inocularon matraces que contenían 10 mL medio A3 (Medio Antibiotic 3 Difco, Detroit, MI, EUA) y se incubaron a 37°C, 250 rpm, durante 12h. Pasado este tiempo el cultivo se centrifugó a 5000 rpm, durante 10 min, la pastilla celular se lavó una vez con Sales Spizzen y se resuspendió en 1 mL de esta solución En seguida se plaquearon alícuotas de 0.1 mL en tres placas de LB suplementadas con Rifampicina (10µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C. y las colonias resistentes a Rif se contaron después de 24 horas. La cantidad de células en el cultivo bacteriano se determinó mediante dilución seriada y cuenta viable en placas de LB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de una triple Mutante ΔGO en el fondo genético 1A751.

Como un requisito necesario para comenzar a investigar si la sobreexpresión del gen *oxrB* protege a *B. subtilis* de los efectos mutagénicos promovidos por el estrés oxidativo era necesario contar con una cepa de *B. subtilis* carente del sistema GO (YtkD, MutM, MutY). Para mejorar la sobreproducción de OxrB se utilizó como fondo genético una cepa de *B. subtilis* incapaz de producir proteasas a la cual se le interrumpió el gen *YtkD* con un casete de resistencia a Cm. Para construir la triple mutante se transformaron células competentes de la cepa $\Delta ytkD$ con DNA cromosómico de una mutante deficiente en los genes *mutY* y *mutM* ($Sp^R Tc^R$). Como primer criterio para verificar la obtención de la cepa mutante *ytkD/mutM/mutY* se corroboró que las colonias transformantes adquirieran una resistencia simultánea a los antibióticos Cm, Sp y Kn. En estudios previos se demostró que la inactivación del sistema GO (YtkD, MutM y MutY) induce un fenotipo hipermutador en *B. subtilis* [15]. Considerando este antecedente, se precedió a determinar la frecuencia de mutación espontánea de colonias resistentes a rifampicina (Rif^R) de la presunta mutante. Los resultados preliminares mostraron que, de acuerdo con un reporte previo [6], la falta del sistema GO indujo un aumento significativo en la frecuencia de mutación espontánea comparada con la cepa silvestre (**Figura 1**). Estos resultados demostraron la obtención de la triple mutante ΔGO en el fondo genético *B. subtilis* 1A751.

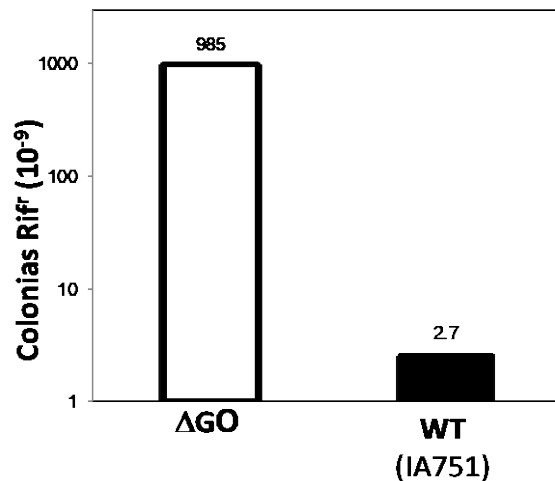


Figura 1. Frecuencia de Mutación (Rif^R) espontánea en las cepas *B. subtilis* WT y la triple mutante (ΔGO).

Obtención de una cepa de *B. subtilis* para sobreexpresar al gen *oxrB*

Para conocer el efecto de la sobreexpresión de *oxrB* se purificó el plásmido pPERM1557, el cuál expresa a *oxrB* desde el promotor fuerte *Pspac* inducible por ITPG [12]. A continuación, el plásmido pPERM1557 se introdujo por transformación a células competentes de la cepa *B. subtilis* PERM1699 (ΔGO), construida en este trabajo. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en placas con medio LB suplementado con Kn. Se obtuvieron mini preparaciones de ADN plasmídico de las colonias transformantes y se sujetaron a restricción con la enzima EcoRV. El resultado de este análisis se muestra en la **Figura 2**, el cuál corrobora la obtención de la cepa de interés, la cual se denominó *B. subtilis* PERM1703.

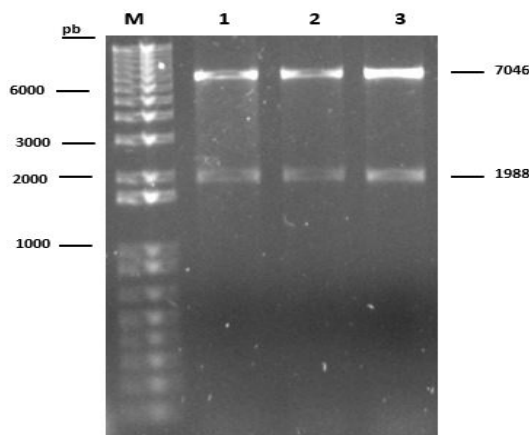


Figura 2. Análisis electroforético del DNA plasmídico aislado de la cepa de *B. subtilis* PERM1699 para corroborar la presencia de pPERM1557 en este fondo genético: Las preparaciones de las clonas indicadas se sujetaron a restricción con la enzima EcoRV generando en los tres casos las bandas esperadas; i.e. de 7046 y 1988 pb, respectivamente, M escalera de ADN de 1Kpb

CONCLUSIONES

Se generó y caracterizó fenotípicamente una cepa de *B. subtilis* con fondo genético Δ GO (MutM-MutY-YtkD). De igual manera se generó y caracterizó molecularmente una cepa de *B. subtilis* 1A751 para sobreexpresar el gen *oxrB*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Subsidios, 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio CIIC 188/2018) otorgados a MPR. D.E.P agradece la beca de Verano de Investigación otorgada por DAIP

REFERENCIAS

- [1] Ramírez-Díaz, Ml., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismo y aplicaciones. *REB* 28(3), 73-79.
- [2] Martínez-Pérez, R., Sandoval-Ibarra, P., Cárdenas-González, JF., Martínez-Juárez, VM. & Acosta-Rodríguez I. (2011). Reducción y remoción de cromo VI en solución por la cascara de lichee (*Litchi chinensis* Soon). *Geoquímica Ambiental*. 2(1), 1-8.
- [3] Gutiérrez-Corona, JF. & Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: Mecanismos y potencial biotecnológico. *CONCYTEG* 37(3), 21-36.
- [4] Masood, F. & Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* Sp. Strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 86(4), 114-119.
- [5] Losi, ME., Amrhein, C. & Frankenberger, T.J. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Environ Contam Toxicol* 136: 91-131.
- [6] Liu KJ, Shi X. 2001. In vivo reduction of chromium(VI) and its related free radical generation. *Mol. Cell. Biochem.* 222:41–47
- [7] Santos-Escobar, F. Gutiérrez-Corona, F. & 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 (17), 549 3-5502. [8] Brown S, Thompson M, VerBerkmoes N, Chourey K, Shah M, Zhou J, Hettich R, Thompson D. 2006. Molecular dynamics of the *Shewanella oneidensis* response to chromate stress. *Mol. Cell. Proteomics* 5 :1054–1071. 10.1074/mcp.M500394-MCP200
- [9] Tajiri T, Maki H, Sekiguchi M. 1995. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 336 :257–267. 10.1016/0921-8777(94)00062-B
- [10] Ramírez M, Castellanos-Juárez F, Yasbin R, Pedraza-Reyes M. 2004. The *ytkD* (*mutTA*) gene of *Bacillus subtilis* encodes a functional antimutator 8-oxo-(dGTP/GTP)ase and is under dual control of sigma A and sigma F RNA polymerases. *J. Bacteriol.* 186 :1050–1059. 10.1128/JB.186.4.1050-1059.2004
- [11] Sekiguchi M, Tsuzuki T. 2002. Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 21 :8895–8904. 10.1038/sj.onc.1206023
- [12] Díaz-Trujano, RR., Ramírez-Ramírez, N. & Pedraza-Reyes M. (2016). Obtención de una construcción génica para la sobreexpresión homóloga del gen *yhdA* de *Bacillus subtilis*. *Jóvenes en la ciencia* 3 (2): 1-5.
- [13] Ayala-García JC., Valenzuela García LI & Pedraza-Reyes M. (2017). Efecto de la sobreexpresión de una azoreductasa en la resistencia de *bacillus subtilis* a los efectos tóxicos del cromo. *Jóvenes de la ciencia* 3 (2): 1-5
- [14] 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 and *J Bacteriol* 110: 281-290.
- [15] Vidales L, Cárdenas L, Robleto E, Yasbin R, Pedraza-Reyes M. 2009. Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191:506–513.