

OBTENCIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE *Escherichia coli* PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN *nth* DE *Bacillus subtilis*

Andrés Job Méndez López, Rocío del Carmen Barajas Ornelas, Mario Pedraza
Reyes *

Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria
Alta s/n, Edificio L, Planta Baja, Guanajuato, Gto.

Resumen

Además de las principales endonucleasas apurínicas/apirimidinicas (APEs) Nfo y ExoA; *Bacillus subtilis* posee una tercer proteína denominada Endonucleasa III o Nth. Esta comparte una identidad de 46.2% con la Endonucleasa III de *Escherichia coli*, capaz de procesar una amplia variedad de bases oxidadas, así como sitios AP generados *in vitro*. Con el fin de estudiar las propiedades enzimáticas y la función fisiológica de la endonucleasa III de *B. subtilis*, codificada por el gen *nth*, el cual se expresa durante todo el ciclo de vida de esta bacteria; se obtuvo una cepa de *E. coli* portando una construcción para la expresión del gen y sobreproducción de una proteína Nth conteniendo una etiqueta de seis histidinas (His₆) en el extremo amino-terminal. La cepa recombinante obtenida permitirá, en experimentos futuros, obtener muestras puras de la enzima His₆-Nth y proceder con su caracterización estructural y bioquímica.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*; Nth; endonucleasa; especies reactivas de oxígeno; 8-oxoG.

CONSTRUCTION OF A RECOMBINANT STRAIN OF *Escherichia coli* FOR EXPRESSION OF THE *nth* GENE FROM *Bacillus subtilis*

Abstract

In addition to the main apurinic/apyrimidinic endonucleases (APEs) Nfo and ExoA, *B. subtilis* possesses a third AP, called Nth or EndoIII. Nth shares 46.2% identity with the Endonuclease III from *Escherichia coli* (EndoIIIc) that operates over a high variety of oxidized bases as well as AP sites generated *in vitro*. To unravel the biochemical and structural properties of Nth, whose encoding gene is expressed through the life

cycle of *B. subtilis*, here we report the design of a recombinant *E. coli* strain carrying a construct that directs the expression and synthesis of Nth containing a N-terminal His₆-tag. Future work will allow us to establish the optimal conditions of *nth* expression and His₆-Nth production, and purification.

Keywords: *Bacillus subtilis*; Nth; endonuclease; reactive oxygen species; 8-oxoG.

1. Introducción

El material genético de los seres vivos está expuesto constantemente a una gran variedad de agentes físicos, químicos y biológicos que comprometen su estructura, actividad y estabilidad. El estrés oxidativo es una condición celular caracterizada por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO, incluyendo a los radicales superóxido e hidroxilo, y al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), pueden generarse a partir del metabolismo celular o por exposición a radiación ionizante, metales de transición y toxinas ambientales (Araldi y col., 2016). En todas las especies aeróbicas, las ERO tienen el potencial de afectar la estructura primaria y secundaria del ADN con consecuencias citotóxicas y genotóxicas (Pedraza-Reyes y col. 2024).

En cuanto a las 4 bases nitrogenadas encontradas en el ADN, la guanina es especialmente vulnerable a las alteraciones estructurales (oxidación) debidas a ERO por su característica fisicoquímica de bajo potencial de ionización, lo que significa que pierde electrones fácilmente siendo blanco preferente de los radicales libres. La oxidación de la guanina produce una base alterada conocida como 7,8-dihidro-8-

oxoguanina (8-oxoG). Esta base modificada puede emular la timina durante la replicación del ADN, formando un apareamiento erróneo con adenina (8-oxoG•A), lo que genera mutaciones tipo transversión $G:C \rightarrow T:A$, relacionadas con procesos de carcinogénesis y envejecimiento celular (Pedraza-Reyes y col., 2024; David y col., 2007).

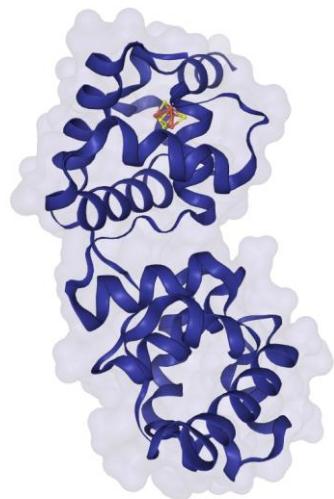


Figura 1. Estructura tridimensional de Nth, la proteína contiene un clúster [4Fe-4S] mostrado en amarillo y marrón.

Entre las enzimas clave involucradas en la reparación del ADN dañado por especies reactivas de oxígeno (ERO) se encuentra Nth (Figura. 1), una ADN glicosilasa bifuncional, que actúa en la vía de reparación por escisión de bases (BER; por sus siglas en inglés: Base Excision Repair). Esta enzima, previamente

caracterizada en *E. coli*, reconoce y elimina pirimidinas oxidadas y sitios abásicos (AP sites) del ADN. Se postula que Nth, inicialmente, realiza un ataque sobre el enlace glicosídico de la base dañada, seguida de un corte en la cadena de ADN mediante una reacción de β -eliminación (Tse y col., 2017; Dizdaroglu y col., 2000).

Se ha propuesto que la presencia de un clúster [4Fe-4S] en la estructura de proteínas de reparación, podría conferirles estabilidad

estructural y prevenir su oxidación promovida por las ERO. Además, se ha propuesto que este clúster metálico, en enzimas como MutY, podría participar en la detección de sitios dañados a través del ADN (David y col., 2007). Para elucidar las propiedades estructurales y funcionales de la enzima Nth de *B. subtilis*, en el presente estudio se generó una cepa recombinante de *E. coli* que porta una construcción para expresar heterólogamente al gen *nth* de *B. subtilis*.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Fenotipo, genotipo y descripción	Referencia
<i>B. subtilis</i>		
PERM451	<i>B. subtilis</i> PS832 WT Trp ⁺	Colección de cepas del laboratorio de Peter Setlow.
<i>E. coli</i>		
PERM1744	<i>E. coli</i> XL10 GOLD Kan ^R	Colección de cepas del laboratorio de Mario Pedraza-Reyes.
PERM390	<i>E. coli</i> XL10 GOLD contenido el plásmido pQE30 con el gen <i>celR</i> insertado en los sitios de restricción BamHI/Sall; Kan ^R , Amp ^R	Colección de cepas del laboratorio de Mario Pedraza-Reyes.
PERM2100	<i>E. coli</i> XL10GOLD contenido el plásmido pQE30- <i>nth</i> de 654 pb con los sitios de restricción BamHI/Sall; Kan ^R , Amp ^R	Este estudio.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia	Descripción
1036	5' - ACT GGA TCC TTA AAT CTA AAA CAA ATT GAA TTC TG -3'	Oligonucleótido directo para la amplificación y expresión de <i>nth</i> .
1037	5' - ACT GTC GAC TCG TTT CAC CAG TCC TTT TTT ATC CC-3'	Oligonucleótido reverso para la amplificación y expresión de <i>nth</i> .

2. Materiales y métodos

2.1. Medios de cultivo

Para el crecimiento rutinario de las bacterias se utilizó el medio Luria-Broth (LB). Cuando se requirió, este medio fue suplementado con los siguientes antibióticos, Ampicilina (Amp; 100 µg/mL), Kanamicina (Kan; 50 µg/mL). La preparación de células competentes y transformación de *E. coli* se llevó a cabo mediante protocolos previamente publicados (Boylan y col., 1972; Sambrook y col., 1989).

2.2. Condiciones de cultivo

Los cultivos en medio LB líquido fueron incubados a 37°C con agitación constante (250 rpm); los pre-inóculos crecidos durante toda la noche se diluyeron 100 veces en el medio LB fresco. Los cultivos en medio sólido se incubaron a 37°C. El crecimiento

fue determinado mediante espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro Biochrom (Cambridge, UK), ajustado a una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀).

2.3. Construcción de plásmidos y obtención de cepas bacterianas.

Las cepas de *B. subtilis* y *E. coli*, así como plásmidos empleados se describen en la Tabla 1. Para amplificar mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) al gen *nth*, se utilizó como molde ADN cromosómico de la cepa de *B. subtilis* PERM451 (Tabla 1) y los oligonucleótidos 1036 y 1037 (Tabla 2). Las reacciones se efectuaron en un equipo Mastercycler EPgradient Eppendorf (Hamburg, Germany). El producto de PCR digerido con las enzimas BamHI y SalI se ligó en el vector de expresión pQE30 tratado con

las mismas enzimas; el producto de la ligación se introdujo por transformación en células competentes de *E. coli* XL10 GOLD. Una vez obtenidas y caracterizadas molecularmente mediante restricción enzimática, 12 de estas se almacenaron a -80°C en glicerol al 50%. Las reacciones de restricción enzimática se llevaron a cabo por 30 min, a 37°C, mientras que las reacciones de ligación se efectuaron por 1 h a 22°C. Los productos obtenidos de las PCRs o de las reacciones de restricción se analizaron en geles de agarosa al 0.8% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (0.25 µg/ml). Cuando fue requerido, los productos de las restricciones enzimáticas y de las reacciones de PCR fueron purificados en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (2.5 µg/ml).

3. Resultados

3.1. Amplificación del fragmento de *nth* mediante PCR.

Para la amplificación mediante PCR, se utilizó como blanco el marco de lectura del gen *nth*, carente de los codones de inicio y paro, con un tamaño de 672 pb. Se utilizó DNA cromosómico de la cepa 451 de *B.*

subtilis y los oligonucleótidos 1036 y 1037, con secuencias de 5'-ACT GGA TCC TTA AAT CTA AAA CAA ATT GAA TTC TG-3' (oligo directo) y 5'-ACT GTC GAC TCG TTT CAC CAG TCC TTT TTT ATC CC-3' (oligo reverso) conteniendo sitios de corte para las enzimas de restricción BamHI y SalI (subrayadas), respectivamente. La reacción de PCR se realizó en un gradiente de temperaturas, encontrándose una amplificación óptima del fragmento de interés a una temperatura de 61.5°C, lo cual se verificó mediante electroforésis en un gel de agarosa al 0.8% (Figura. 2).

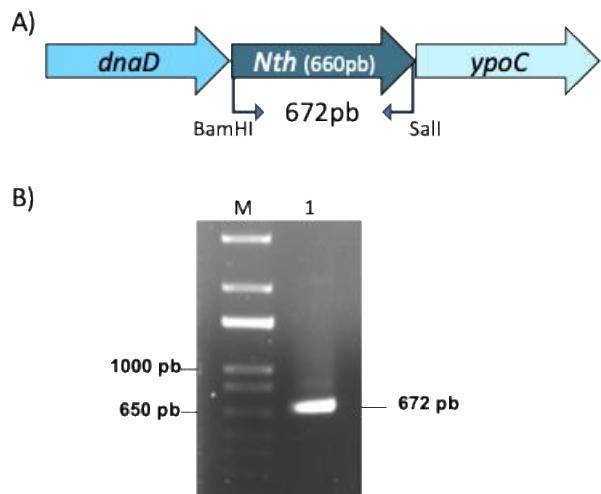


Figura 2. A) Representación esquemática del locus *nth* en el cromosoma de *B. subtilis*. Se muestra entre flechas el tamaño del amplicón de *nth* de 672 pb, tomando en cuenta los oligonucleótidos utilizados. B) Análisis electroforético del producto de PCR del gen *nth*. M: marcadores de ADN. Carril 1: producto de PCR del gen *nth*.

El producto de PCR de *nth* se recuperó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, y se purificó mediante columnas de gel de sílice.

3.2. Purificación y digestión del vector de expresión pQE30

Una vez realizada la amplificación y purificación del marco de lectura del gen *nth* (Figura. 3), se procedió a la obtención y purificación del vector pQE30, de la cepa *E. coli* PERM390, el cual se sujetó a restricción con las enzimas BamHI y Sall generando una banda de 3433 pb como se muestra en la Figura 3.

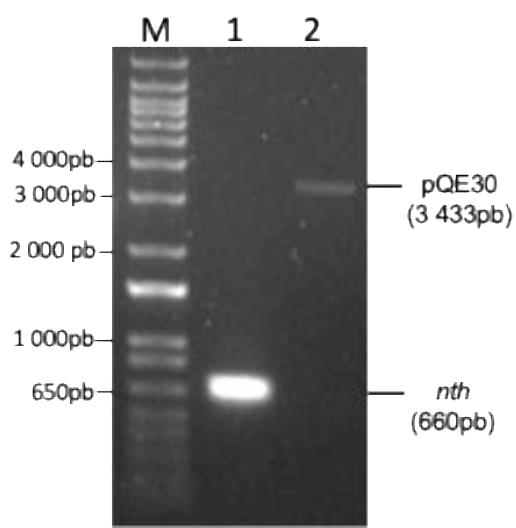


Figura 3. Análisis electroforético de los productos purificados de PCR del gen *nth* digerido con las enzimas BamHI y Sall (Carril 1) y el vector de expresión pQE30 cortado con las mismas enzimas (Carril 2). M: marcadores de ADN.

3.3. Construcción de un plásmido para expresar a *nth* en el vector pQE30

Habiendo purificado el vector pQE30 y el marco de lectura de *nth*, ambos cortados con BamHI y Sall (Figura. 3), estos se mezclaron en una reacción conteniendo T4 DNA ligasa. La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 h. Los productos de esta reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* XL-10 Gold.

3.4. Obtención de colonias transformantes de *E. coli* XL-10 Gold portando una construcción para expresar a *nth*.

Las colonias transformantes, se recuperaron en placas de LB sólido-suplementadas con ampicilina, después de 12 h de incubación a 37°C.

La presencia del plásmido pQE30-*nth* se verificó en 3 colonias transformantes resistentes a Amp sujetas a análisis de restricción de minipreparaciones de ADN plasmídico con las enzimas BamHI y Sall. Los productos de las restricciones se separaron en un gel de agarosa contenido

bromuro de etidio. Los resultados mostrados en la Figura 4 (carriles 1, 3 y 5) indican la presencia del gen *nth* correctamente ligado en el vector pQE30.

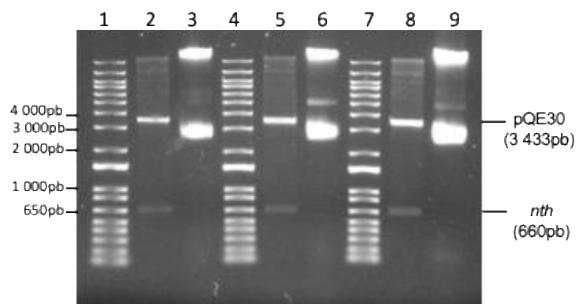


Figura 4. Corroboration molecular mediante restricción con las enzimas BamHI y Sall de los plásmidos purificados a partir de tres colonias Amp^R de *E. coli* XL10 GOLD, después de su transformación con el producto de la ligación entre pQE30 y el gen *nth*. M: Marcadores de ADN. Los carriles 1, 3 y 5 corresponden a los plásmidos aislados de las colonias transformantes sujetas a restricción. Carriles 2, 4 y 6 muestran los mismos plásmidos sin digerir.

4. Discusión

Como se mencionó anteriormente, se lograron obtener al menos tres clonas de una cepa de *E. coli* que expresan el gen *nth* de *B. subtilis*, lo cual constituye un éxito preliminar en las estrategias de producción de esta proteína. Sin embargo, los resultados preliminares de expresión con estos clones sugieren que la producción de Nth puede inducir la formación de cuerpos de inclusión,

un fenómeno común en la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli*.

La acumulación de proteínas en cuerpos de inclusión puede estar relacionada con diversos factores, como una alta tasa de síntesis proteica, la incapacidad de las proteínas para plegarse correctamente o la presencia de dominios que favorecen su agregación. Dado que Nth es una proteína involucrada en la reparación del ADN, su producción podría promover interacciones con el material genómico u otros componentes internos de la célula, aumentando así su tendencia a formar agregados. Aunque la formación de cuerpos de inclusión representa un desafío para obtener la proteína en forma funcional, también puede ofrecer ventajas, como protección contra la degradación y facilitar su aislamiento.

Para mejorar el rendimiento de la producción y facilitar la recuperación de la proteína, se plantean distintas condiciones experimentales. Entre ellas, reducir la temperatura de cultivo durante la inducción a 16 °C, lo cual favorece un correcto plegamiento; probar distintas

concentraciones de IPTG y regular el tiempo de expresión.

5. Conclusión

Se generaron y caracterizaron molecularmente cepas de *E. coli* para expresar al gen *nth* de *B. subtilis*.

Agradecimientos

Trabajo financiado por SECIHTI (CBF2023/2024-708). R.D.C.B.O fue apoyada por una beca posdoctoral de SECIHTI.

Referencias bibliográficas

Araldi, R.P., Módolo, D.G., de Sá Júnior, P.L., Consonni, S.R., de Carvalho, R.F., Roperto, F.P., Beçak, W., de Cassia Stocco, R. (2016). Genetics and metabolic deregulation following cancer initiation: A world to explore. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 82 (449–458). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.031>

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.

David, S.S., O’Shea, V.L., Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941–950. <https://doi.org/10.1038/nature05978>.

Dizdaroglu, M., Bauche, C., Rodriguez, H., Laval, J. (2000). Novel substrates of *Escherichia coli* Nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. *Biochemistry*, 39 (18), 5586–5592. <https://doi.org/10.1021/bi9927787>.

Pedraza-Reyes, M., Abundiz-Yañez, K., Rangel-Mendoza, A., Martínez, L.E., Barajas-Ornelas, R.C., Cuéllar-Cruz, M., Leyva-Sánchez, H.C., Ayala-García, V.M., Valenzuela-García, L.I., Robleto, E.A. (2024). *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 88(2), e00158-23. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00158-23>

Sambrook, J., Fritsch, E.F. Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tse, E.C.M., Zwang, T.J., Barton, J.K. (2017). The oxidation state of [4Fe4S] clusters modulates the DNA-binding affinity

of DNA repair proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 139(36), 12784–12792. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07230>.