



Introducción

La exposición de los organismos a factores extracelulares e intracelulares puede provocar daños en el material genético. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por el metabolismo aerobio, causan daños al ADN mediante la oxidación de sus nucleótidos. El sistema GO, conformado por las proteínas YtkD, MutM y MutY permite reparar e incluso prevenir estos daños. Una cepa de *B. subtilis* deficiente en este sistema es altamente mutagénica; paradójicamente, esta mutante muestra un fenotipo de hiperresistencia al estrés oxidativo. El gen *yhaZ* se compone de 1071 pb y codifica para una proteína de 357 aminoácidos. Posee 40-50% de homología con alquil purina ADN glicosilasas y 58% con proteínas de la familia de enzimas TET, capaces de transferir grupos hidroxilo al ADN. Además, *yhaZ* cuenta con sitios de unión para LexA en la región promotora. En el presente trabajo, se pretende determinar la función bioquímica de YhaZ e investigar si esta proteína contribuye al fenotipo de alta resistencia al estrés oxidativo en la cepa ΔGO . Para tal fin se diseñó una construcción genética, en un plásmido integrativo, para interrumpir el gen *yhaZ* en los fondos genéticos *B. subtilis* WT y ΔGO . Las transformantes obtenidas se caracterizaron por PCR

Resultados

I. Obtención de una construcción génica para interrumpir el gen *yhaZ*

Para abordar este aspecto, se amplió por PCR un fragmento interno del ORF de *yhaZ* de 372 pb, el cual se clonó entre los sitios HindIII/BamHI del plásmido integrativo pMutin4-CAT. La construcción de aproximadamente 8372 pb (Fig. 1a), se corroboró mediante análisis de restricción, como se muestra en la Figura 1b.

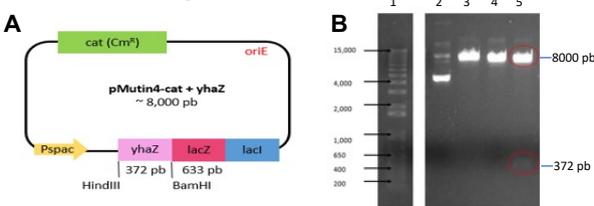


Figura 1. A) Mapa del constructo pMutin4- $\Delta yhaZ$. **B)** Análisis de restricción que corrobora la obtención de la construcción pMutin4- $\Delta yhaZ$. Carriles: 1, marcadores de ADN; 2, pMutin4- $\Delta yhaZ$; 3, pMutin4- $\Delta yhaZ$ + BamHI; 4, pMutin4- $\Delta yhaZ$ + HindIII, 5, pMutin4- $\Delta yhaZ$ + BamHI/HindIII.

II. Interrupción de *yhaZ* en los fondos genéticos *B. subtilis* WT y ΔGO

A continuación, de manera independiente, se transformaron células competentes de las cepas *B. subtilis* WT y ΔGO y se seleccionaron colonias transformantes resistentes a cloranfenicol (Cm). Para demostrar la interrupción del *yhaZ*, se realizaron reacciones de PCR en ambos transformantes, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 1000 pb (Figs 2 y 3).

II.1. Caracterización de colonias transformantes Cm^R de la cepa *B. subtilis* $\Delta yhaZ$

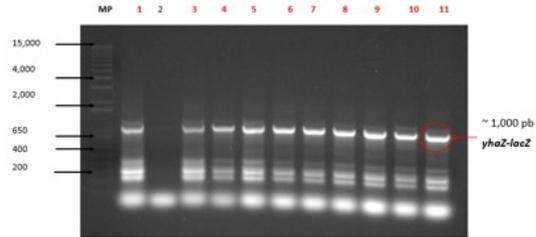


Figura 2. Corroboración por PCR en colonia de la integración de la construcción *yhaZ-lacZ* en el genoma de la cepa *B. subtilis* WT. Colonias resistentes a Cm (carriles 1-11), se lisaron y sujetaron a PCR utilizando oligonucleótidos específicos. La obtención de un amplión de 1000 pb, corrobora la interrupción del gen *yhaZ*. MP. Marcadores de ADN.

II.2. Caracterización de colonias transformantes Cm^R de la cepa *B. subtilis* $\Delta GO \Delta yhaZ$

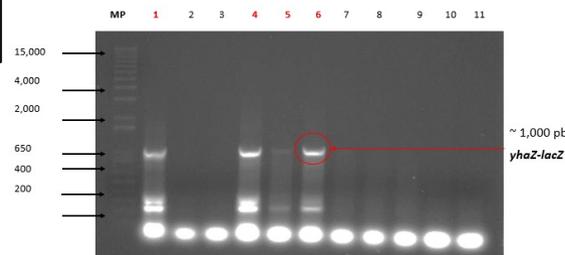


Figura 3. Corroboración por PCR en colonia de la integración de la construcción *yhaZ-lacZ* en el genoma de la cepa *B. subtilis* ΔGO . Colonias resistentes a Cm (carriles 1-11), se lisaron y sujetaron a PCR utilizando oligonucleótidos específicos. La obtención de un amplión de 1000 pb, corrobora la interrupción del gen *yhaZ*. MP. Marcadores de ADN.

Conclusiones

Se generaron y caracterizaron molecularmente las cepas *B. subtilis* $\Delta yhaZ$ y *B. subtilis* $\Delta GO \Delta yhaZ$.

Referencias

1. Christopher S. et al. 2017. doi/10.1021/cb2002895
2. SubtiList Web Server. (s. f.). yhaZ. Recuperado de <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/genome.cgi>
3. Gómez Romo G. Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato. 2017

Agradecimientos

Trabajo apoyado por el CONACYT (Subsidio A-1S-27116) y la Universidad de Guanajuato (subsidio CIIC 107/2022). ID. Romo Franco agradece la beca otorgada por la DAIP durante la Estancia de Verano 2022.