

Introducción

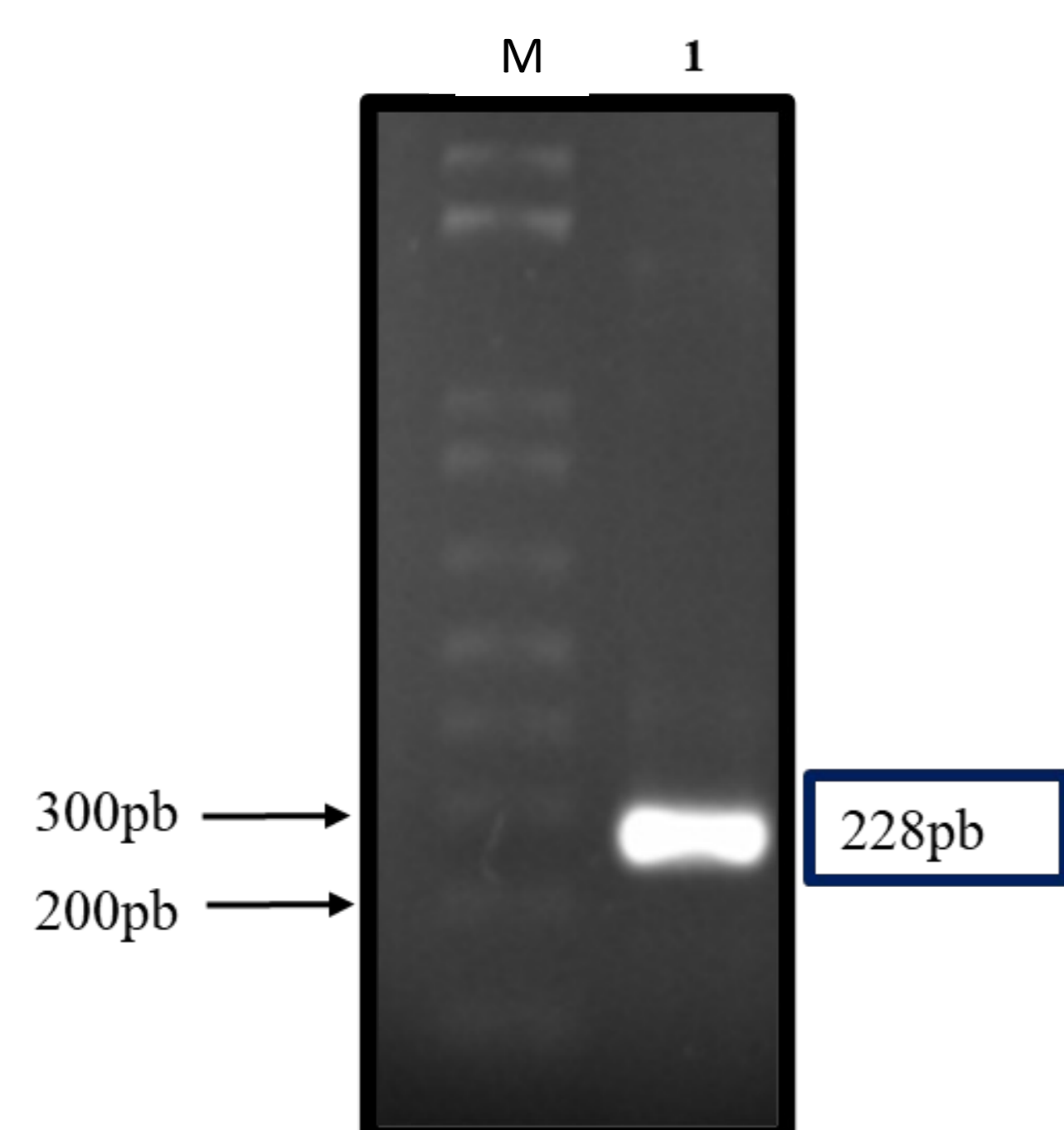
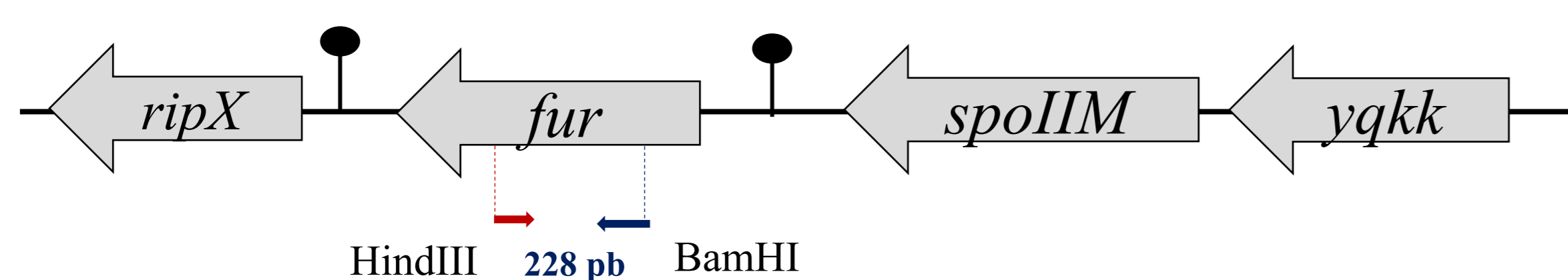
El ADN está continuamente expuesto a agentes endógenos y exógenos que amenazan su integridad^[1]. Dentro de los agentes con mayor influencia en el daño genético están las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se producen durante la respiración celular^[2]. El radical hidroxilo, es una especie altamente reactiva que surge de la reacción entre el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el hierro (Fe²⁺). Este radical impacta el ADN generando, entre otras, la altamente mutagénica lesión, 8-oxo-guanina (8-OxoG)^[2]. El Fe²⁺ es un nutriente esencial, pero, en exceso, promueve el estrés oxidativo en todas las células, causando inestabilidad de la homeostasis redox^[2]. Para protegerse de los efectos nocivos del hierro, la bacteria *B. subtilis* cuenta con YkvW, una bomba de eflujo de Fe²⁺. Este transportador de hierro es activado por Fur, un sensor de la suficiencia del metal, que activa la expresión de *ykvW*.

Para contrarrestar los efectos nocivos de la 8-OxoG y mantener la integridad de su genoma, *B. subtilis* utiliza al sistema de reparación/prevenición de la Guanina oxidada (GO)^[3]. En adición, la tolerancia al daño en el ADN puede garantizar una supervivencia general^[4]. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que una cepa de *B. subtilis*, deficiente del sistema GO, presenta un fenotipo de hiperresistencia al H₂O₂ e hipermutagenicidad. Es posible que un desbalance en las concentraciones de hierro sustenten estos efectos. Para investigar este aspecto, en este estudio, se planteó obtener una mutante en el gen *fur* y una cepa sobreexpresante de YkvW.

Resultados

I. Obtención de una cepa mutante en el gen *fur* de *B. subtilis* en el fondo genético deficiente del sistema GO.

A. Amplificación de un fragmento interno de *fur*

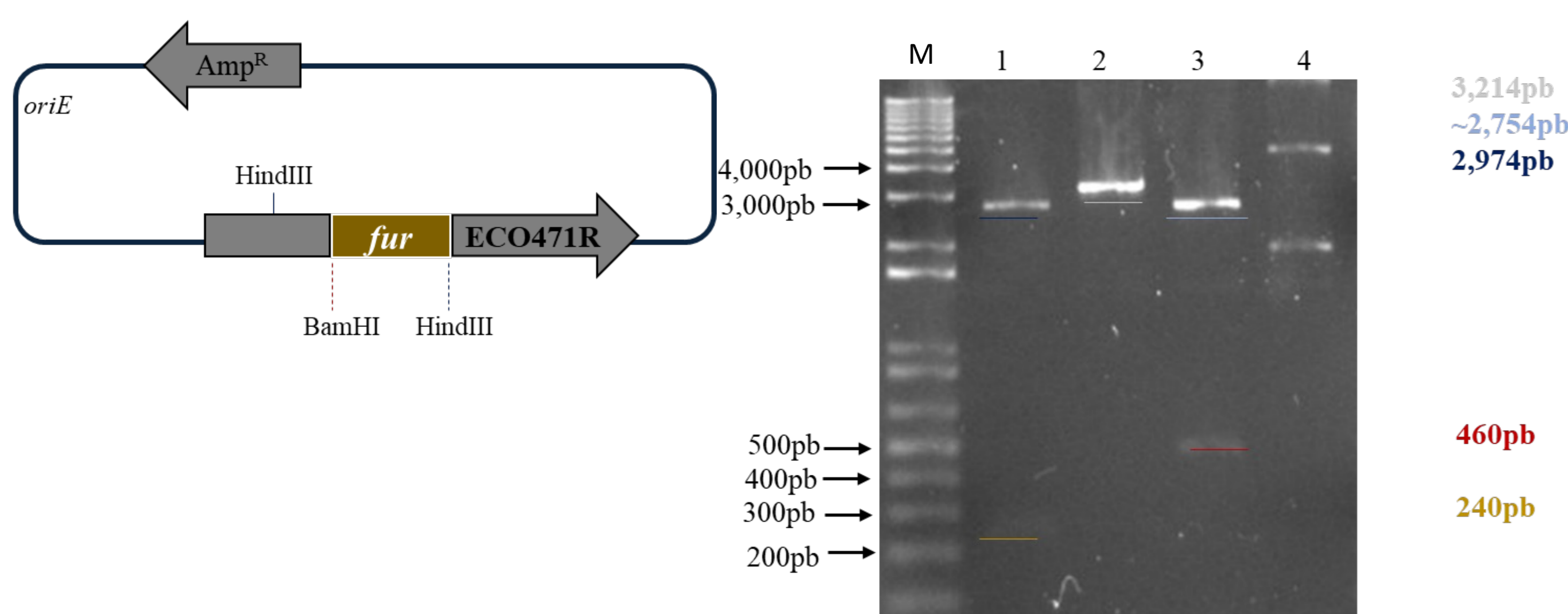


Amplificación por PCR de un fragmento interno al ORF de *fur* (arriba). M. Marcadores de ADN; Carril 1, fragmento de 228 pb de *fur* (Abajo).

B. Corroboración enzimática de la construcción pJET1.2/blunt-*fur*.

El fragmento de *fur*, se ligó en el vector de clonación pJET1.2/blunt.

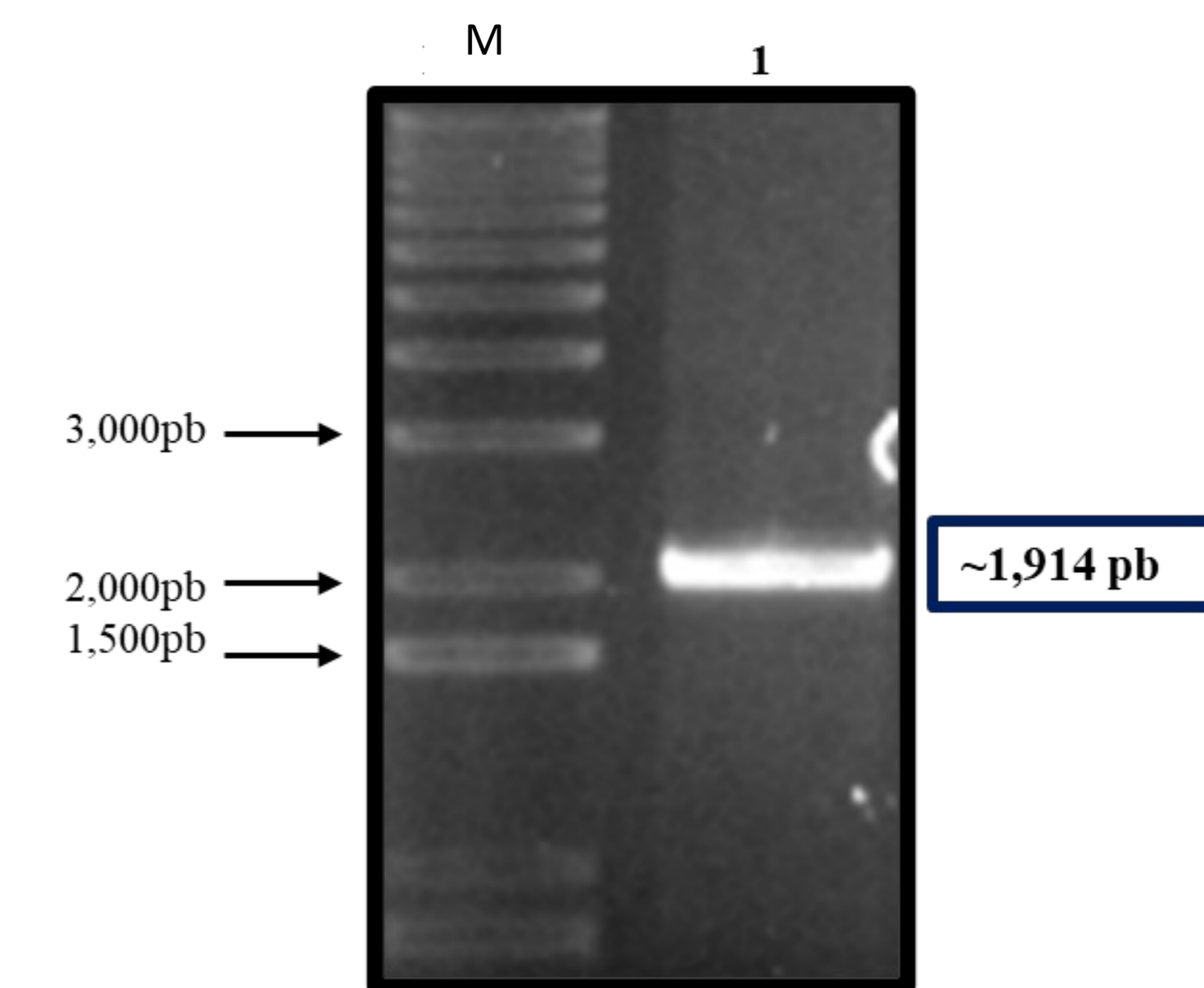
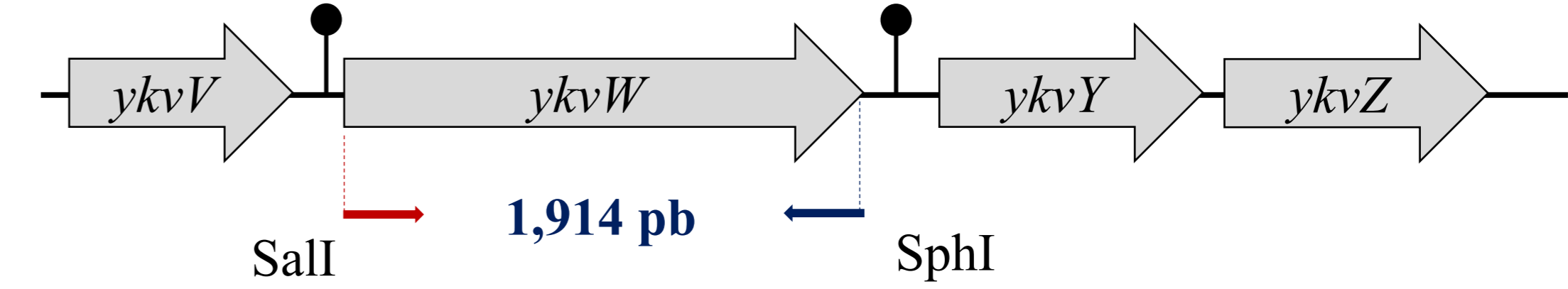
pJET1.2/blunt-*fur* (pPERM1888) 3,214 pb



Digestión enzimática de la construcción génica pJET1.2/blunt-*fur*. MTM. Marcadores de tamaño molecular
1. Digestión con BamHI.
2. Digestión con HindIII.
3. Digestión doble (BamHI-HindIII).
4. Plásmido sin cortar.

II. Obtención de una cepa sobreexpresante de YkvW de *B. subtilis* en el fondo genético deficiente del sistema GO.

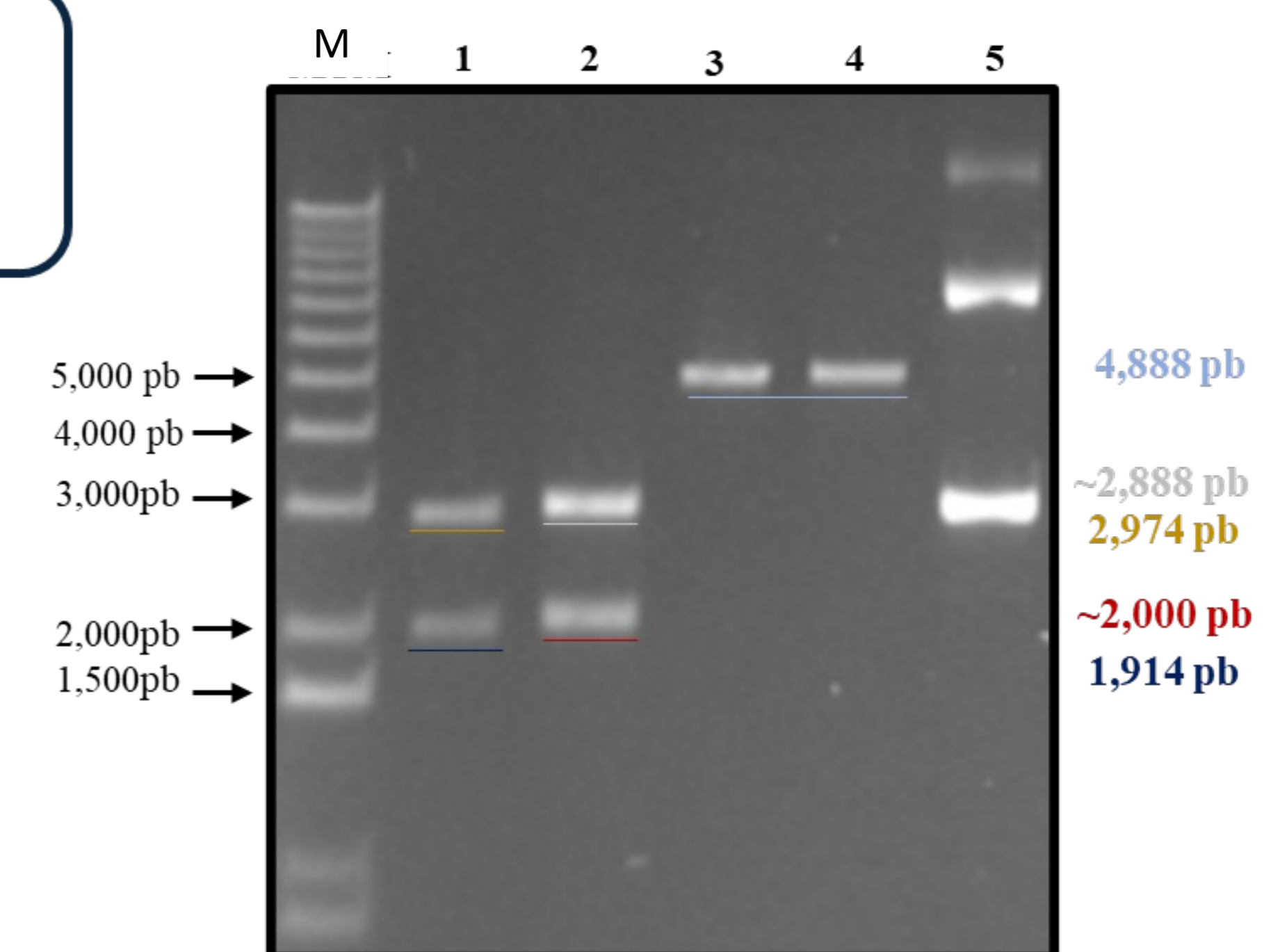
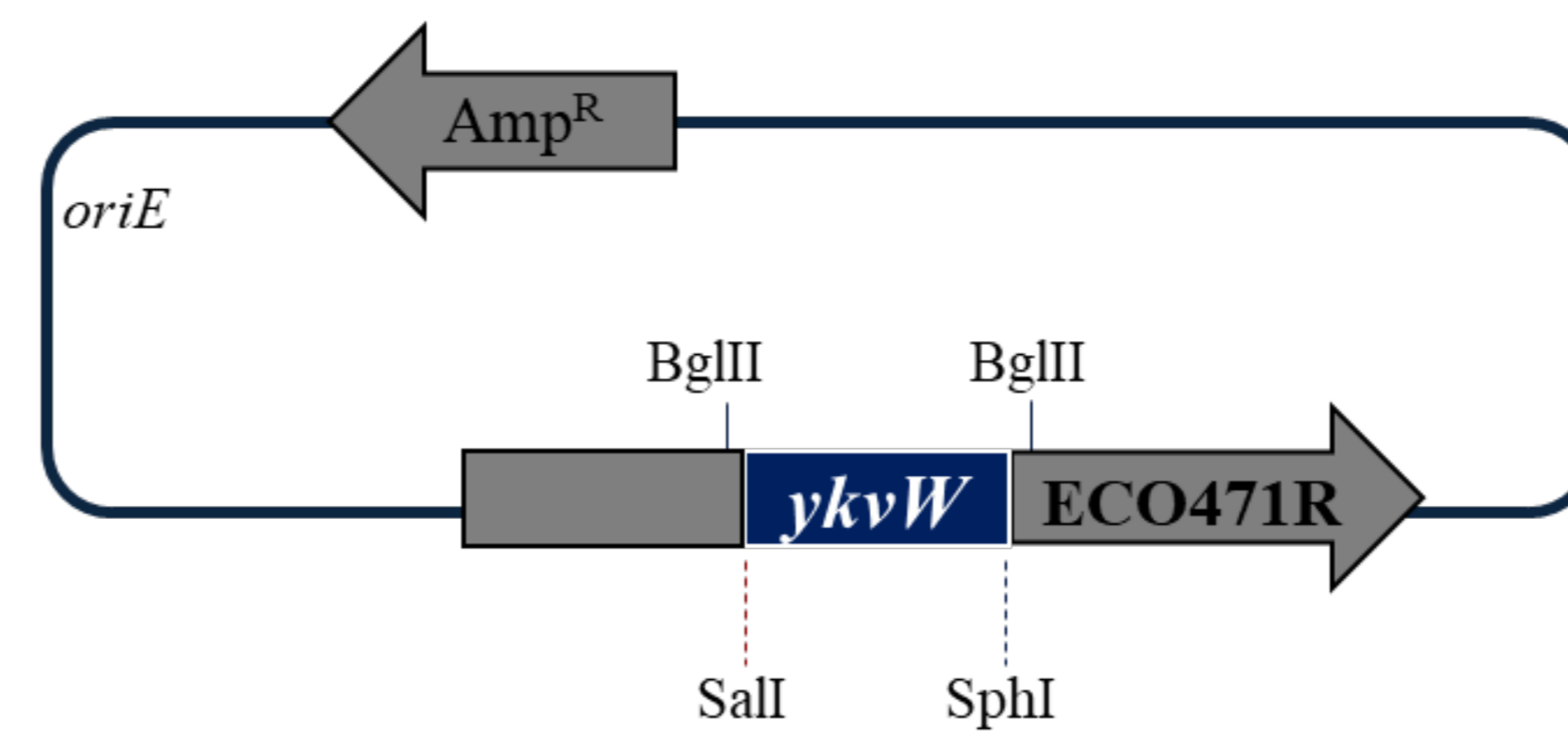
A. Amplificación del ORF de *ykvW*



Amplificación del ORF de *ykvW* por PCR con Vent pol. MTM. Marcadores de tamaño molecular
1. Amplicon del ORF de *ykvW* con los oligos #897 y #864

B. Corroboración enzimática de la construcción pJET1.2/blunt-*ykvW*

pJET1.2/blunt-*ykvW* (pPERM1887) 4,888 pb



Digestión enzimática de la construcción génica pPERM1887. MTM. Marcadores de tamaño molecular
1. Digestión doble (Sall-SphI).
2. Digestión con BglII.
3. Digestión con Sall.
4. Digestión con SphI.
5. Plásmido sin cortar.

Conclusiones

Se amplificó por PCR y se clonaron exitosamente las secuencias de interés (*ykvW* y *fur*) en el vector pJET1.2/blunt.

Referencias

1. Branzei and Foiani, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 9, 297–308 (2008)
2. Galaris *et al.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 12, 118535 (2019).
3. Lenhart *et al.* Microbiol Mol Biol Rev. 76, 530-564. (2012).
4. Chatterjee and Walker. Environ Mol Mutagen. 58,235-263. (2017).

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Subsidio: A1-S-27116); Universidad de Guanajuato (Subsidio: CIIC 082/2021); Veranos de la Ciencia (E. Ramírez agradece la beca otorgada por DAIP para la realización de este trabajo).