



Introducción

Las células se enfrentan constantemente a factores ambientales e intracelulares que pueden promover la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los radicales de oxígeno tienen el potencial de modificar la estructura química de sus genomas, con consecuencias citotóxicas y genotóxicas. En *Bacillus subtilis*, el estrés oxidativo, activa la expresión de distintos circuitos genéticos cuyos productos le permiten prevenir y/o eliminar el daño que genera el estrés oxidativo sobre su material genético. No obstante, existen genes como *yhaZ*, cuya función, es aun desconocida. Este gen se compone de 1,071 pb y su producto predicho posee homología con Alquilpurinas-ADN-N-glicosilasas, proteínas vinculadas con la reparación del DNA. Sin embargo, estudios recientes muestran que *yhaA*, posee además, homología con la proteína de la familia TET (por sus siglas en Ingles ten-eleven translocation) con función de metilcitosinas dioxigenasas [4-8]. Para determinar la función bioquímica de *YhaZ* y facilitar su purificación, en el presente proyecto se obtuvo una cepa de *E. coli* portando un plásmido para sobreexpresar a *yhaZ* y generar una proteína recombinante His₆-YhaZ.

A continuación, se prepararon células competentes de la cepa *E. coli* XL-10 Gold y se transformaron con el plásmido pPERM1891. Se seleccionaron colonias resistentes a ampicilina (Amp); de estas, se eligieron 4, las cuáles se sujetaron a análisis de restricción de minipreparaciones de ADN plasmídico, utilizando las enzimas BamHI y HindIII. Los resultados obtenidos se

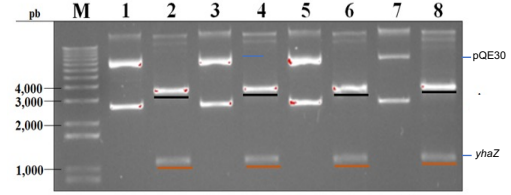


Figura 3. El DNA plasmídico extraído de 4 colonias transformantes (Carriles 1, 3, 5, y 7) se sujeto a restricción con las enzimas BamHI y HindIII (Carriles 2, 4, 6, y 8). Los productos generados separados en un gen de agarosa mostraron dos bandas de ADN, una de 3461 pb, correspondiente al vector pQE30, y otra de 1071 pb (Carriles 2, 4, 6, y 8). Consistente con el tamaño del gen *yhaZ*. M. Maradores de ADN.

Resultados

I. Análisis, mediante restricción, del vector pJET 1.2/blunt conteniendo al gen *yhaZ*

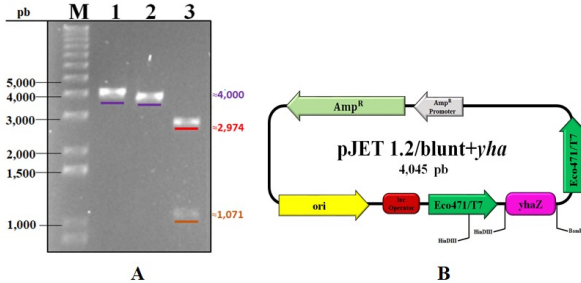


Figura 1. A). Fragmentos obtenidos de las digestiones enzimáticas realizadas con BamHI y HindIII del plásmido pJET 1.2/blunt que contenía el marco de lectura abierto del gen *yhaZ*. En los carriles 1 y 2 se aprecia la linealización del plásmido, en el carril 3 se observan las bandas generadas por la restricción conjunta de las enzimas BamHI y HindIII, liberando al gen *yhaZ* (aprox. 1,071 pb) del vector pJET 1.2/blunt (aprox 2,974 pb). B) Mapa del plásmido pPERM 1890; pJET1.2Blunt conteniendo el marco de lectura abierto del gen *yhaZ* con sitios de corte para BamHI y HindIII.

II. Obtención de una cepa de *E. coli* portando una construcción para la sobreexpresión heteróloga del gen *yhaZ*

El gen *yhaZ*, liberado del plásmido pJET1.2/Blunt, se subclonó en entre los sitios BamHI/HindIII en el sitio de clonación múltiple del vector de expresión pQE30, obteniendo la construcción pQE30-*yhaZ* (pPERM1891)(Fig. 2).

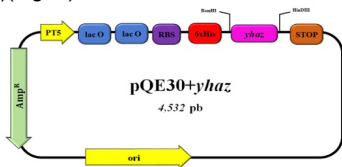


Figura 2. Mapa del plásmido pPERM1891, pQE30 conteniendo el marco de lectura abierto del gen *yhaZ* entre los sitios BamHI y HindIII.

Conclusión

Se obtuvieron cepas de *E. coli* XL-10 portando la construcción pPERM1891 (pQE30+*yhaZ*) para la sobreexpresión heteróloga de gen *yhaZ*. En estudios futuros, las cepas se utilizarán para corroborar la sobreproducción de una proteína YhaZ etiquetada con 6 hostidinas, así como su purificación mediante cromatografía de afinidad,

Referencias

- 1.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.
- 2.Hariri Akbari, F. (2021). An overview of Stress in cellular and molecular levels and the importance of studying responses to stresses in biology. Research Journal of Biotechnology, 16.
- 3.Taufert Cardona, Y., & Marin Morales, M. A. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. Biosalud, 13(2), 95-110
- 4.Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L. E., Canny, S. P., Chachu, K., ... & Lovett, C. M. (2005). Genetic composition of the Bacillus subtilis SOS system. Journal of bacteriology, 187(22), 7655-7666.
- 5.Pedreira, T., Eifmann, C., & Stülke, J. (2022). The current state of Subti Wiki, the database for the model organism Bacillus subtilis. Nucleic Acids Research, 50(D1), D875-D882.
- 6.[Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., ... & Yoshikawa, H. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature, 390(6657), 249-256.
- 7.Shi, R., Mullins, E. A., Shen, X. X., Lay, K. T., Yuen, P. K., David, S. S., ... & Eichman, B. F. (2018). Selective base excision repair of DNA damage by the non-base-flipping DNA glycosylase AlkC. The EMBO journal, 37(1), 63-74.
- 8.Nabel, C. S., Manning, S. A., & Kohli, R. M. (2012). The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. ACS chemical biology, 7(1), 20-30.

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.