



Introducción

El sistema de la guanina oxidada (GO) es una ruta dedicada a reparar y prevenir lesiones en el ADN causadas por el estrés oxidativo mejorando la fidelidad de la replicación del ADN.^[1] El estrés oxidativo es causado por una producción desmedida de especies oxidantes las cuales pueden dañar moléculas como los ácidos nucleicos, proteínas y ácidos grasos.^[2]

El gen *ohrA* de *Bacillus subtilis* (~426 pb) codifica para una peroxidoxina (141 aminoácidos) cuya función es proteger a la célula contra peróxidos orgánicos. Su expresión es regulada por el factor Sigma A y por la proteína OhrR que lo reprime.^[3]

Se ha demostrado que una cepa de *B. subtilis* Δ GO es hiperresistente al peróxido de hidrógeno ^[4]. Un análisis proteómico de esta cepa demostró que *ohrA* aumenta su síntesis cuando se adiciona peróxido de hidrógeno. Con el objetivo de estudiar el papel de *ohrA* en la resistencia al peróxido de hidrógeno de la cepa Δ GO se obtendrá una mutante de *B. subtilis* en ese gen.

Resultados

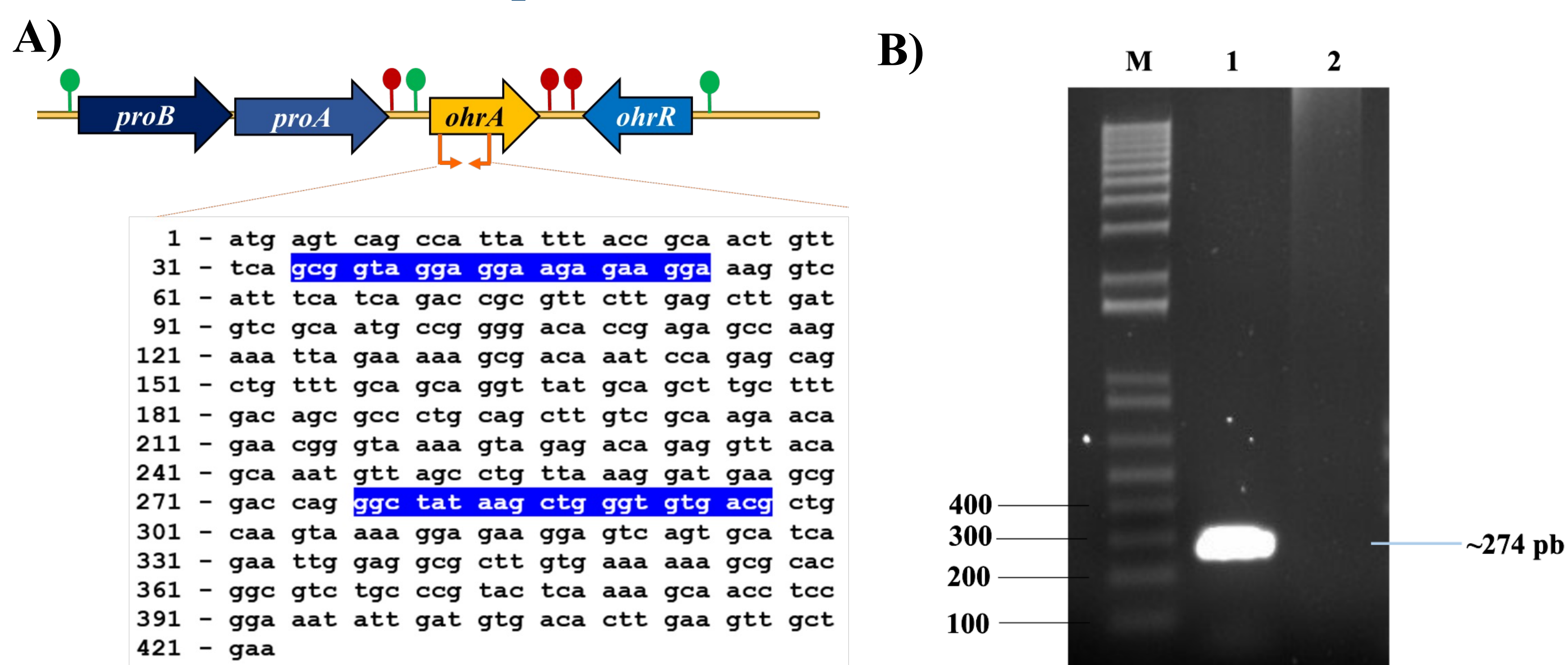
I. Amplificación del gen *ohrA* por PCR

Fig. 1. PCR para amplificar una región interna del marco de lectura del gen *ohrA* de *Bacillus subtilis*. **A)** Representación esquemática y secuencia amplificada. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en azul. **B)** Amplificación por PCR. El amplicón generado es de 274pb. **(M)** Marcadores de tamaño molecular 1kb. **(1)** Amplificación de *ohrA* **(2)** control negativo conteniendo únicamente el oligonucleótido directo.

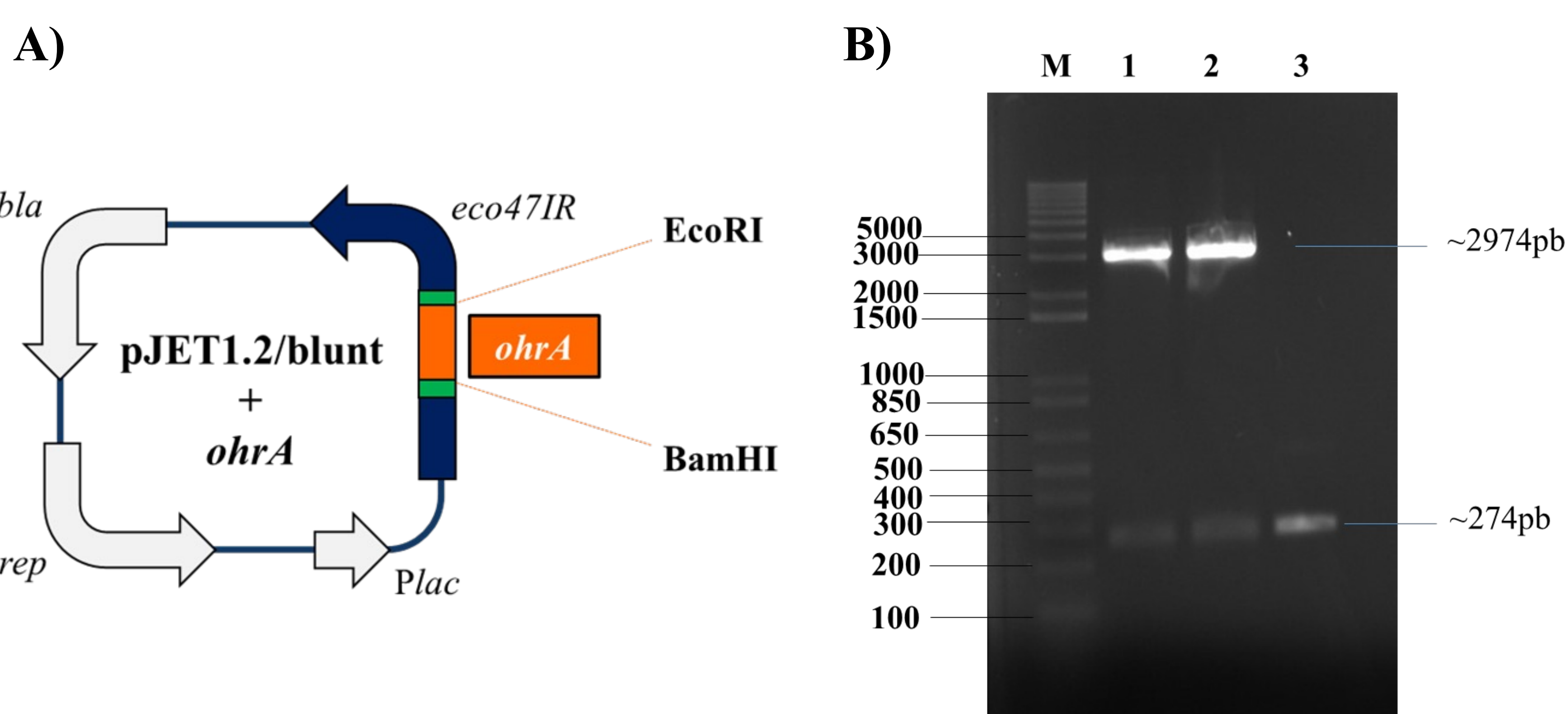
II. Construcción pJET1.2/blunt-*ohrA*

Fig. 2. Construcción pJET1.2/blunt-*ohrA*. **A)** Representación esquemática de la construcción con el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt más un fragmento del marco de lectura de *ohrA*. **B)** Corroboración de la construcción pJET1.2/blunt-*ohrA* por restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. **(M)** Marcadores de tamaño molecular, **(1)** Restricción con EcoRI y BamHI del Clon 1, **(2)** Restricción con EcoRI y BamHI del Clon 24, **(3)** Fragmento purificado de *ohrA* (control).

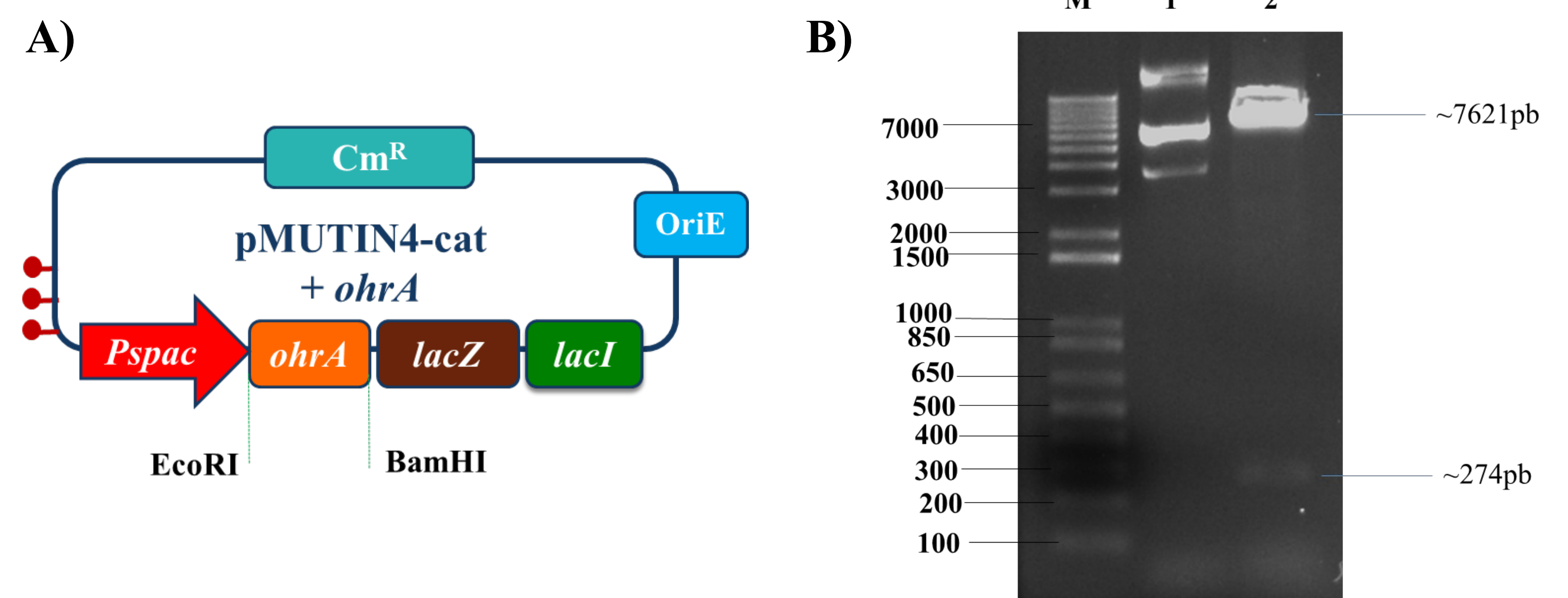
III. Construcción pMUTIN-4-cat-*ohrA*

Fig. 3. Construcción pMUTIN-4-cat-*ohrA*. **A)** Representación esquemática de la construcción con el vector integrativo pMUTIN-4-cat más un fragmento del marco de lectura de *ohrA*. **B)** Corroboración de la construcción por medio de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI **(M)** Marcadores de tamaño molecular, **(1)** ADN plasmídico pMUTIN-4-cat-*ohrA*, **(2)** Restricción de pMUTIN-4-cat-*ohrA* con EcoRI y BamHI.

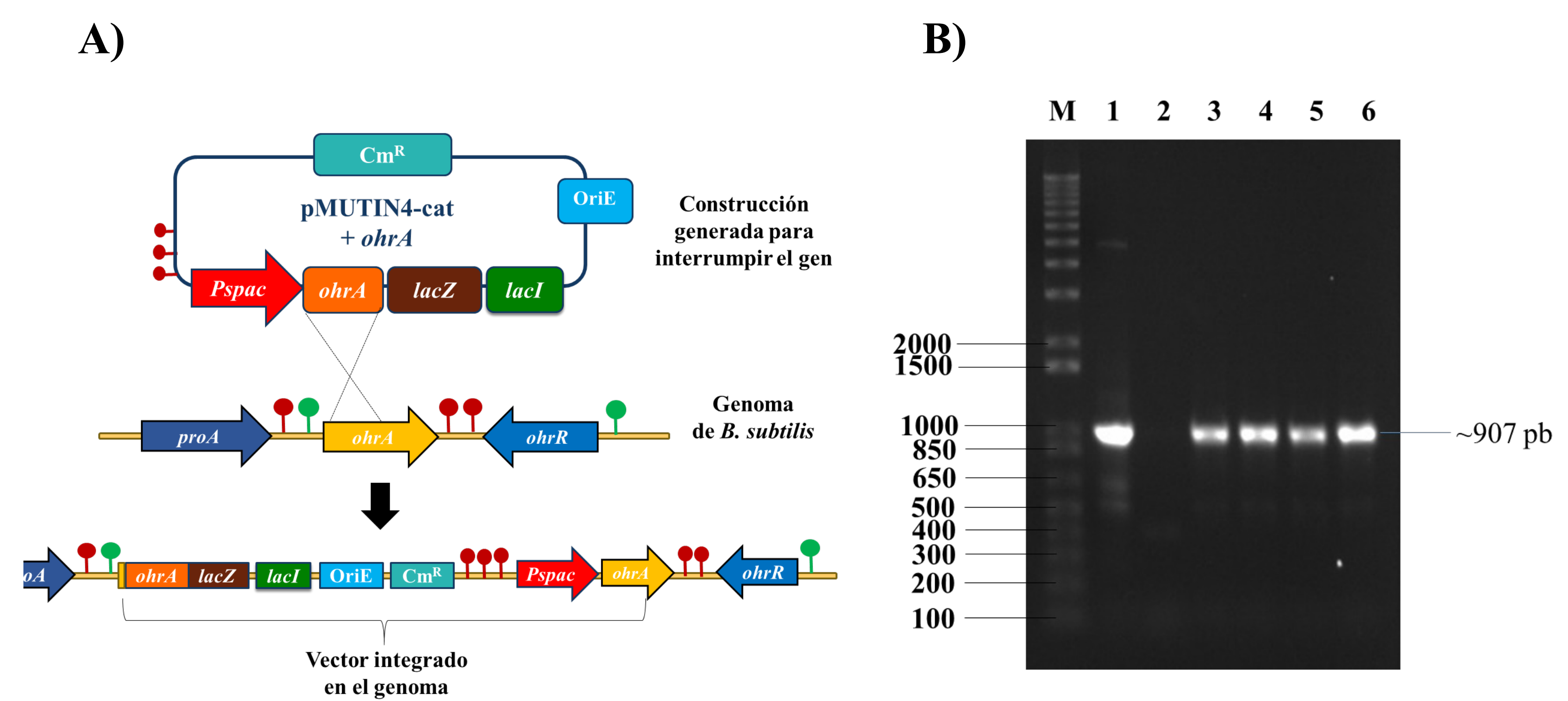
IV. Obtención de una mutante de *Bacillus subtilis* Δ *ohrA*

Fig. 4. Obtención de cepas mutantes en el gen *ohrA* de *B. subtilis*. **A)** Representación esquemática de la interrupción del gen *ohrA* con la construcción pMUTIN-4-cat-*ohrA*. **B)** Obtención de las cepas de *B. subtilis* Δ *ohrA* y Δ GO/*ohrA*. **(M)** Marcadores de tamaño molecular 1 kb, **(1)** Control positivo: amplificación de *ohrA-lacZ* en pDNA de la construcción pMUTIN4-cat-*ohrA*. **(2)** Control negativo: amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de la cepa WT **(3-4)** Amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de las mutantes *B. subtilis* Δ *ohrA*, **(3-4)** Amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de las cuádruples mutantes *B. subtilis* Δ GO/*ohrA*.

Conclusión

En este estudio se diseñó, se obtuvo y se corroboró molecularmente la construcción genética pMUTIN-4-cat-*ohrA* para interrumpir el gen *ohrA* de *B. subtilis*. Con esta construcción se obtuvieron y caracterizaron molecularmente cepas mutantes de *B. subtilis* deficientes del gen *ohrA*, así como mutantes deficientes del sistema GO y *ohrA*, que se utilizarán para estudiar la contribución de *ohrA* en proteger a la cepa Δ GO del peróxido de hidrógeno.

Referencias

- [1] Michaels ML, & Miller JH. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-Hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine). . J. Bacteriology. 174: 621-6325.
- [2] Portillo, S. (2018) *Peroxirredoxinas: eficientes reductoras de peróxidos y eficientemente reducidas. Función de los aminoácidos conservados en ambas reacciones*
- [3] Fuangthong, M. y col. (2001) *OhrR Is a Repressor of ohrA, a Key Organic Hydroperoxide Resistance Determinant in Bacillus subtilis.*
- [4] Gómez Romo, G. (2017) *Elucidación de factores involucrados en la hiperresistencia al peróxido de hidrógeno de una mutante de Bacillus subtilis deficiente en el sistema de reparación de la guanina oxidada (GO).* Tesis de Maestría, Universidad de Guanajuato.

Agradecimientos

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