

Introducción

La pared celular es un andamiaje vital para mantener la forma e integridad de las bacterias [1,2]. La principal estructura de carga de la pared celular es el peptidoglicano (PG), un copolímero formado por una secuencia alternante de N-acetilglucosamina y el Ácido N-acetilmurámico unidos mediante enlaces β -1,4 [1]. Debido a su restricción a bacterias, la síntesis de PG es uno de los principales objetivos de los antibióticos [2]. El gen *yciB* de *B. subtilis* codifica para una supuesta L,D transpeptidasa, perteneciente a la familia proteica YkuD [3]. Se demostró que la transcripción de *yciB* está regulada por el represor Zur, encargado de la captación de zinc, y se ha propuesto un papel en el transporte de zinc para YciB [4]. El ADN es una de las moléculas principales, y su estabilidad es de suma importancia para el correcto funcionamiento y la existencia de todos los sistemas vivos. Las sustancias químicas y las radiaciones genotóxicas ejercen efectos adversos sobre la estabilidad del genoma [5]. *Bacillus subtilis* cuenta con el sistema GO, el cual se encarga tanto de prevenir como de eliminar lesiones 8-oxoG. En nuestro grupo de trabajo se cuenta con una cepa deficiente del sistema GO la cual presenta un fenotipo hiperresistente a H₂O₂ e hipermutagénico. Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo sugieren que YciB podría contribuir a este fenotipo. Para investigar este aspecto, en este trabajo realizamos una mutante de *B. subtilis* deficiente en esta proteína.

Resultados

I. Amplificación y clonación de un fragmento del ORF de *yciB*

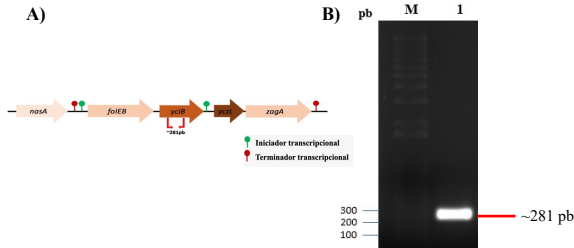


Figura 1. Estrategia de construcción de un plásmido para interrumpir al gen *yciB* de *B. subtilis*. A) Representación esquemática del locus de *yciB* y regiones aledañas, así como de la región interna de este gen que se amplificó por PCR indicado con las flechas rojas (*yciB*). B) Análisis electroforético del fragmento de la región interna de *yciB* amplificado por PCR. M: Marcadores de ADN (pb); Carril 1: Fragmento de *yciB* amplificado por PCR.

II. Diseño de una construcción integrativa (pMUTIN4- Δ *yciB*) para interrumpir a *yciB*

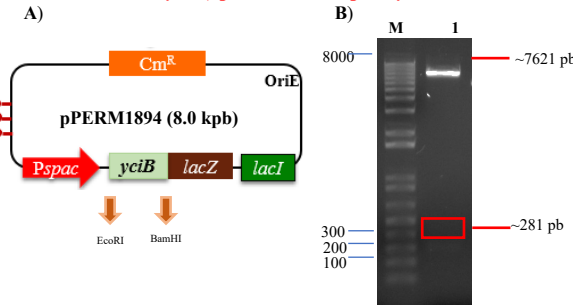


Figura 3. A) Mapa de restricción del plásmido pMUTIN4- Δ *yciB* (pPERM1894). **B)** Corroboración por restricción enzimática con EcoRI y BamHI de la obtención del plásmido pPERM1894, aislado de colonias transformantes de *E. coli* DH5 α . Carril 1, pPERM1894 cortado con EcoRI y BamHI. M, marcadores de ADN (pb).

III. Corroboración de la interrupción de *yciB* en *B. subtilis* WT y Δ GO

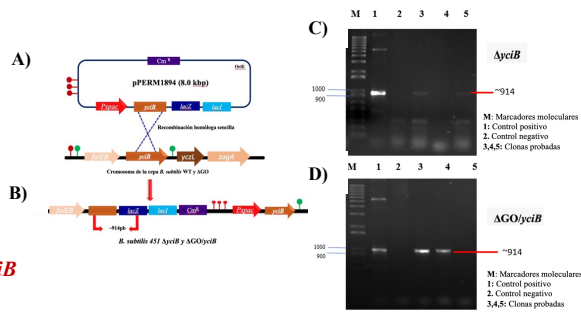


Figura 4. Interrupción del gen *yciB* de *B. subtilis*. A) Evento de recombinación homóloga sencilla que conduce a la integración del plásmido pPERM1894 en el locus *yciB* de *B. subtilis*. B) Fragmento de ADN que se amplificó por PCR, para corroborar la interrupción de *yciB*. C, D) Amplificación por PCR del fragmento esperado de ~914 pb que corrobora la interrupción de *yciB* en el fondo genéticos DGO (C) y WT (D), respectivamente. Carril 1, control positivo; carril 2 control negativo; Carril 3-5, clonas probadas para ambos fondos genéticos. M. Marcadores de ADN (pb).

Conclusión

Se obtuvieron y caracterizaron molecularmente cepas mutantes de *B. subtilis* deficientes del gen *yciB*, así como mutantes deficientes del sistema GO y *yciB*. Estas cepas se utilizarán para estudiar la contribución de *yciB* al fenotipo de hiperresistencia al estrés oxidativo de la cepa Δ GO de *B. subtilis*.

Referencias

- Höltje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 62:181–203
- Scheffers DJ, Pinho MG (2005) Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. Microbiol Mol Biol Rev 69:585–607
- <http://genolist.pasteur.fr/SubtilList/index.html>
- Gaballa A, Wang T, Ye RW, Helmann JD (2002) Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. J Bacteriol 184:6508–6514
- Rastogi, R. P., Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. Journal of nucleic acids, 2010.

Agradecimientos

Trabajo financiado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Subsidio: A1-S-27116); Universidad de Guanajuato (Subsidio: CIIC 082/2021). MJ. Toledo Ramírez agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de su estancia de Verano 2022.

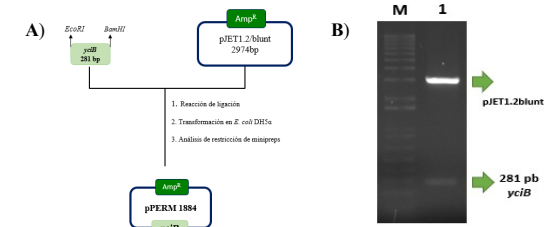


Figura 2. Construcción y corroboración de la clonación de *yciB* en el vector pJET1.2blunt. A) Diagrama de la estrategia que se utilizó para generar un plásmido conteniendo el fragmento de *yciB* entre los sitios EcoRI/BamHI de pJET1.2blunt. B) Corroboración por restricción enzimática del plásmido pPERM1884, aislado de colonias transformantes de *E. coli* DH5 α . Carril 1, pPERM1884 cortado con EcoRI y BamHI. M. Marcadores de ADN (pb).