

INTRODUCCIÓN

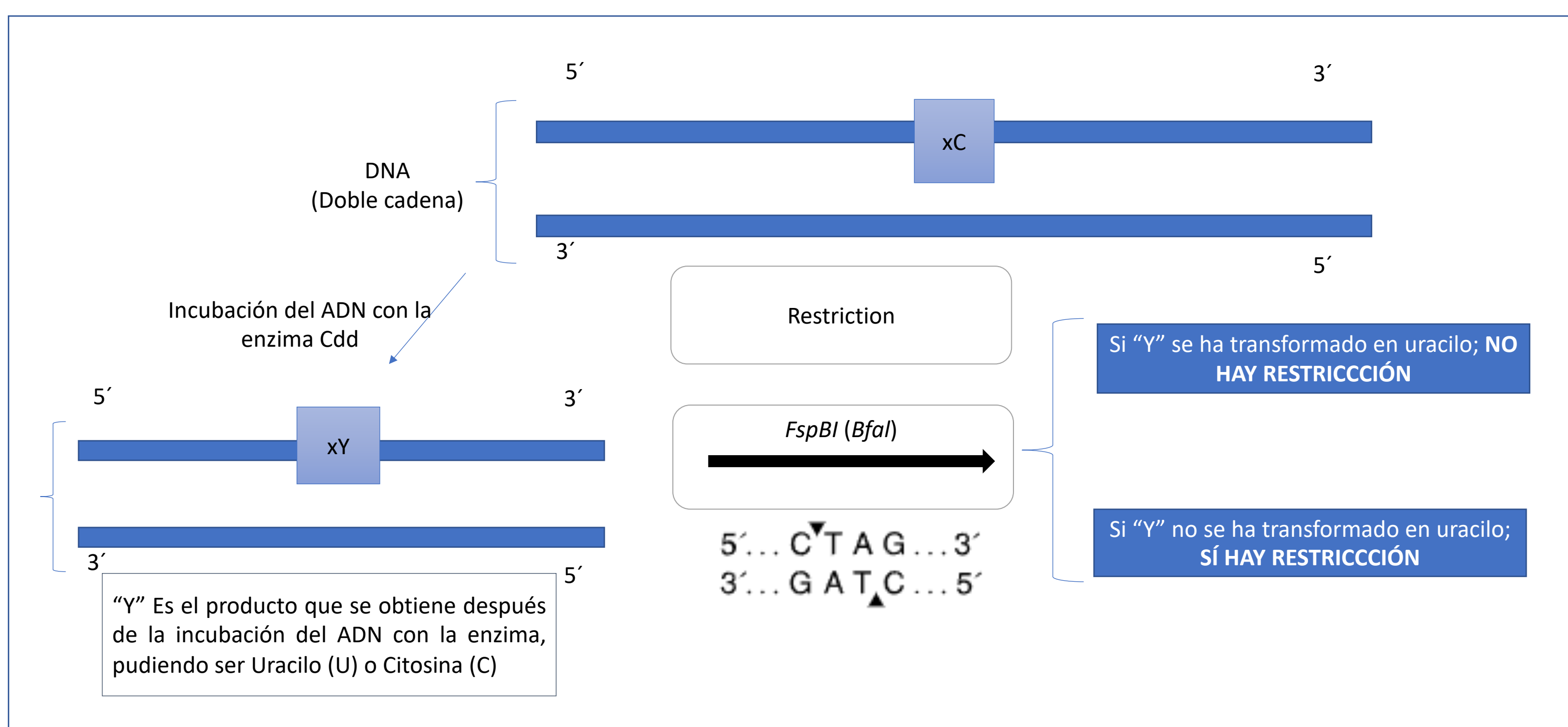
La enzima Citidin Desaminasa Cdd de *B. subtilis* participa en la ruta de salvamento de pirimidinas (1). Sin embargo, evidencia genética reciente ha involucrado a esta enzima en procesos de mutagénesis y reparación del ADN (2). A este respecto, se encontró que la sobreexpresión y/o eliminación de *cdd* incrementó la mutagénesis durante el crecimiento *B. subtilis*. Se postuló que estos efectos son resultado de un desbalance en la desaminación de bases que afectan la correcta operación del sistema de reparación de bases erróneamente apareadas (MMR). Por lo tanto, se hipotetizó que Cdd es capaz de operar sobre ADN genómico catalizando la desaminación hidrolítica de citosinas para generar uracilo, el procesamiento del uracilo a través de la Uracil DNA glicosilasa Ung o la Endonucleasa V YwqL generaría puntos de acceso para el sistema MMR (2,3). A la fecha se desconoce si Cdd es capaz de reconocer y desaminar ADN de cadena sencilla y/o doble, Para investigar si Cdd es capaz de desaminar DNA de doble cadena, en el presente estudio se diseñó una estrategia molecular basada en la incapacidad de una enzima de restricción de operar sobre su sitio de reconocimiento después de ser ofrecido como sustrato a la enzima Cdd.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Se utilizará como blanco de acción de Cdd una secuencia de ADN de 730 pares de bases con un sitio único de restricción Bfal contenida en el vector de clonación pUC18 (Fig. 1). Utilizando la estrategia experimental mostrada en el Esquema 1, el fragmento de ADN blanco se incubará con la proteína recombinante His₆-Cdd purificada mediante cromatografía de afinidad. En este ensayo se espera que la desaminación del sitio Fbal dependiente de His₆-Cdd impida la acción de la enzima de restricción generando una banda intacta (Esquema 1). En caso contrario, la acción de Fbal producirá dos fragmentos de ADN (Esquema 1).

```
1021 aactggatct caacagcggg atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg
1081 tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccggtatt gacgcggggc
1141 aagagcaact cggtcgcgcg atacactatt ctacagaatga ctggtgtgag tactcaccag
1201 tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa
1261 ccatgagtga taacactcgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc
1321 taaccgcttt ttgacacaac atggggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg
1381 agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa
1441 caacgttgcg caaactatta actggcggaac tacttactct agcttcccg caacaattaa
1501 tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg
1561 gctgggttat tgcgtataaa tctggagcgc gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag
1621 cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg
1681 caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg
```

Figura 1. Secuencia de ADN contenida en el vector pUC18 conteniendo un sitio único de corte para la enzima Bfal.



Esquema 1: Procedimiento experimental desarrollado para las pruebas de desaminación. Se inicia incubando la secuencia de ADN con la enzima Cdd en 4 diferentes concentraciones; 1, 2, 4 y 6 mg/μL, y a 1,2,4 y 8 horas de incubación a 30 °C. Finalizado su proceso de incubación, se precipita el ADN con 2 μL de acetato de sodio y 50 μL de etanol absoluto, posteriormente se realiza la restricción empleando la enzima Bfal y se corre una electroforesis para evidenciar la condición en la que se encuentra la secuencia de ADN, pudiendo ser desaminado si es que no hubo restricción o no desaminado y la restricción dio como resultado 2 fragmentos; uno de 522 pb y el otro de 208 pb.

RESULTADOS

La secuencia de interés fue amplificada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos específicos que flanquean este fragmento (Fig. 1); luego de purificarlo, el tamaño del fragmento amplificado fue corroborado en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (Fig. 2). Se corroboró que el tratamiento con Fbal genera dos fragmentos, uno de 522 pb y otro de 208 pb, como se muestra en la Figura 3. Actualmente, se cuenta con la enzima purificada His6-Cdd lo que nos permitirá en experimentos futuros investigar su capacidad de desaminar ADN de doble cadena utilizando la estrategia planteada en este estudio

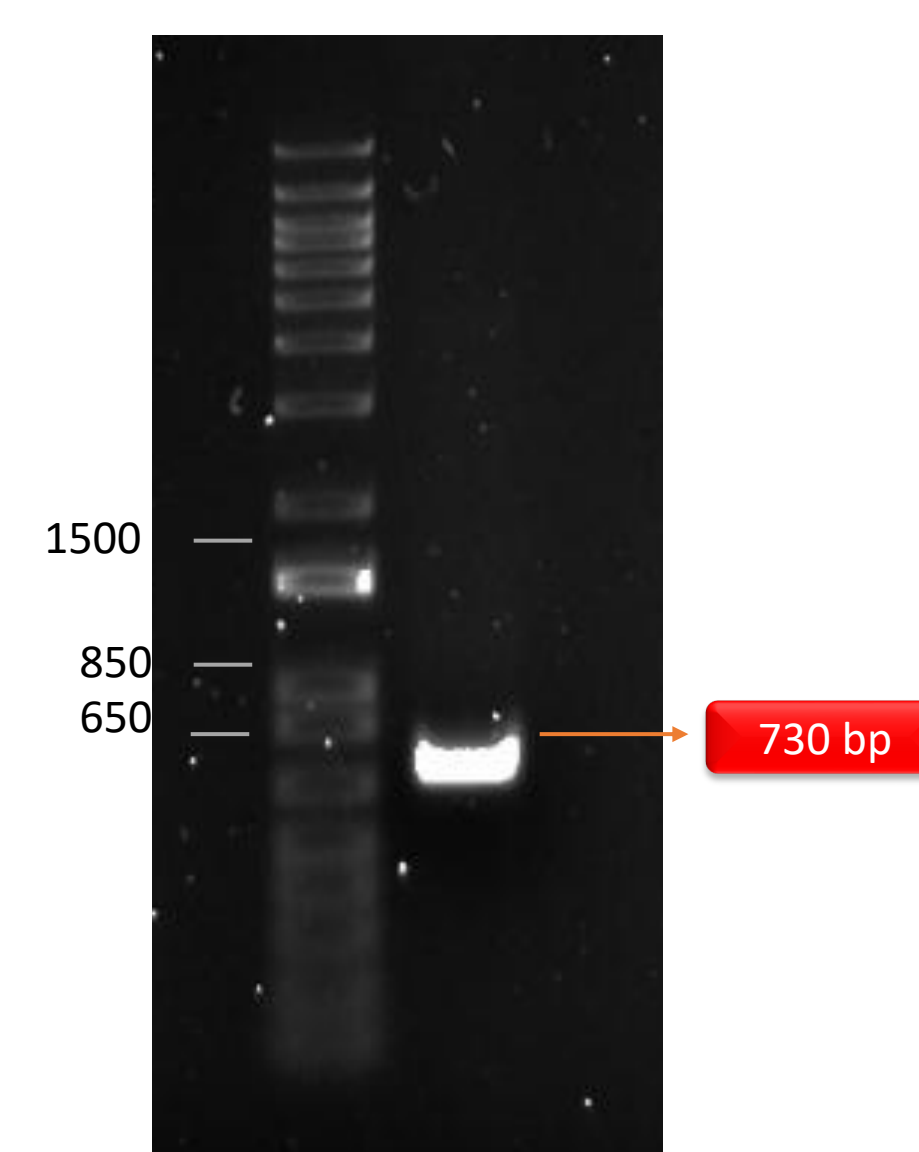


Figura 2. Gel de agarosa al 1% mostrando el fragmento de 730 pb amplificado por PCR usando como blanco el plásmido pUC18.

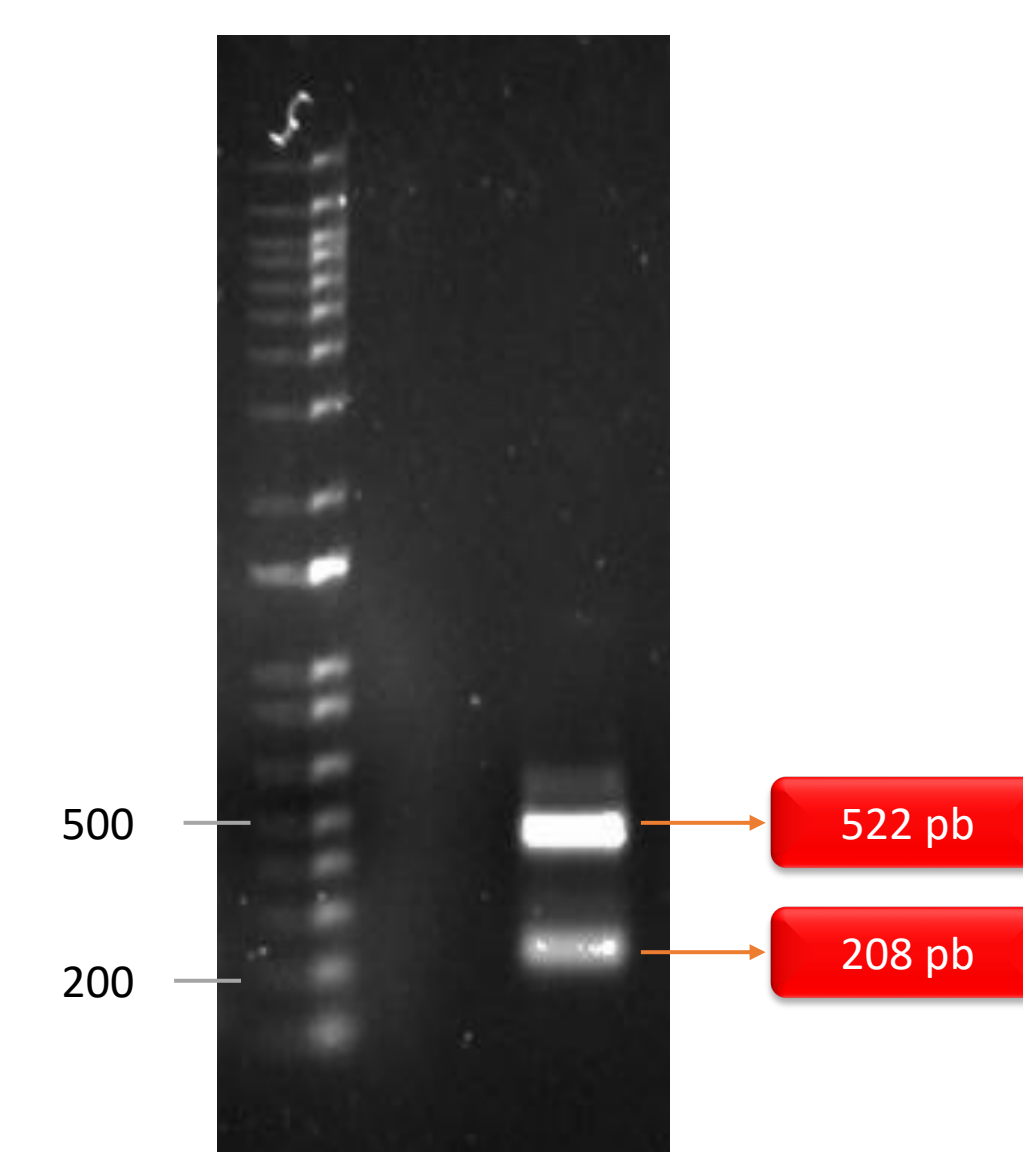


Figura 3. Gel de agarosa al 1%, mostrando la producción de los fragmentos de ADN esperados después de tratar el fragmento de ADN mostrado en la Fig. 1 con la enzima Bfal.

CONCLUSIÓN

Se obtuvo un fragmento de DNA con un sitio único de corte para la enzima Fbal el cual nos permitirá investigar si la enzima Cdd de *B. subtilis* es capaz de desaminar DNA de doble cadena.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo apoyado por CONAHCYT (Subsidios A-1S-27116 y CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio CIIC-029-2024). M. Rangel Martinez agradece el apoyo económico otorgado por la DAIP, para la realización de estancia de verano de investigación 2024. Se agradece también a la Beca QF. Raquel Ramirez Mauriño otorgada por la UG-DCNE durante el semestre enero-junio 2024.

REFERENCIAS

- Song BH, Neuhaard J. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase. Mol Gen Genet. 1989 Apr;216(2-3):462-8. doi: 10.1007/BF00334391. PMID: 2526291.
- Vázquez, A. (2021). *Análisis de la interacción de YwqL y MutSL durante el procesamiento de bases desaminadas en el DNA de Bacillus subtilis*. Tesis Doctoral, Universidad de Guanajuato.
- Nabel, C. S., Lee, J. W., Wang, L. C., & Kohli, R. M. (2013). Nucleic acid determinants for selective deamination of DNA over RNA by activation-induced deaminase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(35), 14225–14230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306345110>.