

Obtención de una cepa de *Escherichia coli* que sobreexpresa la proteína recombinante NrdR de *Bacillus subtilis*

Alejandro Beltrán Bautista¹, Karen Abundiz Yáñez¹, Mario Pedraza Reyes^{1*}

¹ División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México. * pedrama@ugto.mx

Introducción

El represor transcripcional NrdR regula los niveles de expresión de *nrdEF*, que codifica a la ribonucleótido reductasa (RNR) en respuesta a la concentración de nucleótidos [1]. La RNR cataliza la conversión de ribonucleótidos difosfatos (NDPs) en los correspondientes desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) [1]. Los dNTPs son necesarios para la replicación y reparación del ADN; por lo tanto, esta reacción enzimática se considera un paso clave para el metabolismo de los nucleótidos [1]. Así mismo, el balance de los dNTPs tiene implicaciones en la generación de mutaciones. La ausencia del represor NrdR resulta en la sobreexpresión de la RNR y en un incremento drástico en la generación de mutaciones que permiten a la bacteria *Bacillus subtilis* sobreponerse a condiciones limitantes del crecimiento [1]. Un análisis proteómico de una cepa carente de NrdR sometida a estrés nutricional, reveló una desregulación en proteínas que interactúan y sintetizan c-di-AMP, sugiriendo una relación con este segundo mensajero [2].

El c-di-AMP regula varios procesos fisiológicos en bacterias como la detección de daño al ADN y la mutagénesis y actúa por medio de moléculas efectoras que son ampliamente desconocidas [3]. Un estudio en *Listeria monocytogenes* utilizando perlas que tenían unido al c-di-AMP, identificó en un lisado de proteínas unidas a estas perlas a NrdR como una potencial proteína de unión a c-di-AMP. Posteriormente se vio que un lisado que sobreexpresa a NrdR une más c-di-AMP que el lisado control sugiriendo que hay una interacción directa con el segundo mensajero [4].

Por lo anterior, en este estudio se generó una cepa de *Escherichia coli* que expresa la proteína recombinante NrdR de *B. subtilis* para posteriormente purificarla y estudiar aspectos de su estructura/función, así como probar su capacidad de interactuar con c-di-AMP.

Resultados

Amplificación del gen *nrdR* por PCR

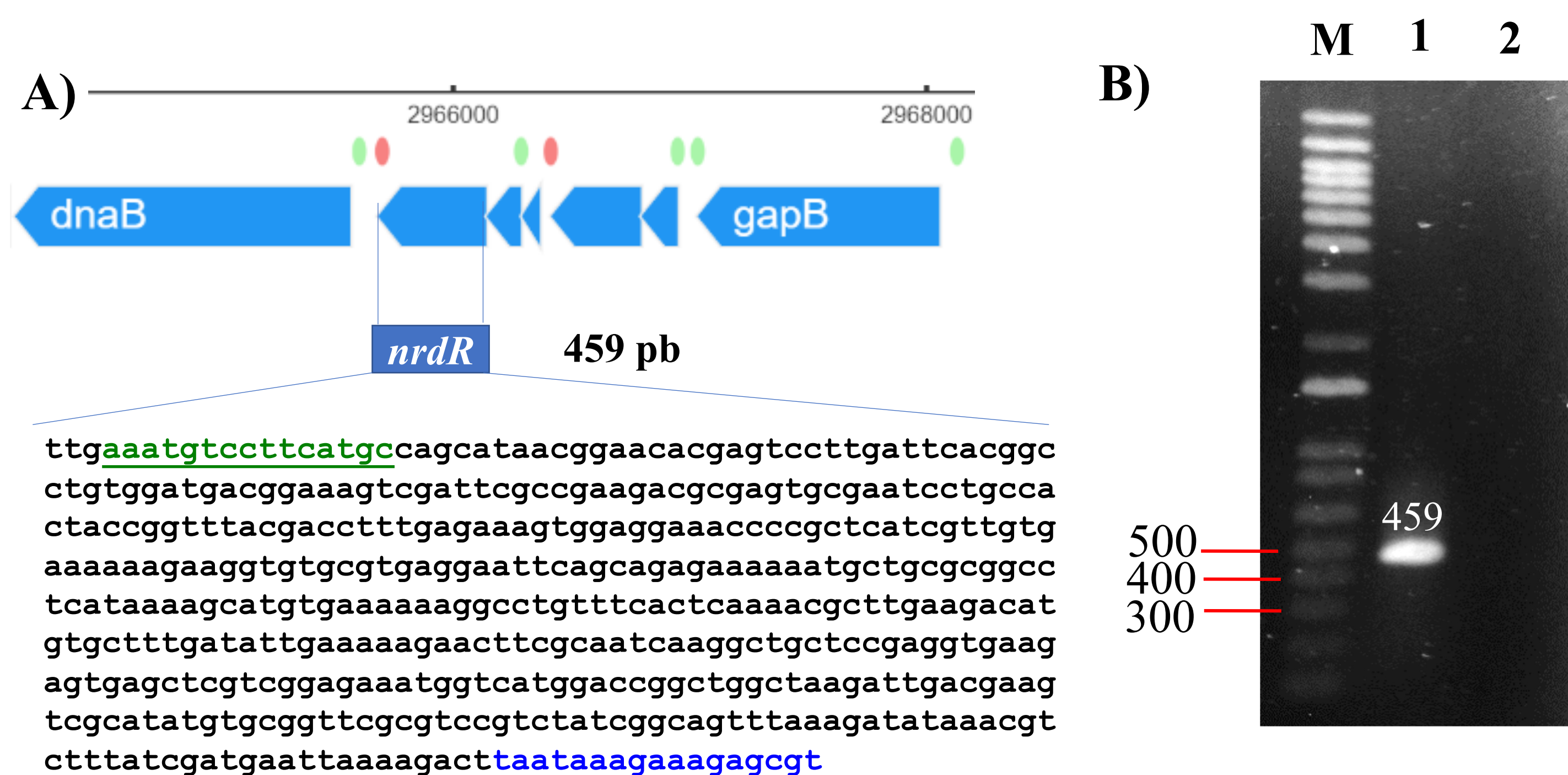


Fig. 1. PCR para amplificar el marco de lectura del gen *nrdR* de *Bacillus subtilis*.

A) Representación esquemática del gen de interés que fue amplificado. **B)** Amplificación por PCR: (M) Marcadores de tamaño molecular 1 Kb (1) Amplificación del gen *nrdR*. El amplicón generado es de 459 pb. (2) Control negativo de reacción (sin ADN).

Construcción pQE30-*nrdR*

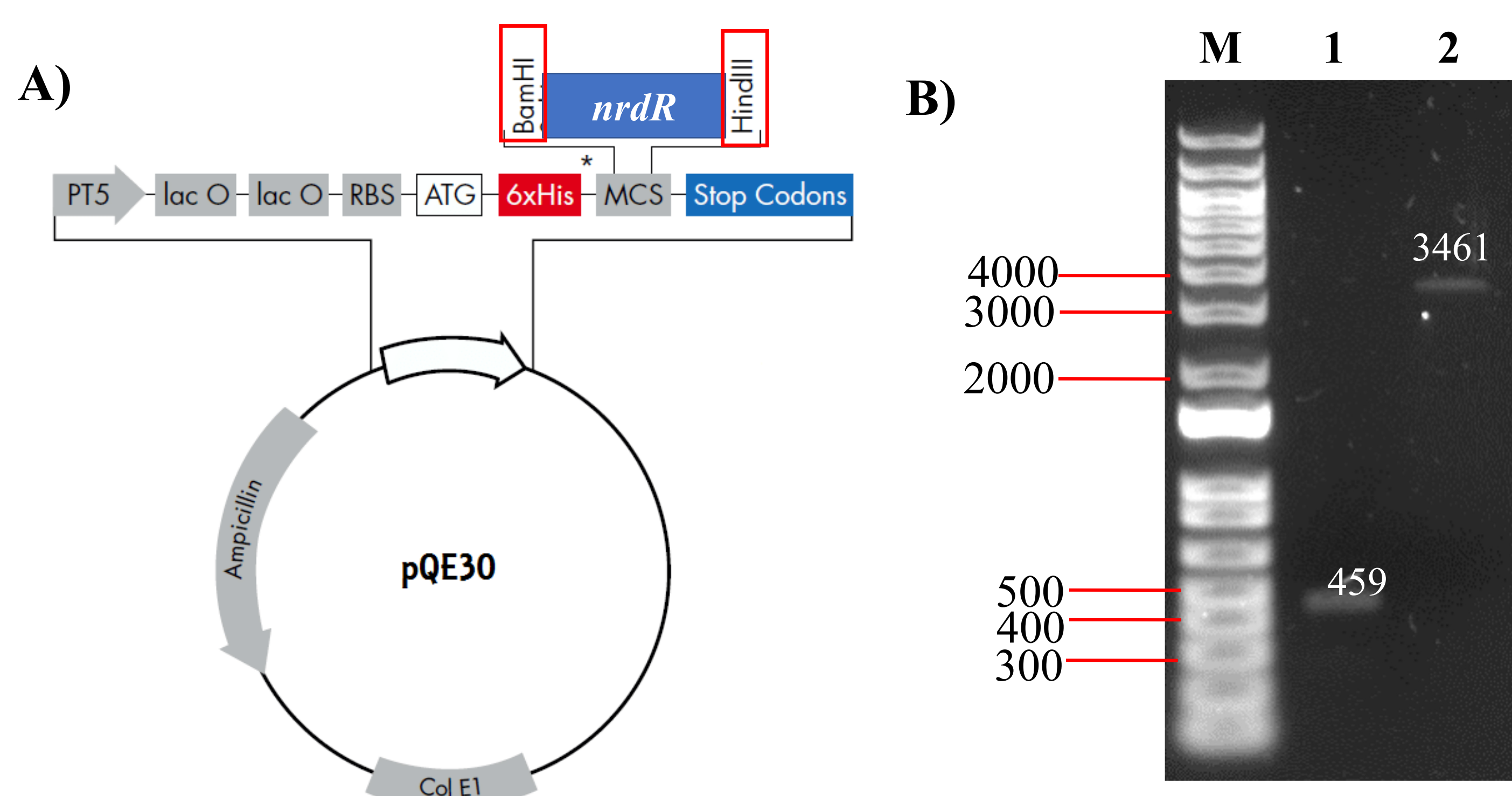


Fig 2. Construcción pQE30-*nrdR*. **A)** Representación esquemática de la construcción con el vector de expresión pQE30 más el marco de lectura abierto del gen *nrdR* **B)** Fragmento *nrdR* purificado con sitios BamHI e HindIII y pQE30 cortado con BamHI e HindIII purificado para su posterior ligación.

Corroboración de pQE30-*nrdR*

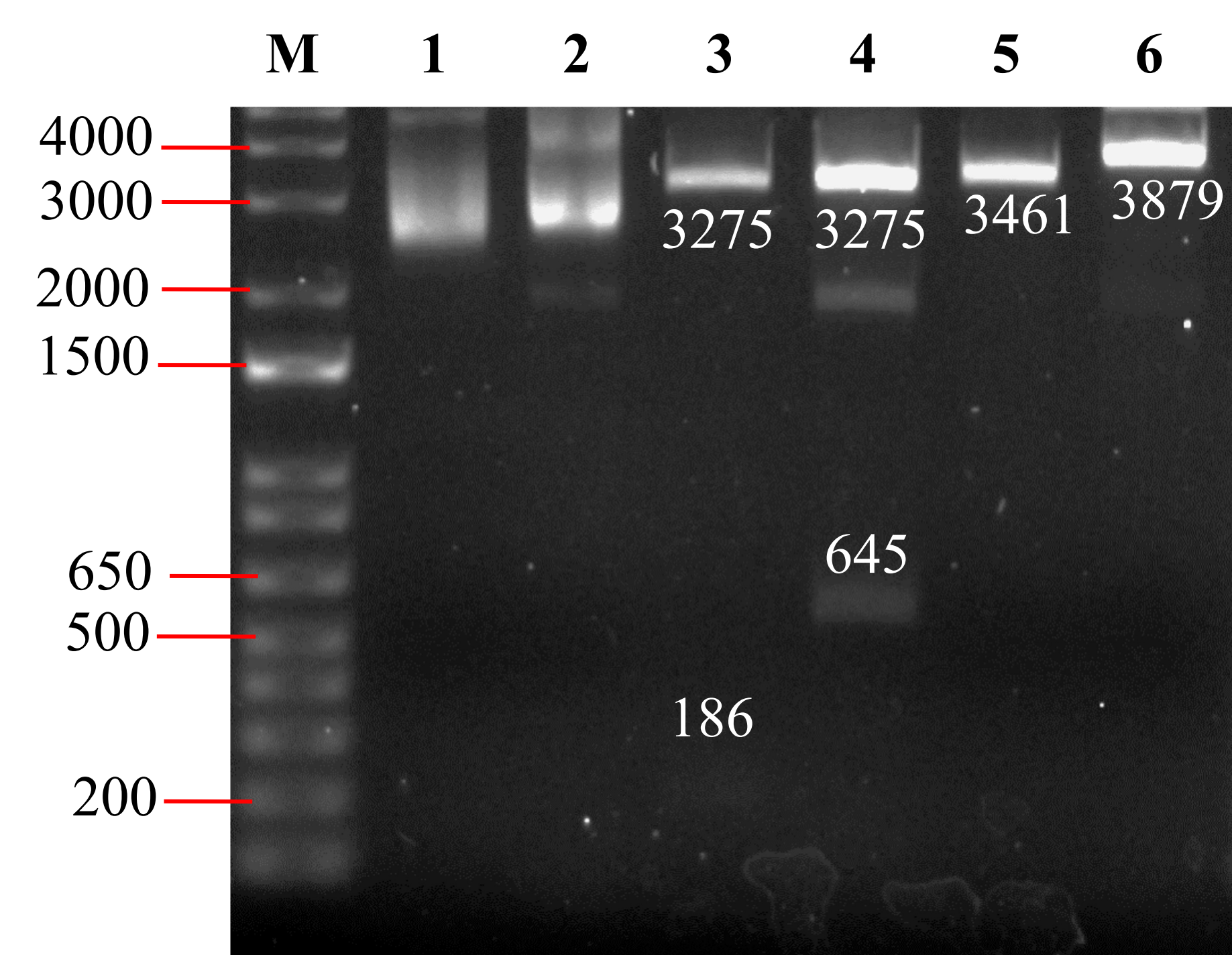


Fig. 3. Corroboración de la obtención de pQE30-*nrdR*. (M) Marcadores de tamaño molecular 1 Kb. (1) Plásmido pQE30 vacío sin cortar. (2) Plásmido pQE30-*nrdR* sin cortar. (3) Restricción con las enzimas XhoI y HindIII con el plásmido pQE30 vacío, se libera un fragmento de ~186 pb (4) Restricción con las enzimas XhoI y HindIII con el plásmido pQE30-*nrdR*, se libera un fragmento de ~645 pb correspondiente con el tamaño del fragmento de *nrdR* más ~186 pb generados por la restricción con XhoI. (5) Restricción con SacI de pQE30 vacío, se obtiene una banda de ~3461 pb correspondiente al tamaño del vector. (6) Restricción con SacI de pQE30-*nrdR*, se obtiene una banda de ~3879 pb, coincidiendo con el tamaño esperado de contener el inserto de 459 pb.

Análisis electroforético que corrobora la sobreexpresión de NrdR

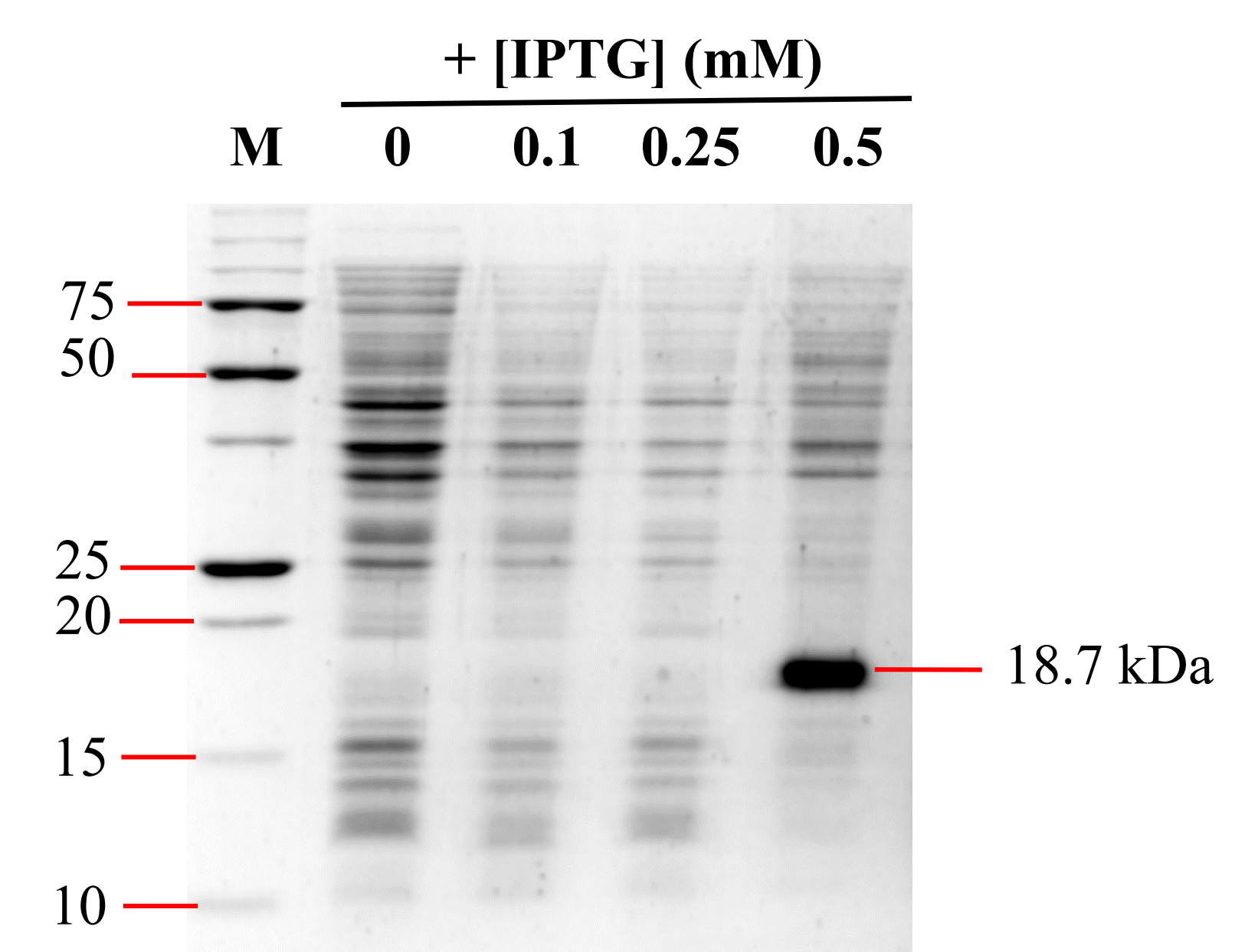


Fig. 4. Corroboración de la sobreexpresión de la proteína NrdR en *E. coli*. Análisis de lisados completos obtenidos de la cepa conteniendo la construcción pQE30-*nrdR* en gel SDS-PAGE al 15% con concentraciones 0 mM, 0.1 mM, 0.25 mM y 0.5 mM de IPTG. A la concentración de 0.5 mM se observa una banda de ~18.7 kDa, correspondiente con el esperado para la proteína recombinante 6xHis-NrdR.

Conclusión

Se demostró la obtención de la construcción genética pQE30-*nrdR* y la sobreexpresión de NrdR en *E. coli*. Las cepas sobreexpresantes se utilizarán para purificar la proteína recombinante y determinar experimentalmente si existe interacción con el c-di-AMP.

Referencias

- [1] Castro-Cerritos, K. V., Lopez-Torres, A., Obregón-Herrera, A., Wrobel, K., Wrobel, K., & Pedraza-Reyes, M. (2017). LC-MS/MS proteomic analysis of starved *Bacillus subtilis* cells overexpressing ribonucleotide reductase (*nrdEF*): implications in stress-associated mutagenesis. *Current Genetics*, 64(1), 215-222. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0722-7>
- [2] Castro-Cerritos, K.V., Lopez-Torres, A., Obregón-Herrera, A. et al. LC-MS/MS proteomic analysis of starved *Bacillus subtilis* cells overexpressing ribonucleotide reductase (*nrdEF*): implications in stress-associated mutagenesis. *Curr Genet* 64, 215–222 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0722-7>
- [3] Abundiz-Yáñez, K.; Leyva-Sánchez, H.C.; Robleto, E.A.; Pedraza-Reyes, M. Stress-Associated and Growth-Dependent Mutagenesis Are Divergently Regulated by c-di-AMP Levels in *Bacillus subtilis*. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 455. <https://doi.org/10.3390/ijms24010455>
- [4] Sureka, K., Choi, P. H., Precit, M., Delince, M., Pensinger, D. A., Huynh, T. N., Jurado, A. R., Goo, Y. A., Sadilek, M., Iavarone, A. T., Sauer, J., Tong, L., & Woodward, J. J. (2014). The Cyclic Dinucleotide c-di-AMP Is an Allosteric Regulator of Metabolic Enzyme Function. *Cell*, 158(6), 1389-1401. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.046>

Agradecimientos

Trabajo apoyado por CONAHCYT (Subsidios A-1S-27116 y CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio CIIC-029-2024). A. Beltrán agradece el apoyo económico otorgado por la DAIP, para la realización de estancia de verano de investigación 2024