

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

Alejandro Beltrán Bautista<sup>1</sup>, Karen Abundiz Yáñez<sup>1</sup>, Mario Pedraza Reyes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México. \* pedrama@ugto.mx

## Introducción

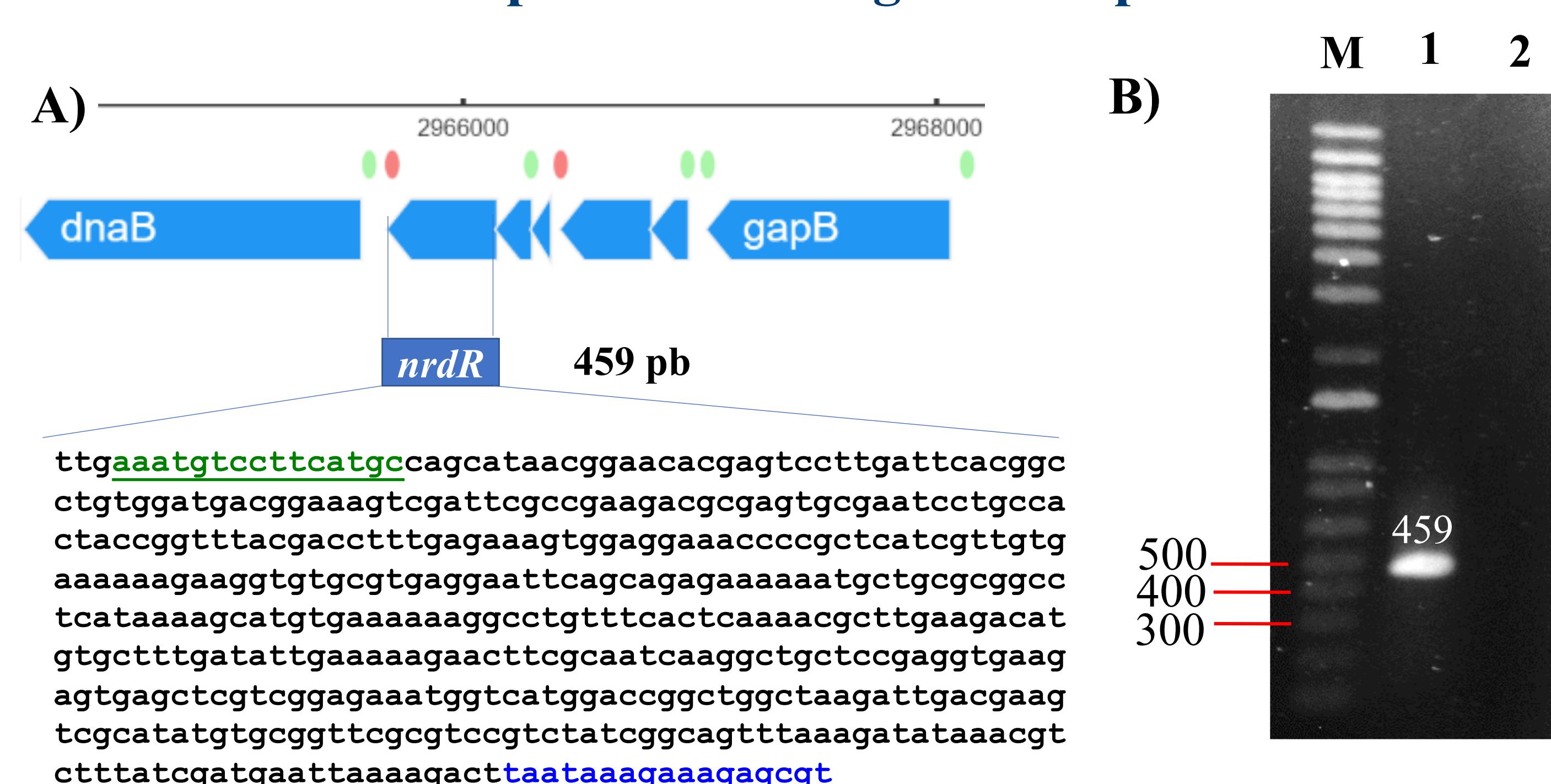
El represor transcripcional NrdR regula los niveles de expresión de *nrdEF*, que codifica a la ribonucleótido reductasa (RNR) en respuesta a la concentración de nucleótidos [1]. La RNR cataliza la conversión de ribonucleótidos difosfatos (NDPs) en los correspondientes desoxirribonucleótidos trifosfatos (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 interaccionar con c-di-AMP.

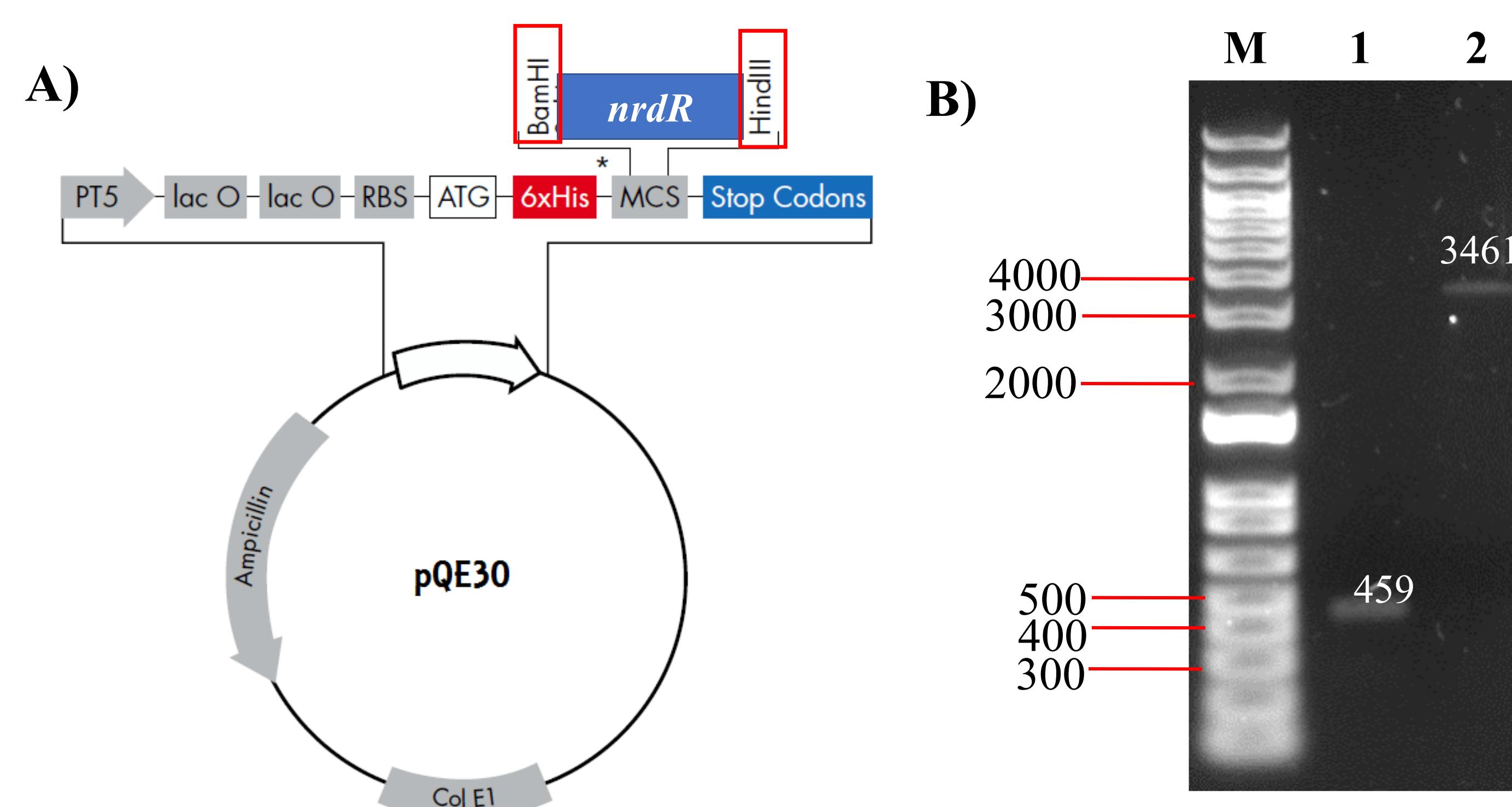
## Resultados

### Amplificación del gen *nrdR* por PCR



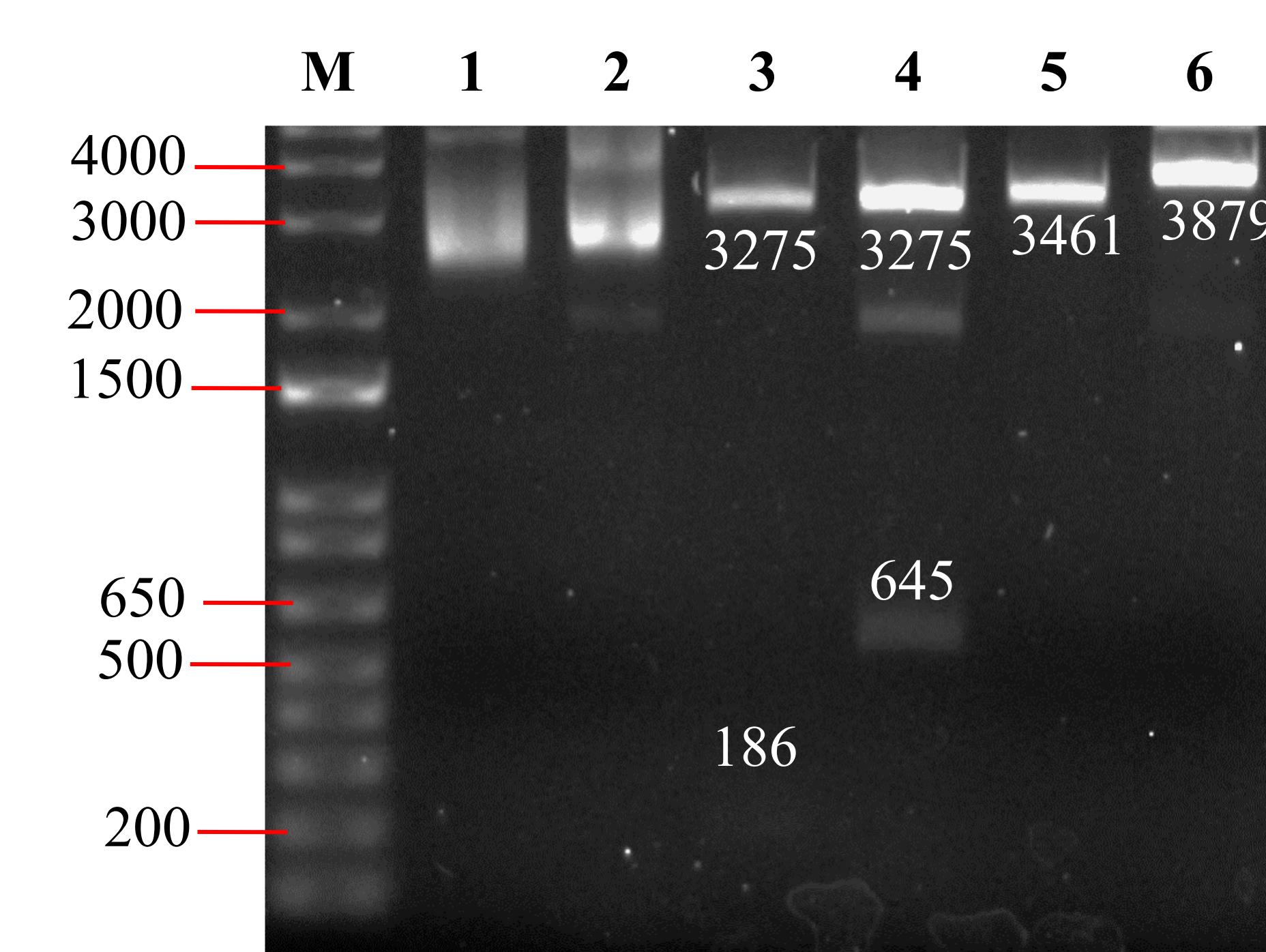
**Fig. 1. PCR para amplificar el marco de lectura del gen *nrdR* de *Bacillus subtilis*.**  
A) Representación esquemática del gen de interés que fue amplificado. B) Amplificación por PCR: (M) Marcadores de tamaño molecular 1 Kb (1) Amplificación del gen *nrdR*. El amplicón generado es de 459 pb. (2)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

### Construcción pQE30-*nrdR*



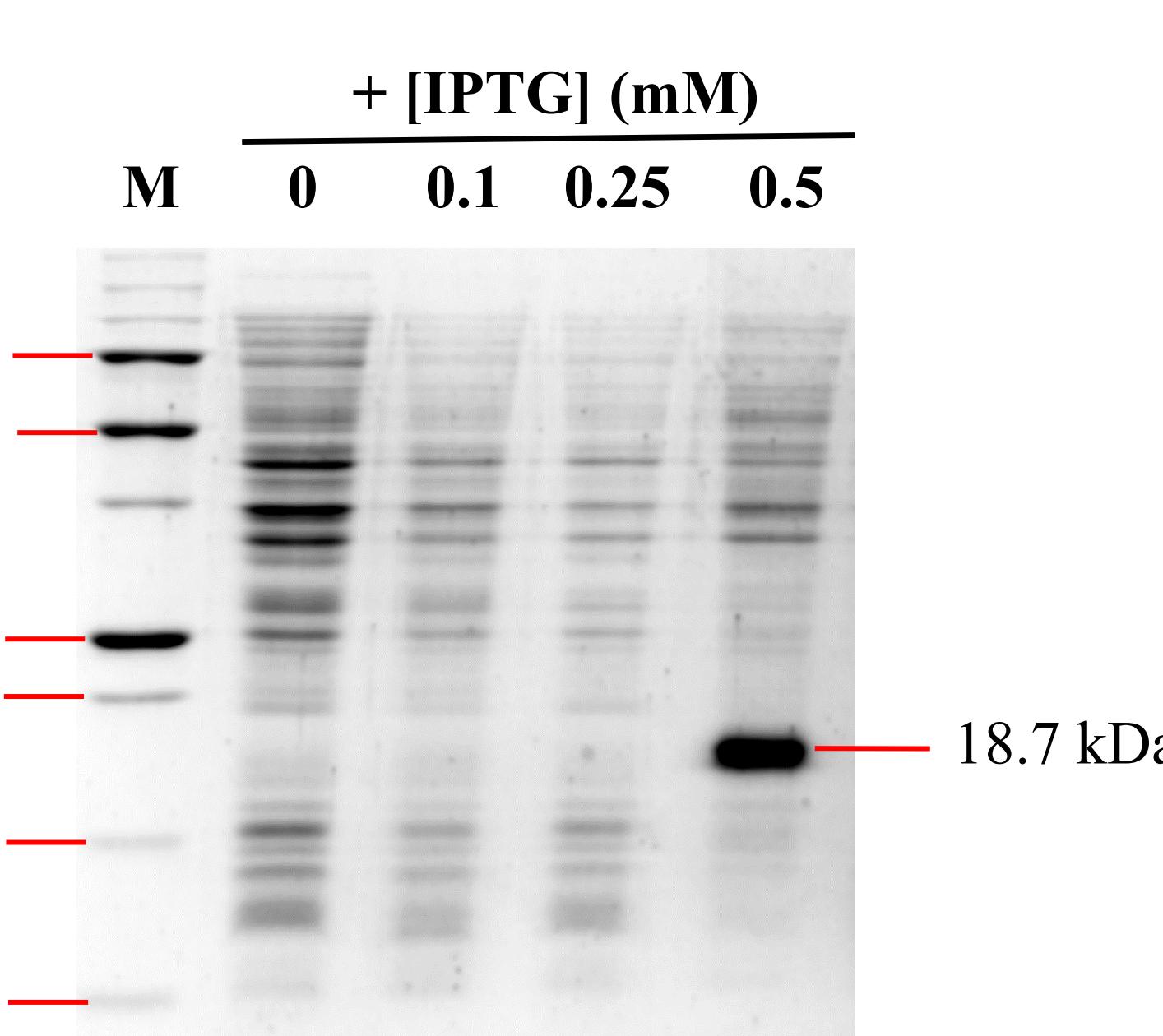
**Fig 2. Construcción pQE30-*nrdR*.** A) Representación esquemática de la construcción con el vector de expresión pQE30 más el marco de lectura abierto del gen *nrdR*. B) Fragmento *nrdR* purificado con sitios BamHI e HindIII y pQE30 cortado con BamHI e HindIII purificado para su posterior ligación.

### 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.

### Analís 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 6×His-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