Naturaleza y TECNOLOGÍA
Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA CEPA DE *BACILLUS SUBTILIS* DEFICIENTE EN RelA Y EL SISTEMA DE LA GUANINA OXIDADA

Eduardo Jafet Pérez Sandoval[a], Andrea Cantador Gámez[a], Mario Pedraza Reyes[a*]

[a] Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Guanajuato, Guanajuato, C.P. 36050, México. pedrama@ugto.mx

Resumen

La mutagénesis adaptativa o de fase estacionaria (MFE) permite a las bacterias generar diversidad genética y acelerar su evolución bajo condiciones de estrés celular. En este trabajo, se describe la generación y caracterización molecular de una cepa de *B. subtilis* YB955 (*hisC952 metB5 leuC427*) deficiente en RelA y el sistema de reparación/prevención de la Guanina Oxidada (GO). La estrategia experimental implementada consistió en preparar células competentes de una cepa de *B. subtilis* YB955 deficiente en el sistema GO. A continuación, estas células se transformaron con un plásmido integrativo que porta un fragmento del extremo 5′ de *relA* y un marcador de resistencia a cloranfenicol (Cm^R). El evento de recombinación homóloga que conduce a la interrupción de *relA* se verificó mediante PCR en colonias transformantes con fenotipo Cm^R. La obtención exitosa de esta cepa permitirá investigar la relación genética entre RelA y el sistema GO en la MFE de *B. subtilis*.

Palabras clave: Bacillus subtilis; Estrés oxidativo; Sistema GO; *relA*

GENERATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A *BACILLUS SUBTILIS* STRAIN DEFICIENT IN RelA AND THE GUANINE OXIDATION PREVENTION/REPAIR SYSTEM

Abstract

Stationary-phase mutagenesis (SPM) allows bacteria to generate genetic diversity and accelerate their evolution under conditions of cell stress. This work describes the generation and molecular characterization

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

of a *B. subtilis* ΔGO Δ*relA* strain in the YB955 genetic background (*hisC952 metB5 leuC427*). The strategy consisted of disrupting the *relA* gene in the strain *B. subtilis* YB955 ΔGO, which lacks a functional Guanine Oxidized (GO) prevention/repair system. To this end, an integrative plasmid carrying a 5´-end fragment of *relA* and the *cat* resistance gene was employed to disrupt *relA* through a single homologous recombination event. Transformant colonies exhibiting chloramphenicol resistance were successfully corroborated by PCR to confirm the disruption of *relA*. The generation and appropriate characterization of this strain will allow us to investigate the genetic relationship between RelA and the GO system in *B. subtilis* SPM.

Keywords: Bacillus subtilis; Oxidative stress, GO system; *relA*

1. Introducción

Bacillus subtilis representa un excelente paradigma para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la diferenciación celular en bacterias Grampositivas. Durante su ciclo de vida, este microorganismo es capaz de producir varios tipos celulares bien caracterizados, incluyendo esporas, células competentes y presuntamente una subpoblación que promueve la diversidad genética (Shank y Kolter, 2019; Pedraza-Reyes y col., 2024).

La mutagénesis en fase estacionaria (MFE), también conocida como mutagénesis inducida por estrés, es el conjunto de procesos celulares que produce alteraciones genéticas en células carentes de crecimiento. Estos procesos ampliamente conservados han sido implicados en la inestabilidad genómica y se consideran mecanismos que producen diversidad genética y aceleran la evolución en tiempos de estrés (Foster, 2007). Es posible que, durante condiciones de estrés, como la limitación de nutrientes, ocurran eventos mutagénicos sesgados sobre genes activamente transcritos, aumentando así el potencial adaptativo de las mutaciones (Robleto y col., 2012).

Sung y Yasbin (2002) diseñaron un sistema de ganancia de función para estudiar la mutagénesis adaptativa en la cepa *B. subtilis* YB955. Esta cepa es incapaz de sintetizar histidina, metionina y leucina debido a las mutaciones cromosómicas *hisC952*, *metB25* y *leuC427*.

1.1 Lesiones oxidativas como fuente de mutaciones adaptativas

Los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) son regulados de forma endógena por el metabolismo aerobio y pueden ser alterados por distintos factores intra- y extracelulares. Los radicales de oxígeno pueden reaccionar con las bases nitrogenadas y los azúcares desoxirribosa y ribosa, por lo que el ADN, ARN, desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos son susceptibles al daño oxidativo (Michaels y col., 1992; Taddei y col., 1997; Juan y col., 2021). Uno de los principales factores de daño al ADN es la formación de 7,8-dihidro-8-oxodesoxiguanosina (8-OxoG). Esta base oxidada, generada por ataque de un radical hidroxilo sobre la guanina, se aparea erróneamente con una adenina (8-OxoG:A) lo que puede generar, tras la replicación, mutaciones por transversión G·C → T·A y promover errores transcripcionales (Michaels y Miller, 1992). En *B. subtilis*, estos efectos son contrarrestados por el sistema de prevención/reparación de la Guanina Oxidada (GO). En este sistema participa YtkD, una nucleotidil difosfohidrolasa que se encarga de hidrolizar el precursor 8-Oxo-dGTP a su forma monofosfato, evitando su incorporación en el ADN. Además, este sistema utiliza las ADN glicosilasas MutM y MutY, que reconocen y procesan los malos apareamientos 8-oxo-G:A. Mientras que la primera hidroliza la 8-OxoG del ADN, la segunda opera sobre la adenina de este mal apareamiento. Posteriormente, los sitios apurínicos/apirimidínicos (AP) resultantes, son reparados mediante la vía de reparación por escisión de bases (BER), restaurando la secuencia original y preservando la estabilidad del genoma (Friedberg y col., 1995; Seeberg y col., 1995; Pedraza-Reyes y col., 2024).

En un reporte previo (Vidales y col., 2009), se demostró que la inactivación genética del sistema GO de la cepa *B. subtilis* YB955, indujo en esta, un incremento dramático en la frecuencia de producción de colonias protótrofas His^+ y Met^+, sin afectar las reversiones en el gen *leuC427*. Estudios posteriores revelaron que las reversiones en este alelo ocurren mediante un mecanismo de cooperación y competencia entre MutY y el sistema de reparación de bases erróneamente apareadas (MMR) (Debora y col., 2011). Estos resultados mostraron que en condiciones de estrés nutricional las lesiones oxidativas y su procesamiento pueden representar oportunidades para la generación de mutaciones adaptativas (Pedraza-Reyes y col., 2024).

Número Especial "Verano de la Investigación DCNE 2026"
ISSN 2007-672X
Universidad de Guanajuato

1.2 Respuesta estricta en B. subtilis

En condiciones desfavorables para la supervivencia, la síntesis de segundos mensajeros de nucleótidos como las guanosinas tetrafosfato (ppGpp) y pentafosfato (pppGpp), es crucial en las bacterias. Estas moléculas, también conocidas como "alarmonas", preparan a las bacterias para afrontar y escapar de estados metabólicos desventajosos como la inanición. Esta reorganización metabólica es conocida como "*respuesta estricta*" y se caracteriza por la atenuación de los procesos de crecimiento y replicación, al tiempo que se activa la biosíntesis de aminoácidos, la adaptación al estrés y se favorecen estados celulares como la esporulación, motilidad, formación de biopelículas, etc., (Anderson y Col., 2021).

Las (p)ppGpp (término colectivo que define las alarmonas guanosina penta y tetra fosfato) se sintetizan a partir de la pirofosforilación de guanosina difosfato (GDP) o guanosina trifosfato (GTP), y su concentración intracelular puede variar desde niveles micromolares hasta milimolares en respuesta a las fluctuaciones ambientales (Anderson y Col., 2021).

Los cambios drásticos en los niveles de (p)ppGpp están determinados por diferentes sintetasas e hidrolasas que responden a señales ambientales y celulares específicas (Ronneau y Hallez, 2019). Estas enzimas se clasifican generalmente en dos tipos: las sintetasas monofuncionales que cuentan con un solo dominio de síntesis y bifuncionales que, además de sintetizar (p)ppGpp, cuentan con un dominio para hidrolizarlo (Ronneau y Hallez, 2019).

B. subtilis cuenta con dos enzimas monofuncionales, YjbM y YwaC, y una enzima bifuncional, denominada RelA. Se estima que en este organismo los niveles de (p)ppGpp son inferiores a 20 micromolar por unidad de densidad óptica durante el crecimiento exponencial (Nishino y col., 1979), pero aumentan rápidamente a niveles milimolares en respuesta a condiciones de crecimiento adversas, como la privación de aminoácidos (Cashel y col., 1996). RelA también es responsable de los altos niveles de (p)ppGpp que se acumulan en *B. subtilis* durante la respuesta estricta (Smith y col., 1980).

El estrés oxidativo es un factor que promueve la MFE en células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente. Bajo estas condiciones, esta bacteria también desencadena la respuesta estricta (Pedraza-Reyes y col.,

2024). En consideración a estos antecedentes, resulta de interés investigar si la acumulación de lesiones genéticas 8-OxoG es un factor que modula la MFE en una cepa deficiente en RelA. Para abordar esta pregunta, utilizando un enfoque genético-molecular, el presente trabajo se enfocó en generar una cepa mutante de *B. subtilis* deficiente en el sistema GO y RelA.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos empleados en este estudio se describen en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Fenotipo, genotipo y descripción	Referencia
	B. subtilis	
YB955	*hisC952 metB5 leuC427*	Sung and Yasbin., 2002
PERM1517	*Bacillus subtilis* YB955 ΔGO *(ytkD mutM yfhQ)* Neo^R, Tc^R, Eri^R	Vidales y col., 2009
PERM2171	*Bacillus subtilis* YB955 ΔGO *relA* Neo^R, Tc^R, Eri^R, Cm^R	Este estudio
	E. coli	
PERM 2020	*E. coli* conteniendo el plásmido pMUTIN4-CAT más un fragmento del gen *relA* de *B. subtilis* para su interrupción	Stock del laboratorio de Mario Pedraza Reyes
	Plásmidos	
pPERM2020	pMUTIN4-CAT más un fragmento del gen *relA* de *B. subtilis* para su interrupción	Stock del laboratorio de Mario Pedraza Reyes

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

Oligonucleó-tidos	Secuencia (5´- 3´)	Descripción
Directo 975	GCGAATTCC AAGTATTGA CTG	Oligonucleótido directo que amplifica ~315 pb rio arriba del codón interno del gen *relA*
Reverso 183	GCAGCAACG AGACGTCAC	Oligonucleótido reverso interno a *lacZ* para corroborar mutantes de *B. subtilis* con el gen *relA* interrumpido

2.2. Medios de cultivo

Para la generación de células competentes se utilizó el medio de cultivo BMK. Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo sólido y líquido de Luria-Broth (LB). Cuando fue requerido, este medio se suplementó con los siguientes antibióticos, cloranfenicol (Cm, 5 µg/ml), eritromicina (Eri, 1 µg/ml), tetraciclina (Te, 15 µg/ml), neomicina (Neo, 10 µg/ml).

2.3 Condiciones de cultivos

Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37 °C en agitación orbital a 250 rpm durante el tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria. Los preinóculos se dejaron crecer durante 12 h a 37 °C en agitación a 250 rpm. Los medios sólidos se incubaron a 37 °C durante 12 h.

3. Resultados

3.1 Obtención de la cepa B. subtilis ΔGO/ΔrelA.

Siguiendo la estrategia descrita en Materiales y Métodos, se prepararon células competentes de la cepa *B. subtilis* PERM1517 (ΔGO). Estas se transformaron con el plásmido integrativo pPERM2020, el cual porta un fragmento 5′ del gen relA y un marcador que confiere resistencia a cloranfenicol (Cm^R). Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de medio LB suplementado con Neo, Eri, Tc y Cm. El evento de recombinación homóloga sencilla hipotético que conduce a la interrupción del gen *relA* se muestra en la Figura 1.

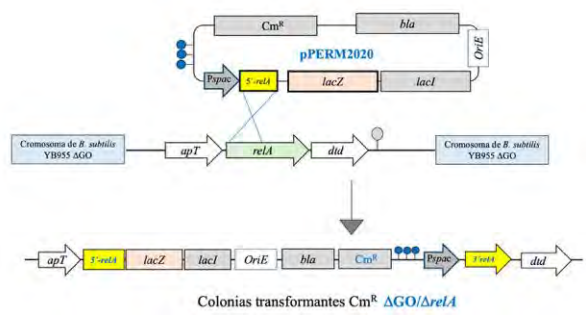


Figura 1. Estrategia para interrumpir el gen *relA* en la cepa *B. subtilis* ΔGO. Mediante un evento de recombinación homóloga sencilla, el plásmido pPERM2020 se integra en el gen *relA*. La recombinación interrumpe a *relA* y confiere a las colonias transformantes resistencia a Cm.

3.2. Caracterización molecular de colonias transformantes de la cepa B. subtilis ΔGO/ΔrelA

Las colonias transformantes se corroboraron molecularmente mediante PCR en colonia utilizando oligonucleótidos específicos directo (975) y reverso (183) descritos en la Tabla 2. La temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos se determinó en reacciones de PCR, utilizando como molde el plásmido pPERM2020 (Tabla 1). Las reacciones de amplificación se realizaron en 3 temperaturas de alineamiento; i.e., 56.3, 61.3 y 67 °C. Las tres temperaturas elegidas generaron una única banda con un tamaño esperado de ~948 pb. En consideración a estos resultados, se eligió la temperatura de 67 °C (Fig. 2B; carril 2) para la caracterización de las colonias transformantes de interés.

A continuación, se eligieron 3 colonias transformantes para realizar reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican un fragmento del extremo 5′ de *relA* y el gen *lacZ* del plásmido integrativo que interrumpe este gen (Fig. 2A). Las tres colonias transformantes generaron un único producto de amplificación con el tamaño esperado de ~948 pb (Fig. 2B). Estos

resultados demostraron la obtención de la cepa *B. subtilis* ΔGO/Δ*relA*.

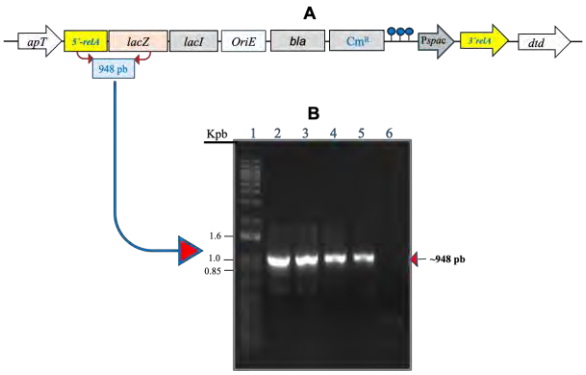


Figura 2. Análisis electroforético de reacciones de PCR para corroborar la interrupción del gen *relA* en colonias transformantes deficientes en el sistema GO. A) Esquema que muestra la región del gen *relA* interrumpida con el plásmido integrativo; se señala el fragmento de PCR de ~948 pb que corrobora la interrupción de *relA*. B) Carril 1, marcadores de DNA; carril 2, DNA plasmídico pPERM2020; carriles 3-5, productos de reacciones de PCR utilizando como molde DNA de colonias transformantes; carril 6, reacción de control realizada sin DNA molde.

4. Discusión

La cepa *B. subtilis* YB955 ha sido fundamental en el estudio de los procesos mutagénicos que ocurren durante la fase estacionaria, bajo condiciones de estrés nutricional (Sung y Yasbin, 2002). Durante esta fase, RelA permite a *B. subtilis*, a través de la síntesis y degradación de (p)ppGpp, adaptarse a condiciones limitantes del crecimiento (Pedraza-Reyes y col., 2024). Por otra parte, se ha reportado que la acumulación de 8-OxoG en una cepa de *B. subtilis* YB955 deficiente en el sistema GO, potencia la MFE (Vidales y col., 2009). En el presente estudio se interrumpió el gen *relA* en el fondo genético *B. subtilis* YB955 ΔGO. En estudios en marcha, la cepa resultante permitirá investigar si las mutaciones adaptativas dependientes de las alarmonas (p)ppGpp son moduladas por lesiones genéticas de naturaleza oxidativa, específicamente por la 8-OxoG. Los resultados esperados extenderán el conocimiento actual referente a los factores que promueven la diversidad genética y que permiten a bacterias de vida libre escapar de condiciones limitantes del crecimiento.

5. Conclusión

Se generó y caracterizó molecularmente una mutante de la cepa *B. subtilis* YB955 deficiente en RelA y en el sistema GO.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Secretaría de Ciencias Humanidades Tecnologías e Innovación (SECIHTI; Subsidio, CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio, CIIC 219/2026).

Referencias bibliográficas

Anderson, B. W., Fung, D. K., Wang, J. D. (2021). Regulatory themes and variations by the stress-signaling nucleotide alarmones

(p)ppGpp in Bacteria. *Annu Rev Genet.* 55:115-133. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021821-025827

Cashel, M., Gentry, D. M., Hernandez. V. J., Vinella, D. (1996). The stringent response, p 1458–1496. In Neidhardt FC (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: *Cellular and Molecular Biology*, Vol 1. ASM Press, Washington, DC.

Debora, B. N., Vidales, L. E., Ramírez, R., Ramírez, M., Robleto, E. A., Yasbin, R.E., Pedraza-Reyes, M. (2011). Mismatch repair modulation of MutY activity drives *Bacillus subtilis* stationary-phase mutagenesis. *J. Bacteriol.* 193:236-45. https://doi.org/10.1128/jb.00940-10

Foster, P. L. (2007). Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42: 373–397. https://doi.org/10.1080/10409230701648494

Friedberg, E. C., Walker, G. C., and Siede, W. (1995). DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(9):4642. https://doi.org/10.3390/ijms22094642

Michaels M. L., Cruz, C., Grollman, A, P., Miller, J, H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7022–7025. https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7022

Michaels, M. L., Miller, J.H. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriol* 174:6321–6325. https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6321-6325.1992

Nishino, T., Gallant, J., Shalit, P., Palmer, L., Wehr, T. (1979). Regulatory nucleotides involved in the Rel function of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 140:671–679. https://doi.org/10.1128/jb.140.2.671-679.1979

Pedraza-Reyes, M., Abundiz-Yañez, K., Rangel-Mendoza, A., Martínez, L. E., Barajas-Ornelas, R. C., Cuéllar-Cruz, M., Leyva-Sánchez, H. C., Ayala-García, V. M.,

Valenzuela-García, L. I, Robleto, E. A. (2024). *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 27;88(2): e0015823. https://doi.org/10.1128/mmbr.00158-23

Robleto, E. A., Martin, H. A., Pedraza-Reyes, M. (2012), Mfd and transcriptional derepression cause genetic diversity in *Bacillus subtilis*. *Front Biosci (Elite Ed).* 4(4):1246-54. https://doi.org/10.2741/e455

Ronneau, S., Hallez, R. (2019). Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 43:389–400. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz009

Seeberg, E., Eide, L., Bjørås, M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20:391–397. DOI: 10.1016/S0968-0004(00)89086-6

Shank, E., A., Kolter, R. (2019). Extracellular signaling and multicellularity in *Bacillus subtilis. Curr. Opin. Microbiol*. 14:741–747. https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.09.016

Smith, I., Paress, P., Cabane, K., Dubnau, E. (1980). Genetics and physiology of the rel system of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.*178:271–279. https://doi.org/10.1007/BF00270472

Sung H-M, Yasbin RE. 2002. Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 184(20):5641–5653. https://doi.org/10.1128/jb.184.20.5641-5653.2002

Taddei, F., Hayakawa, H., Bouton, M., Cirinesi, A., Matic, I., Sekiguchi, M., Radman, M. (1997). Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science* 278:128–130. DOI: 10.1126/science.278.5335.12

Vidales, L.E., Cárdenas, L, C., Robleto, E., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M. (2009). Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191(2):506-13. https://doi.org/10.1128/jb.01210-08