

## PAPEL DE LAS ENDONUCLEASAS Nfo y ExoA EN LA PROTECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DE ESPORAS DE *Bacillus subtilis*

Pedraza-Reyes, M.

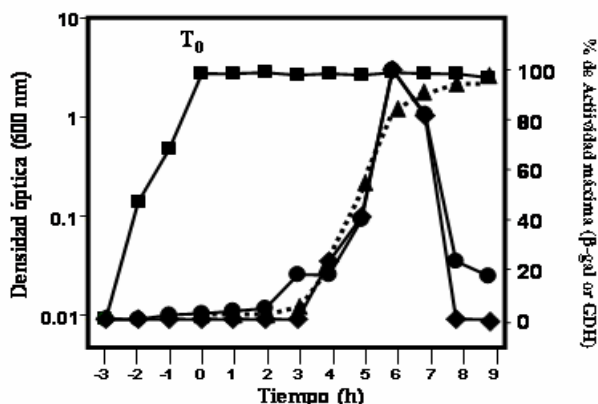
Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, A.P.187, Guanajuato, Gto. 36050 MEXICO. [pedrama@quijote.ugto.mx](mailto:pedrama@quijote.ugto.mx)

El DNA de las esporas de *B. subtilis* se encuentra recubierto con un grupo de pequeñas proteínas ácido-solubles (SASPs), codificadas en su mayoría por los genes *sspA* y *sspB*, que lo protegen del daño que generan diversos factores físicos y químicos (**Revisado en Nicholson y col., 2000**). Sin embargo, durante la dormancia y/o germinación, el DNA de las esporas acumula diferentes tipos de daños, que incluyen, modificación y pérdida de bases y rupturas de cadena. En distintos organismos, estas lesiones son específicamente procesadas por las endonucleasas apurínicas/apirimidinicas (AP), componentes esenciales del sistema de reparación por escisión de bases (**Friedberg y col., 1996**). *B. subtilis* cuenta con los genes *nfo* y *exoA* (**Kunst y col., 1997**), cuyos productos predichos pueden ser clasificados como miembros de las familias Endo IV y ExoIII de las AP endonucleasas, respectivamente (**Salas-Pacheco y col., 2005**).

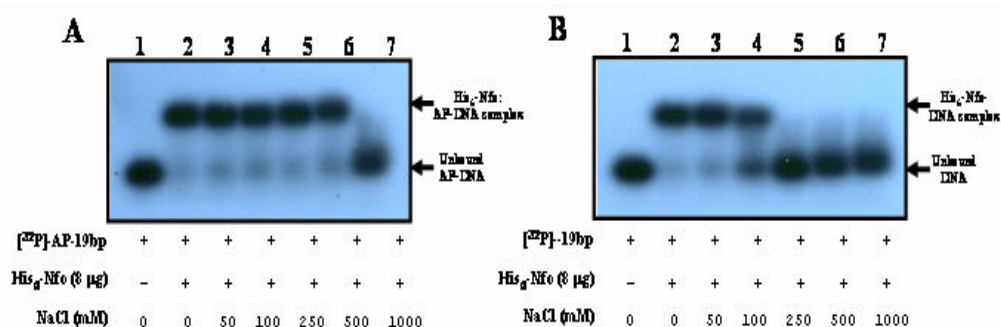
Utilizando enfoques genéticos y moleculares se encontró que el gen *nfo* de *B. subtilis* se expresa durante la esporulación y su transcripción es dependiente de la RNA polimerasa Sigma-G, encargada de transcribir los genes en el interior de la espora en las últimas etapas de su desarrollo (**Fig. 1**) (**Urtiz-Estrada y col., 2003**). Además, una fusión *exoA-lacZ* mostró que el gen *exoA* se transcribe durante la esporulación y es  $\sigma^G$  dependiente (**Salas-Pacheco y col., 2005**).

Para determinar las propiedades bioquímicas y la localización celular de la AP-endonucleasa Nfo, se sintetizó y purificó a homogeneidad una proteína recombinante His<sub>6</sub>-Nfo. Un anticuerpo anti-His<sub>6</sub>-Nfo fue capaz de localizar a la enzima Nfo en extractos celulares de esporas. Además, la proteína His<sub>6</sub>-Nfo mostró poseer propiedades bioquímicas características de las enzimas de reparación tipo IV. Ensayos de retardo en la movilidad electroforética efectuados con la enzima pura demostraron que Nfo es capaz de unirse a DNA normal (**Fig. 2A**) e interaccionar fuertemente con DNA dañado (**Fig. 2B**). De acuerdo con la función predicha, se encontró que el gen *nfo* de *B. subtilis* fue capaz de complementar la deficiencia en reparación de DNA de una mutante *endoIV exoIII* de *Escherichia coli* (**Salas-Pacheco y col., 2003**).

Esporas de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *nfo* y/o *exoA*, en los fondos genéticos  $\alpha/\beta$ -SASPs<sup>+</sup> y  $\alpha/\beta$ -SASPs<sup>-</sup> mostraron diferencias en sus propiedades de resistencia a factores que generan sitios AP y rupturas de cadena en el DNA, respecto a las mostradas por espora de las cepas parentales (**Salas-Pacheco y col., 2005**). La introducción de las mutaciones *nfo* y *exoA* a fondos genéticos de *B. subtilis* deficientes en sistemas que participan en la prevención del daño, reparación por escisión y/o recombinación del material genético, mostró que la integridad del material genético es fundamental para permitir una eficiente germinación de las esporas de *B. subtilis*.



**Figura 1.** Expresión de una fusión *nfo-lacZ* durante el crecimiento y esporulación de *B. subtilis* en medio NSM (■). Se colectaron muestras a diferentes tiempos, se trataron con lisozima y se les determinó actividad de  $\beta$ -galactosidasa (◆), o glucosa deshidrogenasa (●). Se muestra la actividad de  $\beta$ -galactosidasa encontrada en la fracción de pre-esporas, resistente a lisozima (▲).



**Figura 2.** Análisis por EMSA de la interacción de His<sub>6</sub>-Nfo con un oligonucleótido de 19 pb conteniendo (B), o no (A) un sitio AP, en la ausencia (carriles 1 y 2) o presencia (carriles 3-7) de diferentes concentraciones de NaCl.

## REFERENCIAS

- Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.G. and P. Setlow. 2000. Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 64:548-572.
- Kunst, F. y col.1997. Nature. 390: 249-256.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and W. Siede. 1995. DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Urtiz-Estrada, N., Salas-Pacheco, J.M., Yasbin, R.E. and M. Pedraza-Reyes. J. Bacteriol. 185:340-348.
- Salas-Pacheco J.M., Urtiz-Estrada, N., Martínez-Cadena, G., Yasbin, R.E. and M. Pedraza-Reyes. 2003. J. Bacteriol. 185:5380-5390.
- Salas-Pacheco, J.M., Setlow, B., Setlow, P. and M. Pedraza-Reyes. (2005). J. Bacteriol. 187:7374-7381.