



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

Bases moleculares del papel de la
ribonucleótido reductasa NrdEF
en la generación de mutaciones asociadas
a la fase estacionaria de *Bacillus subtilis*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M.C. KARLA VIRIDIANA CASTRO CERRITOS

Director de tesis

Dr. Mario Pedraza Reyes

Guanajuato, Gto. Enero 2017

CONTENIDO

Contenido.....	2
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Función y clasificación de las Ribonucleótido Reductasas.....	10
1.2 Distribución de las Ribonucleótido Reductasas clase I.....	10
1.3 Regulación alóstérica de las Ribonucleótido Reductasas.	11
1.4 Regulación transcripcional de las Ribonucleótido Reductasas.	12
1.5 Ribonucleótido Reductasa de <i>Bacillus subtilis</i>.	13
1.6 Regulador transcripcional NrdR.....	14
1.7 Mecanismo de Regulación Mediada por NrdR	15
1.8 Mutación Adaptativa o de Fase Estacionaria	15
1.9 Hipótesis planteadas para explicar el fenómeno de la mutación adaptativa en <i>B. subtilis</i>....	17
1.10 Factores involucrados en la producción de mutantes asociados a la fase estacionaria en <i>B. subtilis</i>.....	17
1.11 Tipos de mutaciones que dan origen a las reversiones His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en la	

cepa YB955.....	19
1.12 Influencia de la Ribonucleótido Reductasa y la poza de dNTPs en la respuesta al daño en el ADN y en mutagénesis.....	20
1.13 Antecedentes.....	21
II. OBJETIVOS	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Cepas y plásmidos utilizadas.....	23
3.2 Oligonucleótidos utilizados.....	25
3.3 Medios y condiciones de cultivo.....	26
3.4 Construcción de cepas mutantes.	26
3.5 Ensayos de fluctuación.....	26
3.9 Ensayos de mutagénesis asociada a fase estacionaria.....	27
3.6 Ensayos de β -galactosidasa.	28
3.7 Secuenciación de Revertantes	29
3.8 Ensayos de RT-PCR semicuantitativo en células carentes de división de las cepas YB955, PERM1017 y PERM1202 de <i>B. subtilis</i>	29
2.12. Análisis proteómico en las cepas YB955 y PERM1202 en condiciones de estrés nutricional.	30
2.13 Análisis de LC-MS/MS.....	31
2.14 Identificación, cuantificación de péptidos y análisis estadístico.	31
IV. RESULTADOS	33

4.1 Papel del represor transcripcional NrdR en <i>B. subtilis</i>	33
4.2 Efecto de la eliminación del gen <i>ytcG</i> en los niveles de expresión de los genes <i>nrdEF</i>	35
4.3 Efecto de variaciones en los niveles de expresión en los genes <i>nrdEF</i> en la mutagénesis asociada al crecimiento	37
4.4 Niveles de expresión de los genes <i>nrdEF</i> en células expuestas a estrés nutricional	38
4.5 Efecto de los niveles de expresión de <i>nrdEF</i> en la generación de mutaciones en células de <i>B. subtilis</i> carentes de división.....	40
4.6 Dinámica de la generación de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en células carentes de división de la mutantes Δ<i>ytcG</i>.....	44
4.7 Cambios genéticos que originan las reversiones His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en células carentes de división en la cepa PERM1202.....	45
4.8 Análisis proteómico en las cepas YB955 y PERM1202 en condiciones de estrés nutricional	48
V. DISCUSIÓN.....	56
VI. CONCLUSIONES	65
VI. PERSPECTIVAS.....	66
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
IX. ANEXOS.....	74

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alelos mutantes presentes en la cepa YB955 de <i>B. subtilis</i>	16
Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.	23
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.	24
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR	25
Tabla 5. Frecuencia de generación de dobles y triples reversiones en cepas de <i>B. subtilis</i>	45
Tabla 6. Cambios genéticos encontrados en las revertantes generadas por la cepa PERM1202 de <i>B. subtilis</i>	47
Tabla 7. Proteínas sobreexpresadas en la cepa PERM1202 en células de <i>B. subtilis</i> sujetas a estrés nutricional.....	50
Tabla 8. Proteínas reprimidas en la cepa PERM1202 en células de <i>B. subtilis</i> sujetas a estrés nutricional.	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación alostérica de la RNR clase Ia.	11
Figura 2. Mutación condicional en los genes <i>nrdEF</i>	21
Figura 3. Cajas NrdR en la región promotora <i>nrdIEF</i> de <i>B. subtilis</i>	34
.....	34
Figura 4. Alineamiento de YtcG con la proteína NrdR de <i>E. coli</i> . L.....	35
Figura 5. Efecto de la eliminación del gen <i>ytcG</i> en los niveles de expresión de una fusión <i>nrdE-lacZ</i>	36
Figura 6. Frecuencia de mutación asociada al crecimiento en cepas con distintos grados de expresión de <i>nrdEF</i>	37
Figura 7. Expresión de <i>nrdE</i> en células sujetas a estrés nutricional de <i>B. subtilis</i>	39
.....	39
Figura 8. Protocolo empleado en los ensayos de mutagénesis adaptativa.....	42
Figura 9. Efecto de los niveles de expresión de los genes <i>nrdEF</i> en la mutagénesis en células sin división..	43
Figura 10. Sobrevivencia de las distintas cepas en medio selectivo.	44
Figura 11. Perfil proteico de las cepas YB955, PERM1017 y PERM1202.....	48
Figura 12. Análisis comparativo de proteínas expresadas en las cepas YB955 y PERM1202 durante estrés nutricional.	49
Figura 13. Proteínas involucradas en la síntesis de dNTPs afectadas por la falta del gen <i>ytcG</i>	55
Figura 14. Mecanismo propuesto para la generación de triples revertantes His ⁺ Met ⁺ Leu ⁺	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ATP	Adenosina trifosfato
Cat ^R	Resistencia a Cloranfenicol
CID	Disociación inducida por colisión
CTP	Citosina trifosfato
dATP	2'-desoxiadenosina trifosfato
dCTP	2'- desoxicitosina trifosfato
dGTP	2'- desoxiguanosina trifosfato
dITP	2'-desoxiinosina trifosfato
dNTPs	2'-deoxiribonucleótidos trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetráctico
Erm ^R	Resistencia a Eritromicina
ESI-Q-TOF-MS	Espectrometría de masas acoplada con fuente de ionización por electronebulización con filtro de masas de cuádrupolo y analizador de masas de tiempo de vuelo.
FUR	Regulador de ingesta de hierro
GTP	Guanosina trifosfato
GFP	Proteína verde fluorescente
His	Histidina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
Kan ^R	Resistencia a Kanamicina
Leu	Leucina
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a detector de espectrometría de masas
Met	Metionina
mRNA	ARN mensajero

Abreviatura	Significado
mM	milimolar
MMS	Metil-metano sulfonato
Ni-NTA	Níquel-àcido nitrilotriacético
nt	Nucleótido
NTPs	Nucleótidos trifosfato
ONPG	Orto-nitro-fenil- β -D-galactopiranosido
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
(p)ppGpp	Guanosina pentafosfato y Guanosina tetrafosfato
pppGpp	Guanosina pentafosfato
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
P/V	Peso/volumen
RBS	Sito de unión al ribosoma
Rif ^R	Resistencia a Rifampicina
RNR	Ribonucleótido Reductasa
RT-PCR	Transcripción reversa y Reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE	Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio.
SSIX	Sales Spizizen 1x
STL	Síntesis translesión
tRNA	ARN de transferencia
TTP	Timidina trifosfato
UFC	Unidad formadora de colonia
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra desempeño
UV	Luz ultravioleta
Wt	Silvestre
4 -NQ	4-nitroquinolona

RESUMEN.

La enzima Ribonucleótido Reductasa (RNR) es responsable del paso limitante en la síntesis de los dNTPs. Además del estricto control alostérico al que se encuentra sujeta esta enzima, la expresión del gen que la codifica es regulada por distintos factores de transcripción, de tal manera que durante la replicación, la célula asegura el suministro de cantidades suficientes de dNTPs para la síntesis de DNA. Alteraciones en los mecanismos de regulación de la RNR pueden conducir a cambios en las concentraciones de dNTPs y a la generación de mutaciones.

En este trabajo se presenta evidencia experimental que sugiere que el producto del gen *ycg* de *Bacillus subtilis* codifica para un homólogo de la proteína NrdR, el represor transcripcional de los genes de la Ribonucleótido Reductasa (NrdEF). Además, se analizó el efecto de la inactivación de los genes *nrdEF*, así como de una mutante carente del represor NrdR, en la mutagénesis en células en crecimiento y en células carentes de división, observando que la tasa de generación de mutaciones es proporcional al nivel de expresión de *nrdEF* y que el efecto en la generación de mutaciones es mayor en células en ayuno. Estos resultados sugieren que en células sujetas a estrés nutricional un desbalance en las concentraciones de nucleótidos puede permitirle a una célula escapar de las condiciones que limitan su crecimiento y dividirse en respuesta a una presión selectiva no letal.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Función y clasificación de las Ribonucleótido Reductasas.

La ribonucleótido reductasa (RNR) es una enzima esencial para la biosíntesis de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) a partir de los correspondientes ribonucleótidos trifosfato (NTPs) requeridos para la replicación y reparación del ADN. Estás enzimas están ampliamente distribuidas en todos los dominios de la vida, incluso varias especies de virus portan su propia copia de RNR para asegurar su proliferación (Torrents, 2014).

A la fecha se han descrito tres diferentes tipos de RNR (clases I, II y III), las cuáles difieren en el cofactor metálico requerido para su actividad catalítica (Eklund *et al.*, 1997; Eklund *et al.*, 2001; Torrents, 2014). Las proteínas de clase I se componen usualmente de dos proteínas homodiméricas α 2 y β 2, la subunidad mayor α , contiene el sitio activo y los sitios alostéricos que controlan la especificidad de reducción, mientras que la subunidad menor β contiene un radical tirosil unido al cofactor metálico (Eklund *et al.*, 1997; Eklund *et al.*, 2001). La clase I de RNRs se ha subdividido en Ia, Ib y Ic basado en diferencias en su regulación alostérica, cofactor metálico y organización génica (Torrents, 2014). La clase Ia, codificada por los genes *nrdAB* requieren un centro diférrico ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$) para su actividad catalítica (Mulliez *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 2014), y la clase Ib, las cuáles son codificadas por los genes *nrdEF* contienen un centro con manganeso ($\text{Mn}^{\text{III}}\text{-O-Mn}^{\text{III}}$) para generar el radical tirosil (Martin & Imlay, 2011; Mohamed *et al.*, 1998; Schimpff-Weiland *et al.*, 1981). Además, las RNR de la clase I poseen dos potenciales centros alostéricos que activan o inactivan la enzima y le dan especificidad de sustrato dependiendo de los nucleótidos que se unan a la proteína, aunque en la clase Ib el sitio que regula la actividad de la enzima está ausente (Hofer *et al.*, 1998; Nordlund & Reichard, 2006).

1.2 Distribución de las Ribonucleótido Reductasas clase I.

La clase I de RNRs, es ubicua en la naturaleza, se encuentra prácticamente en todos los eucariotes desde hongos, plantas hasta mamíferos; así como en algunos procariotes y virus. Mientras que eucariotes altamente diferenciados como los humanos poseen únicamente

información genética que codifica para RNRs de la clase Ia, microorganismos como *B. subtilis* poseen solamente una RNR de la clase Ib; sin embargo, la gran mayoría de las bacterias poseen genes que codifican para varias clases de RNR, posiblemente relacionadas con su capacidad de proliferar en distintas condiciones ambientales.

La clase Ib es encontrada únicamente en bacterias (Torrents, 2014), y en *E. coli* esta RNR es esencial para la formación de biopelículas, crecimiento bajo condiciones de limitación de nutrientes (Cendra Mdel *et al.*, 2012) o estrés oxidativo (Monje-Casas *et al.*, 2001), mientras que las otras dos clases de RNR; Ia y II mantienen el crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente (Barlow, 1988; Eriksson, 1975).

1.3 Regulación alostérica de las Ribonucleótido Reductasas.

Se conoce que la actividad de las RNRs en células procariotas es regulada en dos niveles: i) mediante regulación alostérica, y ii) Mediante regulación transcripcional.

A nivel alostérico la unión de ATP o dATP activan o inactivan, respectivamente, la actividad de la enzima. Además, la unión de cada uno de los distintos nucleótidos modifica la especificidad de sustrato de la enzima, de tal manera que esta puede sintetizar cantidades equimolares de cada dNTP (Larsson *et al.*, 2004; Torrents, 2014).

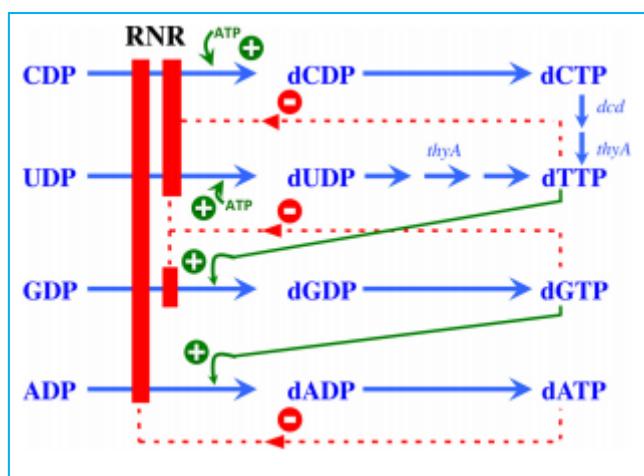


Figura 1. Regulación alostérica de la RNR clase Ia. La unión de ATP al sitio de especificidad de sustrato activa la enzima, promoviendo la reducción de CDP y UDP. dTTP promueve la reducción de GDP a dGTP, este último induce la reducción de ADP. Una alta concentración de dATP inhibe la actividad de la enzima a través de su unión al sitio alostérico. Símbolos en verde indican estimulación de reducción y símbolos rojos indican inhibición.

1.4 Regulación transcripcional de las Ribonucleótido Reductasas.

La regulación de las ribonucleótido reductasas es más compleja en organismos que contienen más de una RNR, distintos factores de transcripción (inhibidores y activadores) están involucrados en la regulación de la expresión de los genes de las RNRs.

Por ejemplo, en el organismo modelo *E. coli* se han descrito tres distintas clases de RNR (Ia, Ib y III) (Torrents *et al.*, 2007), las cuales pueden ser expresadas dependiendo del ambiente que rodea a la bacteria. Durante el crecimiento aeróbico las proteínas DnaA, FIS e IciA regulan la expresión de los genes *nrdAB* (clase Ia) (Herrick & Sclavi, 2007; Olliver *et al.*, 2010), mientras en anaerobiosis la expresión de la RNR clase III es inducida por el sistema FNR, un regulador transcripcional que regula la expresión de genes involucrados en la respiración anaeróbica (Roca *et al.*, 2008), la expresión de la tercer RNR clase Ib (*nrdEF*) es desreprimida durante estrés oxidativo y limitación de hierro por la inactivación de la proteína FUR (Monje-Casas *et al.*, 2001), y por daño al ADN por un mecanismo a la fecha desconocido (Martin & Imlay, 2011; Monje-Casas *et al.*, 2001).

La proteína DnaA (proteína iniciadora de la replicación) regula la expresión de diversos genes asociados a la replicación del cromosoma entre ellos a los genes *nrd* en distintas bacterias, aunque en organismos que contienen más de una clase de RNR, este iniciador solo regula la expresión de la RNR principal (Cendra Mdel *et al.*, 2013). Cuando DnaA está unida a ATP (ATP-DnaA) reprime la expresión de los genes *nrd*, cuando disminuye los niveles de ATP-DnaA la expresión de estos genes incrementa, permitiéndole a la célula generar los dNTPs requeridos para la replicación del ADN (Olliver *et al.*, 2010). Por lo tanto, el control que ejerce DnaA sobre la expresión de los genes *nrd* es dependiente de las concentraciones de nucleótidos durante la replicación del cromosoma.

Un importante factor transcripcional que regula la expresión de todas las clases de RNR en respuesta a la concentración de nucleótidos, incluso en organismos que contienen más de una clase de RNR, es el represor NrdR, cuyas características se describen más adelante en este trabajo (Torrents *et al.*, 2007).

1.5 Ribonucleótido Reductasa de *Bacillus subtilis*.

A diferencia de la mayoría de los procariotes, en el genoma de la bacteria de suelo *B. subtilis* solo se encuentra la secuencia de una clase de RNR, los genes *nrdEF* codifican una RNR clase Ib (Scotti *et al.*, 1996). Homólogos a los genes *nrdEF*, designados *bnrdEF*, fueron localizados en el cromosoma de la cepa silvestre *B. subtilis* 168, en el segmento correspondiente al profago SP β (Lazarevic *et al.*, 1998). Sin embargo, el aislamiento de una mutante letal condicional en los genes *nrdEF* (Bazill & Karamata, 1972), sugieren que NrdEF es la única enzima funcional en *B. subtilis*, y es esencial para la síntesis de dNTPs, en todas las condiciones de crecimiento; aeróbico, anaeróbico y durante estrés genotóxico (Hartig *et al.*, 2006).

En distintos organismos los genes *nrdEF* que codifican para la RNR Ib, se encuentran usualmente arreglados en un operón conformado por los genes *nrdH-nrdI-nrdE-nrdF*, en *B. subtilis* el locus *nrd* está constituido por los genes *nrdI-nrdE-nrdF-ymaB*; aunque se ha demostrado la existencia de un terminador transcripcional entre los genes *nrdF* y *ymaB* (Hartig *et al.*, 2006). Los genes *nrdE* y *nrdF* de este operón codifican para las subunidades mayor (α) y menor (β) respectivamente (Scotti *et al.*, 1996), mientras que la proteína NrdI podría actuar como un factor reductor involucrado en la regeneración del sitio activo Mn(III)2-Y.

Aunque existen pocos reportes tocantes a la regulación transcripcional de los genes *nrdEF*, estudios con microarreglos sugieren que la proteína DnaA controla su expresión durante el crecimiento aeróbico (Goranov *et al.*, 2005), mientras que el sistema de dos componentes ResD-ResE controlan su expresión en anaerobiosis (Hartig *et al.*, 2006). También se describió que la proteína RecA puede afectar directa o indirectamente la expresión de los genes *nrdEF* (Scotti *et al.*, 1996). Un análisis transcriptómico sugiere que DnaA puede regular la expresión de los genes *nrdIEF* en *B. subtilis* (Goranov *et al.*, 2005); sin embargo no existen estudios adicionales que confirmen o descarten la regulación del operón *nrdIEF* por estos factores de transcripción en *B. subtilis* o por factores transcripcionales adicionales como FUR o NrdR que regulan los genes *nrd* en distintas bacterias.

1.6 Regulador transcripcional NrdR

Un importante regulador transcripcional de todas las clases de RNRs en bacterias es el represor NrdR (Grinberg *et al.*, 2006; Grinberg *et al.*, 2009; Torrents *et al.*, 2007), esta proteína se une a secuencias específicas ubicadas en la región promotora llamadas “Cajas NrdR”, que consisten de una secuencia palindrómica altamente conservada acaCwAtATaTwGtg (Rodionov & Gelfand, 2005). Dos copias de esta secuencia consenso son consistentemente observadas en la región promotora de distintos genes *ndr*, con un espacio específico correspondiente a un número entero de vueltas en la doble hélice de DNA (Rodionov & Gelfand, 2005; Torrents, 2014).

NrdR es una proteína altamente conservada en procariotes, eubacterias y algunas arqueas, usualmente conformada por 150 a 200 aminoácidos con un extremo N-terminal (aproximadamente 45 aminoácidos) correspondientes a un dedo de zinc que le permite a NrdR unirse a secuencias específicas en la cadena de DNA y un dominio C-terminal de unión a ATP/dATP de aproximadamente 90 aminoácidos con actividad alóstérica similar a la encontrada en las RNRs (Grinberg *et al.*, 2006; Grinberg *et al.*, 2009).

Mediante estudios filogenéticos se identificaron genes con posibles sitios de unión a NrdR (Rodionov & Gelfand, 2005). En estos estudios se identificaron dos copias de la secuencia consenso en las regiones rio arriba de los genes codificantes para RNR de la mayoría de los genomas procarióticos analizados. Además, se identificaron cajas NrdR rio arriba de genes involucrados en la replicación del ADN y rutas de salvamento de nucleótidos, los cuales se enlistan a continuación, *topA* (DNA topoisomerasa I) en *Pseudomonas* spp.; *dnaA* (iniciador de la replicación) en *Shewanella* spp., *Myxococcus xanthus* y *Desulfotalea psychrophil*; *pnuC* (salvamento de dNTPs) en *Lactobacilli*; *nucA* (nucleotidasa) en *Lactococcus lactis*; *yvdC* (NTP pirofosfohidrolasa) en *Bacillus* spp.; *ligA* (DNA ligasa) en *Clostridium acetobutylicum*, y, DR1775 (DNA helicasa II) en *Deinococcus radiodurans*.

1.7 Mecanismo de Regulación Mediada por NrdR

Se han propuesto dos diferentes mecanismos para explicar la regulación mediada por NrdR. El primero sugiere que la unión de ATP/dATP controla el estado oligomérico de NrdR, de tal manera que cuando dATP se une a un oligómero formado por ocho subunidades de NrdR, el dedo de zinc queda libre para unirse a su ADN blanco bloqueando la unión de la RNA polimerasa. Por el contrario, una disminución en los niveles de los dNTPs, y, por lo tanto en el número de moléculas de dATP unidas a NrdR inducen un cambio del estado oligomérico de NrdR de un octámero a un dímero, evitando con ello su unión al ADN (Grinberg *et al.*, 2009). La segunda hipótesis plantea un mecanismo más complejo en el cuál NrdR selectivamente une nucleótidos trifosfato, los cuáles son hidrolizados a monofosfatos y son estos los que regulan el estado oligomérico de NrdR y su unión al ADN (McKethan & Spiro, 2013). Distintas evidencias apoyan ambas hipótesis, sin embargo ambas coinciden con el concepto de que los niveles de nucleótidos en las células regulan la función de NrdR.

1.8 Mutación Adaptativa o de Fase Estacionaria

Por mucho tiempo se consideró que las mutaciones surgen durante el crecimiento de manera espontánea e independientemente de sus consecuencias fenotípicas, sin embargo, un cúmulo de evidencias sugiere que las mutaciones también pueden surgir en células que no se dividen en respuesta a una presión selectiva no letal. A este tipo de mutaciones se les conoce con el nombre de mutaciones adaptativas o mutaciones asociadas a la fase estacionaria (Cairns & Foster, 1991).

Inicialmente este proceso de mutagénesis fue descrito en 1988 por John Cairns utilizando como modelo de estudio el sistema de reversión F' Lac en *E. coli* (Cairns & Foster, 1991), observando que la generación de mutantes Lac⁺ durante fase estacionaria requiere un sistema funcional de recombinación homóloga (Harris *et al.*, 1994), funciones de transferencia del plásmido F' (Foster & Trimarchi, 1995; Foster *et al.*, 1996) y componentes del sistema SOS (McKenzie *et al.*, 2001). Además, existe evidencia genética de que la ADN polimerasa III (Harris *et al.*, 1996) y la ADN polimerasa IV generan errores que producen estas mutaciones (McKenzie *et al.*, 2001; McKenzie & Rosenberg, 2001; Tompkins *et al.*, 2003), sin embargo se presentó evidencia de que en el modelo presentado originalmente por Cairns y Foster las reversiones eran originadas por eventos previos a la fase estacionaria y que eran generadas

por eventos de amplificación del gen *lac*(Hendrickson *et al.*, 2002) resultados que generaron controversia.

Este tipo de mutaciones han sido estudiadas también en otros organismos como *Pseudomonas putida*(Tegova *et al.*, 2004), *Saccharomyces cerevisiae*(de Andrade *et al.*, 1989) y *B. subtilis* (Sung & Yasbin, 2002).

El fenómeno de mutación adaptativa fue demostrado en *B. subtilis*, mediante el empleo de un sistema de reversión a las auxotrofías cromosómicas a los aminoácidos histidina, metionina y leucina. Para tal fin, se utilizó la cepa YB955 la cual contenía mutaciones puntuales en los genes de enzimas involucradas en las síntesis de estos aminoácidos. Los cambios contenidos en estos alelos son mutaciones sin sentido para *hisC952* y *metB5* y una mutación de sentido equivocado para *leuC427* (Sung & Yasbin, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Alelos mutantes presentes en la cepa YB955 de *B. subtilis*

Cambio de bases en los alelos mutantes encontrados en YB955							
Alelo	Posición de la mutación (bp)	Tipo de mutación	Cambio en el DNA	Resultado de la mutación	Enzima afectada		
<i>hisC952</i>	952	Transición	C→T	Gln → stop (mutación sin sentido)	Histidinol aminotransferasa	fosfato	
<i>metB5</i>	346	Transversión	G→T	Glu → stop (mutación sin sentido)	Homoserina succiniltransferasa	O-	
<i>leuC427</i>	427	Transición	G→A	Gly → Arg (mutación sentido equivocado)	Isopropilmalato isomerasa		

1.9 Hipótesis planteadas para explicar el fenómeno de la mutación adaptativa en *B. subtilis*

Para explicar el fenómeno de mutagénesis adaptativa en *B. subtilis* se han planteado dos hipótesis. La del estado celular de hipermutabilidad transitoria, la cual pregonó que en una población celular sujeta a algún tipo de estrés o bajo condiciones de ayuno, existe una pequeña población de células propensas a incrementar su frecuencia de mutación, es decir, entrar a un estado de hipermutabilidad transitoria (Robleto *et al.*, 2007; Torkelson *et al.*, 1997), por la supresión de sistemas de reparación del ADN y/o mecanismos que pudieran incrementar la introducción de daño al genoma (Sung & Yasbin, 2002). Así, este grupo de células hipermutables genera mutaciones al azar y si alguna de estas mutaciones le confiere ventajas de supervivencia o de crecimiento bajo la condición estresante, el organismo podrá “adaptarse” a su ambiente (Kivisaar, 2003; Robleto *et al.*, 2007; Sung & Yasbin, 2002).

La segunda, la hipótesis de la “retromutagénesis” o de la síntesis de translesión de la RNA polimerasa, indica que en células que no están en proceso de división y sujetas a algún tipo de estrés, la RNA polimerasa podría cometer errores durante el proceso de transcripción y estos errores tender a la síntesis de proteínas mutantes funcionales que podrían permitir el crecimiento celular (Holmquist, 2002; Holmquist & Maher, 2002; Rudner *et al.*, 1999).

1.10 Factores involucrados en la producción de mutantes asociados a la fase estacionaria en *B. subtilis*

Entre los agentes que han sido involucrados en este tipo de mutaciones se encuentran los factores transcripcionales ComA y ComK, estos factores controlan el desarrollo del estado de competencia en *B. subtilis* demostraron favorecer la generación de mutaciones adaptativas, indicando que este proceso podría involucrar una forma de diferenciación procariótica en la que estos podrían regular la expresión de genes necesarios para la mutagénesis en fase estacionaria y la diferenciación a sub-poblaciones hipermutables (Sung & Yasbin, 2002).

Para explicar el estado de hipermutabilidad transitorio, se propuso que la supresión y/o saturación de sistemas de reparación del DNA pudieran estar involucradas, así como también la activación de mecanismos que incrementaran la introducción de daño al DNA. Respecto a este tema se sabe que diversos sistemas de reparación están involucrados entre ellos, por ejemplo, se demostró que células carentes del sistema de reparación de la Guanina Oxidada (GO), mostraron un incremento dramático en la generación de mutaciones asociadas a fase estacionaria, esto sugiere que en células de *B. subtilis* que no se dividen, la ocurrencia de

mutaciones es exacerbada por especies reactivas de oxígeno y por la disminución o saturación de la actividad del sistema GO (Vidales *et al.*, 2009).

Asimismo se observó que la supresión del operón *mutSL* (componentes del sistema de reparación de bases mal apareadas) incrementó significativamente el número de revertantes asociadas a fase estacionaria. El efecto contrario fue observado al sobreexpresar el operón *mutS-mutL* de dicho sistema; es decir, una disminución significativa en el número de revertantes durante la fase estacionaria (Pedraza-Reyes & Yasbin, 2004).

Interesantemente la sobreexpresión del sistema MMR en un fondo genético deficiente en el sistema de reparación GO disminuyó significativamente la acumulación de mutaciones durante la fase estacionaria, lo cual sugiere que el sistema MMR juega un papel general en corregir bases mal apareadas inducidas por estrés oxidativo durante la fase estacionaria (Vidales *et al.*, 2009).

Además, se demostró que ante la carencia de un sistema MMR funcional, MutY, cuya actividad mutagénica/antimutagénica mostró ser modulada por el sistema MMR, promueve la generación de mutaciones que incrementan la frecuencia de reversión del alelo *leu* en células de *B. subtilis* que no se dividen (Debora *et al.*, 2011).

Otro factor importante en la producción de mutantes adaptativas son las ADN polimerasas que replican el ADN con propensión al error, en *B. subtilis* la Y-DNA polimerasa YqjH fue capaz de promover la generación de revertantes en el alelo *hisC952* (Sung *et al.*, 2003).

Recientemente, se reportó que en células de *B. subtilis* carentes el procesamiento de bases desaminadas es realizado con propensión al error, promoviendo la mutagénesis adaptativa (Lopez-Olmos *et al.*, 2012).

Por otro lado, existen evidencias de que la mutagénesis transcripcional podría ser un mecanismo importante para la generación de mutaciones durante fase estacionaria; la reparación asociada a la transcripción estimulada por el factor Mfd, que acopla la reparación a la transcripción se ha sugerido como un mecanismo que promueve la producción de mutantes adaptativas en *B. subtilis* (Ross *et al.*, 2006) posteriormente se sugirió que Mfd opera de manera coordinada con componentes del sistema NER, MutY y la DNA polimerasa II (Gomez-Marroquin *et al.*, 2016), también se demostró que un incremento en los niveles de transcripción está directamente correlacionado con el aumento en la aparición de mutantes asociadas a fase estacionaria en el alelo *leuC427* (Martin *et al.*, 2011; Pybus *et al.*, 2010).

Recientemente fue demostrado que la carencia de los sistemas de reparación de bases desaminadas y de bases oxidadas (GO) incrementan la frecuencia de mutaciones asociadas a

la transcripción (Ambriz-Avina *et al.*, 2016), además utilizando un sistema reportero con la proteína verde fluorescente (GFP) fue posible aislar y caracterizar una subpoblación con una frecuencia mutagénica incrementada (Ambriz-Avina *et al.*, 2016)

1.11 Tipos de mutaciones que dan origen a las revertiones His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en la cepa YB955

Los alelos *hisC952* y *metB5* son el resultado de mutaciones sin sentido (Tabla 1) que generan codones de paro prematuros y por lo tanto proteínas incompletas, se ha demostrado que pueden ser suprimidas por el alelo *sup3* en adición a otras mutaciones supresoras ya caracterizadas, generando un fenotipo His⁺Met⁺. El alelo *sup3* es una mutación supresora sin sentido localizada en operón *trnS*, se debe a el cambio de T a A en el anticodón de tRNA-Lys (5'-UUU-3' a 5'-UUA-3'), este tRNA mutante puede revertir mutaciones sin sentido al reconocer un codón de paro como codificador y continuar la síntesis de una proteína, aunque no se descarta la generación de otras revertiones supresoras. En la cepa YB955 aproximadamente un 4% de las revertentes His⁺, y un 90% de las revertentes Met⁺ son debidas a mutaciones supresoras (Sung & Yasbin, 2002). El alelo *leuC427* es una mutación que cambia el residuo 142 de Glicina a Arginina (Tabla 1), esta mutación se ha observado puede revertirse principalmente mediante una reversión verdadera de A→G (Sung & Yasbin, 2002).

La frecuencia con la que se generan las mutaciones supresoras y verdaderas puede ser afectada por diversos factores. Las mutaciones supresoras se incrementaron en una cepa deficiente en el sistema de reparación de la guanina oxidada (GO) (Vidales *et al.*, 2009), mientras que las revertiones verdaderas en el alelo *leuC* se incrementan al incrementar la transcripción de este gen, en un mecanismo dependiente de las proteínas MutY y Mfd (Debora *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2011; Pybus *et al.*, 2010).

1.12 Influencia de la Ribonucleótido Reductasa y la poza de dNTPs en la respuesta al daño en el ADN y en mutagénesis.

En *B. subtilis* la expresión del operón *nrdIEF* es inducida como respuesta a la inhibición de la replicación en una mutante *recA*, sugiriendo un papel de estos genes en respuesta al daño al ADN y paro de la horquilla replicativa (Goranov *et al.*, 2005). Además, se reportó que la expresión de los genes *nrdEF* incrementó cuando un cultivo de *B. subtilis* se sujetó a estrés inducido con peróxido de hidrógeno (Castro-Cerritos, 2011).

En distintos organismos, la RNR es inducida en respuesta a agentes genotóxicos (Chabes *et al.*, 2003; Elledge & Davis, 1989; Gon & Beckwith, 2006; Lu *et al.*, 2012). Aunque se ha sugerido que esta respuesta permite a la célula disponer de nucleótidos suficientes para reparar lesiones en el ADN (Elledge & Davis, 1989; Elledge *et al.*, 1993), en *S. cerevisiae*, se ha observado que incrementos en los niveles de dNTPs en presencia de daño causado por luz UV, 4-NQ (4-nitroquinolona) y MMS (metil-metano sulfonato) incrementan la generación de mutaciones y mejora la supervivencia de las células expuestas a estos agentes genotóxicos (Chabes *et al.*, 2003). En *E. coli* se encontró que niveles incrementados de dNTPs aumentan la tasa mutagénica en este organismo, en presencia o en ausencia de estrés genotóxico (Gon *et al.*, 2011).

No obstante, estos estudios han sido realizados en células en crecimiento. En *B. subtilis* se ha observado que la inactivación de la expresión de los genes *nrdEF* disminuye drásticamente la generación de mutaciones tanto en células en crecimiento como en células carentes de división (Castro-Cerritos, 2011). En el último caso, los resultados sugieren que un desbalance en los niveles de dNTPs puede favorecer la mutagénesis adaptativa. Una estrategia para abordar esta hipótesis en *B. subtilis*, consistiría en alterar las concentraciones de dNTPs y evaluar el impacto en la mutagénesis en células carentes de división y durante el crecimiento de esta bacteria.

1.13 Antecedentes.

En un estudio previo, se generó una mutante condicional en los genes *nrdEF* de la RNR de la cepa *B. subtilis* YB955 (Fig. 1A). En la cepa resultante PERM1017, la expresión de los genes de la ribonucleótido reductasa es controlada por el promotor *Pspac* y por lo tanto depende de la adición de IPTG (Fig. 2A). De acuerdo a lo esperado, esta mutante fue incapaz de crecer en medio sin IPTG (Fig. 2B), además se determinó que la mínima concentración de IPTG requerida para el crecimiento de la cepa PERM1017 era de 0.025 mM. Otra característica importante de esta cepa es la presencia de una fusión transcripcional del gen *nrdE* con el gen reportero *lacZ*, bajo el control del promotor nativo de los genes *nrdIEF* (Fig. 2A). Esta característica permite analizar los niveles de expresión de los genes *nrdEF* bajo distintas situaciones fisiológicas.

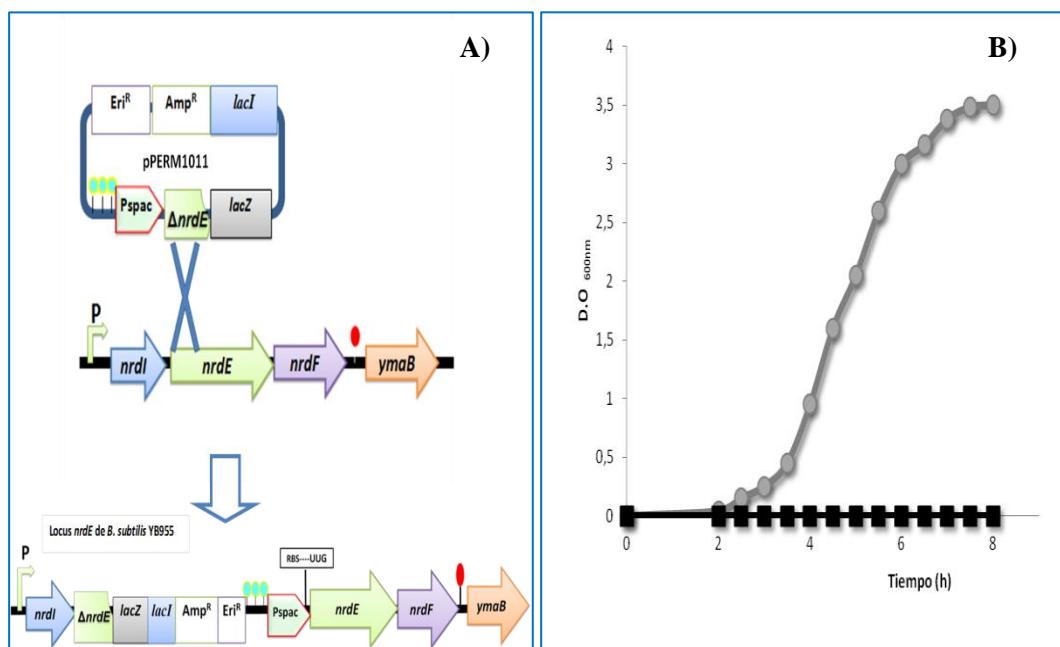


Figura 2. Mutación condicional en los genes *nrdEF*. A) Diagrama del evento de integración por recombinación homóloga del plásmido pPERM1011 en el cromosoma de la cepa YB955 de *B. subtilis*. B) Cinética de crecimiento de la cepa PERM1017 en medio LB suplementado (●) o no (■) con IPTG 1mM.

II. OBJETIVOS.

1. Demostrar que la expresión del operón *nrdIEF* es regulada por el producto del gen *ytcG*.
 - Medir los niveles de expresión de los genes *nrdEF* en una mutante carente de *ytcG*.
 - Establecer las condiciones para sobreexpresar y purificar la proteína YtcG de *B. subtilis*
2. Determinar el efecto de distintos niveles de expresión de los genes *nrdEF* en la mutagénesis asociada a fase estacionaria.
 - Sobreexpresar los genes *nrdEF* utilizando la mutante $\Delta ytcG$ y evaluar su efecto en la mutagénesis asociada al crecimiento y fase estacionaria.
 - Determinar el espectro de lesiones generadas en la mutante $\Delta ytcG$.
 - Medir los niveles de expresión de los genes *nrdEF* durante los experimentos de mutagénesis asociada a fase estacionaria en las cepas de estudio YB955, $\Delta ytcG$ y en la mutante condicional *nrdEF*.
 - Realizar un ensayo proteómico diferencial entre las cepas YB955 y $\Delta ytcG$ en células expuestas a estrés nutricional.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas y plásmidos utilizadas.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Referencia
Cepas de <i>E. Coli</i>		
XL10-GOLD	<i>endA1 glnV44recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Nte</i> $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdsMR-mmr) 173$ <i>tet^R F' [proAB lac9 ZΔM15 Tn10 (Tet^R Amy Cm^R)]</i>	Stratagene, Cedar Creek, TX
DH5α	$\text{F}^- \Phi 80d$ <i>lacZ</i> $\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96$	
Cepas de <i>B. subtilis</i>		
YB955	<i>hisC952 metB5 leuC427 xin-1 SP6^{SENS}</i>	(Sung & Yasbin, 2002)
PERM1017	YB955:: $\Delta nrdE-lacZ$ Pspac- <i>nrdEF</i> ::Erm ^R	(Castro-Cerritos, 2011)
PERM1202	YB955:: $\Delta ytcG$::Neo ^R	pPERM1179 \rightarrow YB955
PERM1207	YB955:: <i>nrdE-lacZ</i> Pspac- <i>nrdEF</i> $\Delta ytcG$::Neo ^R Erm ^R	pPERM1011 \rightarrow PERM1202

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pMUTIN4	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> Erm ^R	(Vagner <i>et al.</i> , 1998)
pBEST501	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> . Neo ^R	(Itaya <i>et al.</i> , 1989)
pPERM1011	pMutin4 conteniendo un fragmento 5' del gen <i>nrdE</i> proveniente clonado en los sitios <i>HindIII/SacII</i> ; Erm ^r	Este estudio
pPERM1179	pBEST501 conteniendo fragmentos 5' y 3' que flanquean al gen <i>ytcG</i> (aprox .400 pb c/u). Neo ^R	Este estudio
pPERM1262	pMutin4 conteniendo un fragmento de la región 3' del gen <i>bnrdF</i> (aprox. 280 pb). Erm ^R	Este estudio

3.2 Oligonucleótidos utilizados.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en PCR

No.	Oligonucleótido (5'-3')	Región amplificada	Aplicación
1	Directo CGAAGCTTCGCTGCGATTACATTGCAG	-367 pb a -22 pb rio arriba del gen <i>ycg</i>	Delección del gen <i>ycg</i> con plásmido pBEST501
2	Reverso CGGTCGACCCCAACTATATCGTTCCCG		
3	Directo GCGGATCCGCTAAGAGGATTCTTCTAGC	+23 pb a + 365 pb rio abajo del gen <i>ycg</i>	
4	Reverso GCGAGCTCCCTGTTTCCTGATGGATCGT		
5	Reverso GCAGCAACGAGACGTCAC	640 pb del gen <i>lacZ</i>	Corroboración de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> .
6	Directo GCAGGCCTTCAGCAGTATTATGAT	841 pb a +71 pb del gen <i>hisC</i>	Amplificación de fragmento de gen <i>hisC</i> para secuenciación
7	Reverso GACCGGCGAGCAATATTGTATCTTCA		
8	Directo ATCCAAGCACACACACGCCG	211pb a 475 pb del gen <i>metB</i>	Amplificación de fragmento de gen <i>metB</i> para secuenciación
9	Reverso AACGGTATGTTCGAACACACCGAAGAT		
10	Directo CAGTGTGGATCAAGGGATTGTC	302 pb a 655 pb del gen <i>leuC</i>	Amplificación de fragmento de gen <i>leuC</i> para secuenciación
11	Reverso CAGTCATTCGTTCATCCATCGT		
12	Directo CGTCTCAACCATCGGCCGTTGG	-195 pb a 52 pb del gen <i>trnS-Lys</i>	Amplificación de genes tRNAs Lys y Gln para secuenciación.
13	Reverso CGGATCCTAAGTCTAGCGCGTCT		
14	Directo CGAAGCTTCGGCACATCTAAAGA	-47 pb a 290 pb del gen <i>nrdE</i>	Corroboración de integración de plásmido pPERM1011.
15	Directo TGGCGAAGACGTTGTCGATATTA	De 2 pb a 83 pb del gen <i>veg</i>	Amplificación de fragmento del gen <i>veg</i> para RT-PCR
16	Reverso CGGCCACCGTTGCTTTAAC		
17	Directo GCTGCAGGCATCTCAAGTTT	Desde 1155 pb a 1344 pb del gen <i>nrdE</i>	Amplificación de fragmento del gen <i>nrdE</i> para RT-PCR.
18	Reverso CGCATTACGGATGTCTGTTG		

3.3 Medios y condiciones de cultivo.

Las cepas de *B. subtilis* se crecieron en medio A3 (Difco Laboratories; Detroit Mich.) y medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). Cuando se requirió los medios se suplementaron con los siguientes antibióticos; cloranfenicol 5 μ g/ml, neomicina 10 μ g/ml, tetraciclina 15 μ g/ml, y eritromicina 5 μ g/ml y/o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) a distintas concentraciones.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio LB suplementado, cuando fue necesario, con ampicilina 100 μ g/mL.

2.4 Construcción de cepas mutantes.

Para la obtención de cepas portando la mutación condicional *nrdEF*, la cepa PERM1202 se transformó con el plásmido pPERM1011 generando la cepa PERM1207, se seleccionaron las transformantes Eri^R y la ocurrencia del evento de recombinación homóloga fue confirmada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 5 y 16 (Tabla 4).

Para la obtención de cepas carentes de *ytcG*, fragmentos flanqueantes del gen *ytcG* se amplificaron por PCR usando los oligonucleótidos 1-2 y 3-4 para amplificar fragmentos de aproximadamente 350 pb cada uno, posteriormente los fragmentos denominados 5' y 3' se clonaron en el vector pBEST501 (Itaya *et al.*, 1989), utilizando los sitios *HindIII* /*SalI* y *BamHI*/*SacI* respectivamente. El vector resultante pPERM1179 se utilizó para transformar las cepas YB955 y 168, se seleccionaron transformantes Neo^R, la construcción se integró por un evento de doble recombinación homóloga generando la sustitución del gen *ytcG* por un casete de resistencia a neomicina, la ocurrencia de este evento se verificó por PCR utilizando los oligonucleótidos 1 y 4 (Tabla 4).

2.5 Ensayos de fluctuación.

Las cepas de interés se cultivaron en medio LB durante 8 horas a 37°C, posteriormente se efectuó una dilución 1:50 del cultivo y se dividió en 42 tubos y se incubaron durante 16 horas a 37°C, se tomó 1 mL de cultivo de cada tubo y las células se colectaron por centrifugación, se lavaron con Sales Spizizen 1X (SS 1X) (indica la composición y da una referencia) y se resuspendieron en 100 μ L de esta solución para posteriormente ser plaqueadas en medio mínimo His⁻, Met⁻ o Leu⁻, descrito en la siguiente sección. Las placas se incubaron 48 horas a

37°C, para posteriormente realizar el conteo de colonias revertantes His⁺, Met⁺, y Leu⁺. Con los cultivos de los tubos 39-42 se efectuaron diluciones seriadas en SS 1X hasta 1x10⁻⁶ y se sembraron las correspondientes a 1x10⁻⁴ a 1x10⁻⁶ por triplicado en placas de LB para realizar la cuenta viable y determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) La frecuencia de reversión dependientes del crecimiento fueron medidas por el test de fluctuación donde el número de mutaciones por cultivo (m) se calculó con la fórmula de Lea-Coulson $r/m - \ln(m) = 1.24$, r es la mediana de los 38 tubos, y la frecuencia de mutación con la fórmula $m/2Nt$, donde Nt es el número total de UFC (Hall *et al.*, 2009).

2.9 Ensayos de mutagénesis asociada a fase estacionaria.

Las diferentes cepas de *B. subtilis*, derivadas de YB955 (*his, met leu*) se cultivaron en 25 mL de medio A3 suplementado con IPTG 1 mM (cuando este se requirió). Los cultivos se incubaron a 37°C y 250 rpm hasta 90 min después del término de la fase exponencial (denominado T₉₀). El crecimiento fue monitoreado con un Espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 2000 a una D.O. de 600 nm. Posteriormente, las células contenidas en 10 mL de cultivo se cosecharon centrifugando a 4800 ×g durante 10 min a temperatura ambiente (TA); se lavaron con 10 mL de SS 1X para reducir la cantidad residual de nutrientes y se resuspendieron en un volumen final de 10 mL de SS 1X. Se tomaron 100 µL de la suspensión celular y se mezclaron con 5 mL de agar suave (primera capa), para posteriormente plaquearlas en placas de Medio Mínimo (Agar Base) carente de dos aminoácidos requeridos para el crecimiento de la cepa, para evitar cualquier ventaja de crecimiento y ejercer una presión selectiva sobre las células. Las placas se incubaron a 37°C durante 10 días y cada tercer día se tomaron 2 placas para restaurar uno de los aminoácidos mediante la adición de una capa de agar suave (segunda capa) con los aminoácidos requeridos, después de 48 horas de incubación se registraron las revertentes que surgieron en cada uno de los medios de selección His⁻, Met⁻ o Leu⁻.

La composición de los medios de cultivo y selección de revertentes a los alelos de interés se describe a continuación:

Agar Base: Agar 1.5%, SS 1X, glucosa al 0.5%, ácido glutámico e Isoleucina 50 µg/mL, y 50 µg/mL de Histidina o Metionina, de tal manera que se generen los medios mínimos; His⁺Met⁻Leu⁻ y His⁻Leu⁻Met⁺

Agar suave (segunda capa): Los mismos reactivos y concentraciones que agar base,

excepto que aquí se utilizó agar al 0.7%

Agar suave (segunda capa): Agar 0.7%, SS 1X, glucosa al 0.5%, ácido glutámico e Isoleucina 50 μ g/mL, y 50 μ g/mL de Histidina, Metionina o Leucina. Cuando se requirió se adicionó IPTG para una concentración final de 0.025 mM.

La selección del aminoácido en el Agar Suave se estableció en base al tipo de reversión que se seleccionó (His⁺, Met⁺ o Leu⁺). Por ejemplo, para la selección de revertantes a His⁺ se agregaron al medio 50 μ g/mL de Leu al medio (His⁻Leu⁻) para así obtener medio mínimo Met⁺ Leu⁺ His⁻. La Isoleucina y el ácido glutámico se agregaron para proteger la viabilidad celular. Cuando fue necesario, se agregó IPTG a una concentración final de 0.025 mM para inducir la transcripción de los genes controlados por el promotor *Pspac*.

La cantidad inicial de bacterias plaqueadas en cada experimento se determinó mediante dilución seriada de la suspensión celular y viabilidad en placas de medio LB con o sin IPTG. Los experimentos se repitieron al menos 3 veces.

Para determinar la sobrevivencia de las células en el medio mínimo selectivo para His⁺, Met⁺ y Leu⁺ se tomaron cada tercer día tres muestras de agar con una pipeta Pasteur estéril de una de las cajas de los experimentos de mutación de fase estacionaria. Las muestras de agar se tomaron de zonas donde no se observó crecimiento de colonias revertentes y se resuspendieron en 1 mL de SS 1X, el número de células en la muestra se determinó mediante dilución seriada y cuenta viable en medio LB. En el caso de la cepa PERM1017 el medio contenía IPTG a una concentración final de 1mM. Las colonias formadas se contaron después de 24 h de incubación a 37°C.

2.6 Ensayos de β -galactosidasa.

Para monitorear los niveles de expresión de las fusiones *lacZ*, se obtuvieron muestras celulares de acuerdo al siguiente protocolo. Se prepararon preinóculos de las cepas de interés durante 12 horas en medio LB. Posteriormente se inocularon en medio A3, los cultivos se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se determinó el crecimiento en un espectrofotómetro ajustado a 600 nm y se colectaron muestras a distintos tiempos durante la fase exponencial y estacionaria. Las células se colectaron por centrifugación a 13000 \times g por 10 min y se lavaron con 1 mL de regulador Tris HCl 25mM de pH 7.4. Las pastillas celulares colectadas por centrifugación se guardaron a -20°C para posteriormente realizarles ensayos de β -galactosidasa. En el caso de la cepa PERM1017 los medios de cultivo fueron

suplementados con IPTG a una concentración de 0.1 mM, para permitir su crecimiento.

Las células obtenidas se procesaron para determinar la actividad β -galactosidasa utilizando ONPG como sustrato (Sambrook, 2001). La actividad enzimática fue expresada en unidades Miller [1 unidad Miller = A₄₂₀ nm (1000)/(min)(mL de cultivo)(A₆₀₀ nm del cultivo)].

2.7 Secuenciación de Revertantes

Se seleccionaron al azar 100 colonias revertantes producidas por la cepa PERM1202 (YB955:: *AytcG*) en cada uno los tres medios de selección His⁻, Met⁻ y Leu⁻ (generadas a partir del tercer día de incubación). Cada una de estas revertantes fue re-inoculada en medio mínimo carente de His, Met o Leu. Se seleccionaron 15 colonias revertantes que pudieron crecer en los tres medios de selección (fenotipo His⁺ Met⁺ Leu⁺), una colonia revertante doble (fenotipo His⁺ Met⁺) y una colonia revertante sencilla (fenotipo His⁺). Las colonias de interés se propagaron en medio LB, se les extrajo ADN genómico y se utilizó como templado para amplificar por PCR regiones de los genes *hisC* (310 pb), *metB* (250 pb), *leuC* (350 pb) y del operón *trnS* (325 pb), respectivamente, utilizando la enzima Vent DNA polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA) y los juegos de oligonucleótidos 8-9, 10-11, 12-13 y 14-15 descritos en la Tabla 4. La secuenciación fue llevada a cabo por la compañía Functional Biosciences, Inc. (Madison, WI).

2.8 Ensayos de RT-PCR semicuantitativo en células carentes de división de las cepas YB955, PERM1017 y PERM1202 de *B. subtilis*.

Células de las cepas YB955, PERM1017 Y PERM1202 se crecieron siguiendo el protocolo realizado en los ensayos de mutagénesis asociada a fase estacionaria, al cese del crecimiento se lavaron las células en SS 1X y se inocularon sobre medio mínimo carente de histidina, metionina y leucina (medio His⁻ Met⁻Leu⁻) para disminuir la generación de revertantes, las placas se incubaron y a los días 1, 3 y 8 se tomaron 2 placas de cada cepa (placas donde no se observaran colonias revertantes) para cosechar las células en SS 1X. La suspensión celular obtenida fue utilizada para realizar la extracción de ARN total de las cepas de *B. subtilis* utilizando el reactivo Tri-reagent (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, EUA) siguiendo las instrucciones descritas por el proveedor. Para la realización del ensayo de RT-PCR, se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican una región del marco de

lectura de los genes *nrdE* y *veg*. Las mezclas de reacción contenían: 2 ng de ARN de las distintas muestras analizadas, 100 nM de oligonucleótidos para amplificar el fragmento del gen *nrdE* y 40 nM de oligonucleótidos para amplificar el fragmento del gen *veg*. Las reacciones de transcripción reversa y amplificación se efectuaron con el sistema Verso SYBR Green 1-step qRT-PCR (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), bajo las siguientes condiciones: 15 min a 50 °C para la síntesis de ADNc, y 15 min a 95 °C para la activación de la ADN polimerasa Thermo-Start; para la amplificación se realizó la desnaturalización a 92°C por 15 segundos; alineamiento a 60°C por 30 seg y la extensión a 70°C durante 30 seg durante 40 ciclos a partir de la síntesis de ADN y una extensión final de 2 min a 72°C. Los productos de la reacción de RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % (P/V) conteniendo bromuro de etidio al 0.1% (P/V) y se cuantificaron por densitometría utilizando el programa Image Lab 4.1 usando la banda correspondiente al fragmento *veg* para normalizar los resultados.ma

2.12. Análisis proteómico en las cepas YB955 y PERM1202 en condiciones de estrés nutricional.

Cultivos de las cepas YB955 y PERM1202 fueron propagados hasta 90 minutos después de T₀, en medio A3. Las células cosechadas por centrifugación se lavaron y concentraron 20X en SS 1X. La suspensión de células de cada cultivo se sembró en placas de medio mínimo (His⁻ Met⁻ Leu⁻). Al quinto día posterior a la siembra, se recuperaron las células de 1 placa de cada cepa (en donde no se observaran colonias revertantes) en SS 1X. Posteriormente, las células se lavaron y resuspendieron en 500 µL de agua y se sujetaron a 3 ciclos de congelación-ebullición de 5 minutos cada uno para efectuar la lisis celular. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y se determinó la concentración de proteína utilizando el protocolo descrito en el sistema Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific; Massachusetts, EUA). Las muestras de proteína de cada cepa fueron obtenidas de cuatro experimentos independientes. Posteriormente las cuatro muestras de cada cepa se liofilizaron y se concentraron en un solo tubo para obtener 200 µg de proteína, previo a la digestión enzimática, el extracto proteico fue reducido con 5 mM DTT en 200 µL de bicarbonato de amonio 100 mM (pH 8.5, temperatura ambiente durante 1 hora) y alquilado con iodoacetamida 10 mM (temperatura ambiente, 1.5 h en oscuridad); y reducida nuevamente con 5 mM DTT. Para la digestión, 5 µg de tripsina fueron adicionadas a las muestras y mantenidas a 37 °C por 16 h; la reacción fue detenida por acidificación con 4%

v/v de ácido fórmico. Las muestras fueron guardadas a -20°C. Antes de la introducción al sistema cromatográfico las muestras fueron centrifugadas a temperatura ambiente por 10 min a 16,000 × g.

2.13 Análisis de LC-MS/MS

Los péptidos obtenidos de la tripsinólisis fueron analizados por duplicado mediante el sistema capLC-MS/MS utilizando un cromatógrafo de líquidos Ultimate3000 nanoRS UPLC (Thermo scientific) acoplado un espectrómetro de masas ESI-Q-TOF Maxis Impact (Bruker; Massachusetts, EUA), ambos operados por el programa Hystar 3 (Thermo scientific, Massachusetts, EUA). 5 µL de cada muestra fue cargada en una pre-columna C18 (300 µm x 5 mm, Thermo scientific) a un flujo de 8 µL/min de acetonitrilo al 5%, ácido fórmico 0.1%. Después de 5 minutos de preconcentración y desalación de los péptidos, la pre-columna fue conectada a la columna capilar de fase inversa Magic (150 x 0.3 mm, 2.5 µm). Los péptidos fueron eluidos a un flujo de 3 µL/min utilizando dos fases móviles (A: 0.1% de ácido fórmico en agua; B: 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo) con un gradiente lineal de 5 a 80% de B en 120 min. El detector Maxis Impact fue operado utilizando ionización por electronebulización en modo positivo, con una ventana espectral en el intervalo de 150 a 2200 m/z en modo de autoMS/MS con fragmentación CID.

2.14 Identificación, cuantificación de péptidos y análisis estadístico.

Los datos LC-MS/MS (cromatografía de líquidos acoplada a detector de espectrometría de masas en serie) adquiridos fueron procesados utilizando el programa MaxQuant versión 1.5.5.1 (Max Plank Institute of Biochemistry, Planegg, Alemania). La identificación de proteínas se llevó a cabo utilizando una base de datos de *Bacillus subtilis* descargada de UniProt (National Institutes of Health). Los parámetros de identificación de péptidos en MaxQuant incluyeron modo de digestión específica por tripsina y modificaciones variables de oxidación de metionina y carbamidometilcisteína. Se programó una cuantificación libre de marcaje (LFQ) basado en intensidad de las señales analíticas de los péptidos únicos para cada grupo de proteínas. El registro de los datos espectrales de los grupos de proteínas identificadas se obtuvieron en un archivo se extensión .txt para su posterior análisis estadístico.

El análisis estadístico de la intensidad de los grupos de proteínas se llevó a cabo con el programa Perseus (Max Plank Institute of Biochemistry, Planegg, Alemania). Para calcular la variabilidad de expresión de proteínas entre la cepa parental y la cepa mutante, la intensidad las proteínas identificadas fueron transformados (\log_2) y se les aplicó una prueba T de Student para dos muestras. Se consideraron significativos los valores con una $p \leq 0.05$ y un incremento en la expresión mayor a 2 veces.

IV. RESULTADOS

4.1 Papel del represor transcripcional NrdR en *B. subtilis*

Un estudio bioinformático reveló la presencia de “cajas NrdR” en la región promotora de los genes *nrdEF* (Rodionov & Gelfand, 2005). El análisis de las regiones promotoras de los genes *nrdEF* (pertenecientes al operón *nrdIEF*) de *B. subtilis* sugieren que la transcripción de estos genes es mediada por un promotor dependiente del factor σ^A . En el caso del operón *nrdIEF*, traslapadas con las regiones -10 y -35 del promotor, se encuentran secuencias consenso de unión a NrdR (Fig. 3A 3B). En distintos organismos se ha observado que los genes *nrdEF* son fuertemente reprimidos por NrdR, muy posiblemente porque sus sitios de unión traslanan o se encuentran aledaños al promotor de los genes *nrdEF* (Panosa *et al.*, 2010; Torrents *et al.*, 2007). Esta situación acontece para el operón *nrdEF* en *B. subtilis* por lo cual se predice que NrdR cause una fuerte represión de dicho operón en este microorganismo. A este respecto, resultados de un análisis *in silico* mostraron que en *B. subtilis* el regulador NrdR es codificado por el gen *ycgG* (Grinberg *et al.*, 2006; Grinberg *et al.*, 2009; Rodionov & Gelfand, 2005), el cual como se observa en la Figura 4 posee similitud con la proteína NrdR de *E. coli*.

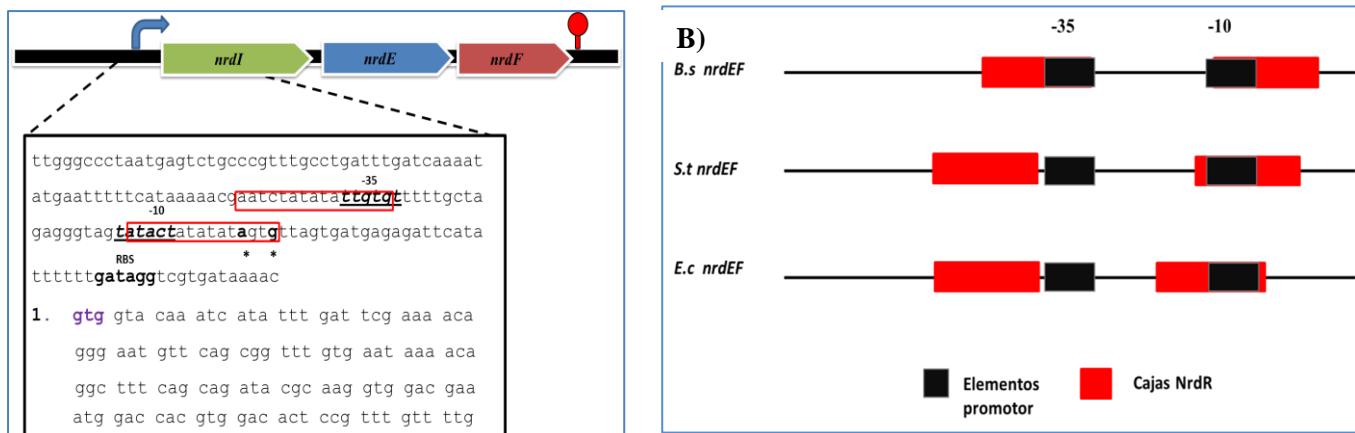


Figura 3. Cajas NrdR en la región promotora *nrDIEF* de *B. subtilis*. A) En la figura se muestran las cajas NrdR predichas marcadas con un cuadro rojo, subrayadas se muestran las regiones -10 y -35 del promotor σ^A , marcado con asteriscos se muestran los probables sitios de inicio de la transcripción, para el operón *nrDIEF*. B) Diagrama mostrando la posición de las cajas NrdR (rectángulos rojos) en referencia a la posición de los elementos -10 y -35 del promotor (rectángulos negros) en los promotores de los genes *nrDE* de *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *E. coli*.

Bs 1	MKCPSCQHNGTRVLDSRPVDDGKSIRRRECESCHYRFTTFEKVEETPLIV
Ec 1	MHCPFCFAVDTKVIDSRLVGEGSSVRRRQCLVCNERFTTFEVAELVMPRV
	* *
Bs 51	VKKEGVREEFSREKMLRGLIKACEKRPVSLKTLEDMCFDIEKELRNQGCSE
Ec 51	VKSNDVREPFNEEKLRSGMLRAEKRPVSSDDVEMAINHIKSQRATGER
	* *
Bs 102	VKSELVGEMVMDRLAKIDEVAYVRFASVRQFKDINVFIDELKDL
Ec 102	VPSKMIGNLVMEQLKKLDKVAYIRFASVRSFEDIKEFGEEIARL
	* *

Figura 4. Alineamiento de YtcG con la proteína NrdR de *E. coli*. Las proteínas poseen 49% de aminoácidos idénticos; además, la proteína YtcG comparte los aminoácidos requeridos para la formación del dedo de zinc (rojo) y sitio de unión a ATP/dATP (subrayado), característicos en este tipo de reguladores.

4.2 Efecto de la eliminación del gen *ytcG* en los niveles de expresión de los genes *nrdeF*.

Para investigar si el gen *ytcG* afectaba los niveles de expresión de los genes *nrdeF*, aquel se sustituyó con un casete de Neo^R en una cepa de *B. subtilis* que contenía una fusión transcripcional *nrdeE-lacZ*. La cepa obtenida se propagó en medio A3 y se determinaron los niveles de expresión del gen reportero *lacZ* a distintos tiempos del crecimiento del cultivo, en referencia a una cepa de *B. subtilis* proficiente en YtcG. Como se muestra en la figura 5, la falta de *ytcG* indujo un incremento significativo en la actividad de β-galactosidasa dirigida por la fusión *nrdeE-lacZ* durante las fases de crecimiento exponencial y estacionaria (Fig. 5B); el promedio de dicho incremento fue de ~5 veces durante crecimiento exponencial y de ~7 veces durante fase estacionaria (Fig. 5A).

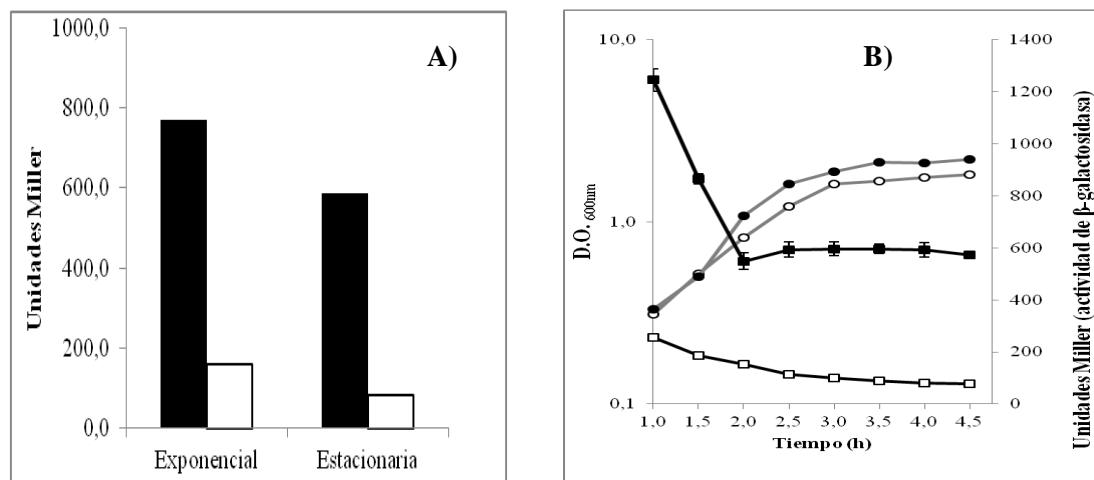


Figura 5. Efecto de la eliminación del gen *ytcG* en los niveles de expresión de una fusión *ndE-lacZ*. A) Niveles de β -galactosidasa en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, de las cepas PERM1207 ($\Delta ytcG$ *ndE-lacZ*; barras negras) y PERM1017 (*ndE-lacZ*; barras blancas). B) Niveles de expresión de una fusión *ndE-lacZ* durante del ciclo de vida vegetativo de las cepas PERM1207 (-■-) y PERM1017 (-■-). Los símbolos (-●- y -●-) muestran las curvas de crecimiento de las cepas PERM1207 y PERM1017 respectivamente. Los resultados mostrados son el promedio de tres experimentos independientes.

Los resultados mostrados en la figura 5 sugieren fuertemente que *ytcG* afecta negativamente la expresión del operón *ndIEF*. Un enfoque adicional para sustentar mejor esta conclusión consistiría en demostrar que el producto de *ytcG* sea capaz de reconocer y unirse específicamente a las supuestas regiones operadoras ubicadas marco arriba del gen *ndE*.

4.3 Efecto de variaciones en los niveles de expresión en los genes *nrdef* en la mutagénesis asociada al crecimiento

Distintos estudios sugieren que elevados niveles de expresión de ribonucleótido reductasa y altos niveles de dNTPs incrementan la generación de mutaciones en células en crecimiento (Chabes *et al.*, 2003; Gon *et al.*, 2011; Mertz *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2015).

En *B. subtilis* estudiamos este fenómeno utilizando cepas con distintos grados de expresión de los genes *nrdef*. Utilizando la cepa YB955 como referencia se encontró que la mutante $\Delta ytcG$ incrementó alrededor de 2 veces la frecuencia de reversiones en los alelos *hisC952*, *metB5* y *leuC427* dependientes del crecimiento (Fig. 6), mientras que en la mutante condicional PERM1017 dicho parámetro disminuyó significativamente. Estos resultados sugieren que alteraciones en los niveles de expresión de los genes *nrdef* afectan la frecuencia de mutaciones asociadas al crecimiento en *B. subtilis*.

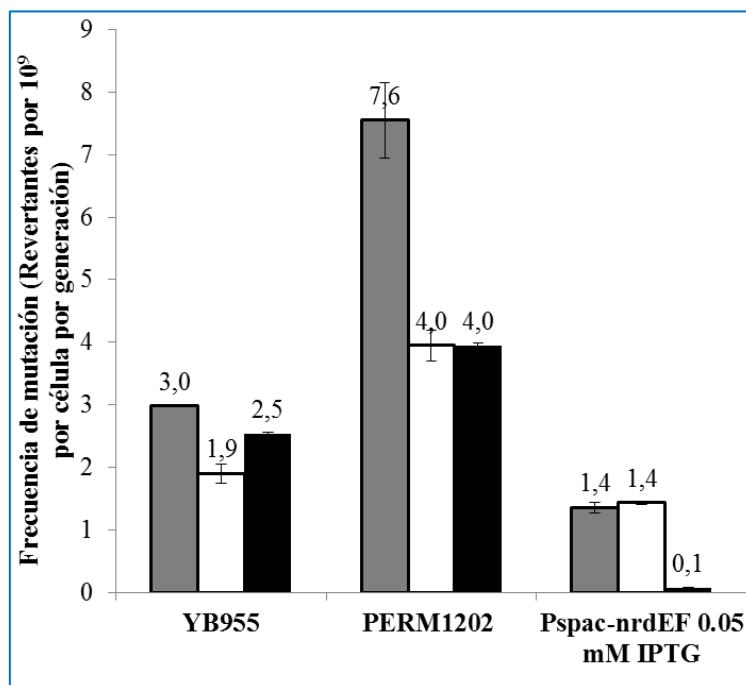


Figura 6. Frecuencia de mutación asociada al crecimiento en cepas con distintos grados de expresión de *nrdef*. Frecuencia de generación de revertantes His⁺ (barras gris), Met⁺ (barras blanco) y Leu⁺ (barras negras) en las cepas YB955, PERM1202 (YB955:: *ytcG*) y PERM1017 (Pspac-*nrdef*). Los experimentos fueron realizados como se describe en Materiales y métodos. La frecuencia de mutación fue calculada utilizando las fórmulas $r/m = 1.24$ y $m/2N_t$, donde r es la mediana de 38 réplicas. Los resultados presentados son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

4.4 Niveles de expresión de los genes *nrdEF* en células expuestas a estrés nutricional

Se ha observado que en un cultivo de *E. coli* los niveles de RNR y dNTPs disminuyen durante fase estacionaria (Buckstein *et al.*, 2008; Sun & Fuchs, 1992); sin embargo, también se encontró que los niveles de expresión de esta enzima pueden incrementarse en respuesta a la a distintos tipos de estrés (Elledge & Davis, 1989; Gon & Beckwith, 2006; Monje-Casas *et al.*, 2001). En *B. subtilis*, se observó que los genes *nrdEF* disminuyen su expresión en fase estacionaria; aunque, los niveles del operón se mantienen relativamente altos (Castro-Cerritos, 2011). Además, se observó que estos genes son inducidos por H₂O₂ (Castro-Cerritos, 2011) e incrementan su expresión en ausencia del represor PerR (Suarez-Castro, 2016), una de las proteínas que controlan la respuesta al estrés oxidativo. En este trabajo se estudió si la expresión de los genes *nrdEF* era afectada en condiciones de estrés nutricional prolongado; además se evaluó el efecto de la mutación condicional en los genes *nrdEF* y la ausencia del gen *ytcG* en la expresión de estos genes.

Las cepas YB955, PERM1017 (Pspac-*nrdEF*) y PERM1202 (Δ *ytcG*) fueron expuesta a estrés nutricional en medio sólido carente de histidina, metionina y leucina (His⁻ Met⁻ Leu⁻) e incubadas por un periodo de ocho días a 37°C. Se realizaron análisis de RT-PCR con el ARN total extraído de cada una de las cepas a los días 1, 3 y 8 de incubación. Como se muestra en la Figura 7, en la cepa YB955 el transcripto del gen *nrdE* decrece alrededor de tres veces al octavo día de ayuno. Por otra parte, en la mutante condicional *nrdEF*, en ausencia de IPTG los niveles del transcripto *nrdE* decrecieron alrededor de tres veces al día 3 de incubación y prácticamente desaparecen al octavo día del ayuno nutricional (Fig. 7). En contraste, con respecto a la cepa YB955 la cepa Δ *ytcG* expresó alrededor de 1.8 veces más al transcripto *nrdE* desde el primer día de incubación, los niveles de expresión de *nrdE* en esta cepa se mantuvieron hasta el octavo día de ayuno generando una diferencia de hasta 3 veces más transcripto de *nrdE* en la mutante Δ *ytcG* comparada con la cepa parental (Fig. 7). Estos resultados muestran que i) en la cepa parental los genes *nrdEF* continúan expresándose en condiciones de arresto celular y ii) existen amplias variaciones en los niveles de expresión de *nrdE* entre las cepas YB955, PERM1017 (sin IPTG) y PERM1202 (Δ *ytcG*) en condiciones de estrés nutricional.

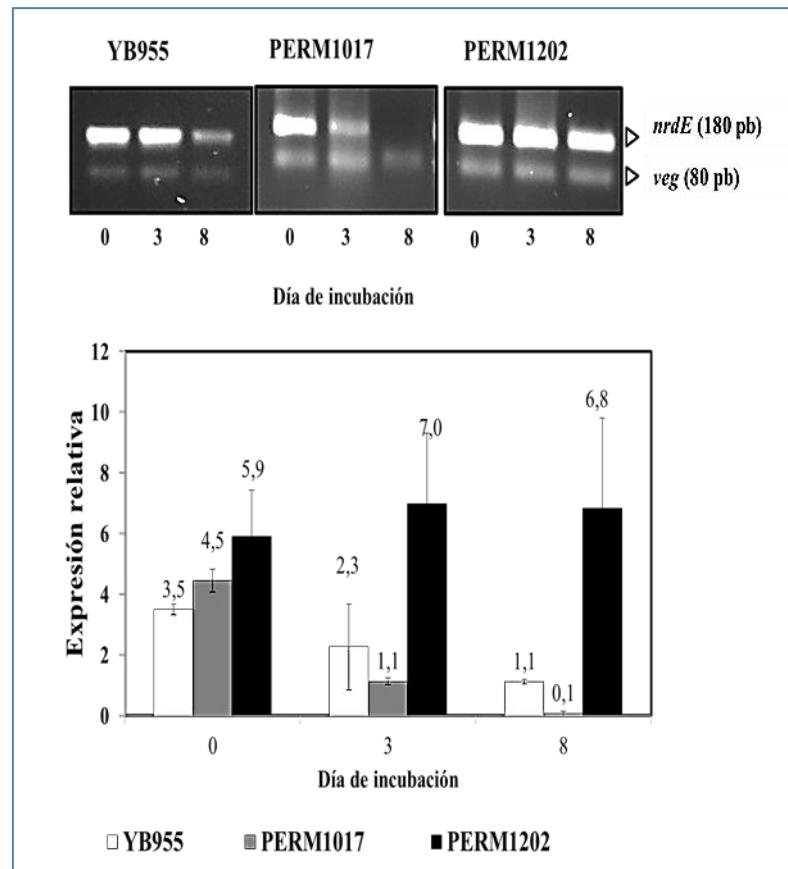


Figura 7. Expresión de *nrdE* en células sujetas a estrés nutricional de *B. subtilis*. A) Análisis de la expresión de *nrdE* por RT-PCR en células sin crecimiento de las cepas YB955, PERM1017 (*nrdEF*) and PERM1202 (*ycgG*), durante los días 1, 3 y 8 de incubación en medio mínimo (His⁻, Met⁻, Leu⁻) y sin IPTG. B) Análisis densitométrico de los resultados mostrados en (A) usando el gen *veg* como control endógeno de expresión constitutiva.

Células no revertantes de cada una de las cepas se obtuvieron de medio mínimo sólido para posteriormente extraer RNA total. Los valores de expresión del gen *nrdE* fueron normalizados utilizando a expresión del gen *veg* de cada condición. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm desviación estándar.

4.5 Efecto de los niveles de expresión de *nrdeF* en la generación de mutaciones en células de *B. subtilis* carentes de división.

Estudios *in vitro* sugieren que en células de *E. coli* sin crecimiento la disminución en los niveles de dNTPs podría incrementar la actividad de la DNA polimerasa DinB (Pol IV) incrementando la generación de mutaciones inducidas por estrés nutricional (Pomerantz *et al.*, 2013). Sin embargo, en *B. subtilis* se observó que en condiciones de estrés nutricional la inactivación de los genes de la ribonucleótido reductasa redujo drásticamente la frecuencia de mutaciones (Castro-Cerritos, 2011).

Para investigar si los niveles de expresión de los genes *nrdeF* afectaban la generación de mutaciones adaptativas se utilizaron cepas de *B. subtilis* modificadas genéticamente para expresar niveles bajos o altos de la RNR en comparación con la cepa parental YB955 que expresa niveles normales de dicha actividad. Para tal efecto, se siguió el protocolo descrito en Materiales y Métodos para seleccionar revertantes a His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en células de *B. subtilis* sujetas a estrés nutricional (Fig. 8).

En estos experimentos, se utilizaron dos medios de selección (His⁻Met⁻ y Met⁻Leu⁻) que posteriormente mediante la adición de una segunda capa de agar suave, se restituyó uno de los aminoácidos para generar los tres medios selectivos His⁻, Met⁻ y Leu⁻. La ausencia inicial de dos aminoácidos evita el surgimiento de revertentes generadas por un fenotipo transitorio o causado por una mutación que generara una enzima poco funcional, además la composición inicial de estos medios de selección fue elegida para no favorecer (pero no para impedir) la generación de mutantes supresoras sin sentido (mutaciones en los tRNA-Gly y tRNA-Gln) que pudiera verse incrementada en un medio His⁻Met⁻. Además, el medio inicial carece también de IPTG, la ausencia de este agente inductor en la cepa PERM1017 impide la transcripción de los genes *nrdeF*, permitiéndonos evaluar el efecto de la ausencia total de actividad RNR en la mutagénesis asociada a fase estacionaria. A distintos tiempos, se les restauró un aminoácido a cada una de las cepas, de tal manera que se pudiese apreciar el surgimiento de mutantes que revertieron una sola auxotrofía (His⁺, Met⁺ o Leu⁺). A la cepa PERM1017 también se le adicionó IPTG para que aquellas células en las que ya hubiese ocurrido una reversión pudieran disponer de suficientes dNTPs para replicar su ADN y dividirse para formar una colonia visible en el medio de selección.

Los resultados de la Figura 9 indican que la producción de mutaciones en células sin división mostró un comportamiento similar al observado en los experimentos de mutagénesis espontánea descritos en la Figura 6. La inactivación de la expresión de *nrdeF* en la cepa

PERM1017 resultó en una disminución drástica en la producción de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺; mientras que la sobreexpresión de dichos genes (cepa PERM1202) aumentó significativamente el número de revertantes a las tres auxotrofías probadas, aun a niveles superiores a los mostrados por la cepa parental YB955. Tal incremento fue más notorio en el caso de las reversiones Leu⁺ (2 veces de incremento) y Met⁺ (6 veces de incremento). En estos experimentos, se demostró que las diferencias en las frecuencias de reversión entre las distintas cepas no son debidas a crecimiento o muerte celular, pues las células se mantuvieron viables durante los 10 días del experimento (Fig. 10).

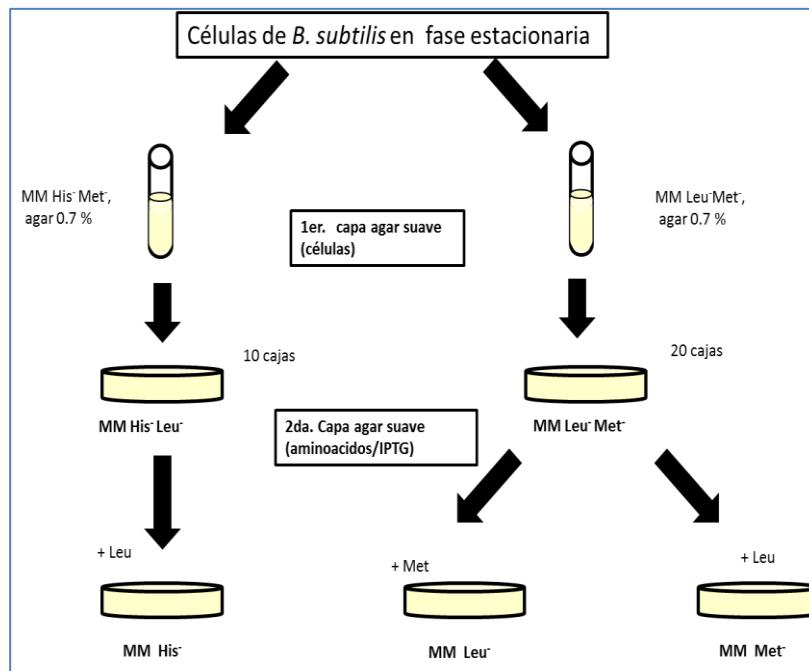


Figura 8. Protocolo empleado en los ensayos de mutagénesis adaptativa. Alícuotas de células colectadas de cultivos llevados a la fase estacionaria fueron resuspendidas en dos medios de cobertura mínimos carentes de Histidina y Metionina o de Leucina y Metionina. Las suspensiones celulares fueron depositadas en cajas de medio mínimo con la misma composición de aminoácidos y se incubaron a 37°C. Transcurridas 48h y posteriormente cada tercer día, se tomaron 2 cajas de cada medio de selección para restituirlle en medio de cobertura un aminoácido y así obtener tres distintos medios de selección. Las revertantes generadas en cada medio de selección se contaron 48 h después de la adición de la segunda capa de agar suave.

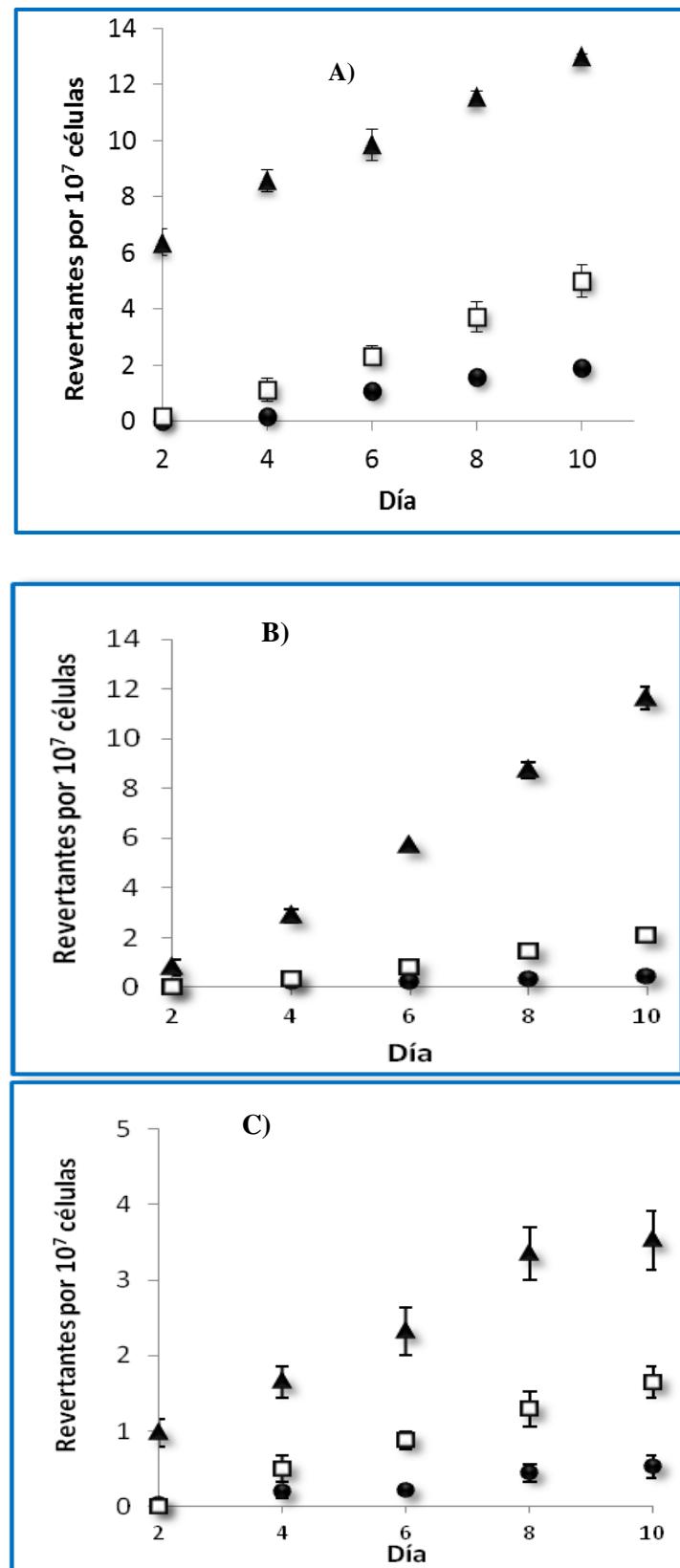


Figura 9. Efecto de los niveles de expresión de los genes *nrdEF* en la mutagénesis en células sin división. Revertantes A) His⁺, B) Met⁺ y C) Leu⁺ obtenidas en las cepas PERM1017 (*nrdEF*) (●), YB955 (□) y PERM1202 (*ytcG*) (▲). Los resultados son el promedio de las revertantes acumuladas en diez diferentes placas de cada medio selectivo. Los resultados mostrados son representativos y fueron repetidos por triplicado.

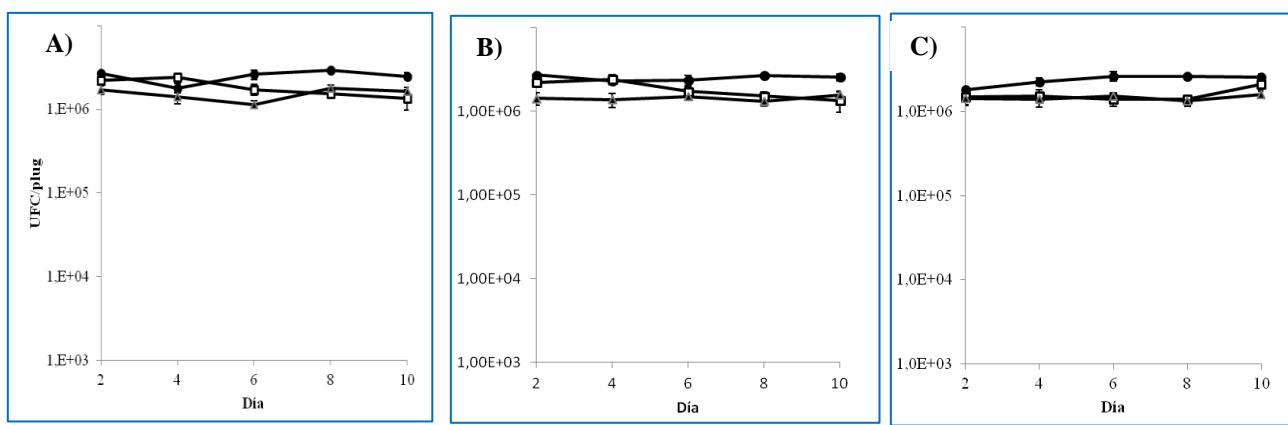


Figura 10. Sobrevivencia de las distintas cepas en medio selectivo. A) His⁻, B) Met⁻ y C) Leu⁻ obtenidas en las cepas PERM1017(*nrdEF*) (●), YB955 (□) y PERM1202 (*ytcG*) (▲). Los resultados son el promedio de las revertantes acumuladas en diez diferentes placas de cada medio selectivo. Los resultados mostrados son representativos y fueron repetidos por triplicado.

4.6 Dinámica de la generación de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en células carentes de división de la mutantes *ΔytcG*.

Es importante resaltar que en la cepa PERM1202, una gran parte de las revertantes aparecieron antes de restaurar uno de los dos aminoácidos a las placas, es decir, en los medios de selección His⁻Leu⁻ y Met⁻Leu⁻; esto sugiere que las colonias contenían mutaciones en los dos alelos probados. Distintas colonias generadas por esta cepa se rescataron y se inocularon en medio carente de cada uno de los aminoácidos (His⁻, Met⁻ o Leu), encontrándose que un 26% de dichas colonias fue capaz de crecer en los tres medios de selección (Tabla 5). En resumen, un alto porcentaje de las células seleccionadas generó la reversión a los tres aminoácidos.

Es de señalarse también el comportamiento de las revertantes con fenotipos His⁺, Met⁺ y Leu⁺ (Fig. 9) producidas por la cepa *ytcG* ya que hasta el cuarto día de incubación esta produjo niveles similares de reversión en cada uno los tres alelos de las cuales la mayoría presentó un fenotipo de triple y en menor proporción doble reversión (Tabla 5). A partir del día 6 de incubación, la mayoría de las revertantes generadas en los tres medios de selección fueron debidas a reversiones simples, con una frecuencia claramente incrementada en las revertentes Met⁺ (Fig. 9B y Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia de generación de dobles y triples reversiones en cepas de *B. subtilis*.

Cepa	Revertantes triples (His ⁺ , Met ⁺ Leu ⁺)	Revertantes dobles	Revertantes sencillas
PERM1017 (<i>nrdDEF</i> inactivos)	0/123 (0%)	8/123 (6%) ^a	115/123 (93%) ^c
YB955	5/300 (2 %)	67/300 (22%) ^b	232/300 (77%) ^c
PERM1202	67/259 (26%)	37/259 (14%) ^b	155/259 (60%) ^c

Las colonias analizadas de cada una de las tres cepas fueron tomadas a tomadas a partir del sexto día de incubación de los medios His⁻, Met⁻ y Leu⁻.

^a Todas reversiones His⁺Met⁺

^b Suma de reversiones His⁺Met⁺, His⁺Leu⁺ y Met⁺Leu⁺

^c Suma de reversiones His⁺, Met⁺ y Leu⁺

4.7 Cambios genéticos que originan las reversiones His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en células carentes de división en la cepa PERM1202.

De un total de 300 revertantes de la cepa YB955 analizadas de cada medio de selección (300 de His⁻, 300 de Met⁻ y 300 de Leu⁻) 22% de dichas colonias mostró la doble reversión His⁺Met⁺ (Tabla 5), mientras que solo un 6% de las revertantes generadas por la cepa PERM1017 mostraron un fenotipo His⁺Met⁺.

Anteriormente, se reportó que la reversión His⁺ y Met⁺ puede ocurrir de forma simultánea en cerca del 4% de las revertantes His⁺ y 90% de las revertantes Met⁺ (Sung & Yasbin, 2002), se consideró que las mutaciones que mostraron la doble reversión fueron generadas por mutaciones supresores en los tRNAs de Gly y Lys (Sung & Yasbin, 2002). Además en un alto porcentaje de revertantes His⁺ y His⁺Met⁺ no se identificó el cambio genético que originó la reversión sugiriendo una alta proporción de mutaciones supresoras (Ross *et al.*, 2006; Sung & Yasbin, 2002). Para investigar el tipo de mutaciones que dan lugar a las colonias His⁺ y Met⁺ y Leu⁺ en las triples revertantes generadas en la cepa PERM1202 se seleccionaron 30 colonias que presentaron crecimiento robusto en los tres medios de selección His⁻, Met⁻ y Leu⁻

(revertantes triples), una revertante que creció en dos distintos medios; His⁻, Met⁻ (revertante doble) y 10 revertantes sencillas His⁺, 10 revertantes Met⁺ y 10 revertantes Leu⁺ para secuenciar fragmentos de los genes *hisC*, *metB*, *leuC*, en las regiones donde se encuentran los cambios que originan las auxotrofías.

Cerca de dos tercios de las triples revertantes secuenciadas mostraron el cambio genético que reestablecía la prototrofía a cada uno de los aminoácidos (Tabla 6), mientras que en las restantes no se observaron cambios en las regiones secuenciadas. Dado que no se observaron cambios en las secuencias de los genes codificantes para tRNA-Gly y tRNA-Gln, es muy probable que las revertantes no correspondan a mutaciones supresoras en estos genes..

Por otro lado, en el caso de las revertantes sencillas His⁺ (10/10 revertentes) y Met⁺ (8/10 revertentes) se observó un cambio genético que cambió la secuencia de un codón de paro a una secuencia codificante para un aminoácido. Los cambios ocurridos en estas revertantes fueron más variados que los ocurridos en las revertantes triples y predominaron las transiciones T→C, T→A y A→G (Tabla 6). Por otro lado no se encontraron cambios genéticos en las revertentes que dieron origen al fenotipo Leu⁺ (Tabla 6). En conclusión, la mayoría de las revertantes secuenciadas fueron originadas por mutaciones verdaderas.

Tabla 6. Cambios genéticos encontrados en las revertantes generadas por la cepa PERM1202 de *B. subtilis*.

Gen	Posición de la mutación (pb)	# Revertantes con la mutación/ #revertantes secuenciadas	Tipo de mutación	Cambio en el DNA	Resultado de la mutación
^a Fenotipo: His ⁺ Met ⁺ Leu ⁺					
<i>hisC</i>	952	22/30	Transición	T→C	stop→Gln
<i>hisC</i>	ND	8/30	ND	ND	ND
<i>metB</i>	346	19/30	Transversión	T→G	stop→Glu
<i>metB</i>	346/348	2/30	Transversión/ Transversión	T→G/ A→T	stop→Asp
<i>metB</i>	ND	9/30	ND	ND	ND
<i>leuC</i>	427	19/30	Transición	A→G	Arg→Gly
<i>leuC</i>	ND	11/30	ND	ND	ND
^b Fenotipo: Met ⁺					
<i>metB</i>	346	6/10	Transición	T→C	stop→Gln
<i>metB</i>	346	2/10	Transición	T→A	stop→Lys
<i>metB</i>	ND	2/10	ND	ND	ND
^c Fenotipo: His ⁺					
<i>hisC</i>	952	4/10	Transición	T→C	stop→Gln
<i>hisC</i>	952	2/10	Transversión	T→G	stop→Glu
<i>hisC</i>	953	4/10	Transición	A→G	stop→Trp
^d Fenotipo Leu ⁺					
<i>leuC</i>	ND	10/10	ND	ND	ND

Las revertantes fueron aisladas y probadas por su habilidad de crecer en medio carente de histidina, metionina y leucina y clasificados por su fenotipo. Se secuenciaron fragmentos de los genes *hisC*, *metB* y *leuC* dependiendo de la reversión observada.

^aRevertantes aisladas de medio His⁻ (7/30 revertantes) o Met⁻ (23/30 revertantes).

^bRevertantes aisladas de medio Met⁻ (10 revertantes)

^cRevertantes aisladas de medio His⁻ (10 revertantes).

^dRevertantes aisladas de medio Leu⁻ (10 revertantes).

ND (No determinado); no se encontraron cambios en los fragmentos secuenciados.

4.8 Análisis proteómico en las cepas YB955 y PERM1202 en condiciones de estrés nutricional.

La expresión del gen *nrdE* resultó drásticamente alterada en las cepas PERM1017 y PERM1202 en condiciones de estrés nutricional (Fig. 7). En referencia a la cepa parental YB955 ambas cepas presentaron diferencias en la generación de revertantes (Fig. 9) mostrando que la frecuencia en la generación de revertantes aumenta paralelamente a los niveles de expresión de *nrdEF* sugiriendo que fluctuaciones en la concentración de RNR y dNTPs tienen un efecto directo en la mutagénesis asociada a fase estacionaria.

Sin embargo, es importante considerar que especialmente en el caso de la cepa PERM1202 distintas proteínas pueden verse afectadas por la falta del gen *ytcG*. Un análisis electroforético en gel SDS-PAGE de células en crecimiento de *B. subtilis* muestra en la cepa PERM1202 una proteína diferencialmente expresada cuyo tamaño podría corresponder a la proteína NrdE de 75KDa (Figura 11) sugiriendo que esta proteína es radicalmente afectada por la falta de *ytcG* durante crecimiento. Esta proteína no se observó sobreexpresada en la mutante condicional en ninguna de las concentraciones de IPTG ensayadas.

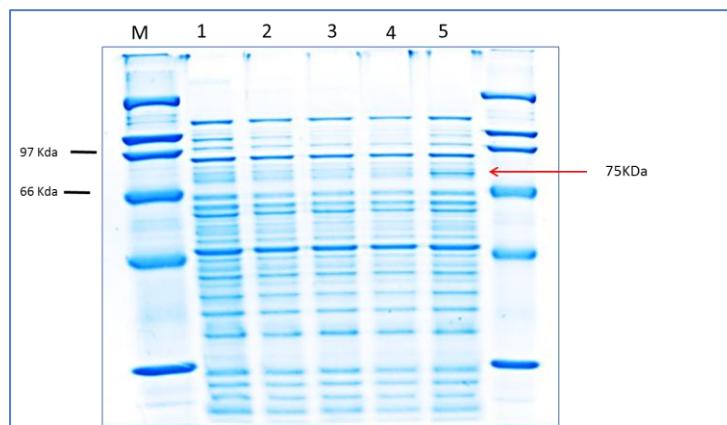


Figura 11. Perfil proteico de las cepas YB955, PERM1017 y PERM1202. Una colonia de cada una de las cepas fue propagada en medio A3 hasta una DO_{600nm} de 0.5, las células se rompieron con lisozima (2 mg/mL) y la fracción soluble se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE). (M) Marcadores de tamaño molecular, (1) YB955, (2) PERM1017 crecida con 0.05 mM de IPTG, (3) PERM1017 crecida con 0.1 mM IPTG, (4) PERM1017 crecida con 1 mM IPTG, (5) PERM1202.

Para verificar el incremento en la RNR en la mutante PERM1202 en condiciones de estrés nutricional y las distintas proteínas afectadas en esta mutante se realizó un análisis proteómico diferencial entre las cepas PERM1202 y YB955 mediante LC-MS/MS.

En el análisis proteómico se identificaron 749 proteínas, utilizando el programa PERSEUS se encontró que 54 de estas incrementaron más de 2 veces su síntesis en la cepa PERM1202 respecto a la cepa parental YB955, mientras que otras 55 resultaron disminuidas más de dos veces en la cepa PERM1202 (Figura 12). Sin embargo, este análisis *in silico* no contempló las proteínas no detectadas en una u otra cepa (4 no detectadas en la cepa YB955 y 29 no detectadas en la cepa PERM1202), por lo que el análisis de este tipo de proteínas se realizó de manera manual.

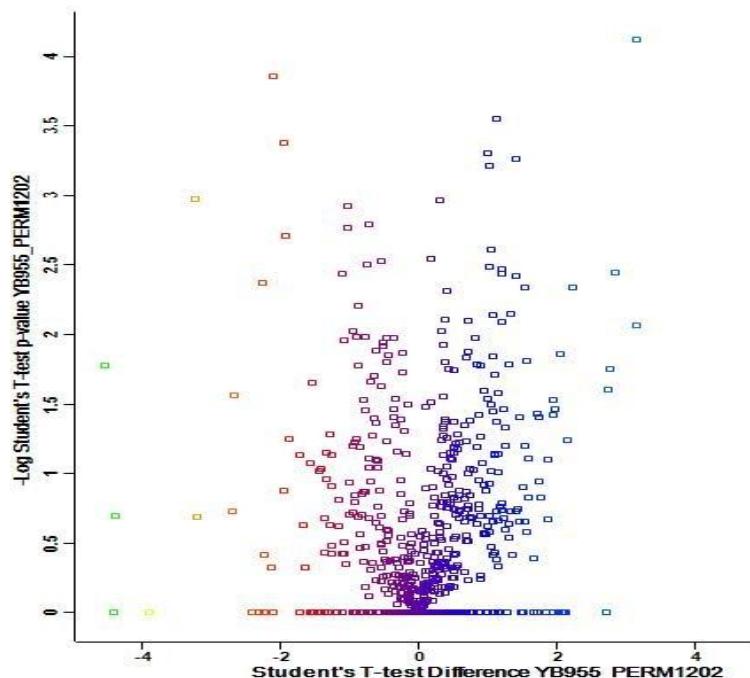


Figura 12. Análisis comparativo de proteínas expresadas en las cepas YB955 y PERM1202 durante estrés nutricional. Se extrajeron muestras de proteína soluble del 5 día de ayuno de histidina, metionina y leucina. Los extractos proteicos fueron digeridos con tripsina y analizados mediante ESI-Q-TOF-MS, los péptidos se identificaron utilizando el programa MaxQuant. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Perseus. Se realizó una prueba estadística t de Student para dos muestras. En verde-rojo se muestran las proteínas sobreexpresadas en la cepa PERM1202, mientras e violeta-azul las que disminuyeron su expresión.

En conjunto los resultados del análisis proteómico se muestran en las Tablas 7 y 8, donde se muestra que la cantidad de proteínas reprimidas (Tabla 8) en la cepa PERM1202 excede a las sobreexpresadas (Tabla 7) en esta misma cepa. Entre las proteínas con síntesis incrementada fue posible identificar a la exorribonucleasa (YhaM) y a la proteína NrdE la cual se incrementó 14 veces su producción en la cepa PERM1202, mientras que la proteína NrdF y otras proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno (UreC), biosíntesis de histidina (HisH), transporte de ribosa (RbsB), y biosíntesis de riboflavina (RibH) incrementaron aún más su síntesis (Tabla 7). Además, tres proteínas ribosomales y proteínas involucradas en motilidad, competencia, esporulación y formación de biopelículas incrementaron su síntesis en la cepa $\Delta ytcG$. Por otro lado, en la cepa PERM1202 se reprimió la síntesis de 7 proteínas involucradas en el metabolismo de nucleótidos PyrH, Gmk, Cmk, PurT, Prs, PurE y YqfO, además de 9 proteínas relacionadas con la síntesis de aminoácidos, 5 tRNA sintetasas, 4 proteínas implicados en la regulación de la transcripción y traducción y 4 proteínas de reparación del ADN entre otras proteínas con funciones diversas (Tabla 8).

Tabla 7. Proteínas sobreexpresadas en la cepa PERM1202 en células de *B. subtilis* sujetas a estrés nutricional.

Veces de expresión	Proteína	Función
Metabolismo de nucleótidos		
14,7	YhaM	3'-5' exorribonucleasa (degradación de RNA)
14,6	NrdE	Ribonucleótido reductasa Ib (subunidad alfa)
2,2	PurK	5-carboxiaminoimidazol ribonucleótido sintasa
ND ^a	NrdF	Ribonucleótido reductasa Ib (subunidad beta)
Síntesis de aminoácidos		
ND ^a	HisH	Imidazol glicerol fosfato sintasa
Traducción		
2,5	InfA	Factor de inicio de traducción IF-1
2,5	RplF	Proteína ribosomal L6
2,4	RpmE	Proteína ribosomal L31, proteína de estrés general
3,2	AsnS	Asparagina-tRNA ligasa
2,2	RplU	Proteína ribosomal L21
Diferenciación celular		
14,7	SinI	Antagonista de SinR
4,9	Oppb	Oligopéptido permeasa competencia esporulación
2,9	Hag	Flagelina
2,9	SpoIIB	Proteína regulatoria durante la esporulación
2,9	SpoVG	Proteína regulatoria durante la esporulación
3,7	YuaB	Hidrofobina
2,6	SpeD	S-adenosilmetionina descarboxilasa
2,5	ComZ	Proteína de competencia tardía
2,4	YfmS	Receptor soluble de quimiotaxis
3,2	Rok	Represor de ComK

Otros		
8,8	UreC	Ureasa (subunidad alfa)
2,1	UreA	Ureasa (subunidad gama)
9,3	RibH	6,7-dimetil-8-ribitolumazina sintasa (síntesis de riboflavina)
2,9	YwlF	Ribosa-5-fosfato isomerasa B
6,3	RbsB	Transportador de ribosa ABC
4,3	YfkN	Nucleotidasa (degradación de c-di-AMP)
2,6	CdaR	Proteína efectora de control de actividad de diadenilato ciclase CdaA
3,9	DarA	Proteína de unión a c-di-AMP
4,2	YvcA	Lipoproteína
3,7	BslA	Hidrofobina
ND ^a	Lgt	Prolipoproteína diacilgliceril transferasa
2,0	PpiB	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
4,2	YvcA	Lipoproteína
2,1	AtpC	ATP sintasa (cadena épsilon)
2,1	Vpr	Serin proteasa extracelular
2,0	IspA	Serin proteasa intracelular
2,4	YabA	Regulador negativo de inicio de la replicación
2,4	Fer	Ferredoxina
2,5	SppA	Peptidasa de péptido señal
2,5	BmrU	Proteína de resistencia a distintas drogas
2,7	SipT	Peptidasa señal
2,9	CspC	Proteína de choque térmico
5,3	Acca	Acetil-coenzima A carboxilasa (subunidad alfa)
6,4	SknR	Represor transcripcional de genes de profagos
3,6	Ptsh	Proteína acarreadora HPr
4,7	YuiA	Proteína sin caracterizar
ND ^a	YugI	similar a polribonucleótido fosforilasa
2,4	YdjO	Proteína sin caracterizar
2,4	YndB	Proteína sin caracterizar
2,1	YqeY	Proteína sin caracterizar
2,7	YfhC	Proteína sin caracterizar
3,1	YuzD	Proteína sin caracterizar
3,8	YtmB	Proteína sin caracterizar
4,6	YwqI	Proteína sin caracterizar
4,7	YqkB	Proteína sin caracterizar
4,8	YuiA	Proteína sin caracterizar
9,2	YhdX	Proteína sin caracterizar
3,8	YtmB	Proteína sin caracterizar

^aND. Proteína no detectada en la cepa YB955.

Tabla 8. Proteínas reprimidas en la cepa PERM1202 en células de *B. subtilis* sujetas a estrés nutricional.

Veces de expresión	Proteína	Función
Metabolismo de nucleótidos		
-2,7	PurE	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa
-2,5	Prs	Fosforibosilpirofosfato sintetasa
ND ^b	PyrH	Uridilato cinasa
ND ^b	Gmk	Guanilato cinasa
ND ^b	Cmk	Citidilato cinasa
ND ^b	PurT	Fosforibosilglicinamida formiltransferasa 2
ND ^b	YqfO	GTP ciclohidrolasa (hidrólisis de GTP)
Síntesis de aminoácidos		
-6,7	ArgH	Argininosuccinato liasa
-2,9	ArgF	Ornitina carbamoiltransferasa
-2,7	SerC	Fosfoserina aminotransferasa
-2,5	IlvD	Dihidroxiacido deshidratasa
-4,2	YwaA	aminotransferasa
ND ^b	LeuA	2-isopropilmalate sintasa
ND ^b	YitJ	Metionina sintasa
ND ^b	ThrB	Homoserina cinasa
ND ^b	AspB	Aspartato aminotransferasa
tRNA sintetasas		
ND ^b	PheT	Fenilalanina--tRNA ligasa (subunidad beta)
ND ^b	LeuS	Leucina--tRNA ligasa
-2,8	TyrZ	Tirosina--tRNA ligasa
-3,2	GatB	Aspartil/glutamilo-tRNA(Asn/Gln) amidotransferasa
-3,0	GltX	glutamato tRNA ligasa
Transcripción y traducción		
ND ^b	RplJ	Proteína ribosomal
-7,2	InfB	Factor de iniciación de la traducción IF-2,
-2,7	GreA	Factor de elongación de la transcripción
-2,3	CodY	Represor transcripcional dependiente de GTP.
Utilización de aminoácidos		
-2,3	RocA	1-pirroline-5-carboxilato deshidrogenasa
-2,2	RocF	Arginasa
-2,1	RocD	Ornitina aminotransferasa
Reparación DNA		
-3,4	DisA	Proteína escáner de integridad del ADN, diadenilato ciclase
-2,4	RecA	Proteína multifuncional involucrada en recombinación homóloga y reparación del ADN.
-2,2	Nfo	AP endonucleasa tipo IV
ND ^b	SbcC	DNA exonucleasa
Otros		
-8,9	YceC	Proteína de estrés general
-8,9	DinB	Inhibidor de nucleasas

-6,7	YqhY	Proteína sin caracterizar
-3,9	MenB	1,4-dihidroxi-2-naphthoil-CoA sintasa
-3,9	YwfI	Possible peroxidasa
-3,9	YtoP	Glutamil aminopeptidasa
-3,9	MenB	Naftolonato sintasa
-4,6	PpaX	Pirofosfatasa
-2,8	YcsN	Oxidoreductasa
-2,8	Spo0M	Control de esporulación
-2,8	YtkH	Sin caracterizar
-2,8	YhfK	Epimerasa
-3,6	Dat	D-alanina aminotransferasa
-2,7	YmfH	Possible proteasa
-3,4	TagC	Proteína de ensamblaje de poliglicerol fosfato
-2,5	YhgC	Proteína sin caracterizar
-2,5	YtjP	Dipeptidasa PepV
-3,3	CotE	Proteína morfogénica en espora
-2,4	YjcH	Possible hidrolasa
-4,1	YfmJ	Oxidoreductasa
-2,3	RdbRB	Componente del estresosoma
-2,3	PepF	Oligoendopeptidasa F (inhibe esporulación)
-2,3	HslU	Proteasa dependiente de ATP
-2,3	YtvA	Receptor de luz azul
-2,3	GpmI	Fosfoglicerato mutasa
-2,2	RbsD	Transportador ribosa ABC (proteína de membrana)
-2,2	Murb	UDP-N-acetilenolpiruvoirglucosamina reductasa
-2,2	SufB	Proteína de FeS cluster
-2,2	NamA	NADPH deshidrogenasa
-2,1	YwpJ	fosfatasa
-2,1	YxdD	Proteína sin caracterizar
-2,1	YumC	Ferredoxina reductasa
-2,1	YtpR	Proteína sin caracterizar
-2,1	NadA	Quinolinato sintasa A
-2,1	PtsI	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa
-2,1	MtnD	Acireductona dioxigenasa
ND ^b	YbfA	Proteína sin caracterizar
ND ^b	YrvC	Possible componente de transporte de Potasio
ND ^b	CysI	Componente beta de sulfito reductasa [NADPH] dependiente
ND ^b	MelA	Alfa-galactosidasa
ND ^b	YtpA	Fosfolipasa
ND ^b	YaaA	Proteína de unión a RNA
ND ^b	TagD	Glicerol-3-fosfato citidiltransferasa
ND ^b	YwfO	Fosfohidrolasa metal dependiente
ND ^b	YvyC	Proteína Flagelar
ND ^b	YtxG	Proteína sin caracterizar
ND ^b	PanC	Pantotenato sintetasa
ND ^b	GsaB	Glutamato-1-semialdehido 2,1-aminomutasa

ND ^b	MinC	inhibidor de la división celular
ND ^b	FliF	Proteína flagelar
ND ^b	Dps	Proteína de estrés general 20U
ND ^b	YwtF	Possible regulador transcripcional

^bND. Proteína no detectada en la cepa PERM1202

En conjunto la proteína NrdEF fue visiblemente afectada por la falta de *ytcG*, sin embargo otras proteínas involucradas en la síntesis de nucleótidos disminuyeron, probablemente en respuesta a una elevada actividad de RNR, en la Figura 13 se muestran las proteínas involucradas en la síntesis de purinas y pirimidinas afectadas por la falta de *ytcG*.

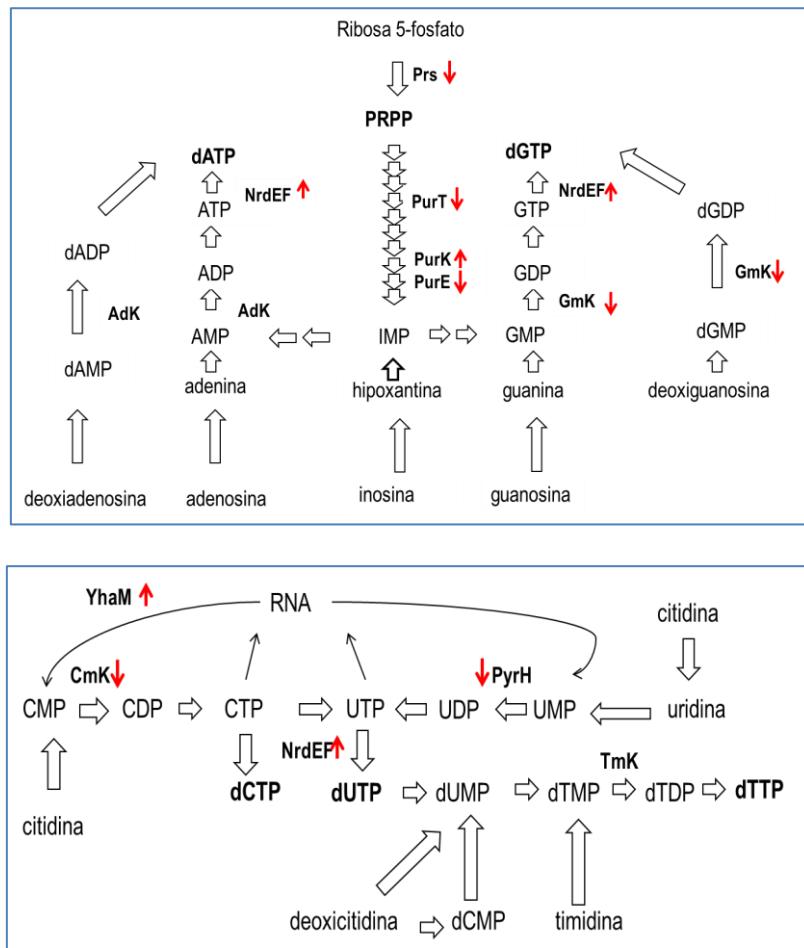


Figura 13. Proteínas involucradas en la síntesis de dNTPs afectadas por la falta del gen *ytcG*.

V. DISCUSIÓN.

En algunos organismos, el gen de la RNR clase Ib es únicamente expresado en condiciones de daño al ADN o estrés oxidativo (Panosa *et al.*, 2010; Torrents *et al.*, 2007), cuando las altas concentraciones de dNTPs son requeridas por las células. En *E. coli*, los genes RNR de la clase Ib carecen de las regiones regulatorias presentes en la clase Ia pues la clase Ib no es inhibida por ATP (Cendra Mdel *et al.*, 2013; Olliver *et al.*, 2010) permitiéndole a la célula alcanzar los niveles requeridos de dNTPs en un menor tiempo. En contraste, a nivel transcripcional la fuerte represión ejercida por distintos factores como FUR (Martin & Imlay, 2011) y NrdR (Torrents *et al.*, 2007) evitan la sobreproducción de nucleótidos en situaciones en las que no son requeridos por las células.

B. subtilis posee únicamente una RNR (clase Ib) y se ha observado que los mecanismos que regulan su actividad así como la expresión de los genes que la codifican son distintos a los observados en otros organismos. En referencia a la regulación alóstérica, un análisis estructural sugeriré que las RNR clase Ib muestra la ausencia de un sitio de unión a ATP/dATP que en otras clases de RNRs inhibe su actividad enzimática. No obstante, en *B. subtilis* se ha demostrado que el dATP es capaz de inhibir *in vitro* la actividad de la RNR a concentraciones mayores a 10 µM (Parker *et al.*, 2014); esta situación no ha sido observado en otras RNR de la clase Ib, ya que su actividad no es afectada, aun a concentraciones de 1 mM de dATP (Jordan *et al.*, 1994; Jordan *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Por otro lado, a nivel transcripcional, en organismos como *E. coli* y *S. typhimurium* que poseen genes que codifican para más de una ribonucleótido reductasa, la clase Ib (NrdEF) es siempre la más reprimida y las cajas NrdR en los promotores de genes *nrdEF* respecto a los elementos -10 y -35 del promotor se encuentran ya sea traslapadas o más cercanas que en los promotores de las otras clases de RNR (Panosa *et al.*, 2010; Torrents *et al.*, 2007). Por lo tanto, además del efecto que ejercen las concentraciones de nucleótidos en la actividad de la RNR, la ubicación de las cajas NrdR respecto al promotor del operón *nrdEF* podría ser un factor importante en modular el nivel de represión ejercida por NrdR. En apoyo del papel regulatorio de YtcG en el presente estudio se observó que en una cepa carente de YtcG ocurre un incremento de ~8 veces en los niveles de expresión del operón *nrdEF* sugiriendo que YtcG es el ortólogo de NrdR en *B. subtilis*.

Distintos estudios han presentado evidencia donde se observa que alteraciones en los niveles de dNTPs pueden afectar la fidelidad de la replicación del ADN. En células en crecimiento de *E. coli* la sobreexpresión de los genes de RNR y un subsecuente incremento en la poza de dNTPs no solamente estimuló la actividad de polimerasas de síntesis translesión (TLS), también fue capaz de modificar transitoriamente la actividad correctora de polimerasas replicativas (Gon *et al.*, 2011). Un efecto similar fue observado en células de *Saccharomyces cerevisiae* donde niveles incrementados de dNTPs promovieron eventos mutagénicos al conferir a las DNA polimerasas la capacidad de extensión sobre malos apareamientos en la doble hélice de ADN (Mertz *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2015). Por lo tanto, es claro que la expresión incrementada de RNR y el subsecuente aumento en los dNTPs es capaz de afectar la tasa de mutagénesis en células con crecimiento activo.

En *B. subtilis* YB955 la desrepresión de los genes *nrnEF* incrementó los niveles de reversión de los alelos *his* *met* y *leu* durante el crecimiento (Fig. 9). Es muy probable que altos niveles de RNR resulten en un aumento en las concentraciones de dNTPs en *B. subtilis* lo cual puede propiciar la generación de mutaciones espontáneas en un mecanismo semejante al descrito en *E. coli* (76). En *B. subtilis* altas concentraciones de dNTPs podrían activar la síntesis translesión de las Y-DNA polimerasas (YqjH y YqjW) favoreciendo la mutagénesis o bien propiciar errores en la replicación por la polimerasa replicativa (DNA Pol III) en células en crecimiento.

Sin embargo, el efecto de alteraciones en los niveles de expresión de RNR en células en estrés nutricional no había sido estudiado, se reportó que en células de *E. coli* en condiciones de crecimiento limitado los niveles de dNTPs tienden a disminuir (Buckstein *et al.*, 2008), por otro lado se ha demostrado en estudios *in vitro* que la reducción en las concentraciones de dNTPs es capaz de incrementar la actividad de la polimerasa de STL DinB (Pol IV) (Pomerantz *et al.*, 2013); dicha polimerasa, se ha sugerido ejerce un papel central en la mutagénesis asociada a estrés en *E. coli* (Buckstein *et al.*, 2008; Hastings *et al.*, 2010; Pomerantz *et al.*, 2013; Ponder *et al.*, 2005; Tompkins *et al.*, 2003). En conjunto estos estudios sugieren que en condiciones que limitan el crecimiento bajas concentraciones de dNTPs pueden propiciar mutaciones en *E. coli*.

En células de *B. subtilis* en ayuno de aminoácidos los niveles de RNR y por lo tanto de dNTPs tienden a disminuir (Fig. 7); no obstante, la mutagénesis en estas condiciones

incrementa paralelamente a los niveles de expresión del gen *nrdE* (Figura 9), altos niveles en la transcripción de los genes *nrdEF* incrementaron los niveles de reversión de los alelos *his*, *met* y *leu* sugiriendo que bajo estas condiciones, en *B. subtilis* una elevada actividad de RNR propicia la generación de mutaciones. Una aparente contradicción surge de estas observaciones debido a que los niveles de RNR tienden a disminuir en la cepa parental YB955 bajo estrés nutricional (Fig. 7). En cambio las revertentes *His*⁺, *Met*⁺ y *Leu*⁺ continúan acumulándose (Fig. 9). Sin embargo, es importante resaltar dos puntos: a) los niveles de transcripto del gen *nrdE* en células en ayuno nutricional fueron medidos en la población de células no revertentes, b) las células no revertentes de las cepas PERM1202 y YB955 son susceptibles a responder a factores endógenos que modifiquen espontáneamente sus niveles de expresión. Algunos de los factores celulares que pueden alterar los niveles de expresión de *nrdEF* en *B. subtilis* se ha sugerido son las proteínas DnaA (Goranov *et al.*, 2005), ResDE (Hartig *et al.*, 2006) y PerR (Suarez-Castro, 2016), además del estrés oxidativo (Castro-Cerritos, 2011), condición que se ha demostrado posee enorme influencia en la generación de mutaciones asociadas a fase estacionaria (Vidales *et al.*, 2009).

Además, distintas evidencias experimentales sugieren que los cambios que promueven el surgimiento de mutaciones en células sin crecimiento ocurren en una subpoblación de células en las cuales los mecanismos de reparación de DNA se encuentran limitados o suprimidos mientras que los mecanismos que introducen mutaciones en el genoma son activados (Ambriz-Avina *et al.*, 2016; Bridges & Ereira, 1998; Foster, 1998; Foster, 1999; Gonzalez *et al.*, 2008; Hendrickson *et al.*, 2002; Rosche & Foster, 1999; Saumaa *et al.*, 2006; Sung & Yasbin, 2002). Por lo tanto, es factible suponer que a pesar de la disminución en los niveles de expresión de los genes *nrdEF* estos sean susceptibles a cambios en su transcripción por distintos factores celulares lo que conllevaría a una alteración en la frecuencia mutagénica en condiciones de estrés nutricional. En apoyo a esta idea la mutante condicional PERM1017 en la cual la transcripción de *nrdEF* resulta incapaz de responder a los distintos factores celulares presentó bajos niveles de revertentes *His*⁺, *Met*⁺ y *Leu*⁺.

Por otro lado, en la cepa Δ *ytcG* se observó mayor proporción de revertentes con fenotipo *Met*⁺ (Fig. 9). Estudios previos han sugerido que la mayoría de las revertentes *Met*⁺ en cepas de *B. subtilis* deficiente en distintos sistemas de reparación son debidas a mutaciones supresoras sin sentido (Ross *et al.*, 2006; Sung & Yasbin, 2002; Vidales *et al.*, 2009); sin embargo, en la mutante *ytcG* estas revertentes podrían ser generadas por mecanismo(s) diferente(s).

Un fenómeno aún más interesante fue la alta frecuencia de aparición de colonias que revirtieron la auxotrofía a los tres aminoácidos probados en la cepa PERM1202. Este fenómeno es interesante ya que en el estudio realizado por Sung y Yasbin (2002), solo 3 de 500 (0,6 %) de los revertentes generadas por la cepa YB555 presentaron prototrofía a los tres aminoácidos. Un resultado ligeramente elevado (2%) se observó para esta cepa en este proyecto, es posible que la generación de dobles y triples revertentes sea favorecido en los experimentos de mutagénesis asociada a fase estacionaria debido a la ausencia inicial de dos aminoácidos, mientras que en trabajos anteriores las células únicamente se sometían ayuno de un aminoácido (Debora *et al.*, 2011; Lopez-Olmos *et al.*, 2012; Pedraza-Reyes & Yasbin, 2004; Ross *et al.*, 2006; Sung & Yasbin, 2002). Sin embargo, este fenómeno se exacerbó dramáticamente en ausencia del gen *ycgG* (*nrdR*). La secuenciación de algunas colonias revertentes producidas por esta cepas demostró que la mayoría contenían el cambio requerido para revertir la mutación en los genes *hisC*, *metB* y *leuC* involucrados en la síntesis de los correspondientes aminoácidos (Tabla 6), además en las revertentes sencillas secuenciadas (His^+ o Met^+) la mayoría de las mutaciones pudieron ser identificadas en la posición donde originalmente se encontraba la mutación, es decir la falta de *ycgG* produce una tasa de generación de mutaciones verdaderas relativamente alta a lo reportado previamente para la cepa YB955 (Ross *et al.*, 2006; Sung & Yasbin, 2002). Por lo tanto, es posible que la delección de *ycgG* incremente la generación de reversiones verdaderas sin afectar la generación de mutaciones supresoras.

La generación de las posibles mutaciones supresoras se ha visto incrementada por el estrés oxidativo (Vidales *et al.*, 2009) mientras que la ausencia de *mfd* anula la generación de revertentes Met^+ verdaderas (Ross *et al.*, 2006). Mfd, un factor que acopla la reparación a la transcripción ha demostrado ser necesario para la generación de mutaciones en los tres alelos *hisC*, *metB* y *leuC* (Martin *et al.*, 2011; Ross *et al.*, 2006), por lo que es posible que la generación de revertentes verdaderas obtenidas por la sobreexpresión de *nrdEF* se encuentre relacionada con el proceso de reparación acoplada a la transcripción.

Un mecanismo que simultáneamente podría dar origen al surgimiento de dobles y triples revertentes en *B. subtilis*, podría ser la desrepresión paralela de genes involucrados en la síntesis de aminoácidos. A este respecto, se conoce que en células de *E. coli* K12 carentes de división, gran parte de la generación de revertentes a arginina y leucina resultó ser dependiente de la enzima RelA (Wright & Minnick, 1997). Se encontró que la delección del gen *relA*, el cuál codifica para una (p)ppGpp (Guanosina (penta)tetrafosfato) sintetasa,

disminuyó drásticamente la generación de revertantes a las dos auxotrofías, sugiriendo que la acumulación de ppGpp generada por la respuesta estricta favorece la generación de estas reversiones (Wright & Minnick, 1997). En *B. subtilis* la acumulación de (p)ppGpp inhibe la síntesis de GTP en la célula (Bittner *et al.*, 2014), la disminución en los niveles de este nucleótido a su vez inactiva al represor transcripcional CodY (Handke *et al.*, 2008; Levdikov *et al.*, 2006), el cual está implicado en la regulación transcripcional de distintos genes entre ellos genes implicados en la síntesis de aminoácidos ramificados (Belitsky & Sonenshein, 2008; Handke *et al.*, 2008; Molle *et al.*, 2003; Shivers & Sonenshein, 2004; Villapakkam *et al.*, 2009), por lo tanto es posible que la simultánea desrepresión de distintos operones controlados por CodY favorezca la generación de mutaciones en los genes con altos niveles de transcripción.

En *B. subtilis* se ha comprobado que en células sin división la generación de revertantes *Leu*⁺ está directamente relacionado con altos niveles del transcripto del gen *leuC* (Martin *et al.*, 2011; Pybus *et al.*, 2010), lo cual sugiere que la desrepresión simultánea de distintos genes implicados en la síntesis de aminoácidos podría explicar el fenómeno reversión a las tres auxotrofías mostrado en la cepa carente de *YtcG*.

Aunque el gen *leuC* de *B. subtilis* forma parte de un regulón controlado por CodY, los genes *metB* e *hisC* no son afectados significativamente por este represor (Kriel *et al.*, 2014; Molle *et al.*, 2003); sin embargo se conoce que en esta bacteria la ausencia de (p)ppGpp la desregulación de los niveles de GTP afectan negativamente la biosíntesis de histidina y metionina (Kriel *et al.*, 2014). Estos antecedentes sugieren que el aumento en los niveles de GTP puede regular la transcripción y/o biosíntesis de estos aminoácidos en un mecanismo independiente de CodY.

Debido a que el fenómeno de triple reversión fue incrementado fuertemente por la delección del gen *ytcG* (*nrdR*), surge la pregunta de cómo podría estar relacionado el represor NrdR y el metabolismo de nucleótidos en la respuesta estricta. Es muy posible que la cepa carente de este represor, posea una elevada actividad de RNR y que en conjunto; la reducción de GTP a dGTP y la inhibición de la síntesis del primero por el análogo (p)ppGpp ocasione una fuerte disminución en la concentración intracelular de GTP, incrementando la transcripción de genes controladas por CodY-GTP y/o GTP. Por otra parte como se mostró en este trabajo, una elevada actividad de RNR y por lo tanto en la poza de algunos dNTPs favorecería la mutagénesis en los alelos en estudio (Fig. 14).

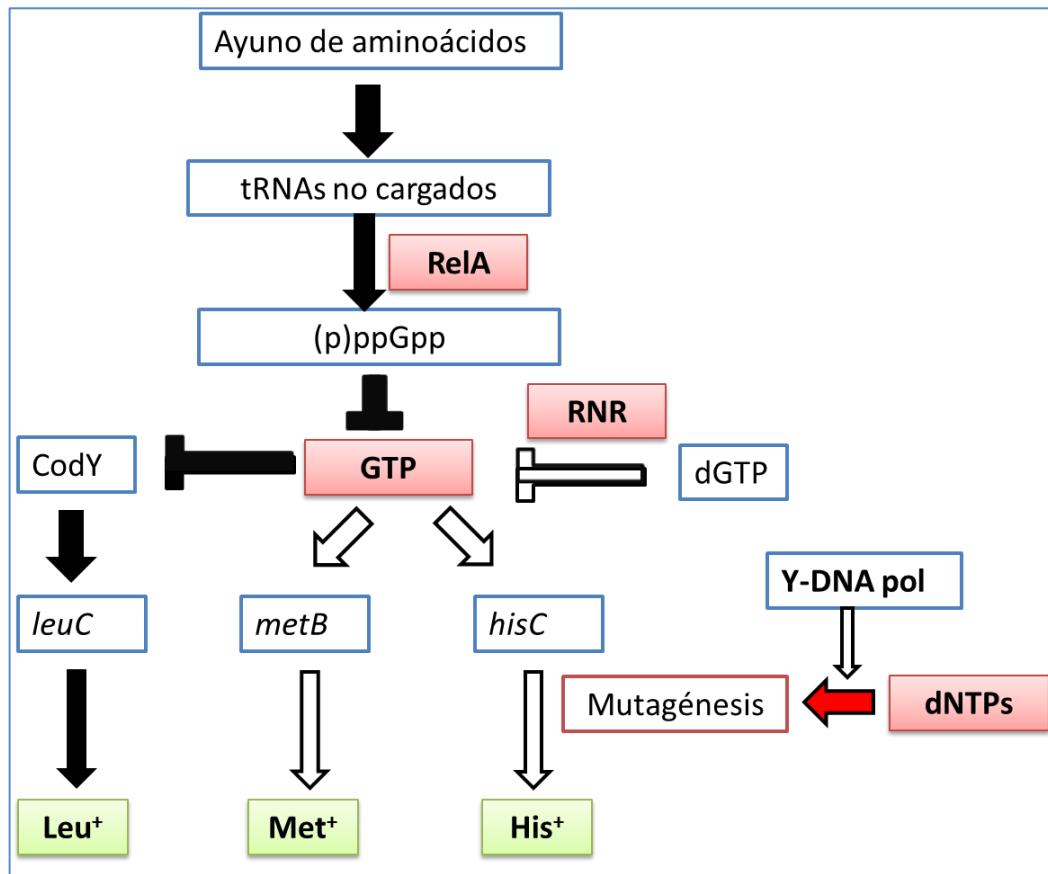


Figura 14. Mecanismo propuesto para la generación de triples revertantes His⁺Met⁺Leu⁺. Los cuadros rojos marcan las moléculas principales que podrían estar involucradas en este proceso, las flechas negras indican procesos ya confirmados en *B. subtilis*, las flechas blancas representan procesos propuestos hipotéticos que requieren comprobación experimental.

El ayuno de uno o varios aminoácidos genera tRNAs no cargados, los cuales son detectados por RelA, la cual como respuesta sintetiza (p)ppGpp y ppGpp, los cuales disminuyen la biosíntesis de GTP inactivando al represor CodY y por lo tanto desreprimiendo la transcripción de *leuC*. Se sugiere que la elevada actividad de RNR podría disminuir aún más los niveles de GTP, que a su vez potencialmente afectarían los niveles de transcripción de *metB* e *hisC*. Una elevada concentración de dNTPs propiciaría la generación de mutaciones en el genoma, particularmente en aquellos genes transcripcionalmente activos, generando en algunos casos la generación de triples revertentes His⁺Met⁺Leu⁺.

Aunque NrdR ha sido involucrado principalmente en reprimir la expresión de genes de distintas clases de RNR, estudios recientes han mostrado que la deficiencia de este factor altera la transcripción de genes y la producción de proteínas adicionales a la RNR (Crespo *et al.*, 2015; Naveen & Hsiao, 2016). En el presente estudio se encontró que la ausencia de *ytcG* en *B. subtilis* altera drásticamente los niveles de expresión del gen *nrdE* y las concentraciones de las proteínas de la RNR NrdE y NrdF (Tabla 7). En adición, distintas proteínas fueron afectadas por la falta de este gen, proteínas involucradas en la síntesis de dNTPs en pasos que anteceden a los de la RNR se observaron disminuidas; las proteínas guanilato cinasa (GmK), citidilato cinasa (CmK) y uridilato cinasa (PyrH) que catalizan la conversión de GMP, CMP y UMP respectivamente a su forma difosfatada, además la fosforibosilpirofósfato sintetasa (Prs), la fosforibosilglicinamida formiltransferasa (PurT) y la carboxiaminoimidazol ribonucleotido mutasa (PurE) que catalizan pasos importantes requerido para la síntesis de PRPP e IMP también resultaron reprimidas en la mutante *ytcG* (Figura 13, Tabla 8), es probable que la disminución en la síntesis de estas proteínas sea en respuesta a los elevados niveles de actividad de RNR.

Además, se observaron niveles incrementados de un componente del transportador de ribosa (RbsB) y la imidazol glicerol fosfato sintasa (HisH) requerida en la síntesis de histidina y que al igual que en las rutas de síntesis de nucleótidos requiere de fosforibosil pirofósfato (PRPP) (Kilstrup *et al.*, 2005). Una 3'-5' exorribonucleasa (YhaM) incrementó drásticamente en la cepa mutante PERM1202, enzimas de esta familia participan en la degradación de mRNAs, YhaM forma parte del regulón SOS y es inducida por daño al ADN (Au *et al.*, 2005). Se encontraron niveles incrementados de una proteína involucrada en la síntesis de riboflavina (RibH) en la cepa Δ *ytcG*; en otros organismos *ribH* ha sido genéticamente relacionado al gen *ytcG* (Crespo *et al.*, 2015; Torrents *et al.*, 2007).

Tres proteínas ribosomales; RplF, RpmE y RplU (L6, L31 y L21, respectivamente), el factor de inicio de la traducción InfA, la proteína YugI y la ATP sintasa AtpC se observaron aumentadas en la mutante *nrdR*, este tipo de proteínas son reguladas negativamente durante la respuesta estricta en *B. subtilis* (Eymann *et al.*, 2002). Las proteínas UreA, Vpr, SpoVG que son positivamente inducidas durante la respuesta estricta en *B. subtilis* (Eymann *et al.*, 2002) incrementaron su síntesis en la cepa PERM1202. En contraste, proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos que son positivamente inducidas por la respuesta estricta como arginosuccinato liasa (ArgH), Ornitina carbamoiltransferasa (ArgF), 2-isopropilmalato sintasa (LeuA), fosfoserina aminotransferasa (SerC), dihidroxiacido deshidratasa (IlvD),

aminotransferasa (YwaA), metionina sintasa (YitJ) disminuyeron su síntesis en la cepa PERM1202. Otras proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos y traducción de proteínas también se observaron disminuidas en esta cepa; la, homoserina cinasa (ThrB) y aspartato aminotransferasa (AspB), además de las tRNA ligasas de fenilalanina (PheT), leucina (LeuS), tirosina (TyrZ) y glutamato (GltX) el factor de inicio de la traducción (InfB) y la proteína ribosomal (RplJ). Se conoce que muchas de estas proteínas aumentan su expresión durante el ayuno de aminoácidos, de manera dependiente o independiente de RelA (Eymann *et al.*, 2002; Gutierrez-Preciado *et al.*, 2009).

El represor transcripcional dependiente de GTP CodY resultó disminuido en la cepa PERM1202, en concordancia con esto, la proteína YuiA y la oligopeptido permeasa OppB cuyos genes son reprimidos por este factor (Molle *et al.*, 2003) se mostraron incrementadas.

Interesantemente, distintas proteínas que interaccionan (DarA) o regulan la síntesis de c-di-AMP (CdaR y YfkN) se mostraron inducidas en la cepa PERM1202 mientras que DisA se mostró reprimida en esta misma cepa sugiriendo que los niveles de c-di-AMP en la cepa carente de *ytcG* se encuentran disminuidos en condiciones de estrés nutricional.

La cepa PERM1202 mostró una frecuencia relativamente elevada de mutaciones verdaderas al compararlo con la cepa YB955 donde se ha sugerido cierto porcentaje de las reversiones ocurren debido a errores en la transcripción y traducción o a mutaciones supresoras(Ambriz-Avina *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2011; Pybus *et al.*, 2010; Robledo *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2006; Vidales *et al.*, 2009), en el presente trabajo se observó que las tRNA sintetasas (tRNA ligasas) se encuentran disminuidas en la cepa PERM1202 ,estas tRNA sintetasas han sido reportadas como susceptibles a distintos grados de error durante su actividad generando cambios durante la traducción que conducen a proteínas mutantes en distintos organismos (Ribas de Pouplana *et al.*, 2014; Schwartz *et al.*, 2016), por lo tanto este resultado podría explicar al menos en parte la relativa alta ocurrencia de mutaciones relacionadas con la traducción en la cepa YB955 o la alta proporción de revertantes verdaderas en la cepa PERM1202.

Por otro lado también se observaron disminuidos el factor de elongación de la transcripción GreA y el factor de inicio de la traducción InfB, el factor GreA además del factor de terminación de la transcripción NusA han sido asociado a mutagénesis asociado a la transcripción en células sin división de *B. subtilis*(Villegas-Negrete & Pedraza-Reyes, 2016), el gen *infB* se encuentra formando parte de un operón junto con el gen *nusA*.

Tomados en conjunto, los resultados del análisis proteómico muestran claramente una drástica elevación en las concentraciones de la Ribonucleótido reductasa NrdEF en la cepa PERM1202 de *B. subtilis*; sin embargo, también muestran que la síntesis de otras proteínas involucradas en la síntesis *de novo* de nucleótidos resulta afectada. Por otra parte, las altas concentraciones de la proteína YhaM detectadas en la cepa Δ ytcG podrían indicar que la probable fuente de obtención de ribonucleótidos trifosfato requeridos para la síntesis de dNTPs podrían provenir de los productos de degradación de ARN. Además, estos análisis sugieren una estrecha correlación entre el comportamiento observado en la cepa PERM1202 durante los ensayos de mutagénesis asociada a fase estacionaria y la respuesta estricta en *B. subtilis* debido a que distintas proteínas involucradas en la respuesta provocada por el (p)ppGpp modificaron su expresión.

En conclusión, los resultados descritos en este estudio abonan al entendimiento de los mecanismos que regulan la expresión de la RNR con un impacto directo en procesos celulares que modulan la mutagénesis asociada al estrés, la variabilidad genética, la resistencia a antibióticos y la patogénesis microbiana.

VI. CONCLUSIONES

1. *ytcG* codifica al represor funcional NrdR en *B. subtilis*
2. YtcG reprime la expresión de los genes de la ribonucleótido reductasa y la síntesis de NrdEF.
3. La mutagénesis asociada al crecimiento así como las mutaciones en células sin división son afectadas por los niveles de transcripción de los genes de la ribonucleótido reductasa.
4. La falta de *ytcG* produce la expresión diferencial de distintas proteínas en células sujetas a estrés nutricional entre las cuales destacan las relacionadas al metabolismo de nucleótidos y la respuesta estricta generada por el (p)ppGpp

VI. PERSPECTIVAS

- Determinar los niveles de nucleótidos en células de *B. subtilis* sujetas a estrés nutricional en la cepa *ΔytcG*.
- Realizar un estudio transcriptómico de células sujetas a estrés en la cepa *ΔytcG*.
- Realizar un estudio proteómico diferencial entre células en crecimiento y células sin división en las cepas PERM1202 y YB955.
- Determinar la participación de la respuesta estricta y el (p)ppGpp en la mutagénesis asociada a fase estacionaria.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambriz-Avina, V., Yasbin, R. E., Robleto, E. A. & Pedraza-Reyes, M. (2016).** Role of Base Excision Repair (BER) in Transcription-associated Mutagenesis of Nutritionally Stressed Nongrowing *Bacillus subtilis* Cell Subpopulations. *Curr Microbiol* **73**, 721-726.
- Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V. & other authors (2005).** Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *Journal of bacteriology* **187**, 7655-7666.
- Barlow, T. (1988).** Evidence for a new ribonucleotide reductase in anaerobic *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **155**, 747-753.
- Bazill, G. W. & Karamata, D. (1972).** Temperature-sensitive mutants of *B. subtilis* defective in deoxyribonucleotide synthesis. *Mol Gen Genet* **117**, 19-29.
- Belitsky, B. R. & Sonenshein, A. L. (2008).** Genetic and biochemical analysis of CodY-binding sites in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **190**, 1224-1236.
- Bittner, A. N., Kriel, A. & Wang, J. D. (2014).** Lowering GTP level increases survival of amino acid starvation but slows growth rate for *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp. *Journal of bacteriology* **196**, 2067-2076.
- Bridges, B. A. & Ereira, S. (1998).** DNA synthesis and viability of a mutT derivative of *Escherichia coli* WP2 under conditions of amino acid starvation and relation to stationary-phase (adaptive) mutation. *Journal of bacteriology* **180**, 2906-2910.
- Buckstein, M. H., He, J. & Rubin, H. (2008).** Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **190**, 718-726.
- Cairns, J. & Foster, P. L. (1991).** Adaptive reversion of a frameshift mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **128**, 695-701.
- Castro-Cerritos, K. V., Pedraza-Reyes Mario (2011).** Tesis de Maestría *Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto.*
- Cendra Mdel, M., Juarez, A. & Torrents, E. (2012).** Biofilm Modifies Expression of Ribonucleotide Reductase Genes in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, e46350.
- Cendra Mdel, M., Juarez, A., Madrid, C. & Torrents, E. (2013).** H-NS is a novel transcriptional modulator of the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **195**, 4255-4263.
- Crespo, A., Pedraz, L. & Torrents, E. (2015).** Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR transcription factor: global transcriptomic analysis and its role on ribonucleotide reductase gene expression. *PLoS One* **10**, e0123571.
- Chabes, A., Georgieva, B., Domkin, V., Zhao, X., Rothstein, R. & Thelander, L. (2003).** Survival of DNA damage in yeast directly depends on increased dNTP levels allowed by relaxed feedback inhibition of ribonucleotide reductase. *Cell* **112**, 391-401.
- de Andrade, H. H., Marques, E. K., Schenberg, A. C. & Henriques, J. A. (1989).** The PSO4 gene is responsible for an error-prone recombinational DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **217**, 419-426.

Debora, B. N., Vidales, L. E., Ramirez, R., Ramirez, M., Robleto, E. A., Yasbin, R. E. & Pedraza-Reyes, M. (2011). Mismatch repair modulation of MutY activity drives *Bacillus subtilis* stationary-phase mutagenesis. *Journal of bacteriology* **193**, 236-245.

Eklund, H., Eriksson, M., Uhlin, U., Nordlund, P. & Logan, D. (1997). Ribonucleotide reductase--structural studies of a radical enzyme. *Biol Chem* **378**, 821-825.

Eklund, H., Uhlin, U., Farnegardh, M., Logan, D. T. & Nordlund, P. (2001). Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Prog Biophys Mol Biol* **77**, 177-268.

Elledge, S. J. & Davis, R. W. (1989). DNA damage induction of ribonucleotide reductase. *Mol Cell Biol* **9**, 4932-4940.

Elledge, S. J., Zhou, Z., Allen, J. B. & Navas, T. A. (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays* **15**, 333-339.

Eriksson, S. (1975). Ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*: demonstration of a highly active form of the enzyme. *Eur J Biochem* **56**, 289-294.

Eymann, C., Homuth, G., Scharf, C. & Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis. *Journal of bacteriology* **184**, 2500-2520.

Foster, P. L. & Trimarchi, J. M. (1995). Adaptive reversion of an episomal frameshift mutation in *Escherichia coli* requires conjugal functions but not actual conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5487-5490.

Foster, P. L., Trimarchi, J. M. & Maurer, R. A. (1996). Two enzymes, both of which process recombination intermediates, have opposite effects on adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Genetics* **142**, 25-37.

Foster, P. L. (1998). Adaptive mutation: has the unicorn landed? *Genetics* **148**, 1453-1459.

Foster, P. L. (1999). Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annu Rev Genet* **33**, 57-88.

Gomez-Marroquin, M., Martin, H. A., Pepper, A., Girard, M. E., Kidman, A. A., Vallin, C., Yasbin, R. E., Pedraza-Reyes, M. & Robleto, E. A. (2016). Stationary-Phase Mutagenesis in Stressed *Bacillus subtilis* Cells Operates by Mfd-Dependent Mutagenic Pathways. *Genes* **7**.

Gon, S. & Beckwith, J. (2006). Ribonucleotide reductases: influence of environment on synthesis and activity. *Antioxid Redox Signal* **8**, 773-780.

Gon, S., Napolitano, R., Rocha, W., Coulon, S. & Fuchs, R. P. (2011). Increase in dNTP pool size during the DNA damage response plays a key role in spontaneous and induced-mutagenesis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19311-19316.

Gonzalez, C., Hadany, L., Ponder, R. G., Price, M., Hastings, P. J. & Rosenberg, S. M. (2008). Mutability and importance of a hypermutable cell subpopulation that produces stress-induced mutants in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* **4**, e1000208.

Goranov, A. I., Katz, L., Breier, A. M., Burge, C. B. & Grossman, A. D. (2005). A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **102**, 12932-12937.

Grinberg, I., Shtenberg, T., Gorovitz, B., Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Borovok, I. (2006). The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *Journal of bacteriology* **188**, 7635-7644.

Grinberg, I., Shtenberg, T., Hassan, A. Q., Aharonowitz, Y., Borovok, I. & Cohen, G. (2009). Functional analysis of the *Streptomyces coelicolor* NrdR ATP-cone domain: role in nucleotide binding, oligomerization, and DNA interactions. *Journal of bacteriology* **191**, 1169-1179.

Gutierrez-Preciado, A., Henkin, T. M., Grundy, F. J., Yanofsky, C. & Merino, E. (2009). Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **73**, 36-61.

Hall, B. M., Ma, C. X., Liang, P. & Singh, K. K. (2009). Fluctuation analysis CalculatOR: a web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Bioinformatics* **25**, 1564-1565.

Handke, L. D., Shivers, R. P. & Sonenshein, A. L. (2008). Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of bacteriology* **190**, 798-806.

Harris, R. S., Longerich, S. & Rosenberg, S. M. (1994). Recombination in adaptive mutation. *Science* **264**, 258-260.

Harris, R. S., Ross, K. J. & Rosenberg, S. M. (1996). Opposing roles of the holliday junction processing systems of *Escherichia coli* in recombination-dependent adaptive mutation. *Genetics* **142**, 681-691.

Hartig, E., Hartmann, A., Schatzle, M., Albertini, A. M. & Jahn, D. (2006). The *Bacillus subtilis* *nrdEF* genes, encoding a class Ib ribonucleotide reductase, are essential for aerobic and anaerobic growth. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5260-5265.

Hastings, P. J., Hersh, M. N., Thornton, P. C. & other authors (2010). Competition of *Escherichia coli* DNA polymerases I, II and III with DNA Pol IV in stressed cells. *PLoS One* **5**, e10862.

Hendrickson, H., Slechta, E. S., Bergthorsson, U., Andersson, D. I. & Roth, J. R. (2002). Amplification-mutagenesis: evidence that "directed" adaptive mutation and general hypermutability result from growth with a selected gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2164-2169.

Herrick, J. & Sclavi, B. (2007). Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**, 22-34.

Hofer, A., Ekanem, J. T. & Thelander, L. (1998). Allosteric regulation of *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase studied in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **273**, 34098-34104.

Holmquist, G. P. (2002). Cell-selfish modes of evolution and mutations directed after transcriptional bypass. *Mutat Res* **510**, 141-152.

Holmquist, G. P. & Maher, V. M. (2002). The bypass of DNA lesions by DNA and RNA polymerases. *Mutat Res* **510**, 1-7.

Itaya, M., Kondo, K. & Tanaka, T. (1989). A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic acids research* **17**, 4410.

Jordan, A., Pontis, E., Atta, M., Krook, M., Gibert, I., Barbe, J. & Reichard, P. (1994). A second class I ribonucleotide reductase in Enterobacteriaceae: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12892-12896.

Jordan, A., Pontis, E., Aslund, F., Hellman, U., Gibert, I. & Reichard, P. (1996). The ribonucleotide reductase system of *Lactococcus lactis*. Characterization of an NrdEF enzyme and a new electron transport protein. *J Biol Chem* **271**, 8779-8785.

Kilstrup, M., Hammer, K., Ruhdal Jensen, P. & Martinussen, J. (2005). Nucleotide metabolism and its control in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 555-590.

Kivisaar, M. (2003). Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environ Microbiol* **5**, 814-827.

Kriel, A., Brinsmade, S. R., Tse, J. L., Tehranchi, A. K., Bittner, A. N., Sonenshein, A. L. & Wang, J. D. (2014). GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *Journal of bacteriology* **196**, 189-201.

Larsson, K. M., Jordan, A., Eliasson, R., Reichard, P., Logan, D. T. & Nordlund, P. (2004). Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1142-1149.

Lazarevic, V., Soldo, B., Dusterhoff, A., Hilbert, H., Mauel, C. & Karamata, D. (1998). Introns and intein coding sequence in the ribonucleotide reductase genes of *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SPbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1692-1697.

Levdikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L. & Wilkinson, A. J. (2006). The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **281**, 11366-11373.

Lopez-Olmos, K., Hernandez, M. P., Contreras-Garduno, J. A., Robleto, E. A., Setlow, P., Yasbin, R. E. & Pedraza-Reyes, M. (2012). Roles of endonuclease V, uracil-DNA glycosylase, and mismatch repair in *Bacillus subtilis* DNA base-deamination-induced mutagenesis. *Journal of bacteriology* **194**, 243-252.

Lu, A. G., Feng, H., Wang, P. X., Han, D. P., Chen, X. H. & Zheng, M. H. (2012). Emerging roles of the ribonucleotide reductase M2 in colorectal cancer and ultraviolet-induced DNA damage repair. *World J Gastroenterol* **18**, 4704-4713.

Martin, H. A., Pedraza-Reyes, M., Yasbin, R. E. & Robleto, E. A. (2011). Transcriptional de-repression and Mfd are mutagenic in stressed *Bacillus subtilis* cells. *J Mol Microbiol Biotechnol* **21**, 45-58.

Martin, J. E. & Imlay, J. A. (2011). The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* **80**, 319-334.

McKenzie, G. J., Lee, P. L., Lombardo, M. J., Hastings, P. J. & Rosenberg, S. M. (2001). SOS mutator DNA polymerase IV functions in adaptive mutation and not adaptive amplification. *Mol Cell* **7**, 571-579.

McKenzie, G. J. & Rosenberg, S. M. (2001). Adaptive mutations, mutator DNA polymerases and

genetic change strategies of pathogens. *Curr Opin Microbiol* **4**, 586-594.

McKethan, B. L. & Spiro, S. (2013). Cooperative and allosterically controlled nucleotide binding regulates the DNA binding activity of NrdR. *Mol Microbiol* **90**, 278-289.

Mertz, T. M., Sharma, S., Chabes, A. & Shcherbakova, P. V. (2015). Colon cancer-associated mutator DNA polymerase delta variant causes expansion of dNTP pools increasing its own infidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2467-2476.

Miller, J. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY*.

Mohamed, S. F., Gvozdiak, O. R., Stallmann, D., Griepenburg, U., Follmann, H. & Auling, G. (1998). Ribonucleotide reductase in *Bacillus subtilis*--evidence for a Mn-dependent enzyme. *Biofactors* **7**, 337-344.

Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y. & Sonenshein, A. L. (2003). Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of bacteriology* **185**, 1911-1922.

Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Alamo, M. J., Holmgren, A. & Pueyo, C. (2001). Expression analysis of the *nrdHIEF* operon from *Escherichia coli*. Conditions that trigger the transcript level in vivo. *J Biol Chem* **276**, 18031-18037.

Mulliez, E., Fontecave, M., Gaillard, J. & Reichard, P. (1993). An iron-sulfur center and a free radical in the active anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**, 2296-2299.

Naveen, V. & Hsiao, C. D. (2016). NrdR Transcription Regulation: Global Proteome Analysis and Its Role in *Escherichia coli* Viability and Virulence. *PLoS One* **11**, e0157165.

Nordlund, P. & Reichard, P. (2006). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **75**, 681-706.

Olliver, A., Saggioro, C., Herrick, J. & Sclavi, B. (2010). DnaA-ATP acts as a molecular switch to control levels of ribonucleotide reductase expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **76**, 1555-1571.

Panosa, A., Roca, I. & Gibert, I. (2010). Ribonucleotide reductases of *Salmonella typhimurium*: transcriptional regulation and differential role in pathogenesis. *PLoS One* **5**, e11328.

Parker, M. J., Zhu, X. & Stubbe, J. (2014). *Bacillus subtilis* class Ib ribonucleotide reductase: high activity and dynamic subunit interactions. *Biochemistry* **53**, 766-776.

Pedraza-Reyes, M. & Yasbin, R. E. (2004). Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **186**, 6485-6491.

Pomerantz, R. T., Kurth, I., Goodman, M. F. & O'Donnell, M. E. (2013). Preferential D-loop extension by a translesion DNA polymerase underlies error-prone recombination. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 748-755.

Ponder, R. G., Fonville, N. C. & Rosenberg, S. M. (2005). A switch from high-fidelity to error-prone DNA double-strand break repair underlies stress-induced mutation. *Mol Cell* **19**, 791-804.

Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Ross, C. A., Martin, H., Ona, K., Yasbin, R. E. & Robleto, E. (2010). Transcription-associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *Journal of bacteriology* **192**, 3321-3328.

Ribas de Pouplana, L., Santos, M. A., Zhu, J. H., Farabaugh, P. J. & Javid, B. (2014). Protein mistranslation: friend or foe? *Trends in biochemical sciences* **39**, 355-362.

Robleto, E. A., Yasbin, R., Ross, C. & Pedraza-Reyes, M. (2007). Stationary phase mutagenesis in *B. subtilis*: a paradigm to study genetic diversity programs in cells under stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**, 327-339.

Roca, I., Ballana, E., Panosa, A., Torrents, E. & Gibert, I. (2008). Fumarate and nitrate reduction (FNR) dependent activation of the *Escherichia coli* anaerobic ribonucleotide reductase *nrdDG* promoter. *Int Microbiol* **11**, 49-56.

Rodionov, D. A. & Gelfand, M. S. (2005). Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends Genet* **21**, 385-389.

Rosche, W. A. & Foster, P. L. (1999). The role of transient hypermutators in adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6862-6867.

Ross, C., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H. M., Yasbin, R. E. & Robleto, E. (2006). Novel role of Mfd: effects on stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **188**, 7512-7520.

Rudner, R., Murray, A. & Huda, N. (1999). Is there a link between mutation rates and the stringent response in *Bacillus subtilis*? *Ann N Y Acad Sci* **870**, 418-422.

Sambrook, J. R., David W. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saumaa, S., Tarassova, K., Tark, M., Tover, A., Tegova, R. & Kivisaar, M. (2006). Involvement of DNA mismatch repair in stationary-phase mutagenesis during prolonged starvation of *Pseudomonas putida*. *DNA Repair (Amst)* **5**, 505-514.

Scotti, C., Valbuzzi, A., Perego, M., Galizzi, A. & Albertini, A. M. (1996). The *Bacillus subtilis* genes for ribonucleotide reductase are similar to the genes for the second class I NrdE/NrdF enzymes of Enterobacteriaceae. *Microbiology* **142** (Pt 11), 2995-3004.

Schimpff-Weiland, G., Follmann, H. & Auling, G. (1981). A new manganese-activated ribonucleotide reductase found in gram-positive bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **102**, 1276-1282.

Schwartz, M. H., Waldbauer, J. R., Zhang, L. & Pan, T. (2016). Global tRNA misacylation induced by anaerobiosis and antibiotic exposure broadly increases stress resistance in *Escherichia coli*. *Nucleic acids research* **44**, 10292-10303.

Shivers, R. P. & Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol Microbiol* **53**, 599-611.

Suarez-Castro, V. P.-R., Mario (2016). Tesis de Licenciatura. *Universidad de Guanajuato*.

Sun, L. & Fuchs, J. A. (1992). *Escherichia coli* ribonucleotide reductase expression is cell cycle regulated. *Mol Biol Cell* **3**, 1095-1105.

Sung, H. M. & Yasbin, R. E. (2002). Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **184**, 5641-5653.

Sung, H. M., Yeaman, G., Ross, C. A. & Yasbin, R. E. (2003). Roles of YqjH and YqjW, homologs of the *Escherichia coli* UmuC/DinB or Y superfamily of DNA polymerases, in stationary-phase mutagenesis and UV-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* **185**, 2153-2160.

Tegova, R., Tover, A., Tarassova, K., Tark, M. & Kivisaar, M. (2004). Involvement of error-prone DNA polymerase IV in stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology* **186**, 2735-2744.

Tompkins, J. D., Nelson, J. L., Hazel, J. C., Leugers, S. L., Stumpf, J. D. & Foster, P. L. (2003). Error-prone polymerase, DNA polymerase IV, is responsible for transient hypermutation during adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **185**, 3469-3472.

Torkelson, J., Harris, R. S., Lombardo, M. J., Nagendran, J., Thulin, C. & Rosenberg, S. M. (1997). Genome-wide hypermutation in a subpopulation of stationary-phase cells underlies recombination-dependent adaptive mutation. *EMBO J* **16**, 3303-3311.

Torrents, E., Grinberg, I., Gorovitz-Harris, B., Lundstrom, H., Borovok, I., Aharonowitz, Y., Sjoberg, B. M. & Cohen, G. (2007). NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *Journal of bacteriology* **189**, 5012-5021.

Torrents, E. (2014). Ribonucleotide reductases: essential enzymes for bacterial life. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 52.

Vagner, V., Dervyn, E. & Ehrlich, S. D. (1998). A vector for systematic gene inactivation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **144** (Pt 11), 3097-3104.

Vidales, L. E., Cardenas, 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*. *Journal of bacteriology* **191**, 506-513.

Villapakkam, A. C., Handke, L. D., Belitsky, B. R., Levdkov, V. M., Wilkinson, A. J. & Sonenshein, A. L. (2009). Genetic and biochemical analysis of the interaction of *Bacillus subtilis* CodY with branched-chain amino acids. *Journal of bacteriology* **191**, 6865-6876.

Villegas-Negrete, N. & Pedraza-Reyes, M. (2016). Tesis de Doctorado. *Universidad de Guanajuato*

Williams, L. N., Marjavaara, L., Knowels, G. M., Schultz, E. M., Fox, E. J., Chabes, A. & Herr, A. J. (2015). dNTP pool levels modulate mutator phenotypes of error-prone DNA polymerase epsilon variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E2457-2466.

Wright, B. E. & Minnick, M. F. (1997). Reversion rates in a leuB auxotroph of *Escherichia coli* K-12 correlate with ppGpp levels during exponential growth. *Microbiology* **143** (Pt 3), 847-854.

Yang, F., Curran, S. C., Li, L. S., Avarbock, D., Graf, J. D., Chua, M. M., Lu, G., Salem, J. & Rubin, H. (1997). Characterization of two genes encoding the *Mycobacterium tuberculosis* ribonucleotide reductase small subunit. *Journal of bacteriology* **179**, 6408-6415.

Zhang, C., Liu, G. & Huang, M. (2014). Ribonucleotide reductase metallocofactor: assembly,

maintenance and inhibition. *Front Biol (Beijing)* **9**, 104-113.

IX. ANEXOS
