

# CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y PAPEL FISIOLÓGICO DEL GEN *ytkD* DE *Bacillus subtilis*.

Francisco Xavier Castellanos Juárez y Mario Pedraza-Reyes  
Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química, Universidad de Guanajuato,  
Apdo. Postal 187, Guanajuato, Gto. CP. 36000, México. Fax (473) 2-00-06 ext. 8153  
Correo electrónico: pedrama@quijote.ugto.mx

Palabras Clave: Estrés oxidativo, MutT

**Introducción.** Se ha propuesto que el estrés oxidativo generado por la luz ultravioleta de tipo A ataca directamente las posas de los precursores que se requieren para la síntesis de ADN y de ARN generando los análogos mutagénicos 8oxo-dGTP y 8oxo-GTP. MutT hidroliza estos análogos evitando así su incorporación durante la síntesis de ADN y ARN, respectivamente. La proteína que cumple la función de eliminar las bases oxidadas de las posas de nucleótidos en *B. subtilis* todavía no ha sido descrita. En nuestro laboratorio se clonó el gen *ytkD* de *Bacillus subtilis* cuyo producto posee un dominio altamente conservado en las proteínas MutT de diversos orígenes. El análisis de la expresión de una fusión *ytkD-lacZ* integrada en el locus *ytkD* de *B. subtilis* reveló que la transcripción de este gen ocurre durante la fase vegetativa y en etapas tempranas de la esporulación (1).

El propósito del presente trabajo es demostrar que el gen *ytkD* de *B. subtilis* es un homólogo funcional del gen *mutT* de *Escherichia coli* y, además, analizar el papel que éste juega durante la esporulación o germinación de las esporas de *B. subtilis*.

**Metodología.** Para establecer la función bioquímica del producto del gen *ytkD*, se montó la metodología para sintetizar en *E. coli* una proteína recombinante His<sub>6</sub>-YtkD, para poder purificarla por cromatografía de afinidad metálica. Actualmente estamos sintetizando el análogo 8oxo-dGTP para corroborar la capacidad de la proteína His<sub>6</sub>-YtkD para catalizar su hidrólisis. Con el fin de investigar el papel fisiológico de *ytkD* se empleó una cepa de *E. coli* que carece del gen *mutT*, a la cual le fue introducido el gen *ytkD* mediante el empleo de un vector de expresión fuerte, con el objeto de observar si era capaz de complementar dicha mutación. Por otro lado diseñamos una construcción que nos permitió interrumpir el gen *ytkD* mediante una integración por doble recombinación homóloga en el genoma de *B. subtilis*.

**Resultados y Discusión.** Para demostrar la función bioquímica de YtkD, el gen que la codifica se expresó en *E. coli* para purificar una proteína conteniendo una etiqueta de 6 histidinas en su extremo amino terminal. La proteína His<sub>6</sub>-YtkD se purificó en un solo paso por cromatografía de afinidad metálica. La enzima se está utilizando para demostrar su capacidad específica para degradar a los análogos 8-Oxo-dGTP y 8-Oxo-GTP. En un enfoque genético, se encontró que el gen *ytkD* de *B. subtilis* es capaz de complementar el fenotipo *mutT* de una cepa altamente mutagénica de *E. coli*. Este resultado sugiere que YtkD cumple la función bioquímica de MutT en *B. subtilis*. Recientemente se obtuvo una mutante nula de *B. subtilis* en el gen *ytkD* por doble recombinación homóloga. Estudios preliminares con esta mutante sugieren que la función de su producto es la de proteger a este microorganismo del estrés oxidativo que se genera durante el crecimiento aeróbico o de aquel provocado por agentes oxidantes.

**Conclusión.** Los resultados de este trabajo sugieren fuertemente que el producto del gen *ytkD* es un homólogo funcional y fisiológico de la proteína MutT.

**Agradecimientos.** Este trabajo es financiado por el CONACyT y la Universidad de Guanajuato.

## Bibliografía.

1. Ramirez-Díaz, MI; Castellanos-Juarez, FX; Urtiz-Estrada, N; Yasbin, RE and Pedraza-Reyes, M (Sometido a publicación)