

Desarrollo de cepa de *Bacillus subtilis* para la obtención de mutantes de FlgM deficientes de su capacidad de interactuar con el factor sigma SigD

✉ Beatriz González,¹ Alessandro Galizzi²

¹ Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología CIGB. División de Plantas. Laboratorio de Bioreactores. Apartado Postal 6162, CP 10600. Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: 53-7-331779; E-mail: beatriz.gonzalez@cigb.edu.cu

² Dipartimento di Genetica e Microbiologia Università degli Studi, Pavia 27100, Italia.

RESUMEN

El presente trabajo muestra el desarrollo de una metodología para la identificación de genes mutantes del factor anti-sigma FlgM imposibilitados en su interacción con el factor sigma SigD. Esta metodología se basa en el desarrollo de una cepa de *Bacillus subtilis* con el gen de la cloranfenicol acetil transferasa, *cat*, bajo el control de un promotor dependiente del factor sigma SigD integrado en su genoma. La funcionalidad de la cepa bacteriana construida, y su utilidad para identificar mutantes del gen *flgM*, se comprobó mediante una mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina de un plásmido que contiene el gen *flgM*, seguida de la transformación de la cepa con los plásmidos mutados y la selección de los mutantes en cloranfenicol.

Palabras claves: factor anti-sigma, mutagénesis, FlgM, interacción

Biotecnología Aplicada 2003;20:173-175

ABSTRACT

Development of *Bacillus subtilis* strain suitable to test FlgM mutants which are not able to interact with the sigma factor SigD. The present work shows the development of a methodology for the identification of mutant forms of the anti-sigma factor FlgM, which are not able to interact with the sigma factor SigD. This methodology is based upon the development of a *Bacillus subtilis* strain with chloramphenicol acetyl transferase (*cat*) gene under the control of σ^D dependent promoter integrated in its genome. The functionality and utility of the constructed bacterial strain to identify mutants of the *flgM* gene, was demonstrated by *in vitro* mutagenesis with hydroxylamine of a plasmid containing the *flgM* gene, followed by the strain transformation with the pool of modified plasmids and the mutants selection on plates with chloramphenicol.

Keywords: anti-sigma, factor, mutagenesis, FlgM, interaction

Introducción

En el estudio de las interacciones entre factores sigma y anti-sigma ha sido esencial la identificación de las regiones o los residuos aminoacídicos implicados en las mismas. Para ello, la obtención de mutantes de estas proteínas y el análisis de cómo las mutaciones afectan dichas interacciones, es de suma importancia. De esta forma han sido caracterizadas molecularmente las interacciones presentes en los complejos SpoIIAB- σ^F , σ^{32} -ARNP y FlgM- σ^{28} [1, 2, 3, 4, 5]. Mediante el estudio de mutantes del factor anti-sigma FlgM de *S. typhimurium*, se ha sugerido que la región comprendida entre los residuos 41 al 97 de FlgM se haya en contacto directo con la región 4 de σ^{28} [6, 7]. Recientemente han sido identificados los residuos L66, I82 y S85 como importantes para la actividad *in vivo* de FlgM [8].

En *B. subtilis* se ha descrito también la proteína FlgM como factor anti-sigma, que al igual que su homólogo en *S. typhimurium*, ejerce una función reguladora sobre la expresión de los genes flagelares tardíos [9, 10, 11]. El factor anti-sigma FlgM interactúa con el factor σ^D (SigD) *in vitro* e *in vivo* formando un complejo heterodimérico estable [12, 13].

Los resultados de los estudios de proteólisis parcial del factor anti-sigma FlgM de *B. subtilis* [12], sugieren una diferencia en cuanto a la organización estructural de esta proteína con relación a su homólogo de *S. typhimurium* [8]. En ausencia de informa-

ción estructural sobre el factor anti-sigma FlgM de *B. subtilis*, la obtención de mutantes deficientes en su capacidad de interactuar con SigD, resulta un método útil para descifrar cuáles son las regiones o residuos aminoacídicos de FlgM involucrados en su mecanismo de acción. Esto implica necesariamente contar con un sistema genético eficiente que permita la identificación de los mismos [14].

La existencia de mecanismos de recombinación homóloga eficientes en *B. subtilis* y el desarrollo de bacteriófagos transductores especializados, han permitido desarrollar sistemas genéticos útiles para el estudio de diversas funciones celulares [15, 16, 17]. En este estudio, para poder identificar los mutantes del factor anti-sigma FlgM, se ha desarrollado una metodología para construir cepas de *B. subtilis* que contienen integrado en el genoma el gen de la cloranfenicol acetil transferasa (*cat*) bajo el control del promotor P_{flgDST} dependiente de σ^D [18], y que permite evaluar la actividad del gen *flgM* de acuerdo a los niveles de resistencia a cloranfenicol.

Materiales y Métodos

Las cepas y fagos de *B. subtilis*, y los plásmidos utilizados en este trabajo se reflejan a continuación:

B. subtilis PB5223: *trp*⁺ *phe*⁺ SP β c2 Δ 2::Tn917::pSK10 Δ 6 [15].

1. Decatur AL, Losick R. Three sites of contact between the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^D and its antisigma factor SpoIIAB. *Genes Dev* 1998;10:2348-58.

2. Joo DM, Nolte A, Calendar R, Zhou YN, Jin DJ. Multiple regions on the *Escherichia coli* heat shock transcription factor σ^{32} determine core RNA polymerase binding specificity. *J Bacteriol* 1998;180:1095-102.

3. Chadsey MS, Karlinsky JE, Hughes KT. The flagellar anti-s factor FlgM actively dissociates *Salmonella typhimurium* σ^{28} RNA polymerase holoenzyme. *Genes Dev* 1998;12:3123-36.

4. Iyoda S, Kutsukake K. Molecular dissection of the flagellum-specific anti-sigma factor, FlgM, of *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1995;249:417-24.

5. Kutsukake K, Iyoda S, Ohnishi K, Iino T. Genetic and molecular analyses of the interaction between the flagellum-specific sigma and anti-sigma factors in *Salmonella typhimurium*. *EMBO J* 1994;13:4568-76.

6. Chilcott GS, Hughes KT. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol Biol Rev* 2000;64:694-708.

7. Kutsukake K. Excretion of the anti-s factor through a flagellar substructure couples flagellar gene expression with flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *Mol Gen Genet* 1994;243:605-12.

B. subtilis PB5148: *trpC2 phe-1 flgM*Δ80 [19].

B. subtilis PB5223-SP16: *trp⁺ phe⁺* SPβ3-16 (este trabajo).

B. subtilis PB5148-SP2: *trpC2 phe-1 flgM*Δ80 SPβ3-16 (este trabajo).

El fago SPβ3-16: SPβc2Δ2::Tn917:(*PfliDST-cat-lacZ*) Neo^r (este trabajo).

Los plásmidos:

pFli-224: Cm^r, *PfliDST-lacZ* [20]

pJPM122: Amp^r *cat*, *lacZ* Neo^r Ori ColE1 (pBR322) [16]

pBGB3: Amp^r Neo^r Ori ColE1 (pBR322) *PfliDST-cat-lacZ* (este trabajo)

pDBflgM: Pspac-*flgM lacI* Ble^r Neo^r, Amp^r, derivado del pDG148 [10]

La cepa de *E. coli* DH5α [21] fue usada para la multiplicación y purificación de los plásmidos empleados y fue propagada en medio LB. Las cepas de *B. subtilis* se cultivaron en Caldo Nutriente (NB) a 13 g/L (Oxoid), y las transformaciones plasmídicas se realizaron de acuerdo al método de Hoch [22]. Para la obtención de los lisados del fago SPβ, se cultivaron las cepas de *B. subtilis* en medio 2xYT [23].

Construcción de las cepas de *B. subtilis*

El fragmento de ADN de 244 pb que contiene el promotor *P_{flid}* dependiente de SigD obtenido mediante digestión *EcoRI-BamHI* a partir del plásmido pFli-224 fue insertado en los sitios *EcoRI* y *BamHI* del pBS(KS+) (Stratagene, GenBank #52327), y posteriormente este fragmento fue subclonado en el vector de fusión transcripcional pJPM122 utilizando los sitios *HindIII* y *BamHI*. El plásmido resultante, pBGB3, previamente digerido con la enzima *ScaI* fue utilizado para transformar la cepa de *B. subtilis* PB5223, seleccionando los transformantes por resistencia a neomicina a 5 μg/mL. El plásmido pJPM122 porta el gen *lacZ* y secuencias del plásmido pBR322 que permiten su integración por recombinación homóloga en el profago SPβc2D2::Tn917::pSK10Δ6 que se encuentra en la cepa lisógena de *B. subtilis* PB5223. El profago recombinante obtenido de esta forma se denominó SPβ3-16 y la cepa lisógena de *B. subtilis*, PB5223-SP16.

Para obtener los lisados del fago SPβ3-16, la cepa PB5223-SP16 fue cultivada a 37 °C en 10 mL de medio 2xYT hasta alcanzar un valor de densidad óptica (DO₅₂₅) de 0,9-1,0 y luego fue calentada a 52 °C durante 5 min. La incubación posterior a 37 °C se mantuvo hasta que la DO₅₂₅ del cultivo se redujo a valores de 0,2-0,3. El lisado de SPβ3-16 fue clarificado mediante centrifugación a 5 000 g y filtración a través de membranas de nitrocelulosa con un poro de 0,45 μm para ser posteriormente conservado a 4 °C.

La cepa PB5148-SP2 que contiene el profago SPβ3-16 fue generada mezclando células en fase exponencial con el lisado del fago en una baja proporción de infección, e incubadas durante 15 min a 37 °C con agitación suave. Posteriormente las células se vertieron sobre placas de medio NB con neomicina a 5 μg/mL [15]. Los transformantes resistentes a neomicina fueron analizados por sus niveles de resistencia a cloranfenicol y se seleccionaron aquellas colonias que crecieron a concentraciones de 10 μg/ml.

Mutagénesis de *flgM*

Para realizar la mutagénesis *in vitro* del gen *flgM*, el plásmido pDBflgM fue incubado con hidroxilamina a 0,4 M, pH 6 durante 24 h a 37 °C [24]. El plásmido fue posteriormente dializado contra tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) y precipitado con etanol absoluto. La cepa de *B. subtilis* PB5148-SP2 fue transformada con el plásmido pDBflgM mutagenizado. Los transformantes se seleccionaron en placas con neomicina a 5 μg/mL y posteriormente se analizaron los niveles de resistencia a cloranfenicol a 1, 2, 5 y 10 μg/mL.

Resultados y Discusión

Construcción de cepa de *B. subtilis* para identificar mutantes del factor anti-sigma FlgM

Para generar el plásmido pBGB3, se realizó la fusión transcripcional de los genes *cat* y *lacZ* al promotor *P_{flid}* [25]. La cepa PB5223 se transformó con el plásmido pBGB3 (Figura 1). Este plásmido no posee origen de replicación de *B. subtilis*, pues está diseñado para integrarse en el genoma de la bacteria por recombinación homóloga entre las secuencias del gen *lacZ* y del plásmido pBR322 que están presentes en el profago SPβc2Δ2::Tn917::pSK10Δ6. La cepa lisógena PB5223 posee el aparato flagelar intacto, por lo que era de esperar que las colonias transformantes desarrollaran bajos niveles de resistencia a cloranfenicol. Para probar esto, las colonias seleccionadas en neomicina a 5 μg/ml fueron cultivadas en diferentes concentraciones de cloranfenicol: 1, 2 y 5 μg/mL. El 50% de las colonias crecieron en las placas con 1 y 2 μg/mL. El resto de las colonias no crecieron. Los niveles de resistencia a cloranfenicol se correspondieron con la actividad del factor anti-sigma FlgM, y como consecuencia, los niveles de expresión a partir de los promotores dependientes de σ^D fueron más bajos que en ausencia de FlgM [10].

De una de las colonias resistentes a cloranfenicol a 1 y 2 μg/mL (cepa PB5223-SP16) se obtuvo un extracto que contiene el fago SPβ3-16 y con él se infectó la cepa PB5148, mutante de *flgM*.

Las colonias transformantes cultivadas en neomicina, se probaron en concentraciones de cloranfenicol desde 1 μg/mL hasta 10 μg/mL (Figura 2). Los resultados mostraron que la mayor parte de las colonias fueron resistentes a niveles de 5 y 10 μg/mL respectivamente (Figura 2, placas 4 y 5). Estos niveles de resistencia

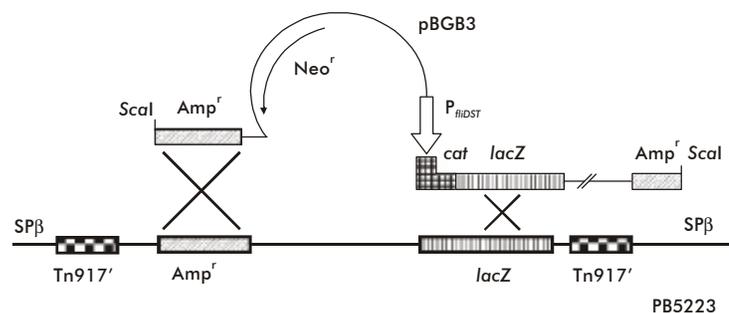


Figura 1. Esquema de la construcción del profago SPβ3-16.

8. Daughdrill GW, Chadsey MS, Karlinsky JE, Hughes KT, Dahlquist FW. The C-terminal half of the anti-sigma factor, FlgM, becomes structured when binds to its target σ^D. *Nat Struct Biol* 1997;4:285-91.

9. Mirel DB, Lauer P, Chamberlin MJ. Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a σ^D dependent operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1994;176:4492-500.

10. Caramori T, Barilla D, Nessi C, Sacchi L, Galizzi A. Role of FlgM in σ^D-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1996;178:3113-8.

11. Fredrick K, Helmann JD. FlgM is a primary regulator of σ^D activity, and its absence restores motility to a *sinR* mutant. *J Bacteriol* 1996;178:7010-3.

12. Bertero MG, Gonzalez B, Tarricone C, Cecilian F, Galizzi A. Overproduction and characterization of the *Bacillus subtilis* anti-sigma factor FlgM. *J Biol Chem* 1999;274:12103-7.

13. González B. Interacción entre el factor SigD de *Bacillus subtilis* y el factor anti-sigma FlgM fusionado a una cola de histidinas en *Escherichia coli*. *Biotecnología Aplicada* 2002;19:143-6.

14. Phizicky EM, Fields S. Protein-protein interaction: Methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 1995;59:94-123.

15. Zuber P, Losick R. Role of AbrB in Spo0A- and Spo0B-dependent utilization of a sporulation promoter in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1987;169:2223-30.

16. Slack FJ, Mueller JP, Sonenshein AL. Mutations that relieve nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *J Bacteriol* 1993;175:4605-14.

17. Chen L, Keramati L, Helmann JD. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8190-4.

18. Chen L, Helmann JD. The *Bacillus subtilis* σ^D dependent operon encoding the flagellar proteins FlhD, FlhS and FlhT. *J Bacteriol* 1994;176:3093-101.

19. Mirel DB, Lauer P, Chamberlin MJ. Identification of flagellar synthesis regulatory and structural genes in a σ^D dependent operon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1994;176:4492-500.

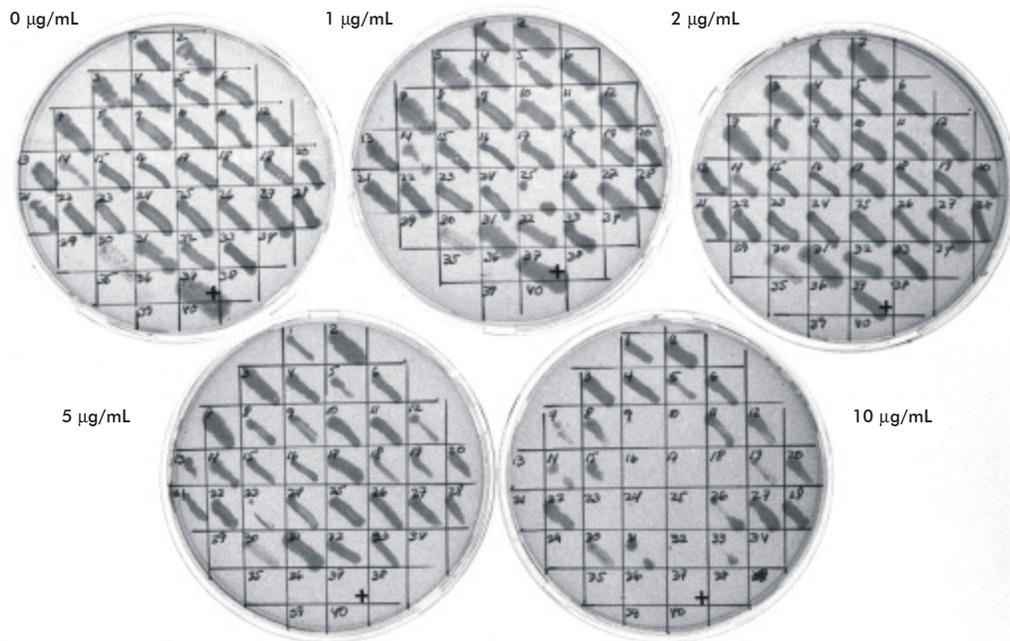


Figura 2. Evaluación de la resistencia a cloranfenicol de la cepa PB5148 infectada con el SPβ3-16 a diferentes concentraciones del antibiótico como se muestra en la figura. Como control (+) se usó la cepa PB5223-SP16.

fueron mayores que los observados en la cepa PB5223-SP16 (Figura 2, placas 2 y 3, colonia +) y respondieron a la ausencia de FlgM [10]. De las colonias analizadas se escogió la número 2 para ser utilizada en el análisis de los mutantes y se denominó: PB5148-SP2.

Mutagénesis de *flgM*

Con vistas a probar la factibilidad de usar las cepas desarrolladas para identificar mutantes de FlgM afectado en su interacción con SigD se realizó la mutagénesis *in vitro* con hidroxilamina del plásmido pDBflgM. Este plásmido contiene el gen *flgM* bajo el control del promotor *spac*, inducible por IPTG [26]. La cepa de *B. subtilis* PB5148-SP2 fue transformada con la preparación del plásmido pDBflgM sometida a la mutagénesis. Alrededor de 200 colonias resistentes a neomicina fueron seleccionadas. Estas colonias se analizaron por su habilidad de crecer en placas con cloranfenicol a 10 µg/mL en presencia de IPTG a 1 mM. Previamente se había demostrado que la cepa PB5148-SP2 transformada con el plásmido pDBflgM sin mutar crecía sólo en placas con 1 µg/mL de cloranfenicol e IPTG a 1 mM (resultado no mostrado). Estudios previos indican que los niveles de expresión del gen *lacZ* bajo el control de promotores dependientes de σ^D aumentan hasta 10 veces en ausencia del gen *flgM* [10]. En las colonias transformantes que contengan el gen *flgM* mutado de modo que inactive su capacidad de interacción con σ^D , ocurre la transcripción a partir del promotor P_{INDST} y con ello los niveles de resistencia a cloranfenicol correspondientes a la cepa PB5148-SP2 sin transformar con el plásmido pDBflgM. De las 200 colonias obtenidas, sólo 18 fueron capaces de crecer en presencia de IPTG a 1 mM y cloranfenicol a 10 µg/mL.

A partir de que los niveles de resistencia a cloranfenicol exhibidos por la cepa PB5223-SP16 en condiciones normales de expresión del gen *flgM* son de 1-2 µg/mL y teniendo en cuenta el comportamiento de la cepa PB5148-SP2 (Figura 2), se puede garantizar la factibilidad de obtener mutantes de FlgM imposibilitados de interactuar con SigD, mediante mutagénesis *in vivo* de la cepa PB5223-SP16.

La aplicación de esta metodología permitirá contar con un repertorio de genes mutados del factor anti-sigma FlgM, y su posterior análisis revelará los residuos aminoácidos de la proteína, involucrados en su interacción con el factor sigma SigD. Con la metodología descrita en este trabajo podríamos también obtener mutantes del factor sigma SigD insensibles a la interacción con FlgM y que no se afecten en su actividad. Además, permitiría buscar e identificar mutantes no sólo de FlgM sino también de otros factores que compitan con SigD por su interacción con FlgM y que sería un conocimiento muy valioso en el esclarecimiento de los mecanismos propios de regulación del factor anti-sigma FlgM.

Estos estudios complementarán de forma decisiva los resultados obtenidos hasta el momento, y ayudarán a la mejor comprensión de los mecanismos de las interacciones proteína-proteína que median la regulación de los factores sigma alternativos por los factores anti-sigma y el papel de estos como reguladores negativos de la transcripción.

Agradecimientos

Agradecemos a J.P. Mueller, Daniela Barilla y Tiziana Caramori por cedernos los plásmidos pJPM122, pDBflgM y pFli-224 respectivamente.

20. Fredrick K, Caramori T, Chen Y-F, Galizzi A, Helmann JD. Promoter architecture in the flagellar regulon of *Bacillus subtilis*: High-level expression of flagellin by the σ^D RNA polymerase requires an upstream promoter element. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2582-6.

21. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-80.

22. Hoch JA, Barat M, Anagnostopoulos C. Transformation and transduction in recombination-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1967;93: 1925-37.

23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

24. Davis RW, Botstein D, Roth R, editors. A manual for genetic engineering. Advanced Bacterial Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1980. p. 39-41.

25. Chen L, Helmann JD. The *Bacillus subtilis* σ^D dependent operon encoding the flagellar proteins FliD, FliS and FliT. *J Bacteriol* 1994;176:3093-101.

26. Yansura DG, Henner DJ. Use of *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 439-43.