



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus Guanajuato

División de Ciencias Naturales y Exactas

Departamento de Biología

“Interacción de DisA con proteínas involucradas en reparación y/o replicación de DNA y sus efectos en la germinación/eclosión de esporas de *Bacillus subtilis*”

TESIS

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias
(Biología)

Presenta:

M. en C. Luz Idalia Valenzuela García

Director de tesis

Dr. Mario Pedraza Reyes

Guanajuato, Gto. Marzo de 2018

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente me permito hacer constar que el trabajo de tesis titulado: **“Interacción de DisA con proteínas involucradas en reparación y/o replicación de DNA y sus efectos en la germinación/eclosión de esporas de *Bacillus subtilis*”** fue desarrollado en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas, en la Universidad de Guanajuato, por la M. en. C. Luz Idalia Valenzuela García a fin de obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología). El proyecto de investigación realizado bajo mi dirección es original y cuenta con la calidad y rigor científico requeridos.

ATENTAMENTE

Dr. Mario Pedraza Reyes
Director de Tesis

Guanajuato, Gto., Marzo de 2018

El presente trabajo de tesis de Doctorado se realizó en el Departamento de Biología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato bajo la dirección del Dr. Mario Pedraza Reyes con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP, 936-2016 y 1090-2016). Luz Idalia Valenzuela García agradece la beca otorgada por el CONACyT para la realización de este trabajo.

Parte de este trabajo de tesis se publicó en el artículo:

Valenzuela-García LI, Ayala-García VM, Regalado-García AG, Setlow P, Pedraza-Reyes M. (2018). Transcriptional coupling (Mfd) and DNA damage scanning (DisA) coordinate excision repair events for efficient *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *MicrobiologyOpen*. 2018;e593. <https://doi.org/10.1002/mbo3.593>

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser la fuerza que me ha guiado en cada momento de mi vida.

A mi familia: A **mis padres** Jaime y Pilla, quienes lo han dado todo para apoyarme siempre, no sólo con maravillosas palabras de aliento, sino con acciones para permitirme lograr mis metas, son mi ejemplo en la vida. A **mi esposo** Víctor, eres parte esencial de este trabajo. Gracias por tu apoyo incondicional para superar cualquier dificultad en cada momento que vivimos juntos y ser el pilar de cada logro en esa etapa, tu compañía ha sido lo mejor. A **mi hijo**, mi Victorín, eres el motor que me impulsa a levantarme y eres mi razón para intentar ser mejor cada día, tu sola existencia es mi felicidad. A **mi hermano**, Daniel, gracias por estar ahí para mí y lo que amo siempre.

Todo esto es por ustedes, los amo.

A mi asesor Dr. Mario Pedraza Reyes, gracias por ser un excelente mentor y una admirable persona. Agradezco permitirme ser parte de su grupo, sus enseñanzas y su dedicación para sacar adelante este trabajo de investigación, así como por transmitirme esa pasión que tiene por la investigación. Agradezco también a usted y su familia la amistad y apoyo que nos han brindado.

A mi comité tutorial, gracias por sus valiosos y respetuosos consejos, que contribuyeron a mejorar el trabajo de investigación.

PERM LAB. A todos los amigos y compañeros que conocí en mi paso por el PERM LAB y que hicieron muy agradable la estancia en el laboratorio: Víctor, Hilda, Fer, Chío, Norberto, Vianey, Gaby, Liz, Karlita, Vero, Martha, Nayar, Karina, Saúl, Gera, Valeria, Jimena, Chino, Adry, Ángel, Memo, Wendy, Luis, Karen, Mariana, Rubí, Pedro, Fer Santos, Susana y Norma, a quien agradezco también su apoyo técnico.

A mis suegros Don Jesús y Doña Carmen, gracias por su apoyo en importantes momentos del desarrollo de este trabajo.

A LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

A todas las personas que integran la Universidad de Guanajuato. Profesores y personal del departamento de Biología. Gracias por sus enseñanzas y por abrirme sus puertas y por el valioso trabajo que hacen para permitir que los estudiantes logremos nuestras metas.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Respuesta al daño al DNA	1
1.2 Mecanismos <i>checkpoint</i> en bacterias	2
1.3 Morfogénesis en <i>B. subtilis</i> y mecanismos <i>checkpoint</i> en su ciclo de vida	2
1.4 Regreso de las esporas a crecimiento vegetativo	5
1.5 Sistemas de protección y reparación de DNA en las esporas de <i>B. subtilis</i>	7
II. ANTECEDENTES	10
III. JUSTIFICACIÓN	12
IV. OBJETIVOS	13
4.1 Objetivo General	13
4.2 Objetivos Específicos	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Cepas y plásmidos empleados en el estudio	14
5.2 Obtención de cepas mutantes en <i>B. subtilis</i>	16
5.3 Obtención y purificación de esporas de <i>B. subtilis</i>	17
5.4 Cinéticas de germinación y eclosión de esporas	17
5.5 Análisis de microscopía de esporas durante germinación/eclosión	18
5.6 Determinación de contenido de DNA cromosómico	19
5.7 Análisis de frecuencia de mutación espontánea e inducida a rifampicina durante germinación/eclosión de esporas y células en crecimiento de <i>B. subtilis</i>	20
5.8 Identificación de mutaciones espontáneas en <i>rpoB</i> confiriendo resistencia a rifampicina en <i>B. subtilis</i>	21
5.9 Análisis estadísticos	21
VI. RESULTADOS	22
6.1 La falta de Mfd o UvrA retarda la eclosión de esporas deficientes en DisA	22
6.2 El retardo en la eclosión de las esporas $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$ es acompañado por el retardo en la replicación del cromosoma	23
6.3. El peróxido de hidrógeno exagera el defecto en eclosión de esporas $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$	27
6.4 DisA y TCR son requeridos durante la eclosión de esporas para contender con los efectos genotóxicos de 4NQO	28
6.5 DisA modula mutagénesis en esporas en eclosión en coordinación con Mfd o UvrA	30
6.6. Substituciones de bases derivadas de oxidación y desaminación de DNA promueven mutagénesis durante la eclosión de esporas	33

VII. DISCUSIÓN	37
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. PERSPECTIVAS	44
X. REFERENCIAS	45

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de <i>B. subtilis</i>	3
Figura 2. Representación esquemática de las etapas del proceso de germinación de <i>B. subtilis</i>	6
Figura 3. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> .	22
Figura 4. Análisis microscópico de la replicación del cromosoma en esporas en eclosión de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i>	25
Figura 5. Concentración de DNA en esporas en eclosión de diferentes cepas	26
Figura 6. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> tratadas con y sin H ₂ O ₂	28
Figura 7. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> tratadas con y sin 4NQO	30
Figura 8. Frecuencia de mutación espontánea de esporas en germinación-eclosión y de células en crecimiento exponencial	31
Figura 9. Frecuencia de mutación inducida con H ₂ O ₂ o 4NQO de esporas en germinación-eclosión de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i>	32
Figura 10. Frecuencia de mutación espontánea de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> en germinación-eclosión	33
Figura 11. Mutaciones en la subunidad β de la RNAP detectadas en diferentes cepas de <i>B. subtilis</i>	35
Figura 12. Posibles vías de reparación y mutagénesis para DisA, Mfd y UvrA durante la germinación-eclosión	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio	15
Tabla 2. Porcentaje de esporas eclosionadas de las diferentes cepas de <i>B. subtilis</i> con un cromosoma replicado y segregado a los 90 min después del inicio de la germinación.	26
Tabla 3. Espectro de mutaciones a Rif ^R generadas durante eclosión y subsecuente división celular de esporas de diferentes cepas de <i>B. subtilis</i>	35

ABREVIATURAS

2xSG	Medio de germinación
4NQO	4-nitroquinolona
°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
Amp	Ampicilina
BER	Sistema de reparación por escisión de bases
C	Citosina
Cm	Cloranfenicol
DO	Densidad óptica
DSM	Medio inductor de la esporulación
Em	Eritromicina
G	Guanina
g	Aceleración de la gravedad
h	Horas
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodalton
Kn	Kanamicina
L	Litro

LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Neo	Neomicina
P	Plásmido
P	Probabilidad
pb	Pares de bases
Rif	Rifampicina
s	Segundos
SASP	Proteínas ácido-solubles de unión al ADN
Sitio AP	Sitio abásico
T	Timina
T	Tiempo
Tet	Tetraciclina
UV	Ultravioleta
WT	Cepa silvestre

RESUMEN

En respuesta a daño al DNA, las células activan mecanismos para detener la progresión del ciclo celular, permitiendo la eliminación de daño y el mantenimiento de la integridad de su genoma. Hemos descrito que DisA, una proteína tipo “checkpoint”, inspecciona el material genético de las esporas de *B. subtilis* en busca de lesiones oxidativas provocadas por la entrada de agua y activación del metabolismo aeróbico durante germinación/eclosión. Las lesiones genéticas provocadas por el estrés oxidativo son procesadas por el sistema BER (reparación por escisión de bases), incluyendo las AP endonucleasas Nfo y ExoA. La carencia de estas enzimas retarda la eclosión y la segregación del cromosoma, y ambos procesos son suprimidos por interrupción de *disA*. Para conocer posibles interacciones de DisA con proteínas de reparación o recombinación, se llevaron a cabo análisis epistáticos entre *disA* y distintos genes de reparación de DNA durante el proceso de germinación/eclosión. Usando este enfoque encontramos que en comparación con mutantes sencillas en cada gen, esporas con las mutaciones $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$ retardaron su retorno al crecimiento vegetativo, sugiriendo que las lesiones que son procesadas por el sistema NER (reparación por escisión de nucleótidos), dependientes e independientes de Mfd, son procesadas en coordinación con DisA. La adición de peróxido de hidrógeno exacerbó el defecto en la eclosión de esporas de las mutantes $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$, así como en la mutante simple Δmfd , lo cual apoya el concepto de que las lesiones oxidativas generadas durante la germinación son procesadas por el sistema NER de manera independiente y dependiente de TCR (reparación acoplada a la transcripción). Para conocer si distintas lesiones afectan los comportamientos observados se empleó 4NQO, un agente promotor de lesiones que distorsionan la doble hélice y que son sustrato para NER y TCR. Se encontró que las mutantes $\Delta uvrA$, $\Delta disA uvrA$, Δmfd y $\Delta disA mfd$ son afectadas

severamente por este agente durante eclosión en comparación con la mutante $\Delta disA$ y la cepa parental silvestre. Análisis de frecuencia de mutación espontánea a rifampicina mostraron incrementos en mutagénesis en la doble mutante $\Delta disA uvrA$ en comparación con la mutante sencilla $\Delta uvrA$, en contraste, la mutante sencilla Δmfd mostró una alta mutagénesis la cuál disminuyo luego de la interrupción genética de *disA*. La frecuencia de mutación inducida por H_2O_2 o 4NQO mostró los mismos comportamientos, pero con niveles de mutagénesis exacerbados. Interesantemente, la cepa WT en presencia de H_2O_2 y 4NQO presentó una tasa de mutación más elevada que la cepa carente de *disA*, estos resultados sugieren que *disA* promueve errores en la reparación cuando existen lesiones que impiden el progreso normal de la eclosión. También se observó que en ausencia de Mfd, DisA promueve mutagénesis dependiente de las DNA polimerasas de baja fidelidad YqjH y YqjW. El espectro de mutaciones observado en colonias resistentes a rifampicina fue asociado con desaminación de bases en esporas de la cepa WT y con bases oxidadas en las esporas $\Delta disA$ y Δmfd . En conclusión, los resultados de este trabajo sugieren que las lesiones oxidativas en el DNA generadas espontáneamente y que son substrato del sistema BER activan la función de DisA, la cual coordina eventos de reparación dependientes de NER y TCR, permitiendo un retorno eficiente de las esporas de *B. subtilis* al crecimiento vegetativo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Respuesta al daño al DNA

El DNA es la macromolécula que guarda la información necesaria para la formación de otro ser vivo, por lo que las células deben copiar y mantener su genoma para asegurar la exitosa transmisión de su material genético a la siguiente generación (Lenhart y col., 2012). Constantemente, el DNA de todos los organismos está expuesto a factores metabólicos, físicos y químicos que pueden alterar su estructura, por lo que las células han desarrollado ingeniosos mecanismos para tolerar y reparar el daño. Si estos mecanismos fallan pueden conducir a enfermedades hereditarias en humanos como Xeroderma pigmentosum (XP), cáncer de colon no-poliposo (HNPCC) y algunas formas de cáncer de mama, entre otras enfermedades (Friedberg y col., 2006). En bacterias, el daño al DNA y la acumulación de mutaciones pueden afectar la viabilidad celular; sin embargo, la mutagénesis es considerada también como el “motor molecular” que dirige la evolución (Walker, 1981).

Distintos mecanismos de reparación de DNA han sido identificados en los seres vivos, incluyendo, la reversión directa (DR), reparación por escisión de nucleótidos (NER), reparación por escisión de bases (BER), reparación de bases mal apareadas (MMR), reparación acoplada a la transcripción (TCR), reparación por recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ) (Friedberg y col., 2006). Adicional a estos mecanismos de reparación, las células poseen proteínas *checkpoint* de daño al DNA, las cuales en eucariotes pueden detener la progresión del ciclo celular y disparar la transcripción de genes de respuesta a estrés, e incluso conducir a apoptosis (Kastan y Barket, 2004).

1.2 Mecanismos *checkpoint* en bacterias

Los mecanismos de *checkpoint* en respuesta a daño al DNA han sido estudiados también en bacterias; por ejemplo, en *Caulobacter crescentus*, una bacteria que produce dos células hijas distintas; una que dispone de flagelo y otra que puede fijarse a una superficie mediante un tallo. Las lesiones genéticas que activan la respuesta SOS en esta bacteria resultan en la inhibición de CtrA, un factor de transcripción que promueve la expresión de proteínas involucradas en división celular. Además, induce la sobreproducción de SidA, una proteína que inhibe la división celular por la unión a FtsW (Domian y col., 1997; Modell y col., 2011). En *Escherichia coli* la detención del ciclo celular es mediada por la expresión de SulA (*sfi* o *sulA*), inducida por la respuesta SOS, previniendo la división celular a través de la inhibición de la polimerización de FtsZ (Mukherjee y col., 1998). Una vez que la respuesta SOS es inactivada, la síntesis de SulA disminuye debido a que está sujeta a una rápida degradación por la proteasa Lon, permitiendo con ello el progreso de la división celular, y el avance del ciclo celular (Mukherjee y col., 1998).

1.3 Morfogénesis en *B. subtilis* y mecanismos *checkpoint* en su ciclo de vida

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva, habitante normal del suelo capaz de llevar a cabo un complejo proceso de desarrollo que culmina en la formación de una célula diferenciada llamada espora. Las esporas pueden sobrevivir a tratamientos que rápida y eficientemente matan a las células vegetativas incluyendo altas temperaturas (aún mayores de 100°C), radiación ionizante, solventes químicos, detergentes y enzimas hidrolíticas (Nicholson y col., 2000).

El proceso de desarrollo de la espora es disparado por condiciones de limitación de nutrientes y alta densidad celular. La formación de la espora puede dividirse en 7 etapas

(Fig.1) (Errington, 2003). En las primeras etapas (I y II) ocurre una división celular asimétrica hacia dos compartimentos de distinto tamaño, la célula madre (compartimento grande) y la preespora (compartimento pequeño), cada uno con su propio cromosoma y su patrón de expresión de genes (Nicholson y col., 2000; Setlow, 2006). Posteriormente, la pre-espora es envuelta y engullida por la célula madre, la cual agrega una serie de cubiertas a la espora en desarrollo en las siguientes etapas (III a VI), las cuales permitirán a la espora la adquisición de las características de resistencia a diferentes factores ambientales. Finalmente, en la etapa VII la espora madura es liberada por lisis de la célula madre (Losick y col., 1986).

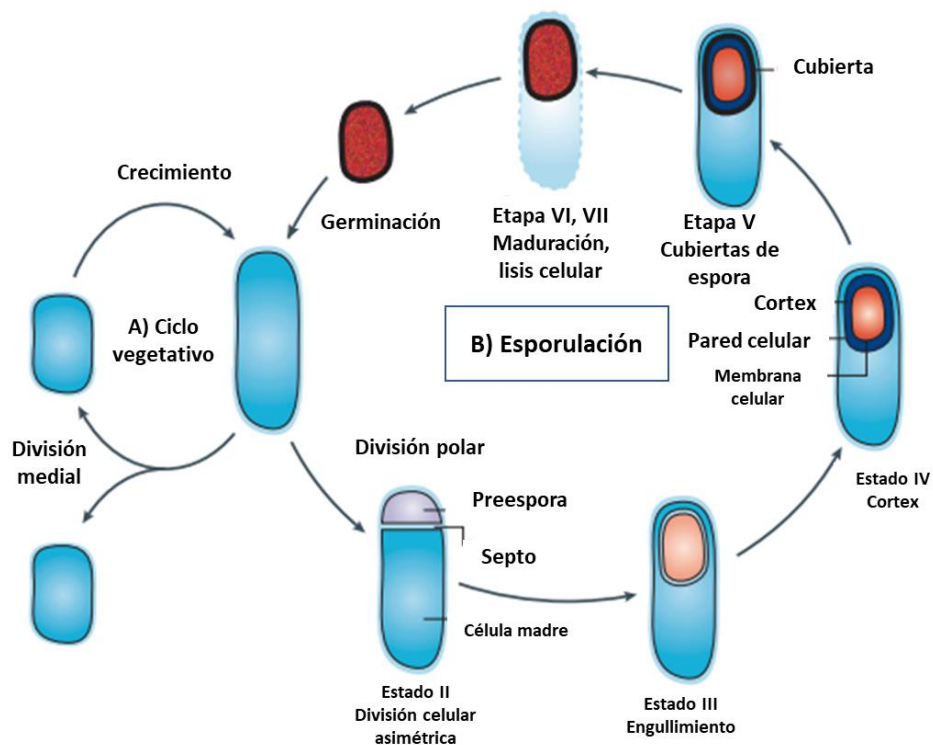


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de vida de *B. subtilis* A) Ciclo de vida vegetativa. B) Ciclo de esporulación (Errington, 2003)

En *B. subtilis* existen proteínas con función de *checkpoint* que regulan la división celular en respuesta a daño en el DNA o estrés en la horquilla de replicación en crecimiento vegetativo y esporulación (Lenhart y col., 2012). Durante el crecimiento vegetativo, la proteína YneA inhibe la división celular; un evento dependiente de la activación de la respuesta SOS, mediante un mecanismo aún por definir (Kawai y col., 2003). Otro evento de *checkpoint* descrito en esta bacteria involucra a DnaA, una proteína que al detectar perturbaciones en la horquilla de replicación se une a regiones regulatorias del operón *yllB-yxA-ftsL-pbpB*, desregulando su transcripción y previniendo nuevas rondas de división celular (Goranov y col., 2005).

La entrada a esporulación es un proceso delicadamente regulado que puede ser modulado por daño al DNA y condiciones que interfieren con la replicación cromosómica. La proteína Sda evita la esporulación cuando la replicación está activa inhibiendo la fosforilación de Spo0A (Burkholder y col., 2001) mediante la unión de Sda al dominio de autocinasa de KinA, previniendo su autofosforilación y subsecuente activación (Rowland y col., 2004). La síntesis de Sda incrementa también en respuesta a daño al DNA o por el estancamiento de las horquillas de replicación (Ruvolo y col., 2006). Adicionalmente, la proteína SirA es activada después de la entrada a esporulación para prevenir nuevas rondas de replicación del DNA. SirA secuestra a la proteína DnaA evitando con ello su unión al origen de replicación OriC (Ran Lee y col., 2009; Wagner y col., 2009). La expresión de SirA es activada a través de la fosforilación de Spo0A, permitiendo la entrada a la esporulación, pero evitando un incremento en el número de copias cromosómicas, lo cual reduciría la viabilidad de la espora (Veening y col., 2009).

Además de Sda, otra proteína que evita la entrada a esporulación cuando existe daño o estrés en la replicación del cromosoma es DisA (DNA integrity scanning protein A). Esta proteína con función de *checkpoint* es capaz de unirse de manera inespecífica al DNA. Se ha descrito que una quimera DisA-GFP es capaz de formar un foco dinámico e inspeccionar el cromosoma bacteriano. Cuando DisA encuentra daño en el DNA, se detiene en el sitio de la lesión e induce una respuesta celular que retarda la activación de Spo0A, deteniendo la esporulación antes de la división asimétrica (Bejerano-Sagie y col., 2006). La estructura de DisA consiste en un dominio globular N-terminal con actividad de diadenilato-ciclasa (DAC) y un dominio C-terminal tipo RuvA (HhH) de unión al DNA, separado por un dominio central helical (Witte y col., 2008). DisA convierte un par de moléculas de ATP a 3,5-diadenosina monofosfato cíclico (C-di-AMP). Esta actividad de diadenilato ciclasa es reducida por la unión de DisA a estructuras de DNA ramificado incluyendo las del tipo 5' y 3' flap o uniones de 3 o 4 cadenas, como los intermediarios de reparación tipo Holliday (Witte y col., 2008). Además, se demostró que la adición de agentes de daño durante la esporulación disminuye los niveles de C-di-AMP, sugiriendo que DisA genera algún tipo de señal cuando la integridad del genoma está comprometida a través de la disminución en la producción del segundo mensajero (Oppenheimer-Shaanan y col., 2011). Recientemente se demostró que durante el regreso de las esporas a crecimiento vegetativo DisA también opera como un *checkpoint* que responde a daño oxidativo en el DNA (Campos y col., 2014).

1.4 Regreso de las esporas al crecimiento vegetativo

Las esporas dormantes pueden monitorear su ambiente y cuando las condiciones son favorables para el crecimiento, son capaces de regresar al crecimiento vegetativo a través de un programa de desarrollo que puede ser dividido en dos etapas, i) germinación, y, ii)

eclosión (Fig.2) (Setlow, 2003). La primera etapa inicia cuando germinantes específicos, los cuales incluyen: aminoácidos, azúcares y nucleósidos de purina, son percibidos por receptores en la membrana interna de la espora. En *B. subtilis* el receptor GerA induce germinación en respuesta a L-alanina, mientras que los receptores GerB y GerK colaboran para disparar la germinación en respuesta a una mezcla de asparagina, glucosa, fructosa e iones de potasio (AGFK) (Setlow, 2003). Segundos después de sensor estos inductores, la espora activa la germinación, que consta de los siguientes eventos: en la fase I ocurre la liberación de H^+ , Zn^+ , ácido dipicolínico (DPA) y Ca^{2+} , reemplazando este último con agua, lo que permite la hidratación parcial del “core” de la espora y pérdida de resistencia a calor. En la fase II de la germinación ocurre la hidrólisis del peptidoglicano del córtex lo que conduce a una mayor captación de agua, permitiendo con ello la movilidad y actividad de proteínas necesarias para el proceso de eclosión, el cual eventualmente convierte las esporas germinadas en células en crecimiento (Setlow, 2003).

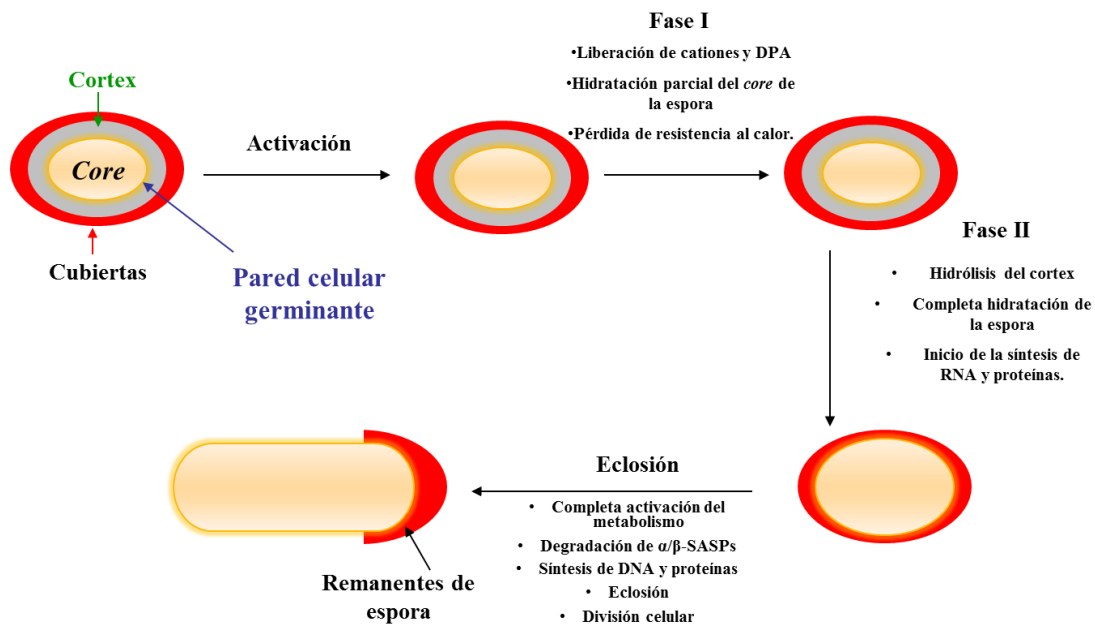


Figura 2. Representación esquemática de las etapas del proceso de germinación de *B. subtilis* (Modificado de Setlow, 2003).

La degradación de las proteínas α/β SASP durante la eclosión de las esporas libera el DNA para la transcripción, probablemente también para reparación y eventualmente replicación (Setlow, 2007). Los aminoácidos libres producidos de la proteólisis de las proteínas SASP suministran gran parte de la energía del metabolismo temprano en la eclosión de las esporas (Setlow, 2003). Debido a que la ribonucleótido reductasa se encuentra presente en esporas eclosionantes, es muy posible que en esta etapa ocurra la síntesis de deoxiribonucleótidos trifosfato requeridos para la síntesis de DNA (Setlow, 2003).

Aunque a la fecha no se ha demostrado de manera fehaciente cuales factores sigma dirigen la expresión de genes durante la eclosión, existen evidencias que apuntan a la participación mayoritaria del factor de transcripción vegetativo σ^A ; aunque también se ha planteado la participación del factor σ^M de función extracitoplasmática, el cual parece jugar un papel en la osmotolerancia de las esporas (Horsburgh y col., 2001).

1.5 Sistemas de protección y reparación de DNA en las esporas de *B. subtilis*

Las esporas bacterianas son metabólicamente inactivas, por lo que el daño ambiental a componentes celulares de la spora se acumula para ser reparado durante la germinación y eclosión (Nicholson y col., 2000). En su estado latente las esporas de *B. subtilis* son altamente resistentes a distintos tipos de estrés ambiental, tal como sustancias químicas tóxicas, desecación, presión, temperaturas extremas y luz UV (Setlow, 2006). La resistencia se basa en la propia estructura de la spora que está constituida por gruesas capas de proteínas entrecruzadas (Fajardo-Cavazos y Nicholson, 1995), el córtex de la spora, el ácido dipicolínico, las proteínas ácido-solubles (α/β SASP) y protectores del DNA de la spora (Setlow y Setlow, 1996). La unión de las proteínas α/β SASP y la deshidratación de la spora parecen cambiar la conformación del DNA de la forma B a la forma A (Nicholson y

col.,1990), lo cual cambia la fotoquímica a luz UV para favorecer la formación de 5-timinyl-5-6-dihidrotimina o fotoproducto de espora (SP), el cual es removido por la enzima SP liasa y el sistema NER durante la germinación (Nicholson y col., 1991; Pedraza-Reyes y col., 1994).

Agentes químicos genotóxicos y agentes oxidantes tienen efectos mutagénicos en células en crecimiento, pero no en esporas, esto ocurre gracias a la protección que le proveen las cubiertas (Setlow, 2006). La mayoría de los agentes oxidantes mata a las esporas dañando las capas externas, así como la membrana interna de la espora (Cortezzo y col., 2004; Setlow, 2006). Las proteínas α/β SASP también protegen al DNA de daño por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pero no de agentes alquilantes (Setlow y col., 1998). Aun cuando las AP endonucleasas Nfo y ExoA no contribuyen a proteger a esporas de H_2O_2 , (Salas-Pacheco y col., 2005) estas enzimas junto con RecA y NER juegan un importante papel en eliminar daño al DNA inducido por H_2O_2 durante germinación/eclosión (Ibarra y col., 2008).

Adicionalmente, las proteínas α/β SASP, la recombinación no homóloga (NHEJ) y las proteínas Nfo y ExoA parecen ser factores importantes en la prevención y reparación de daño inducido por radiación ionizante, la cual genera roturas de doble cadena (Weller y col., 2002; Moeller y col., 2011). ExoA, Nfo y YkoUV así como la respuesta SOS mediada por RecA, están implicados también en reparar lesiones ocasionadas por calor seco incluyendo roturas de cadena y sitios AP (Salas-Pacheco y col., 2005; Wang y col., 2006; Moeller y col., 2007; Setlow y Setlow, 1995). Por otra parte, se ha demostrado que la catalasa KatX es esencial para combatir al H_2O_2 durante la germinación (Setlow, 1988; Bagyan y col., 1996). *B. subtilis* también cuenta con una actividad de superóxido dismutasa (SodA), la cual se encuentra presente tanto en células vegetativas como en esporas, esta actividad enzimática

protege a las células del estrés oxidativo durante el crecimiento vegetativo y durante el proceso de esporulación (Inaoka y col., 1999).

Además de las proteínas SplB, UvrA, RecA, Nfo, ExoA, KatX, SodA, y YkoUV, recientemente se demostró que las proteínas de reparación YwjD, Mfd y Aag se empaquetan en la pre-espora, lo cual sugiere su participación en germinación (Ramírez-Guadiana y col., 2012; Ramírez-Guadiana y col., 2013; Ayala-García y col., 2016).

Mediante un análisis global de la expresión temporal de genes durante la eclosión, se detectaron genes de reparación de DNA, entre los que se encuentran *nth*, *ung*, *yqjW* y *ypcP* (Keijser y col., 2007). Las proteínas de reparación del DNA empacadas en la espora y la expresión *de novo* de las enzimas de reparación durante la eclosión, podrían ser sumamente importantes durante el regreso a crecimiento vegetativo, no solo para reparar el daño acumulado durante la latencia sino también para reparar el daño generado durante la germinación y eclosión de la espora.

II. ANTECEDENTES

Durante la germinación/eclosión, la activación del metabolismo aerobio y la entrada de agua promueven la producción de radicales de oxígeno capaces de atacar el DNA de las esporas (Campos y col., 2014). Las lesiones oxidativas, incluyendo sitios AP, roturas de cadena sencilla y bases oxidadas como la 8-oxoG son procesadas principalmente por el sistema BER. En *B. subtilis* las AP endonucleasas Nfo y ExoA juegan un papel de gran relevancia en eliminar estas lesiones en la etapa de germinación/eclosión (Ibarra y col., 2008). Se reportó que la ausencia de estas enzimas genera un marcado retardo en el proceso de germinación/eclosión y un incremento en la mutagénesis inducida por H₂O₂ en comparación con la cepa parental silvestre. Derivado de estas observaciones, se propuso que la acción coordinada de Nfo y ExoA con el sistema NER y la proteína RecA contrarrestan los efectos del estrés oxidativo en las esporas eclosionantes (Ibarra y col., 2008).

La interrupción del gen *disA* en el fondo genético carente de *nfo* y *exoA* alivió el fenotipo de retardo en la eclosión observado en la doble mutante $\Delta nfo\ exoA$, lo cual sugirió su función como *checkpoint* de daño al DNA en esta etapa diferenciativa. Mediante el análisis de la expresión espacio-temporal de fusiones génicas *disA-gfp* y *disA-lacZ* se demostró que DisA no se empaqueta en el compartimento de la pre-espora de *B. subtilis*, sino que esta se sintetiza durante el regreso a crecimiento vegetativo, colocalizando con el cromosoma de las esporas eclosionantes. La eclosión retardada de esporas $\Delta nfo\ exoA$ es acompañada por un retraso en duplicación y segregación del cromosoma, proceso que también es revertido por la interrupción de *disA*. Interesantemente, en el DNA de esporas silvestres dormantes se detectó una gran cantidad de 8-oxoG, las cuales fueron eliminadas durante la eclosión. En esporas de la cepa $\Delta nfo\ exoA$ se detectó una mayor cantidad de 8-oxoG, así como de sitios

AP los cuales disminuyeron durante la eclosión, sugiriendo la participación de otra enzima de reparación capaz de procesar estas lesiones. Sin embargo, la triple mutante $\Delta nfo\ exoA\ disA$ retuvo mayor proporción de sitios AP y guaninas oxidadas durante la eclosión, sugiriendo que DisA retarda el inicio del crecimiento vegetativo en las esporas carentes de $\Delta nfo\ exoA$ hasta que su genoma se encuentra libre de lesiones (Campos y col., 2014). Estos hallazgos sugieren una interacción de DisA con las AP endonucleasas Nfo y ExoA. La actividad de Nfo y ExoA también coordina la reparación de lesiones oxidativas con el sistema NER y la proteína RecA (Ibarra y col., 2008), por lo que es posible que DisA tenga una relación adicional con estas y otras proteínas de reparación durante germinación/eclosión.

Adicionalmente, durante esporulación, la reparación acoplada a la transcripción es sumamente importante para completar el proceso de diferenciación de célula vegetativa a espora (Ramírez-Guadiana y col., 2013). El gen *mfd*, que codifica para una proteína que media la reparación acoplada a la transcripción, es expresada junto con *uvrA* en ambos compartimentos del esporangio. La expresión de *mfd* en la preespora sugiere que la actividad de TCR durante la germinación/eclosión de las esporas podría ser importante en procesar daño al DNA acumulado en la dormancia de éstas durante su regreso a crecimiento vegetativo (Ramírez-Guadiana y col., 2013).

La reparación del DNA durante la eclosión es fundamental para que las células eclosionantes de *B. subtilis* puedan realizar la primera ronda de replicación de su genoma y proceder con el crecimiento vegetativo. Se conoce que este proceso es regulado por DisA en conjunto con las AP-endonucleasas Nfo y ExoA pero a la fecha se desconoce si la actividad de otras proteínas de reparación que se expresan en esta etapa del ciclo de vida de *B. subtilis* es coordinado por DisA.

III. JUSTIFICACIÓN

Se reportó que la proteína DisA inspecciona el DNA en busca de lesiones promovidas por estrés oxidativo durante el regreso de esporas de *B. subtilis* a crecimiento vegetativo. El daño al DNA y/o proteínas de reparación puede representar una barrera que interrumpe el movimiento de DisA. Si DisA se estanca dispara una respuesta celular que culmina en un bloqueo temporal de la replicación, haciendo más lenta la germinación/eclosión y la división celular, hasta que las lesiones son removidas del genoma. El mecanismo por el cual DisA detiene la replicación y recluta proteínas de reparación es actualmente desconocido. Los aspectos genéticos y bioquímicos que gobiernan este proceso celular serán investigados en este proyecto.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Elucidar vías de reparación y/o replicación que convergen en el mecanismo *checkpoint* dependiente de DisA durante la germinación/eclosión de esporas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Investigar si la germinación/eclosión exitosa de las esporas de *B. subtilis* es dependiente de la acción coordinada de las funciones de DisA, Mfd y el sistema NER.
2. Investigar el papel de DisA, Mfd y UvrA en la mutagénesis espontánea e inducida por agentes genotóxicos durante la germinación/eclosión de las esporas de *B. subtilis*.
3. Determinar el tipo de lesiones genéticas que activan la función de DisA, Mfd y el sistema NER durante la germinación/eclosión de las esporas de *B. subtilis*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas y plásmidos empleados en el estudio

Las cepas y los plásmidos usados en este estudio se enlistan en la Tabla 1. Los procedimientos para la transformación y aislamiento de DNA plasmídico se realizaron como se describió previamente (Boylan y col., 1972; Sambrook y col., 1989). El medio rutinario para el crecimiento de las cepas de *E. coli* y *B. subtilis* fue LB líquido (Miller, 1972), el cual contiene: NaCl, 5 g/L; peptona biotriptasa, 10g/L; extracto de levadura, 5 g/L. Este medio fue suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico cuando se requirieron placas con medio sólido. Cuando fue necesario, se agregaron al medio de crecimiento para *B. subtilis* tetraciclina (Tet) 15 µg/mL, cloranfenicol (Cm) 5 µg/mL, eritromicina (Em) 5 µg/mL, kanamicina (Kn) 10 µg/mL y/o neomicina (Neo) 10 µg/mL y para *E. coli* se usó cloranfenicol (Cm) 25 µg/mL, kanamicina (Kn) 50 µg/mL y/o ampicilina (Amp) 100 µg/mL. Para la obtención de esporas de *B. subtilis* se utilizó medio DSM el cual contiene: Bacto® caldo nutritivo (Difco; City, ST), 8 g/L; KCl, 13.41 mM; MgSO₄·7H₂O, 1 mM; CaCl₂·H₂O, 0.5 mM; MnCl₂·4H₂O, 0.01 mM; FeSO₄, 0.001 mM (Schaeffer y col., 1965), suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico cuando se requirió de forma sólida. El medio para la germinación fue 2xSG el cual contiene: Bacto® caldo nutritivo 16g/L; KCl 26.8 mM; MgSO₄·7H₂O 2mM; CaNO₃, 1 mM; MnCl₂·4H₂O₂, 0.01 mM; FeSO₄, 0.001 mM y Glucosa 5.4 mM (Nicholson y Setlow, 1990). Los cultivos líquidos se incubaron a 37°C con agitación vigorosa a 250 rpm.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa	Genotipo o descripción	Referencia o fuente
<i>B. subtilis</i>		
PS832	Tipo silvestre (WT), revertante Trp+ de la cepa 168	Stock de laboratorio
PERM733	$\Delta disA::lacZ$ Em ^r	Campos y col., 2014
PERM939	$\Delta mfd::tc \Delta yqjH::em$ Tc ^r Em ^r	Ramírez-Guadiana y col., 2013
PERM940	$\Delta mfd::tc \Delta yqjW::em$ Tc ^r Em ^r	Ramírez Guadiana y col., 2013
PERM1333	$\Delta mfd::tc \Delta disA::em$ Tc ^r Em ^r	Este estudio (PERM938 → PERM733)
PERM1342	$\Delta uvrA::cm \Delta disA::em$ Cm ^r Em ^r	Este estudio (PERM985 → PERM733)
PERM1460	$\Delta mfd::tc$ Tc ^r	Este estudio (PERM938 → PS832)
PERM1461	$\Delta uvrA::cm$ Cm ^r	Este estudio (PERM985 → PS832)
PERM1504	$\Delta disA::cm$ Cm ^r	Este estudio (pPERM 1372 → PS832)
PERM1510	$\Delta mfd::tc \Delta yqjH::em \Delta disA::cm$ Tc ^r Em ^r Cm ^r	Este estudio (PERM 939 → PERM 1504)
PERM1511	$\Delta mfd::tc \Delta yqjW::em \Delta disA::cm$ Tc ^r Em ^r Cm ^r	Este estudio (PERM 940 → PERM 1504)
<i>E. coli</i>		
DH5α	F- 80dlacZ M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)</i> <i>phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen ®

PERM1372	<i>E. coli</i> DH5 α contentiendo la construcción pPERM1372	Este estudio
Plásmidos		
pMutin4-cat	Vector integrativo para <i>B. subtilis</i> . Crea una fusión del fragmento clonado con el gen <i>lacZ</i> . Cm ^r	Barajas-Ornelas y col., 2014.
pPERM1372	pMUTIN4-cat con un fragmento interno de 308 pb del gen <i>disA</i> . Cm ^r	Este estudio

*A→B, indica que la cepa “B” se transformó con DNA de la Fuente “A”.

5.2 Obtención de cepas mutantes de *B. subtilis*

Las mutantes en distintos genes de reparación de DNA usadas para los análisis epistáticos (Tabla 1) se obtuvieron de la siguiente manera. El DNA genómico de las cepas PERM938 (Δmfd) y PERM985 ($\Delta uvrA$) fue utilizado para transformar células competentes de la cepa PERM733 ($\Delta disA$), PERM1333 ($\Delta disA mfd$) y PERM1342 ($\Delta disA uvrA$). Las mutantes PERM1460 y PERM1461 se generaron mediante la transformación de la cepa PS832 con DNA genómico de las cepas PERM938 y PERM985, respectivamente. El plásmido pPERM1372 (pMutin4-cat-*disA*) fue obtenido mediante digestión de la construcción pPERM732 (Campos y col., 2014) con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Este evento liberó un fragmento interno (de la posición +274 a +582 relativo al inicio del ORF del gen) el cuál se clonó en el vector pMutin4-cat (Barajas-Ornelas y col., 2014); la construcción resultante (pPERM1372) se replicó *E. coli* DH5 α . Este plásmido se empleó para transformar a la cepa PS832 obteniendo la mutante $\Delta disA$ (PERM1504) con resistencia a cloranfenicol. Posteriormente, el DNA genómico de las cepas $\Delta mfd yqjH$ (PERM939) y

$\Delta mfd yqjW$ (PERM940) se utilizó para transformar células competentes de la cepa PERM1504, obteniendo las mutantes $\Delta disA mfd yqjH$ (PERM1510) y $\Delta disA mfd yqjW$ (PERM1511). Todas las cepas mutantes fueron corroboradas molecularmente por PCR utilizando oligonucleótidos específicos.

5.3 Obtención y purificación de esporas de *B. subtilis*

Las esporas de todas las cepas empleadas fueron obtenidas en placas de medio NSM agar (Medio nutritivo para esporulación; Schaeffer, 1965) sin antibióticos; las esporas se recolectaron, lavaron con agua fría y guardaron a 4°C como lo describieron previamente Nicholson y Setlow (1990). Se corroboró que todas las preparaciones de esporas utilizadas en este trabajo carecieran de células vegetativas, esporas germinantes o fragmentos celulares, mediante microscopía de contraste de fases. Las esporas fueron generalmente usadas a una densidad óptica a 600nm (OD_{600}) de 0.5 correspondiendo a 0.75×10^8 esporas viables/ml

5.4 Cinéticas de germinación y eclosión de esporas.

Las cinéticas de germinación/eclosión de esporas se llevaron a cabo de la siguiente manera. Esporas purificadas suspendidas en agua fueron activadas por choque térmico incubando 30 min a 70°C y enfriando en hielo. Posteriormente, las esporas fueron inoculadas en 25 mL de medio 2×SG, suplementado con 10 mM de L-alanina, ajustando a una densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) de ~0.5 e incubando a 37°C en agitación a 250 rpm. Donde se indicó 0.5 mM de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) o 2µM de 4-Nitroquinolona-1-Oxido (4NQO) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) fueron agregados a los

cultivos cuando la mayor parte de la germinación de la espora había tomado lugar, es decir ~15 min después de mezclar las esporas con germinantes. La densidad DO_{600nm} de los cultivos fue monitoreada en un espectrofotómetro Pharmacia Ultrospec 2000 (Pharmacia, Manassas Park, VA) y los valores fueron graficados como una fracción de la DO_{600nm} inicial (DO_{600nm} al tiempo t/ DO inicial) contra el tiempo.

5.5 Análisis de microscopía de esporas durante germinación/eclosión

La morfología celular y el cromosoma de las esporas durante la etapa de germinación/eclosión, fueron analizados por microscopia de fluorescencia, de acuerdo con el siguiente protocolo. Se colectaron muestras de 1 mL a diferentes tiempos de la cinética de germinación eclosión, se centrifugaron a $11,500 \times g / 2$ min y se mezclaron con 0.2 mL de solución fijadora (3% paraformaldehído; v/v y 5 % glutaraldehído en buffer salino HEPES [(273 mM NaCl; 9.9 mM KCl; 1.27 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 11.1 mM dextrosa; 42mM HEPES (pH=7)]. Después de 30 min a temperatura ambiente, se continuó la fijación en hielo por 50 min. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS, centrifugadas y posteriormente resuspendidas en 100 μ L de GTE, [5mM glucosa, 25mM de Tris-HCl, 10mM EDTA (pH =8)]. Para realizar la tinción de DNA, alícuotas de 10 μ L de la suspensión celular fueron mezcladas con 10 μ L de una solución de 2 μ g/mL de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI; Invitrogen, Eugene, OR) manteniéndose a temperatura ambiente por 15 min. Para tinción de membranas, las células fueron suspendidas en 100 μ L de una solución de 10 μ g/mL del fluorocromo FM4-64(Invitrogen[®]) y mantenidas a temperatura ambiente por 15min. El análisis microscópico se realizó utilizando alícuotas de 5 μ L de las muestras fijadas inmovilizadas sobre agarosa (20 mg/mL) colocada sobre un portaobjetos y sellada con un cubreobjetos previo a la

observación al microscopio. La microscopia de fluorescencia se realizó con un microscopio ZEISS AxioScope A1 equipado con una cámara AxioCam ICc1. Las imágenes adquiridas se ajustaron solo para brillo y contraste con el software AxioVision V4.8.2. Los tiempos de exposición fueron típicamente de 0.2s para DAPI y de 0.5s para FM4-64. La excitación/emisión fueron 350-470 nm para DAPI y 506-750 para FM4-64.

5.6 Determinación de contenido de DNA cromosómico

Para cuantificar el DNA genómico de esporas germinadas y eclosionadas, el DNA cromosómico fue aislado como se describe a continuación. Alícuotas de 3 ml de esporas viables (1.5×10^8 esporas/ml) de las cepas WT, $\Delta disA mfd$ y $\Delta disA uvrA$ que habían germinado y eclosionado por 30, 60, 90 y 120 min en medio 2×SG con alanina fueron colectadas por centrifugación ($13,500 \times g/2$ min). La pastilla celular fue lavada dos veces con 1 mL de buffer de lisis (EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5), suspendida en 0.3 mL del mismo buffer y subsecuentemente procesada para aislar el DNA cromosómico libre de RNA de la fracción que fue directamente susceptible a degradación por lisozima, como se describió previamente (Campos y col., 2014). Después del tratamiento con RNAsa, el DNA cromosómico aislado de ambas fracciones fue cuantificado por espectrofotometría UV (Sambrook y col., 1989). Los valores de DNA de ambas fracciones fueron combinados para obtener el contenido de DNA total.

5.7 Análisis de frecuencia de mutación espontánea e inducida a rifampicina durante germinación/eclosión de esporas y células en crecimiento de *B. subtilis*

La determinación de la frecuencia de mutación de resistencia a rifampicina (Rif^R) espontánea e inducida por H₂O₂ o 4NQO fue llevada a cabo como sigue. Esporas de las distintas cepas, fueron ajustadas a una DO_{600nm} final de 0.5 en medio 2×SG, suplementado con 10 mM de L-alanina y tratadas (inducida) o no (espontánea) con agentes de daño al DNA, H₂O₂ (0.5 mM) o 4NQO (2μM), las cuales fueron agregados a los cultivos 15 min después del inicio de la germinación. Muestras celulares de 10 ml, colectadas 180 min después de iniciada la germinación, fueron lavadas con 10 ml de buffer fosfato salino (PBS; 0.7% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.4% NaCl [pH 7.5]) y resuspendidas en 1 ml del mismo buffer. Alícuotas de 100 μl de células fueron sembradas en 6 placas de LB conteniendo 10 μg/ml de rifampicina, y las colonias Rif^R fueron contadas 2 días después de incubación a 37°C. El número de células usadas para calcular la frecuencia de mutación Rif^R fue determinada por plaquar alícuotas de las diluciones apropiadas en placas de LB sin rifampicina e incubar las placas 24h a 37°C.

Para la determinación de la frecuencia de mutación espontánea en células en crecimiento, 250 μL de un cultivo de toda la noche de cada cepa fueron transferidos a matraces conteniendo 25 mL de medio LB. Los cultivos se crecieron a 37°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.5; 180 min después de este punto, se colectaron 10 ml de muestras celulares y se procesaron para determinar la frecuencia de mutación espontánea de colonias resistentes a rifampicina como se describió líneas arriba. Estos experimentos se realizaron por triplicado para las cepas WT, $\Delta disA$, Δmfd , $\Delta uvrA$, $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$.

5.8 Identificación de mutaciones espontáneas en *rpoB* confiriendo resistencia a rifampicina en *B. subtilis*

Colonias Rif^R generadas espontáneamente de esporas en eclosión de las cepas de interés fueron aleatoriamente elegidas, resuspendidas en 100 µl de agua libre de nucleasas y sujetas a lisis celular por calentar la suspensión celular a 95°C por 5 min (Nicholson y Maughan, 2002). Los lisados celulares fueron empleados para amplificar por PCR un fragmento de 716-pb del gen *rpoB* con Vent DNA polimerasa (New England Bio-Labs, Ipswich, MA) y los oligonucleótidos RpoBFW 5'-CGTCCTGTTATTGCGTCC-3' y RpoBRV 5'GGCTTCTACGCGTTCAACG-3'. El producto de 716 pb de *rpoB* amplificado incluye los tres *clusters hot-spots* (nt +1353 a +2069 relativo al ORF del gen *rpoB*) donde las mutaciones confieren resistencia a rifampicina en muchas bacterias incluyendo *B. subtilis* (Campbell y col., 2001). Los productos *rpoB* amplificados fueron secuenciados para identificar las mutaciones confiriendo resistencia a rifampicina. La secuenciación fue llevada a cabo en ambas direcciones del producto de PCR de 20 colonias para cada una de las cepas WT, $\Delta disA$, Δmfd , y $\Delta disA mfd$. La secuenciación realizada por Functional Biosciences, Inc. (Madison, WI) y la Unidad de Servicios Genómicos en Langebio, Cinvestav, México.

5.9 Análisis estadísticos

Para calcular las diferencias estadísticas en la tasa de mutagénesis para las cepas no tratadas y tratadas con los agentes de daño H₂O₂ y 4NQO se utilizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney con un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). Todas las pruebas se realizaron utilizando una licencia del software Minitab 17.

VI. RESULTADOS

6.1. La falta de Mfd o UvrA retarda la eclosión de esporas deficientes en DisA

El daño oxidativo es un reto enfrentado por las esporas durante su regreso al crecimiento vegetativo, ya que lesiones promovidas por ROS, incluyendo bases oxidadas, sitios AP y roturas de cadena sencilla pueden ser impedimentos para la maquinaria de replicación y transcripción durante la eclosión de esporas (Campos y col., 2014; Ibarra y col., 2008). Durante esporulación, las proteínas de reparación Mfd y UvrA son expresadas y almacenadas en la pre-espora en desarrollo (Ramírez-Guadiana y col., 2013); en contraste, *disA* no es empaquetado en el compartimento de la pre-espora, pero es sintetizado durante los primeros minutos de eclosión (Campos y col., 2014).

Nuestros resultados muestran que esporas carentes de Mfd, UvrA o DisA exhibieron curvas de germinación/eclosión que fueron similares de las de esporas WT, sugiriendo que estas proteínas tienen funciones redundantes en este estado de desarrollo (Fig. 3). En apoyo de una función redundante para estas proteínas, la pérdida de Mfd o UvrA en una cepa carente de DisA generó esporas que retardaron significativamente su regreso a crecimiento vegetativo, en comparación con esporas de las mutantes sencillas y la cepa WT (Fig.3).

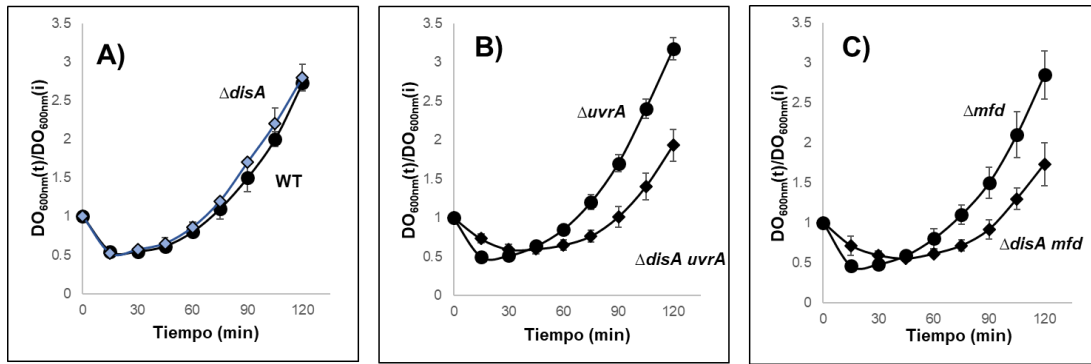


Figura 3. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de *B. subtilis*. Esporas dormantes de las cepas A) WT (●) y $\Delta disA$ (◆) y B) $\Delta uvrA$ (●) y $\Delta disA uvrA$ (◆) C) Δmfd (●) y $\Delta disA mfd$ fueron sometidas a choque térmico y germinadas. La germinación se monitoreo midiendo la DO_{600nm} de los cultivos. Los valores son promedios \pm desviaciones estándar de determinaciones por triplicado con diferentes lotes de esporas.

6.2. El retardo en la eclosión de las esporas $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$ es acompañado por el retardo en la replicación del cromosoma

El defecto en la eclosión exhibido por esporas con genotipo $\Delta disA mfd$ y $\Delta disA uvrA$ fue adicionalmente examinado por microscopia de epifluorescencia. Para este fin, esporas de estas cepas así como de la cepa WT y las mutantes sencillas $\Delta disA$, Δmfd o $\Delta uvrA$ fueron inducidas a germinar en un medio que permite la eclosión y el crecimiento celular, y las muestras fueron colectadas en diferentes etapas de la germinación/eclosión. El DNA y las membranas se tiñeron con DAPI y FM4-64, respectivamente (Figura 4). Para la cepa WT (Fig. 4B), los tiempos analizados de 30 a 90 min bajo las condiciones de germinación empleadas en este trabajo correspondieron al estado fisiológico previamente descrito como eclosión, en el cual la espora germinada se convierte en una célula creciendo, generalmente después de la primera división celular (Setlow, 2003). Las siguientes características definen los puntos de tiempo elegidos para el análisis microscópico de las esporas WT (representados en la Fig. 4A y B): (1) 30 min- las esporas hinchadas han experimentado hidrólisis del

peptidoglicano del córtex como se evidenció por la habilidad del DAPI para penetrar hacia el “core” de la espora y teñir el DNA; a este tiempo, el interior de la espora está completamente hidratado, las proteínas del “core” han recuperado movilidad y son activas (Setlow, 2003); (2) 60-75 min- el metabolismo, la síntesis de DNA y de otras macromoléculas está en progreso, y como se revela por microscopía, los cromosomas replicados han comenzado segregación; (3) 90 min- la segregación de los cromosomas se ha completado y otra ronda de replicación está en progreso; y (4) 120 min- las esporas se han convertido en células creciendo y dividiéndose activamente. Como se muestra en la figura 4C-E, esporas con mutaciones sencillas progresaron hacia la eclosión y segregación de cromosoma, replicación y división celular en los mismos tiempos que la cepa WT. En contraste, esporas carentes de DisA/UvrA o DisA/Mfd exhibieron un retardo de alrededor de 30 min en iniciar la eclosión y completar la replicación del cromosoma en comparación a las esporas WT (Figs. 4F-G). Un detallado análisis de al menos 200 esporas individuales germinadas/eclosionadas reveló que 85-90% de las esporas WT y aquellas de las cepas $\Delta disA$, $\Delta uvrA$ y Δmfd exhibieron un cromosoma replicado y segregado a los 90 min después de inducida la germinación. En contraste sólo 60% de las esporas $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$ exhibieron cromosomas replicados y completamente segregados en ese mismo tiempo (Tabla 2). En resumen, la evidencia microscópica junto con los resultados presentados en la Fig. 3, sugieren fuertemente que DisA junto con Mfd (TCR) o con UvrA (NER) juegan un papel crucial en reparar lesiones espontáneas de DNA que interfieren con replicación y por lo tanto con eclosión.

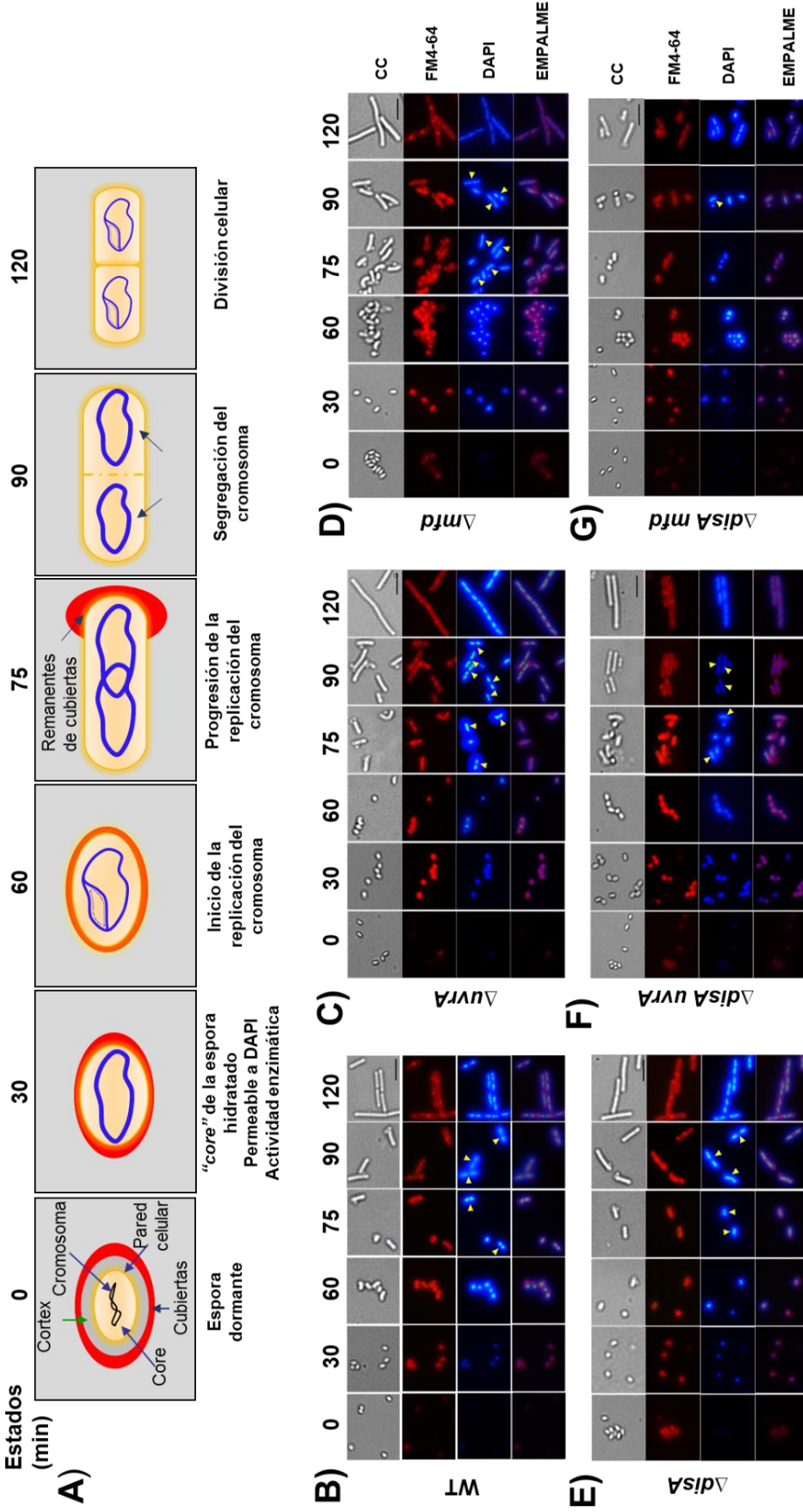


Figura 4. Análisis microscópico de la replicación del cromosoma en esporas en eclosión de diferentes cepas de *B. subtilis*. A) Representación esquemática de los estados germinación/eclosión por análisis microscópico. B-G) Esporas dormantes WT, $\Delta uvrA$, $\Delta disA uvrA$, Δmfd y $\Delta disA mfd$ fueron activadas por choque térmico e inducidas a germinar en medio 2xSG con 10 mM L-alanina. A distintos tiempos (0,30, 60,75, 90 y 120 min) de la cinética de germinación/eclosión se tomaron muestras de los cultivos, se fijaron y tiñeron con DAPI (DNA) y FM4-64 (membranas) antes de ser fotografiadas. El sobrelape de las imágenes de DAPI y FM4-64 en cada tiempo es mostrado como EMPALME. Barra de escala= 5 μ m. Aumento= 100x. Flechas amarillas muestran células que han replicado (en 75 min) y segregado su cromosoma (en 90 min). Para cada cepa >200 células fueron analizadas en al menos seis diferentes campos.

Tabla 2. Porcentaje de esporas eclosionadas de las diferentes cepas de *B. subtilis* con un cromosoma replicado y segregado a los 90 min después del inicio de la germinación.

Wild-type (90)	Δ <i>disA</i> (90)	Δ <i>uvrA</i> (85)	Δ <i>mfd</i> (85)	Δ <i>disA uvrA</i> (60)	Δ <i>disA mfd</i> (18)
--------------------------	------------------------------	------------------------------	-----------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

Esporas de las cepas WT, Δ *disA*, Δ *uvrA*, Δ *mfd*, Δ *disA uvrA*, Δ *disA mfd* fueron germinadas y eclosionadas en medio 2×SG a 37°C. 90 min después del inicio de la germinación, al menos 200 esporas de cada cepa que fueron teñidas con DAPI fueron analizadas por microscopia de fluorescencia en al menos seis campos distintos para determinar el número de células mostrando replicación y segregación de su cromosoma.

Para reforzar esta conclusión, se indujo la germinación de 1.5×10^8 esporas dormantes de las cepas WT, Δ *disA uvrA* y Δ *disA mfd* y se determinó, para cada cepa, el contenido de DNA de la misma cantidad de células, a los 30, 60, 90 y 120 min, después de iniciada la germinación. Los resultados mostraron que el contenido de DNA en 90 y 120 min después de mezclar las esporas con el germinante fue significativamente más bajo en esporas en eclosión de las cepas *disA/uvrA* y *disA/mfd* que en esporas eclosionantes WT (Fig.5).

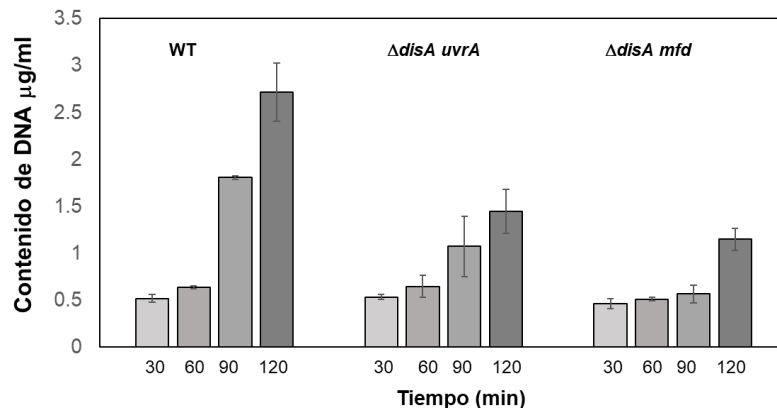


Figura 5. Concentración de DNA en esporas en eclosión de diferentes cepas. Niveles de DNA en muestras de cultivos de esporas las cepas WT, Δ *disA uvrA* y Δ *disA mfd* colectadas en diferentes tiempos después del inicio de la germinación fueron determinados como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados son los promedios de determinaciones independientes por duplicado, con distintos lotes de esporas \pm desviación estándar.

6.3. El peróxido de hidrógeno exagera el defecto en eclosión de esporas $\Delta disA uvrA$ y $\Delta disA mfd$

Posteriormente investigamos si el estrés oxidativo está involucrado en el defecto exhibido por esporas deficientes para DisA, Mfd o UvrA. Para este fin, esporas de la cepa WT y aquellas que contenían mutaciones sencillas en *disA*, *mfd* o *uvrA* o dobles mutaciones $\Delta disA/mfd$ o $\Delta disA/uvrA$ fueron tratadas con 0.5 mM de H₂O₂ 15 min después del inicio de la germinación, y el efecto del agente oxidante fue monitoreado mediante OD_{600nm} de cada cultivo. Como se muestra en la Fig. 6, la eclosión de las esporas carentes de DisA fue ligeramente retardada por el tratamiento con H₂O₂, aun cuando este efecto no fue diferente al observado en esporas eclosionantes de la cepa WT. Sin embargo, en comparación con esporas WT, la eclosión de esporas Δmfd fue más afectada por la adición de H₂O₂ y este efecto fue exacerbado en esporas Δmfd que carecen también de DisA (Fig 6E-F). El retardo inducido por H₂O₂ en esporas eclosionantes fue también evidente en esporas deficientes de UvrA (Figura 6C), aun cuando este efecto fue sólo ligeramente incrementado en esporas de la cepa $\Delta disA uvrA$ (Figura 6D). Tomados en conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que lesiones de DNA inducidas por ROS están involucradas en el defecto en eclosión exhibido por esporas mutantes $\Delta disA mfd$ y $\Delta disA uvrA$.

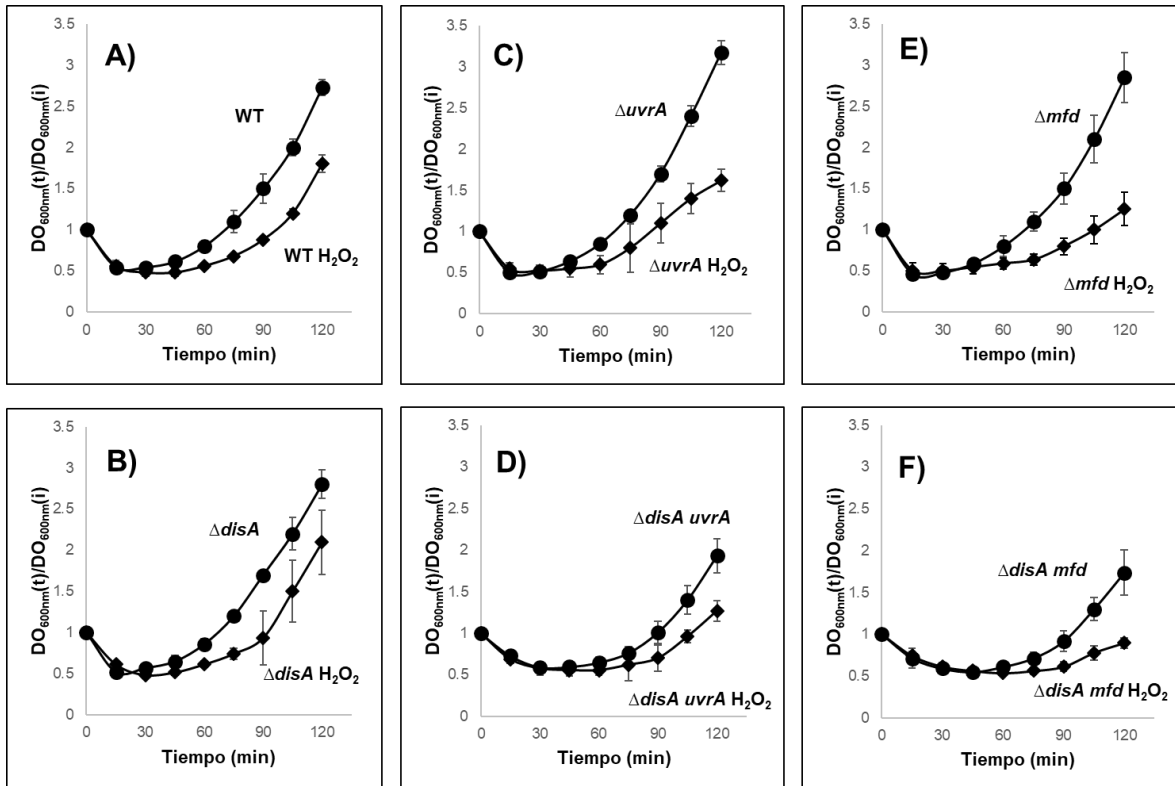


Figura 6. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de *B. subtilis* tratadas con y sin H_2O_2 . Esporas dormantes de A) WT B) $\Delta disA$ C) $\Delta uvrA$ D) $\Delta disA uvrA$ E) Δmfd y F) $\Delta disA mfd$ fueron sometidas a choque térmico germinadas en la ausencia (●) o presencia (◆) de H_2O_2 . Donde se indica, se agregó a los cultivos 0.5 mM de H_2O_2 15 min después del inicio de la germinación. La germinación y eclosión de las esporas se monitoreo midiendo la DO_{600nm} de los cultivos. Los valores son promedios \pm desviaciones estándar de determinaciones por triplicado con diferentes lotes de esporas.

6.4. DisA y TCR son requeridos durante la eclosión de esporas para contender con los efectos genotóxicos de 4NQO

Como se mostró anteriormente, la interrupción de UvrA o Mfd que juegan funciones prominentes en las vías de reparación general por NER y de TCR (Truglio y col., 2006), afectaron la progresión normal a crecimiento vegetativo en la ausencia de la proteína *checkpoint* de daño al DNA, DisA. En células esporulantes, las vías NER y TCR están involucradas en eliminar lesiones de DNA que interfieren con replicación y transcripción (Ramírez-Guadiana y col., 2013, 2016). Para evaluar mejor el papel de NER y TCR en el

regreso de las esporas a crecimiento vegetativo, 15 min después de inducida la germinación, esporas de las cepas WT y mutantes fueron retadas con 4NQO, un agente genotóxico que ataca el DNA generando aductos C8 y N2-guanina y N6- adenina (Galiégue-Zoutinia y col., 1985; Tada y Tada 1976). Estas lesiones en el DNA tienen el potencial de bloquear replicación y transcripción en bacterias (Jaroz y col., 2006) y en células de ave (Edmunds y col., 2008). En *B. subtilis*, los aductos producidos por 4NQO son principalmente eliminados del DNA por NER y mediante reparación por recombinación homóloga (Alonso y col., 1988; Friedman y Yasbin, 1983). Nuestros resultados revelaron que esporas de la cepa WT y deficientes en DisA fueron sólo marginalmente afectadas por 2 μ M de 4NQO (Fig. 7A, B). En marcado contraste, el agente, hizo más lento el regreso a crecimiento vegetativo de esporas deficientes en UvrA o Mfd (Figura 7C, E). Un efecto similar fue causado por 4NQO en esporas de las cepas Δ disA *uvrA* y Δ disA *mfd* (Figura 7D, F). Juntos, estos resultados apoyan la idea que las vías de reparación NER dependientes e independientes de TCR son activas durante eclosión para contrarrestar con lesiones que podrían comprometer eventos como la síntesis de DNA y expresión de genes en este periodo de desarrollo.

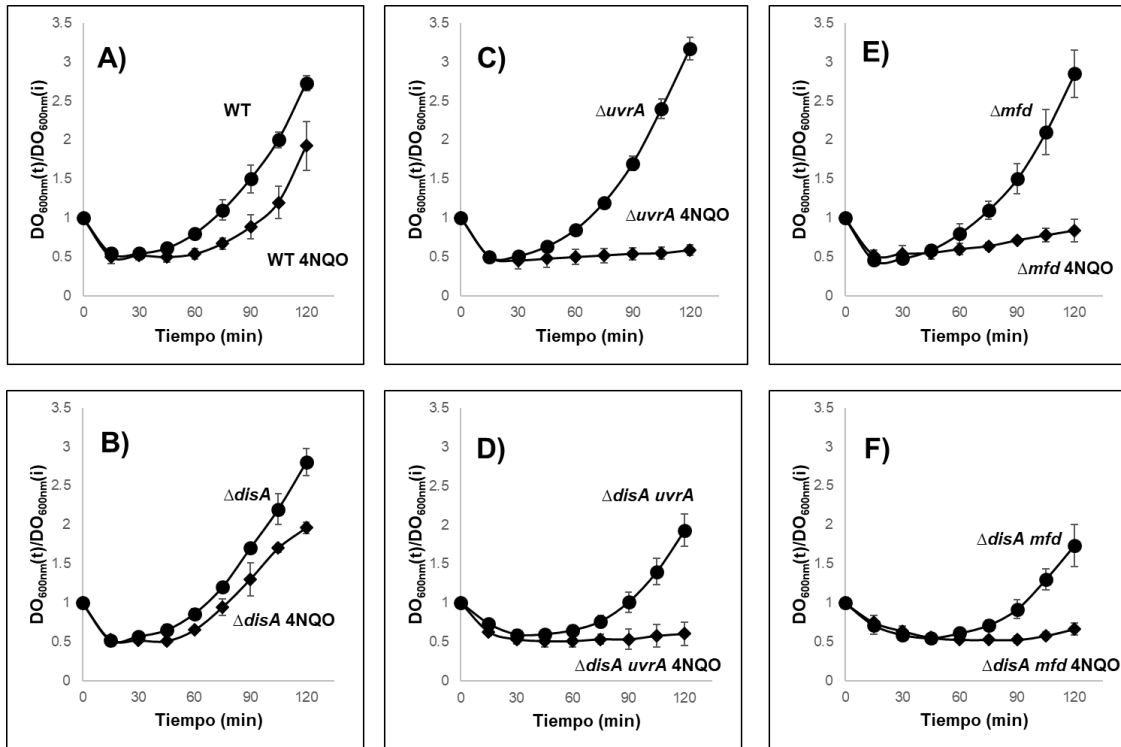


Figura 7. Cinéticas de germinación y eclosión de esporas de diferentes cepas de *B. subtilis* tratadas con y sin 4NQO. Esporas dormantes de A) WT B) $\Delta disA$ C) $\Delta uvrA$ D) $\Delta disA uvrA$ E) Δmfd y F) $\Delta disA mfd$ fueron sometidas a choque térmico germinadas en la ausencia (●) o presencia (◆) de 4NQO. Donde se indica, se agregó a los cultivos $2\mu M$ de 4NQO 15 min después del inicio de la germinación. La germinación y eclosión de las esporas se monitoreo midiendo la DO_{600nm} de los cultivos. Los valores son promedios \pm desviaciones estándar de determinaciones por triplicado con diferentes lotes de esporas.

6.5 DisA modula mutagénesis en esporas en eclosión en coordinación con Mfd o UvrA

Esporas carentes de DisA/Mfd o DisA/UvrA mostraron un retardado regreso a crecimiento vegetativo, el cual fue exacerbado por H_2O_2 o 4NQO (Figs. 6 y 7). Como se propuso arriba, el retardo en eclosión de estas esporas fue presuntamente debido a lesiones de DNA en esporas en eclosión interfiriendo con replicación y transcripción. Para investigar este tema, la frecuencia de mutación espontánea e inducida a rifampicina (Rif^R) fue determinada en esporas germinantes, permitiéndoles experimentar eclosión y varias rondas de división celular por un periodo de 180 min. Como se muestra en la Figura 8A, en comparación con esporas WT, la ausencia de UvrA o Mfd pero no de DisA incrementó

fuertemente los niveles de mutantes Rif^R en esporas en eclosión. Es importante destacar que la frecuencia de mutación a Rif^R de células vegetativas creciendo exponencialmente de las cepas $\Delta disA uvrA$, $\Delta disA mfd$, $\Delta uvrA$ y Δmfd fue alrededor de ~ 14 , ~ 32 ~ 7 y ~ 34 veces inferior en comparación con esporas de las mismas cepas que experimentaron germinación/eclosión, respectivamente (Fig.8B).

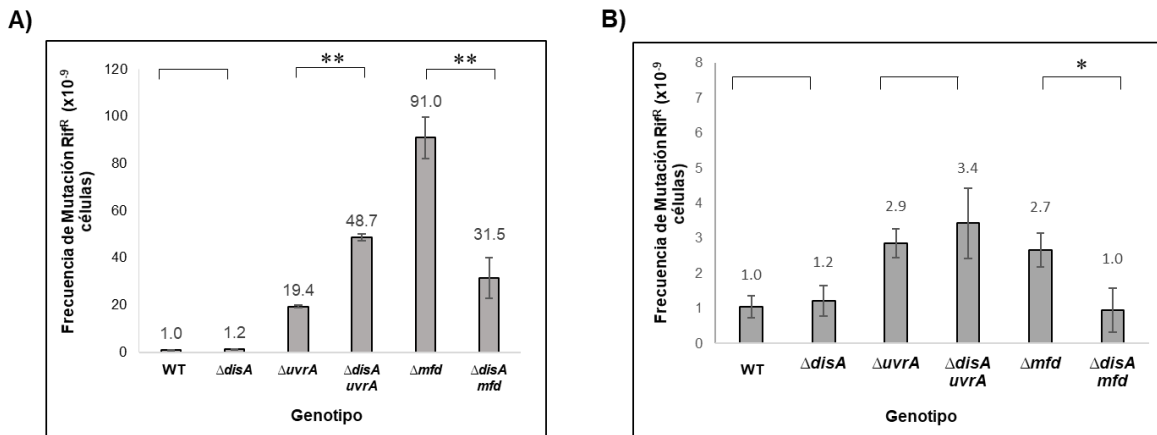


Figura 8. Frecuencia de mutación espontánea de esporas en germinación-eclosión y de células en crecimiento exponencial. A) Esporas de las cepas WT, $\Delta disA$, $\Delta uvrA$, $\Delta disA uvrA$, Δmfd , $\Delta disA mfd$ fueron inducidas a germinar y 180 min después se determinó la frecuencia de mutación a Rif^R como se describió en Materiales y Métodos. B) Células vegetativas de las mismas cepas fueron crecidas hasta una OD_{600nm}=0.5 y 180 min después se determinó la frecuencia de mutación a Rif^R.

Como se describió arriba, las condiciones metabólicas prevalecientes en esporas en eclosión promueven la producción de ROS, las cuales atacan al DNA e inducen la formación de diferentes tipos de lesiones mutagénicas (Wang y col., 1998). En apoyo a esta noción, el agente inductor de ROS, H₂O₂ incrementó también la frecuencia de mutación de esporas en eclosión de la cepa WT y esporas eclosionantes $\Delta disA$, Δmfd , $\Delta uvrA$, $\Delta disA/mfd$ y $\Delta disA/uvrA$ (Fig. 9A).

Posteriormente, investigamos si lesiones en el DNA que interfieren con la replicación y potencialmente afectan transcripción promueven eventos de mutagénesis durante la eclosión de esporas. Nuestros resultados apoyaron esta aseveración, ya que la adición de 4NQO durante la germinación de esporas incrementó los niveles de mutagénesis en esporas en eclosión WT y en esporas llevando simples y dobles mutaciones en $\Delta disA/mfd$ y $\Delta disA/uvrA$ (Fig.9B)

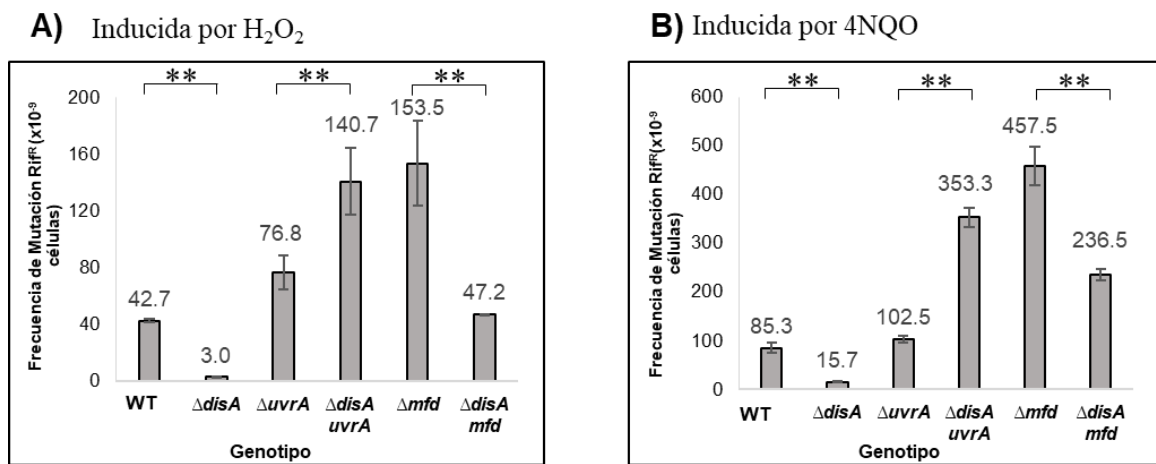


Figura 9. Frecuencia de mutación inducida con H₂O₂ o 4NQO de esporas en germinación-eclosión de diferentes cepas de *B. subtilis*. Esporas de distintas cepas fueron activadas por choque térmico e inducidas a germinar con L-alanina. 180 min después se determinó la frecuencia de mutación a Rif^R como se describió en Materiales y Métodos. A) Frecuencia de mutación inducida por H₂O₂ y B) Frecuencia de mutación inducida por 4NQO. Los valores representan la media de los datos colectados de tres experimentos independientes, y las barras de error representan la desviación estándar. **, P<0.01 (por la prueba U de Mann-Whitney)

El análisis de mutagénesis espontánea o inducida por H₂O₂ o 4NQO reveló que la interrupción de *disA* incrementó los niveles de mutagénesis de esporas deficientes en UvrA, mientras la pérdida de DisA disminuyó la frecuencia de mutación en esporas Δmfd (Figura 8A, 9A y B). Para investigar si DisA incrementa la mutagénesis en la ausencia de Mfd a través de una vía que involucra a DNA polimerasas de baja fidelidad, interrumpimos a *yqjH* o *yqjW*, genes que codifican a las polimerasas de la familia Y en la cepa $\Delta disA/mfd$.

Notablemente, la frecuencia de mutación a Rif^R en esporas eclosionantes $\Delta yqjH$ *disA* *mfd* o $\Delta yqjW$ *disA* *mfd* disminuyó ~5- o 26-veces respectivamente, comparado con las esporas $\Delta disA$ *mfd* (Fig. 10). Estos resultados indican que en esporas eclosionantes, la ausencia de Mfd conduce a reparación de DNA de baja fidelidad promovida por DisA.

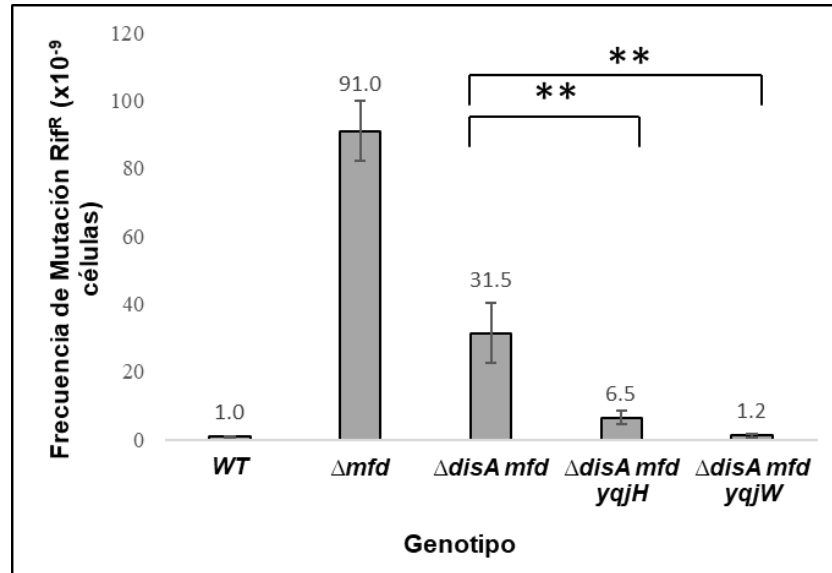


Figura 10. Frecuencia de mutación espontánea de diferentes cepas de *B. subtilis* en germinación-eclosión. Esporas dormantes de las cepas Δmfd , $\Delta disA$ *mfd* $\Delta disA$ *mfd* *yqjH* y $\Delta disA$ *mfd* *yqjW* fueron sometidas a choque térmico y germinadas por la adición de L-alanina. Después de 180 min de inducida la germinación se determinó la frecuencia de mutación por resistencia a rifampicina. Los valores representan la media de los datos colectados de tres experimentos independientes, y las barras de error representan la desviación estándar. **, P<0.01 (por la prueba de Mann-Whitney U).

6.6 Substituciones de bases derivadas de oxidación y desaminación de DNA promueven mutagénesis durante eclosión de esporas

Posteriormente, determinamos los tipos de mutaciones espontáneas que tuvieron lugar en esporas germinadas después de experimentar eclosión y división celular. Para ello, 20 colonias Rif^R de la cepa WT así como de varias mutantes fueron elegidas aleatoriamente. Un fragmento de 716 pb del ORF de *rpoB* abarcando los tres *clusters hot-spots* donde ocurren mutaciones que confieren resistencia a rifampicina en varias bacterias (Campbell y col.,

2001) fue amplificado por PCR en cada colonia. La secuenciación de DNA, confirmó que el fenotipo Rif^R en las cuatro cepas analizadas fue debido a sustituciones de bases que ocurrieron en la región amplificada del gen *rpoB* (Tabla 3). Interesantemente, la mayor proporción de cambios de aminoácidos asociados con el fenotipo Rif^R ocurrió en el *cluster* I del marco de lectura abierto *rpoB* (Fig. 11) (Campbell y col., 2001). Las mutaciones Rif^R identificadas fueron en gran proporción de transiciones A→G y C→T en la eclosión de esporas de las cepas WT y en las mutantes (Tabla 3); estas sustituciones de bases son mutaciones típicas producidas por desaminación de adenina a hipoxantina o citosina a uracilo (Friedberg y col., 2006). La interrupción de *disA* promovió la aparición de transversiones A↔T, transiciones G→A así como también, sustituciones C→G y T→C, las cuales, son propiciadas por estrés oxidativo (Wang y col., 1998). Interesantemente, las transversiones A→T, T→G y C→A que estuvieron ausentes en *rpoB* de esporas eclosionantes WT estuvieron presentes en colonias Rif^R de esporas $\Delta disA$ y Δmfd (Tabla 3). Sin embargo, las sustituciones de bases G→T y A→C que fueron detectadas en esporas Δmfd estuvieron ausentes en esporas WT. Es importante destacar, que en las colonias Rif^R derivadas de esporas eclosionantes deficientes en DisA/Mfd predominaron las sustituciones de bases G→A y G↔T así como la transversión C→A detectada en esporas en eclosión de las cepas $\Delta disA$ y Δmfd (Tabla 3). Notablemente, de 20 colonias Rif^R analizadas en la cepa $\Delta disA mfd$, sólo 16 exhibieron una sustitución de bases en la región secuenciada de *rpoB* (Tabla 3). Por lo tanto, sustituciones de bases en una región *rpoB* diferente a la secuenciada, pueden haber dado lugar al fenotipo Rif^R de las colonias restantes. A este respecto, se han reportado mutaciones que confieren el fenotipo Rif^R en la región N-terminal de RpoB (aminoácidos 132-136).(Campbell y col., 2001). Tomadose en conjunto estos resultados sugieren que en esporas en germinación/eclosión de esporas de *B. subtilis*: (i) eventos de desaminación

espontánea y oxidación contribuyen a interferencia transcripcional y replicativa; y (ii) Mfd y DisA operan en estos tipos de lesiones coordinando eventos de reparación fieles o con propensión al error.

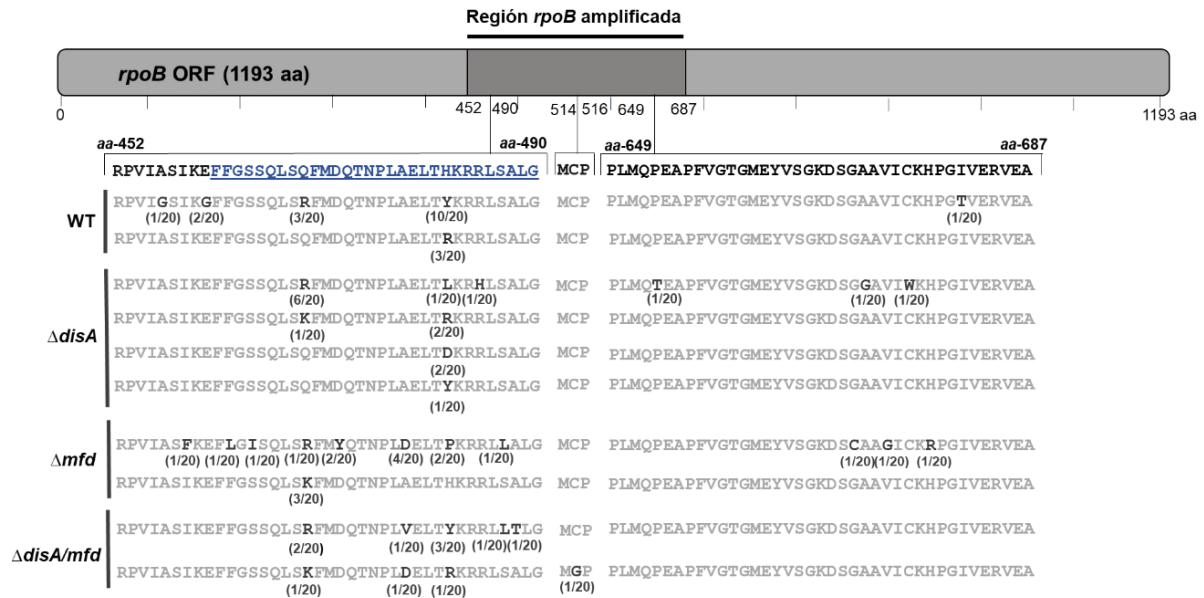


Figura 11. Mutaciones en la subunidad β de la RNAP detectadas en diferentes cepas de *B. subtilis*. La barra representa la secuencia de aminoácidos de la subunidad β de la RNAP (1193 aa). La región amplificada y secuenciada (716-pb de *rpoB*) incluyó los *hot spots Clusters I-III* asociados a sustituciones Rif^R (Campbell y col., 2001). La posición de las sustituciones Rif^R correspondiendo a regiones de aa 452-490, 514-516 y 649-687 de RpoB son mostrados en corchetes. El Cluster I en el cual la mayoría de las mutaciones a Rif^R fueron detectadas es mostrado en letras azules. La secuencia de aminoácidos para cada cepa analizada es mostrada en letras gris claro y los cambios de aminoácidos asociados con el fenotipo Rif^R es mostrado en negritas. La frecuencia de una mutación particular es mostrada debajo de cada aminoácido. aa (aminoácido)

Tabla 3. Espectro de mutaciones a Rif^R generadas durante eclosión y subsecuente división celular de esporas de diferentes cepas de *B. subtilis*.

Substituciones de bases	Cepas Rif ^R							
	WT		$\Delta disA$		Δmfd		$\Delta disA mfd$	
	Frecuencia ^a	Posición de la mutación ^b	Frecuencia ^a	Posición de la mutación ^b	Frecuencia ^a	Posición de la mutación ^b	Frecuencia ^a	Posición de la mutación ^b
A→T			1/20	(1445)/1	1/20	(1372)/1		
T→A			1/20	(1374)/1				
A→G	8/20	(1379)/2 (1406)/3 (1445)/3	8/20	(1406)/6 (1445)/2	2/20	(1406)/1 (2033)/1	3/20	(1406)/2 (1445)/1
G→A			2/20	(1454)/1 (1956)/1			2/20	(1462)/1 (1959)/1
T→G			1/20	(2028)/1	3/20	(1386)/1 (2013)/1 (2021)/1	1/20	(1543)/1
G→T					4/20	(1391)/1 (1414)/2 (2011)/1	1/20	(1428)/1
G→C								
C→G	1/20	(1367)/1	3/20	(1444)/2 (2015)/1				
T→C	1/20	(2042)/1	1/20	(2040)/1				
C→T	10/20	(1444)/10	1/20	(1444)/1	1/20	(1460)/1	7/20	(1383)/1 (1433)/1 (1444)/3 (1460)/1 (2034)/1
A→C					2/20	(1445)/2		
C→A			2/20	(1405)/1 (1957)/1	7/20	(1405)/3 (1433)/4	2/20	(1405)/1 (1432)/1

^a**Frecuencia** → Número de clonas con la sustitución específica de base/ número de clonas secuenciadas

^b**Posición de la mutación** → Posición de la mutación en *rpoB*/número de clonas con esa mutación

VII. DISCUSIÓN

En este trabajo, se reveló la existencia de una interacción de DisA con Mfd y UvrA (NER) en procesar lesiones genéticas que representan posibles impedimentos para la transcripción y la replicación durante la eclosión de las esporas de *B. subtilis*. Esporas WT y $\Delta disA$ tratadas o no con H₂O₂ exhibieron curvas de germinación/eclosión y cinéticas de replicación cromosómica que fueron esencialmente similares, sugiriendo que los mecanismos de reparación operando en este estado de desarrollo podrían ser suficientes para contrarrestar los daños en el genoma capaces de activar la función *checkpoint* de DisA.

Interesantemente, en esporas en eclosión de la cepa WT, detectamos lesiones espontáneas de DNA capaces de estancar a la RNA polimerasa y que potencialmente generan conflictos entre replicación-transcripción en diferentes bacterias (Saxowsky y Doetsch, 2006; Wang y col., 1998) (Tabla 3). Ha sido reportado un prominente papel para Mfd, en resolver estos conflictos citotóxicos en células en replicación de *E. coli* y *B. subtilis* (Million-Weaver y col., 2015). Un estudio adicional, atribuyó un papel a la TCR (Mfd/NER) en contrarrestar los efectos nocivos de agentes distorsionantes de la doble hélice, durante la esporulación de *B. subtilis* (Ramírez- Guadiana y col., 2013). De hecho, *mfd* y *uvrA* son inicialmente expresados en ambos compartimentos del esporangio, pero sólo en la pre-espora en los últimos estados de la esporulación (Ramírez-Guadiana y col., 2013). Un patrón similar de transcripción fue reportado para proteínas de reparación que son empaquetadas en esporas y empleadas para eliminar lesiones de DNA durante el regreso de las esporas a crecimiento vegetativo (Ayala-García y col., 2016; Pedraza-Reyes y col., 1994; Pedraza-Reyes y col., 2012).

Nuestros resultados mostraron que, mientras la sola interrupción de *mfd* no afectó la eclosión o la replicación cromosómica, tales procesos fueron significativamente alterados después de interrumpir a *mfd* en esporas deficientes en DisA. Notablemente, esporas eclosionantes deficientes en Mfd o DisA, exhibieron patrones similares de sustituciones de bases (Tabla 3) sugiriendo que ambas proteínas operan sobre las mismas lesiones durante el regreso de las esporas al crecimiento vegetativo. Por lo tanto, es posible que en esporas deficientes en Mfd y DisA, la RNA polimerasa estancada en lesiones de DNA represente un potencial bloqueo para la transcripción, lo cual finalmente impide una eficiente replicación del DNA durante la eclosión de esporas. Colectivamente estos resultados revelan un nuevo papel para Mfd junto con DisA en proteger esporas en germinación/eclosión contra lesiones espontáneas que potencialmente comprometen transcripción y replicación. De hecho, lesiones de DNA promovidas por ROS, incluyendo sitios AP y 8-OxoGs han sido detectadas en esporas dormantes de *B. subtilis* (Campos y col., 2014). En conexión con estos conceptos, después de la pérdida de dormancia, las esporas asumen un estado activo de transcripción que antecede a la primera ronda de replicación cromosómica (Keijser y col., 2007). Por lo tanto, Mfd podría ser necesario para acoplar la reparación de lesiones que detienen la progresión de la RNA polimerasa en la cadena transcrita de genes requeridos para la eficiente eclosión de esporas. Sin embargo, Mfd podría también estar involucrado en resolver conflictos estructurales que resultan de encuentros de la maquinaria de replicación con la RNA polimerasa estancada en lesiones de DNA (Merrih y col., 2012; Million-Weaver y col., 2015). En apoyo a estas nociones, la eclosión de esporas carentes de Mfd o UvrA (NER) fue severamente afectada por 4NQO, un agente de daño cuyas lesiones interfieren con la replicación de DNA (Fig. 7). Por lo tanto, las vías TCR y NER no sólo son cruciales en

esporulación (Ramírez-Guadiana y col., 2013) sino como se demostró aquí, también durante eclosión de esporas.

Estudios previos han reportado la contribución de UvrA en procesar sitios AP y roturas de cadena sencillas durante germinación/eclosión (Ibarra y col., 2008). Los resultados de este trabajo mostraron que UvrA (NER) podría también respaldar la función de DisA, ya que la falta de ambas proteínas afectó la eclosión de esporas tanto en ausencia como en presencia de H₂O₂. Además, esporas eclosionantes $\Delta disA uvrA$ mostraron retardos en su primera ronda de replicación cromosómica (Fig. 4), así como un incremento substancial en la mutagénesis espontánea Rif^R (Fig.8). Por lo tanto, es posible que durante la eclosión de las esporas, DisA y UvrA actúen coordinadamente, para remover lesiones genéticas espontáneas que son potenciales obstáculos para la replicación. De hecho, el papel de UvrA en este estado de desarrollo podría ser atribuido en parte a su contribución a la ruta TCR.

Como se discutió arriba, Mfd y DisA contrarrestan daño oxidativo en el DNA durante la eclosión de esporas. Análisis de la frecuencia de mutación Rif^R durante la eclosión, reveló un papel antimutagénico para Mfd y UvrA. Adicionalmente, mientras la ausencia de DisA promovió mutagénesis en esporas deficientes de UvrA tratadas con H₂O₂, un efecto opuesto fue observado en esporas en eclosión de la mutante Δmfd . De hecho, la inhabilitación genética de *yqjH* o *yqjW* disminuyó la frecuencia de mutación aún más en esporas eclosionantes deficientes en Mfd y DisA. Juntos estos resultados sugieren fuertemente que durante germinación/eclosión de esporas, las lesiones espontáneas en el DNA pueden ser exitosamente procesadas a través de NER o Mfd en un proceso que involucra síntesis de DNA con tendencia al error en coordinación con Mfd y DisA. Reportes previos han asociado a Mfd en contrarrestar los efectos nocivos de las lesiones voluminosas durante el crecimiento

y la esporulación (Ayora y col., 1996; Ramírez-Guadiana y col., 2013, 2016) y regular mutagénesis asociada a la transcripción (Gómez-Marroquín y col., 2016; Martin y col., 2012; Pybus y col., 2010). La evidencia presentada aquí también revela un papel para Mfd en coordinación con DisA en procesar lesiones promovidas por ROS, presuntamente generadas espontáneamente por las condiciones metabólicas operantes en esporas durante germinación/eclosión. Nuestros datos también sugieren que estas lesiones podrían ser responsables de conflictos entre replicación y transcripción.

Las especies reactivas de oxígeno atacan directa o indirectamente al DNA, generando numerosas lesiones, incluyendo los productos oxidativos 8-oxoG, 8-OxoA, 2-OxoA, 5-OxoC, y timina-glycol (Tg), así como productos de desaminación de la guanina, adenina y citocina incluyendo xantina, hipoxantina y uracilo, respectivamente, entre otros (Chernikov y col., 2007; Cooke y col., 2003). Estas lesiones son eficientemente procesadas por el sistema BER, y en esporas eclosionantes, fue demostrado que las AP endonucleasas *nfo* y *exoA* contribuyen junto con DisA en repararlas; además, recientemente se observó una importante contribución de la DNA glicosilasa/liasa Nth en el procesamiento de lesiones oxidativas durante el regreso de las esporas al crecimiento vegetativo (Alba-Pérez, Tesis de Licenciatura, 2017). Interesantemente, la actividad de liasa existente en DNA glicosilasas de la familia Nth, generan intermediarios de reparación del tipo 5' o 3' flap (Collier y col., 2012). Se ha descrito que DisA es capaz de unirse a estas estructuras disminuyendo la síntesis de C-di-AMP, generando presuntamente una señal para propiciar reparación (Witte y col., 2008; Gándara y col., 2017).

Aún cuando las bases oxidadas son principalmente sujetas a BER en una forma libre de error (Dalhus y col., 2009), modos alternativos de reparación con propensión al error

involucrando a Mfd y proteínas de escisión han sido postulados en bacterias (Brégeon y col., 2003; Gómez- Marroquín y col., 2016; Million-Weaver y col., 2015; Wimberly y col., 2014). Para explorar adicionalmente los aspectos mecanísticos de eventos de reparación durante la eclosión de esporas, secuenciamos una región del gen *rpoB* de colonias con resistencia espontánea a rifampicina provenientes de esporas en eclosión proficientes o deficientes para *disA*, *mfd* y *disA/mfd*. Los resultados revelaron que transiciones A→G y C→T proveniente de la desaminación de adenina y citosina predominaron en esporas WT y esporas mutantes en eclosión. Interesantemente, esporas en eclosión deficientes en DisA y Mfd mostraron un espectro mutacional similar, el cual en adición a las sustituciones de bases detectadas en las esporas WT, incluyó las transversiones A→T y T→G promovidas por las bases oxidadas 2-OxoA y por el producto no reparado de oxidación de la timina, 5-FODU (Wang y col., 1998). Adicionalmente, la transversión C→A, la cual es comúnmente generada por 8-OxoG no reparada (Wang y col., 1998) fue también detectada en esporas en eclosión carentes de DisA o Mfd. De manera notable, se encontró que las transversiones G→T y A→C resultantes de la incorporación de 8-oxoG en el DNA, así como mutaciones G→A promovidas por 5-OxoC (Wang y col., 1998), fueron identificadas en esporas en eclosión carentes de Mfd o DisA, respectivamente. En conjunto, estos resultados apoyan la noción de que DisA y Mfd trabajan juntos para eliminar lesiones no voluminosas promovidas por ROS durante la eclosión de la espora, sugiriendo participación de Mfd y DisA en coordinar proteínas involucradas en reparar estas lesiones. Notablemente, sustituciones de bases en 10 de las 20 colonias generadas de esporas eclosionantes de la cepa WT con resistencia a Rif^R, consistieron en la misma transición C→T, cambiando el codón H₄₈₂(CAC) a Y₄₈₂(TAC) (Tabla 2, Fig. 11). Importantemente, se encontró que esta mutación fue capaz de conferir resistencia rifampicina en esporas de *B. subtilis* (Nicholson y Maughan, 2002). Adicionalmente, 3 de las 20 colonias

Rif^R contuvieron la sustitución A→G, la cual cambió el codón H₄₈₂(CAC) a R₄₈₂(CGC) y esta mutación fue encontrada no sólo esporas sino también en células vegetativas de *B. subtilis* (Nicholson y Maughan, 2002). Por lo tanto, condiciones fisiológicas encontradas por esporas en eclosión de *B. subtilis* no sólo potencian mutagénesis, sino que también generan un espectro mutacional diferencial con respecto al exhibido por células vegetativas. Finalmente, las mutaciones A↔T, G↔C, T→C y A→C estuvieron ausentes en esporas eclosionantes $\Delta disA/mfd$, sugiriendo fuertemente que funciones adicionales de reparación eliminan 2-OxoA, 5-OxoC y 8-OxoG del cromosoma de esporas en eclosión.

Interesantemente, experimentos adicionales a este trabajo, utilizando la fusión *PrecA-gfpmut3a*, revelaron que lesiones de DNA espontáneas o sus intermediarios de reparación en esporas de la cepa WT y las cepas deficientes de reparación $\Delta disA$, Δmfd , $\Delta uvrA$, $\Delta disA mfd$ y $\Delta disA uvrA$ son capaces de activar la respuesta SOS durante eclosión (Regalado-García, 2018). En base a estas observaciones, nosotros postulamos que intermediarios de reparación de estas lesiones oxidativas pueden estancar a la RNA polimerasa. La ausencia de Mfd dificulta la remoción de la RNA polimerasa estancada, lo que eventualmente perturbaría la maquinaria de replicación de DNA. En acuerdo con esta noción, ha sido propuesto que un complejo MutY-sitio AP puede ser capaz de estancar la RNA polimerasa durante la transcripción del gen mutante *leuC427* y activar un evento dependiente de Mfd que conduce a prototrofia a leucina (Gómez-Marroquín y col., 2016). Por otra parte, la vía de reparación con tendencia al error dependiente de DisA podría ser activada por otras estructuras de DNA, incluyendo DNA ramificado, así como horquillas de replicación estancada (Gándara y col., 2017; Witte y col., 2008). En apoyo de esta hipótesis, un reporte reciente reveló la participación de PolY1 (YqjH) y PolY2(YqjW) en la modulación de eventos mutagénicos en

células en crecimiento, deficientes en DisA (Raguse y col., 2017). En conclusión, los resultados descritos en este estudio proveen información novedosa respecto a la función interactiva de Mfd y DisA para contrarrestar dinámicamente los efectos citotóxicos y genotóxicos de las lesiones promovidas por ROS durante el regreso de las esporas de *B. subtilis* al crecimiento vegetativo. En la figura 12 se resumen las posibles vías de reparación y mutagénesis que involucran a DisA, Mfd y UvrA durante la germinación/eclosión de esporas de *B. subtilis*.

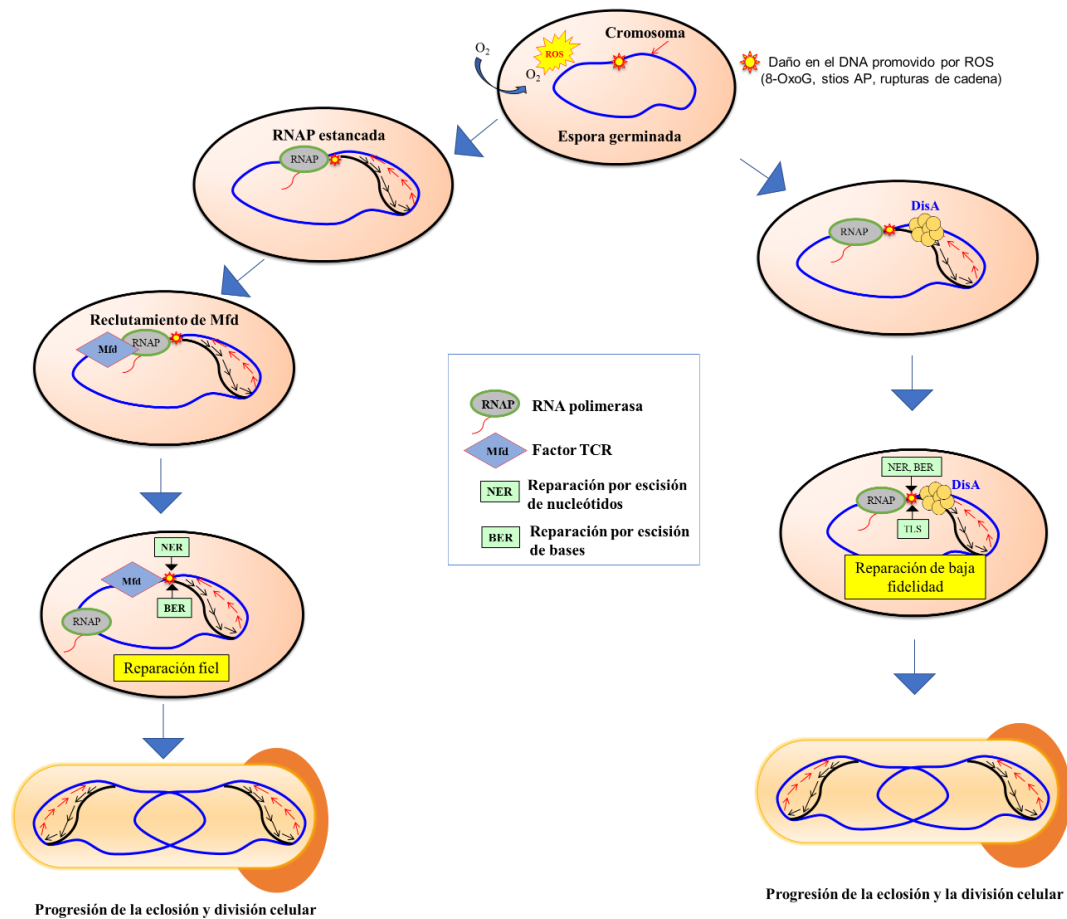


Figura 12. Posibles vías de reparación y mutagénesis para DisA, Mfd y UvrA durante la germinación-eclosión. Durante germinación/eclosión el genoma de las esporas de *B. subtilis* es impactado por lesiones genéticas promovidas por especies reactivas de oxígeno (ROS). Durante eclosión, Mfd y DisA coordinan eventos de reparación por escisión para eliminar dichas lesiones, evitando conflictos entre las maquinarias de transcripción replicación y asegurando con ello un eficiente regreso al crecimiento vegetativo.

VIII. CONCLUSIONES

- i) Lesiones en el DNA que son procesadas por el sistema NER, ya sea dependientes o no de Mfd son procesadas en coordinación con DisA.
- ii) La vía NER en coordinación con Mfd puede contrarrestar el daño promovido por ROS en el DNA durante germinación/eclosión. Además de contrarrestar el daño oxidativo, Mfd, DisA y NER pueden participar en defender las esporas de los efectos genotóxicos de 4NQO.
- iii) DisA promueve mutagénesis espontánea e inducida por daño oxidativo y 4NQO durante la germinación/eclosión en ausencia de Mfd a través de una vía que involucra reparación con tendencia al error.
- iv) DisA y Mfd operan juntos para eliminar lesiones no voluminosas promovidas por ROS durante la eclosión de la espora.
- iv) Lesiones espontáneas producidas por desaminación y oxidación de bases conducen a resistencia a rifampicina, durante la eclosión de esporas de *B. subtilis*.

IX. PERSPECTIVAS

- i) Elucidar el papel del segundo mensajero C-di-AMP en regular la función de DisA durante la germinación/eclosión de esporas.
- ii) Investigar si DisA promueve mutagénesis en fase estacionaria en *B. subtilis*
- iii) Investigar si DisA esta involucrada en resolver colisiones entre las maquinarias de replicación y transcripción.
- iv) Determinar interacción de proteínas entre DisA y proteínas presentes en esporas eclosionantes de *B. subtilis*.

X. REFERENCIAS

- Alba-Pérez V (2017).** Papel de las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth en coordinación con DisA en la reparación de ADN y mutagénesis durante la germinación-eclosión de esporas de *Bacillus subtilis*, Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato, Gto.
- Alonso JC, Tailor RH, Lüder G (1988).** Characterization of recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, **170(7)**, 3001-3007.
- Ayala-García VM, Valenzuela-García LI, Setlow P, Pedraza-Reyes M (2016).** Aag Hypoxanthine-DNA Glycosylase Is Synthesized in the Forespore Compartment and Involved in Counteracting the Genotoxic and Mutagenic Effects of Hypoxanthine and Alkylated Bases in DNA during *Bacillus subtilis* Sporulation. *Journal of Bacteriology*, **198(24)**, 3345-3354.
- Ayora S, Rojo F, Ogasawara N, Nakai S, and Alonso JC (1996).** The Mfd protein of *Bacillus subtilis* 168 is involved in both transcription-coupled DNA repair and DNA recombination. *Journal of Molecular Biology*, **256 (2)**, 301–318
- Bagyan I, Hobot J, Cutting S (1996).** A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **178(15)**, 4500-4507.
- Barajas-Ornelas R, Ramírez-Guadiana FH, Juárez-Godínez R, Ayala-García VM, Robleto EA, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M (2014).** Error-prone processing of apurinic/apyrimidinic (AP) sites by PolX underlies a novel mechanism that promotes adaptive mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **196(16)**, 3012-3022.
- Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S (2006).** A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **125(4)**, 679-690.

Boylan RJ, Mendelson NH, Brooks D, Young FE (1972). Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *Journal of Bacteriology*, **110(1)**, 281-290.

Brégeon D, Doddridge ZA, You HJ, Weiss B, Doetsch PW (2003). Transcriptional mutagenesis induced by uracil and 8-oxoguanine in *Escherichia coli*. *Molecular Cell*, **12(4)**, 959-970.

Burkholder WF, Kurtser I, Grossman AD (2001). Replication initiation proteins regulate a developmental checkpoint in *Bacillus subtilis*. *Cell*, **104(2)**, 269-279.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, **104(6)**, 901-912.

Campos SS, Ibarra-Rodríguez JR, Barajas-Ornelas RC, Ramírez-Guadiana FH, Obregón-Herrera A, Setlow P, Pedraza-Reyes M (2014). Interaction of apurinic/aprimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *Journal of Bacteriology*, **196(3)**, 568-578.

Chernikov AV, Gudkov SV, Shtarkman IN, and Bruskov VI (2007). Oxygen effect in heat-induced DNA damage. *Biophysics*, **52(2)**, 185–190.

Collier C, Machon C, Briggs GS, Smits WK, Soultanas P (2012). Untwisting of the DNA helix stimulates the endonuclease activity of *Bacillus subtilis* Nth at AP sites. *Nucleic Acids Research*, **40(2)**, 739-750.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, **17(10)**, 1195-1214.

Cortezzo DE, Koziol-Dube K, Setlow B, Setlow P (2004). Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of *Bacillus subtilis* and sensitizes spores to subsequent stress. *Journal of Applied Microbiology*, **97(4)**, 838-852.

Dalhus B, Laerdahl JK, Backe PH, and Bjørås M (2009). DNA base repair–recognition and initiation of catalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **33(6)**, 1044-1078.

Domian IJ, Quon KC, Shapiro L (1997). Cell type-specific phosphorylation and proteolysis of a transcriptional regulator controls the G1-to-S transition in a bacterial cell cycle. *Cell*, **90(3)**, 415-424.

Edmunds CE, Simpson LJ, Sale JE (2008). PCNA ubiquitination and REV1 define temporally distinct mechanisms for controlling translesion synthesis in the avian cell line DT40. *Molecular Cell*, **30(4)**, 519-529.

Errington J (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*, **1(2)**, 117-126.

Fajardo-Cavazos P, Nicholson WL (1995). Molecular dissection of mutations in the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase gene which affect repair of spore DNA damage caused by UV radiation. *Journal of Bacteriology*, **177(15)**, 4402-4409.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006). DNA repair and mutagenesis, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Friedman BM, Yasbin RE (1983). The genetics and specificity of the constitutive excision repair system of *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics MGG*, **190(3)**, 481-486.

Galiègue-Zouitina S, Bailleul B, Loucheux-Lefebvre MH (1985). Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction

of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Research*, **45**(2), 520-525.

Gándara C, De Lucena DK, Torres R, Serrano E, Altenburger S, Graumann PL, Alonso JC (2017). Activity and in vivo dynamics of *Bacillus subtilis* DisA are affected by RadA/Sms and by Holliday junction-processing proteins. *DNA repair*, **55**, 17-30.

Gómez-Marroquín M, Martin HA, Pepper A, Girard ME, Kidman AA, Vallin C, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M, Robleto EA (2016). Stationary-Phase Mutagenesis in Stressed *Bacillus subtilis* Cells Operates by Mfd-Dependent Mutagenic Pathways. *Genes*, **7**(7), 33.

Goranov AI, Katz L, Breier AM, Burge CB, Grossman AD (2005). A transcriptional response to replication status mediated by the conserved bacterial replication protein DnaA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(36), 12932-12937.

Horsburgh MJ, Thackray PD, Moir A (2001). Transcriptional responses during outgrowth of *Bacillus subtilis* endospores. *Microbiology*, **147**(11), 2933-2941.

Ibarra JR, Orozco AD, Rojas JA, López K, Setlow P, Yasbin RE, Pedraza-Reyes M (2008). Role of the Nfo and ExoA apurinic/apyrimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, **190**(6), 2031-2038.

Inaoka T, Matsumura Y, Tsuchido T (1999). SodA and Manganese Are Essential for Resistance to Oxidative Stress in Growing and Sporulating Cells of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **181**(6), 1939-1943.

Jarosz DF, Godoy VG, Delaney JC, Essigmann JM, Walker GC (2006). A single amino acid governs enhanced activity of DinB DNA polymerases on damaged templates. *Nature*, **439(7073)**, 225-228.

Kastan MB, Bartek J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, **432(7015)**, 316-323.

Kawai Y, Moriya S, Ogasawara N (2003). Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **47(4)**, 1113-1122.

Keijser BJ, Ter Beek A, Rauwerda H, Schuren F, Montijn R, van der Spek H, Brul S (2007). Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *Journal of Bacteriology*, **189(9)**, 3624-3634.

Lenhart JS, Schroeder JW, Walsh BW, Simmons LA (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76(3)**, 530-564.

Losick R, Youngman P, Piggot PJ (1986). Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Genetics*, **20(1)**, 625-669.

Martin HA, Pedraza-Reyes M, Yasbin RE, Robleto EA (2012). Transcriptional de-repression and Mfd are mutagenic in stressed *Bacillus subtilis* cells. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **21(1-2)**, 45-58.

Merrick H, Zhang Y, Grossman AD, Wang JD (2012). Replication–transcription conflicts in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **10(7)**, 449.

Miller JH (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Página 433.

Million-Weaver S, Samadpour AN, Moreno-Habel DA, Nugent P, Brittnacher MJ, Weiss E, Merrikh H (2015). An underlying mechanism for the increased mutagenesis of lagging-strand genes in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **112(10)**, E1096-E1105.

Modell JW, Hopkins AC, Laub MT (2011). A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. Genes & Development, **25(12)**, 1328-1343.

Moeller R, Setlow P, Pedraza-Reyes M, Okayasu R, Reitz G, Nicholson WL (2011). Role of the Nfo and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in radiation resistance and radiation-induced mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores. Journal of Bacteriology, **193(11)**, 2875-2879.

Moeller R, Stackebrandt E, Reitz G, Berger T, Rettberg P, Doherty AJ, Horneck G, Nicholson WL (2007). Role of DNA repair by nonhomologous-end joining in *Bacillus subtilis* spore resistance to extreme dryness, mono-and polychromatic UV, and ionizing radiation. Journal of Bacteriology, **189(8)**, 3306-3311.

Mukherjee A, Cao C, Lutkenhaus J (1998). Inhibition of FtsZ polymerization by Sula, an inhibitor of septation in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences, **95(6)**, 2885-2890.

Nicholson WL, Maughan H (2002). The spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Bacteriology, **184(17)**, 4936-4940.

Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64(3)**, 548-572.

Nicholson WL, Setlow B, Setlow P (1990). Binding of DNA in vitro by a small, acid-soluble spore protein from *Bacillus subtilis* and the effect of this binding on DNA topology. *Journal of Bacteriology*, **172(12)**, 6900-6906.

Nicholson WL, Setlow B, Setlow P (1991). Ultraviolet irradiation of DNA complexed with alpha/beta-type small, acid-soluble proteins from spores of *Bacillus* or *Clostridium* species makes spore photoproduct but not thymine dimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88(19)**, 8288-8292.

Nicholson WL, Setlow P (1990). Sporulation, germination and outgrowth. *Molecular Biological Methods for Bacillus*, 391-450.

nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis* **454(3)**, 558-566.

Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S (2011). c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Reports*, **12(6)**, 594-601.

Pedraza-Reyes M, Gutiérrez-Corona F, Nicholson WL (1994). Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA polymerase during *Bacillus subtilis* sporulation. *Journal of Bacteriology*, **176(13)**, 3983-3991.

Pedraza-Reyes M, Ramírez-Ramírez N, Vidales-Rodríguez LE, Robleto EA (2012). Mechanisms of bacterial spore survival. In *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Abel-Santos, E. (ed). Norfolk, U.K.: Caister Academic Press. pp. 73-84.

Pybus C, Pedraza-Reyes M, Ross CA, Martin H, Ona K, Yasbin RE, Robleto E (2010).

Transcription associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *Journal of Bacteriology*, **192(13)**, 3321–3328

Raguse M, Torres R, Seco EM, Gándara C, Ayora S, Moeller R, Alonso, JC (2017).

Bacillus subtilis DisA helps to circumvent replicative stress during spore revival. *DNA Repair*, **59**, 57-68.

Rahn-Lee L, Gorbatyuk B, Skovgaard O, Losick R (2009).

The conserved sporulation protein YneE inhibits DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **191(11)**, 3736-3739.

Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Ornelas RC, Ayala-García VM, Yasbin RE, Robleto

E, Pedraza-Reyes M (2013). Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Molecular Microbiology*, **90(5)**, 1088-1099.

Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Ornelas RC, Corona-Bautista SU, Setlow P, Pedraza-

Reyes M (2016). The RecA-Dependent SOS Response Is Active and Required for Processing of DNA Damage during *Bacillus subtilis* Sporulation. *PloS one*, **11(3)**, e0150348.

Ramírez-Guadiana FH, Barraza-Salas M, Ramírez-Ramírez N, Ortiz-Cortés M, Setlow

P, Pedraza-Reyes M (2012). Alternative excision repair of ultraviolet B-and C-induced DNA damage in dormant and developing spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **194(22)**, 6096-6104.

Regalado-García AG (2018). Análisis de la respuesta SOS durante la germinación/eclosión

de esporas de *B. subtilis* deficientes en DisA, Mfd y/o UvrA. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato, Gto.

Rowland SL, Burkholder WF, Cunningham KA, Maciejewski MW, Grossman AD,

King GF (2004). Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine

kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell*, **13(5)**, 689-701.

Ruvolo MV, Mach KE, Burkholder WF (2006). Proteolysis of the replication checkpoint protein Sda is necessary for the efficient initiation of sporulation after transient replication stress in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **60(6)**, 1490-1508.

Salas-Pacheco JM, Setlow B, Setlow P, Pedraza-Reyes M (2005). Role of the Nfo (YqfS) and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in protecting *Bacillus subtilis* spores from DNA damage. *Journal of Bacteriology*, **187(21)**, 7374-7381.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Saxowsky TT, Doetsch PW (2006). RNA polymerase encounters with DNA damage: transcription-coupled repair or transcriptional mutagenesis?. *Chemical Reviews*, **106(2)**, 474-488.

Schaeffer P, Millet J, Aubert JP (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54**, 704-711.

Setlow B, Setlow P (1995). Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Applied and Environmental Microbiology*, **61(7)**, 2787-2790.

Setlow B, Setlow P (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology*, **178(12)**, 3486-3495.

Setlow B, Tautvydas KJ, Setlow P (1998). Small, acid-soluble spore proteins of the α/β type do not protect the DNA in *Bacillus subtilis* spores against base alkylation. *Applied and Environmental Microbiology*, **64(5)**, 1958-1962.

Setlow P (1988). Small, acid-soluble spore proteins of *Bacillus species*: structure, synthesis, genetics, function, and degradation. *Annual Reviews in Microbiology*, **42(1)**, 319-338.

Setlow P (2003). Spore Germination. *Current Opinion in Microbiology*. **6(6)**,550-556

Setlow P (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*, **101(3)**, 514-525.

Setlow P (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology*, **15(4)**, 172-180.

Tada M, Tada M (1976). Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in

Truglio JJ, Croteau DL, Van Houten B, Kisker C (2006). Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chemical Reviews*, **106(2)**, 233-252.

Veening JW, Murray H, Errington J (2009). A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes and Development*, **23(16)**, 1959-1970.

Wagner JK, Marquis KA, Rudner DZ (2009). SirA enforces diploidy by inhibiting the replication initiator DnaA during spore formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **73(5)**, 963-974.

Walker GC, Kenyon CJ, Bagg A, Langer PJ, Shanabruch WG (1981). Mutagenesis and cellular responses to DNA damage. *National Cancer Institute monograph*, **60**, 257-267.

Wang D, Kreutzer DA, Essigmann JM (1998). Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **400(1)**, 99-115.

Wang ST, Setlow B, Conlon EM, Lyon JL, Imamura D, Sato T, Eichenberger P (2006). The forespore line of gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, **358(1)**, 16-37.

Weller GR, Kysela B, Roy R, Tonkin LM, Scanlan E, Della M, Devine KM (2002). Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science*, **297(5587)**, 1686-1689.

Wimberly H, Shee C, Thornton PC, Sivaramakrishnan P, Rosenberg SM, Hastings PJ (2013). R-loops and nicks initiate DNA breakage and genome instability in non-growing *Escherichia coli*. *Nature communications*, **4**, 2115.

Witte G, Hartung S, Büttner K, Hopfner KP (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular Cell*, **30(2)**, 167-178.