



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Función de la proteína MazG de *Pseudomonas aeruginosa* bajo condiciones
de estrés por inanición de aminoácidos

TESIS QUE PRESENTA:

Q. F. B. NELBY IVONNE CRUZ SAVIÑÓN

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GABRIEL GUARNEROS PEÑA

Director de Tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Asesores:

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Dra. Rosa Ma. Del Refugio Bermúdez Cruz.

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

El presente trabajo se realizó en los laboratorios 3 y 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular (DGBM) del Dr. Gabriel Guarneros Peña, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña.

El sustentante recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el período de Agosto de 2013 a agosto de 2015 CVU: 554297

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis el Dr. Gabriel Guarneros Peña por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo.

A mi comité tutorial formado por el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y por la Dra. Rosa Ma. Bermudez Cruz. Por su asesoría y valiosos comentarios realizados para mejorar este trabajo.

A los auxiliares del laboratorio, Marco Magos, José Bueno y Eva Jacinto; por compartir su experiencia y conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio: Ana Sandra, Marco, Rodolfo, Adrián, Víctor Yuritza, Paco, Enith, Irais, Gerardo, por su compañía y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

A Enith, Víctor, Sandra, marco y adrián por la disposición de apoyarme y asesorarme en mi proyecto.

A Ana y Sayda por brindarme su amistad y compañía.

DEDICATORIAS

A mi creador por permitirme culminar una etapa más de mi vida.

A mi madre, por ser mi mayor inspiración y ejemplo de vida.

A mi hermano por darme siempre su apoyo incondicional.

A mi hermana por su cariño

A mi esposo por su amor y apoyo incondicional.

A la señora Silvia y a Ili por todo su apoyo y cariño.

“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero mucha ciencia regresa a Él.”

Louis Pasteur

ÍNDICE

Resumen
Abstract

i. Introducción.....	1
1.1 Estrés en bacterias.....	1
1.2 Proteínas MazG.....	1
1.3 Respuesta estricta o <i>stringent response</i>	4
1.4 Efecto de ppGpp en la expresión génica.....	6
1.5 <i>Stringent response</i> y MazG en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
ii. Antecedentes.....	9
iii. Justificación.....	11
iv. Hipótesis.....	12
v. Objetivos.....	13
vi. Metodología.....	14
6.1 Análisis bioinformático.....	15
6.1.1 Análisis comparativo <i>in silico</i> de las proteínas MazG de <i>P. aeruginosa</i> versus <i>E. coli</i>	15
6.1.2 Alineamiento de secuencias y análisis comparativo del locus <i>mazG-relA</i>	15
6.2 Análisis del nivel de expresión de <i>mazG</i> en condición de estrés.....	16
6.2.2 Extracción de RNA a partir de cultivos con y sin SHX.....	16
6.2.3 Determinación de la concentración e integridad de RNA total.....	18
6.2.4 Tratamiento con DNAsa.....	18
6.2.5 Obtención de DNA complementario (cDNA) por retrotranscripción.....	19
6.2.6 Validación de ensayos para expresión génica de <i>mazG</i> con SYBR Green.....	20
6.3 Clonación de MazG en un vector de expresión pHERD30T.....	21

6.3.1 Extracción de DNA bacteriano.....	23
6.3.2 Amplificación por PCR de <i>mazG</i> de PA14.....	23
6.3.3 Clonación en el vector de transición.....	25
6.3.5 Sub-clonación en el vector de expresión pHERD30T.....	26
6.4. Análisis de expresión de <i>mazG</i> en el vector pHERD30T.....	27
6.4.1 Preparación de gel de acrilamida.....	28
6.5 Confirmación de inserción de transposón en cepas PAO1 Manoil Lab.....	28
6.6 Cinética de crecimiento y supervivencia de cepas PAO1 silvestre, PAO1 mutante- <i>mazG</i> , con SHX.....	30
6.7 Medición de los niveles de ppGpp.....	31
6.7.1 Marcaje in vivo.....	31
6.7.2 Extracción de Nucleótidos.....	31
6.7.3 Separación cromatográfica.....	32
vii. Resultados.....	33
7.1 Comparación del contexto genómico de <i>mazG</i>	33
7.2 Comparación estructural de MazG – <i>E. coli</i> versus MazG <i>P. aeruginosa</i>	35
7.3 Análisis de la expresión del mRNA de <i>mazG</i>	36
7.3.1 Extracción de RNA total.....	36
7.3.2 PCR de punto final.....	37
7.3.3 Medición de la expresión relativa del mRNA de <i>mazG</i> por qRT-PCR.....	38
7.4 Cepas PAO1 mutantes por inserción de transposón (colección Manoil Lab).....	40
7.5 Evaluación del efecto de <i>mazG</i> sobre la supervivencia celular.....	43
7.6 Clonación de <i>mazG</i> en pHERD30T.....	44
7.7 Expresión de <i>mazG</i> a partir de la construcción en el vector pHERD30T.....	46

7.8 Evaluación de los niveles de ppGpp.....	47
7.9 Efecto de MazG sobre los niveles de ppGpp.....	49
7.9.1 Cuantificación de los niveles de ppGpp por Imagej.....	50
viii. Discusión.....	51
ix. Conclusiones.....	55
x. Perspectivas.....	56
xi. Anexos -Métodos.....	57
xii. Anexos-Resultados.....	61
xiii. Referencias.....	72

RESUMEN

Las bacterias en la naturaleza están sometidas constantemente a diversas condiciones de estrés, que van desde falta de nutrientes, cambios en el medio ambiente, hasta estrés oxidativo. Para hacer frente a estos cambios adversos, existen proteínas que regulan la respuesta a cada tipo de estrés. Una proteína relacionada con el estrés es MazG. Esta proteína es una pirofosfohidrolasa muy conservada en bacterias capaz de hidrolizar NTPs en sus respectivos NMP y PPi. Sin embargo su estructura y función varía de acuerdo a la especie bacteriana. Mientras que en *E. coli* MazG cuenta con dos dominios NTP-PPasa, y baja los niveles de ppGpp, una molécula inductora del *stringent response*. En *Mycobacterium tuberculosis* MazG cuenta con un solo dominio NTP-PPasa y se ha relacionado con el estrés oxidativo removiendo dNTPs no canónicos. No obstante se desconoce su posible función en otras bacterias. En este trabajo se estudió la posible función de *mazG* en *P. aeruginosa*. Mediante un análisis comparativo del contexto genómico de *mazG* en esta bacteria con respecto a *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Thermotoga marítima*, se encontró similitud entre el contexto genómico de *P. aeruginosa* solo con respecto a *E. coli*. Por lo que se sugirió una posible similitud en las funciones de ambas proteínas. Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos de sobrevivencia bajo condiciones de estrés por limitación de serina en una cepa mutante en *mazG*, en este ensayo se observó una diferencia de al menos un orden de magnitud *versus* la cepa silvestre; Un efecto menor al observado en *E. coli* donde la diferencia es de tres órdenes de magnitud. Otra observación importante, fue la disminución de los niveles de ppGpp, causado por la sobreexpresión de MazG de *P. aeruginosa*. Por lo que se quiso investigar si existía una relación entre la inducción del estrés por limitación de serina y la expresión de *mazG*. Mediante ensayos de PCR de punto final y qRT-PCR se observó que no existía una diferencia en la expresión de *mazG* en condiciones de estrés versus una condición normal. Sin embargo se observó que *mazG* aumenta su expresión en fases tardías del crecimiento. No obstante son necesarios más experimentos para comprender el significado de este aumento. Así como para saber qué efectos fisiológicos tiene *mazG* y ppGpp sobre la fisiología de *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

Bacteria in nature are constantly subjected to various stress conditions, ranging from lack of nutrients, or oxidative stress. To address these adverse changes, there are proteins that regulate each type of stress. A stress-related protein is MazG. This protein is a pyrophosphatase highly conserved in bacteria, and capable of hydrolyzing NTPs to their respective NMP and PPi. However their structure and function varies according to the bacterial species. In *E. coli* MazG NTP-PPase has two domains, and decreases the levels of ppGpp, an inducer of stringent response. In *Mycobacterium tuberculosis* MazG has a single domain NTP-PPase and has been linked to oxidative stress by removing non-canonical dNTPs. Despite their function in other bacteria it is unknown. In this work the possible role of *mazG* in *P. aeruginosa* was studied. Through a comparative analysis of the genomic context of *mazG* in this bacterium against those in *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Thermotoga maritima*, similarity was found only between the genomic contexts of *P. aeruginosa* and *E. coli*. Hence, it was suggested a possible similarity in the functions of both proteins. To test this hypothesis, assays were performed on survival under stress conditions in a *mazG* mutant strain finding a difference of at least an order of magnitude less versus the wild-type strain. This result was lower than that observed in *E. coli* where the reduction is three orders of magnitude. Another important observation was that overexpression of *mazG* in *P. aeruginosa* reduces ppGpp levels. Thus, we wanted to investigate whether there was a direct relationship between stress induction and expression of *mazG*. By PCR endpoint and qRT-PCR assays it was observed that there was no difference in expression of *mazG* under stress versus a normal condition. Instead, it was noted that the levels of *mazG* transcript increased in later stages of growth. More experiments are necessary to understand the meaning of this result and to understand the effects of *mazG* and ppGpp on the physiology of *P. aeruginosa*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina de MazG de <i>E. coli</i>	2
Figura 2. Síntesis de ppGpp	5
Figura 3. Efecto de ppGpp en la regulación génica de <i>E. coli</i>	7
Figura 4. Mapa del vector de PHERD30T	22
Figura 5. Patrón de acumulación de ppGpp.	32
Figura 6. Comparación genómica de <i>mazG</i> en cepas tipo.	34
Figura 7. Comparación de la estructura.	35
Figura 8. Extracto de RNA total, de muestras con y sin estrés.	36
Figura 9. PCR a partir de DNA genómico y cDNA de <i>mazG</i> , <i>relA</i> y <i>16S</i> .	37
Figura 10. Niveles relativos del mRNA de <i>mazG</i>	39
Figura 11. Mapas de la posición de los <i>primers</i> en cepas mutantes.	41
Figura 12. Comprobación de la interrupción de los genes <i>mazG</i> y <i>relA</i>	42
Figura 13. Comprobación del fenotipo del transposón ISlacZ dentro del gen <i>relA</i>	42
Figura 14. Efecto de la ausencia de <i>mazG</i> sobre la supervivencia celular con SHX	43
Figura 15. Obtención de vector e inserto cortado.	44
Figura 16. Candidatas de clonación identificadas por PCR	45
Figura 17. Restricción de plásmidos candidatos	45
Figura 18. Expresión de <i>mazG</i> a partir del vector pHERD30T	46
Figura 19. Efecto de la limitación de fosfato en PAO1.	47
Figura 20. Identificación de ppGpp de una cepa wt <i>versus</i> una cepa mutante- <i>relA</i> bajo condiciones de inanición por falta de aminoácidos	48
Figura 21. Efecto de MazG sobre los niveles de ppGpp	49
Figura 22. Cuantificación de los niveles de ppGpp por la sobreexpresión de MazG	50

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas tipo MazG	3
Tabla 2. Cepas y plásmidos	14
Tabla 3. <i>Primers</i> usados	14
Tabla-anexo 1. Términos comúnmente usados en PCR tiempo real.	66
Tabla-anexo 2. Datos obtenidos para la gráfica de expresión relativa de <i>mazG</i> .	68
Tabla-anexo 3. Datos crudos de la cuantificación de los niveles de ppGpp.	74

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga marítima</i>
<i>M. Tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
SHX	Hidroxamato de serina
qRT-PCR	Retrotranscripción –y cadena de la polimerasa cuantitativa
mL	Militros
UFC	Unidades formadoras de colonias
PsmazG	Gen de <i>mazG</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EcmaZG	Gen de <i>mazG</i> de <i>Escherichia Coli</i> .
PsMazG	Proteína MazG de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EcMazG	Proteína MazG de <i>Escherichia Coli</i> .

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés en bacterias

Las bacterias son conocidas por ser microorganismos extremadamente adaptables y capaces de colonizar diversos nichos ecológicos. Poseen la capacidad de responder rápidamente a cambios bruscos de su ambiente que pueden afectar el crecimiento normal. En la naturaleza, las bacterias se ven sometidas constantemente a diversas condiciones de estrés, por ejemplo: Falta de nutrientes (aminoácidos, O₂, fuente de carbono), cambios en la temperatura, pH, etc (Craig, 1985) o hasta estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno que se producen en el metabolismo (Imlay, 2015). Cada condición de estrés produce cambios en la expresión génica; Y por lo tanto en la fisiología celular, generando distintos estados metabólicos que son clave para la sobrevivencia bajo condiciones en constante cambio (Matsuoka 2011; Poole, 2014).

Cada condición de sobrevivencia de estrés modifica la fisiología general de la bacteria y genera señales que son reconocidas por sensores específicos y estos a su vez desencadenan una reprogramación de la expresión de proteínas de la bacteria para así sobrevivir (Watson, 1990; Wood, 2015). Un ejemplo de proteínas relacionadas con el estrés es MazG.

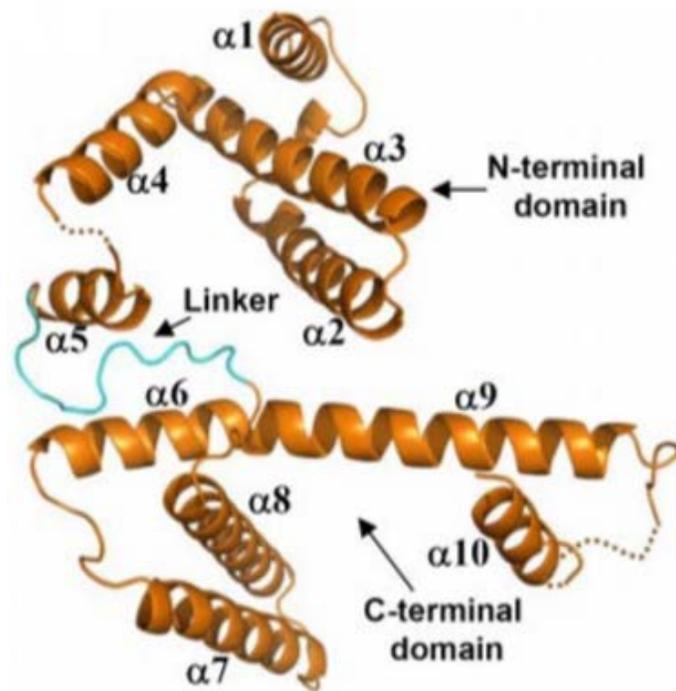
1.2 Proteína MazG

MazG es una pirofosfohidrolasa perteneciente a una extensa familia de UTPasas que se han descrito como proteínas tipo *house-cleaning* (Galperin *et al.*, 2006), capaces de hidrolizar todos los desoxinucleótidos fosfato (dNTPs) canónicos en su respectivo nucleosido monofosfato (NMP) y pirofosfato (PPi) (Zhang *et al.*, 2003). Estas proteínas codificadas por el gen *mazG* se encuentran ampliamente distribuidas y conservadas en bacterias y bacteriófagos (Robinson *et al.*, 2007; Bryan *et al.*, 2008, Lu *et al.*, 2010).

La proteína MazG de *Escherichia coli* (*E. coli*) se ha cristalizado (Lee *et al.*, 2008) como un monómero de 10 α -hélices divididas en dos dominios –C-terminal y N-terminal– de cinco α -hélices cada una, unidas por un *linker* (Figura 1A). Los dos dominios se representan como estructuras globulares entrelazadas que dan una forma globular a la proteína

completa. En la estructura cristalina a partir de *E. coli* se identificaron 4 potenciales sitios activos, con motivos EEXX(E/D) (Lee *et al.*, 2008). Cada dominio contiene dos de los sitios activos, entre las hélices $\alpha 2$ y $\alpha 3$ del dominio N-terminal, y entre $\alpha 7$ y $\alpha 8$ del C-terminal (figura 1B).

A)



B)

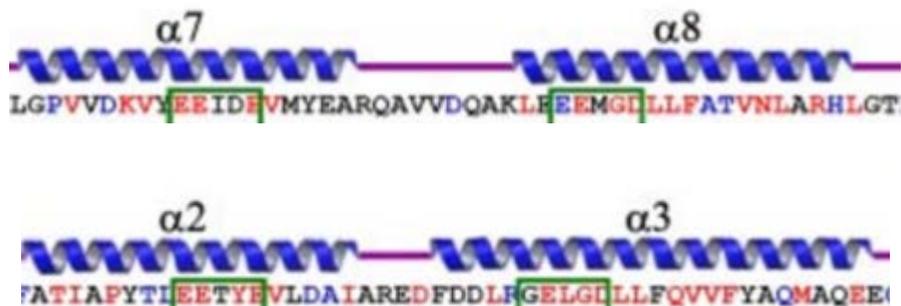


Figura 1. Estructura cristalina de MazG-*E. coli*. A) El monómero de MazG está compuesto por dos dominios, C-terminal y N-terminal, conectados por un *linker* (azul). La estructura está compuesta principalmente de 10 α -hélices enumeradas. B) Secuencia aminoacídica de las cadenas donde se localizan los motivos EEXX(E/D), entre las hélices $\alpha 2$ - $\alpha 3$ y $\alpha 7$ - $\alpha 8$.

A pesar de que MazG tiene potencial de actividad NTP-PPasa en ambos dominios, sólo se ha demostrado actividad catalítica en el dominio C-terminal (Lee *et al.*, 2008). Interesantemente, en otras bacterias MazG contiene sólo un dominio o dos dominios unidos a otros dominios con función desconocida (Lu *et al.*, 2010; Goncalves *et al.*, 2011). Es por esto que algunos autores han propuesto una clasificación de MazG en diferentes géneros bacterianos. Esta clasificación consta de cuatro grupos (Tabla 1) (Lu *et al.*, 2010).

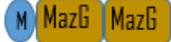
Tipo	Organización de dominio	Phylum (ocurrencia)	Caracterizado en: (bacteria)	Papel fisiológico
I		Distribución amplia	<i>Vibrio Sp.</i>	N.A
II		Actinobacteria (45%)	<i>M. Tuberculosis</i>	Respuesta estrés oxidativo
		Actinobacteria (35%)	<i>M. Smegmatis</i> N.A	N.A
III		Bacteroidetes (86%)	N.A	N.A
		Proteo-bacteria (80%) Thermotogae (100%)	<i>E. Coli</i> (<i>P. aeruginosa</i>) <i>T. Maritima</i>	Regulación ppGpp ----- N.A
IV		Firmicutes (50%)	N.A	N.A

Tabla 1. Clasificación de las proteínas tipo MazG. Las proteínas MazG fueron seleccionadas de 832 especies mediante un análisis de homología de secuencia a nivel de aminoácidos, y la asociación de dominios conservados. Los dominios azules NC corresponden a una función desconocida, el dominio M se refiere a una metilasa. Tomado y modificado de Lu *et al* (2009).

Existen pocos datos de la función fisiológica de MazG. En *Mycobacterium tuberculosis*, MazG funciona como un anti-mutador capaz de hidrolizar dNTPs no canónicos, en particular al 5-OH-dCTP (hidroxi-desoxicitidina 5´trifosfato) producto de estrés oxidativo, ya que estos pueden incorporarse al DNA generando mutaciones nocivas para la bacteria (Lu-LD *et al.*, 2010, 2013). En *E. coli* MazG disminuye los niveles de ppGpp, la molécula efectora del *stringent response*. Este efecto evita la muerte celular bajo condiciones de estrés (Gross *et al.*, 2006).

1.3 RESPUESTA ESTRICTA O *STRINGENT RESPONSE*

El *stringent response* es un mecanismo de regulación desencadenado por privación de nutrientes (aminoácidos, carbono, nitrógeno y fosfatos) (Lazzarini & Cashel, 1971, Dabrowska *et al.*, 2006). A nivel metabólico, la respuesta se caracteriza por el aumento de las moléculas efectoras guanosina tetrafosfato (ppGpp) y guanosina pentafofosfato (pppGpp), formas inusuales de los nucleósidos de guanosina (Cashel, 1969).

Las proteínas RelA y SpoT son las responsables de la síntesis de ppGpp y se han identificado homólogos de los genes correspondientes en una gran variedad de especies bacterianas y de plantas (Kasai *et al.*, 2002; Battesti & Bouveret 2009; Ochi *et al.*, 2012).

RelA es una proteína de unión a ribosoma que cataliza la transferencia de un pirofosfato a la posición 3´OH de la ribosa de GDP/GTP, a partir del ATP, en una reacción mediada por la presencia de Mg^{2+} , produciendo ppGpp (Cashel, 1974). RelA se activa cuando los tRNAs (RNA de transferencia) no cargados superan en cantidad a los tRNAs cargados (condición generada por falta de aminoácidos), propiciando que un tRNA no cargado interactúe con el sitio A del ribosoma, ocasionando que RelA sea reclutada y activada generando así pppGpp (Wendrich *et al.*, 2002). Posteriormente, el pppGpp sintetizado por RelA es usado como sustrato por GppA, una pirofosfohidrolasa que cataliza la conversión de pppGpp a ppGpp (Mechold, *et al.*, 2013). Por otro lado se cuenta con la participación del efector SpoT, una proteína bifuncional que tiene la capacidad de hidrolizar y de sintetizar ppGpp (Boer *et al.*, 1977). El mecanismo de acción de SpoT no se ha caracterizado

completamente, aunque se sabe que es una proteína citoplasmática encargada de mantener los niveles basales de ppGpp durante la fase exponencial (Murray & Bremer, 1996). Estas dos enzimas responden a diferentes estímulos ambientales. Mientras que la falta de aminoácidos activa la función de RelA pero no de SpoT. Esta última es activada por la falta de fuentes de carbono, fosfatos, hierro y lípidos (Seyfzadeh *et al.*, 1993). De esta forma *relA* y *spoT* regulan los niveles de ppGpp (Figura 2). En cualquiera de los casos, el incremento de la concentración de ppGpp genera una drástica disminución de la síntesis del rRNA (RNA ribosomal) y RNAt, generando un estado de emergencia cuya consecuencia es un cambio global en el metabolismo de la bacteria (Donini, 1972).

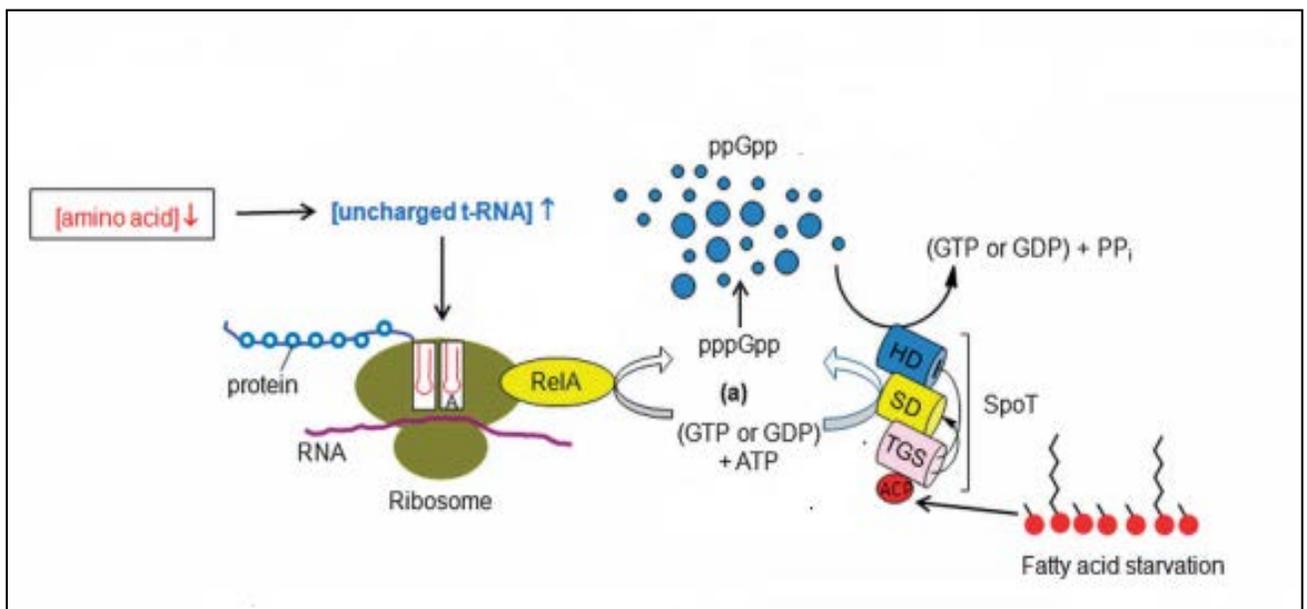


Figura 2. Síntesis de ppGpp. La falta de aminoácidos incrementan la concentración de tRNA no cargados, los cuales interaccionan en el sitio A del ribosoma, propiciando el reclutamiento y activación de RelA. SpoT presenta doble función: síntesis e hidrólisis de ppGpp desde el citoplasma. Cuando los aminoácidos están disponibles, (p) ppGpp se degrada por el dominio hidrolasa (HD) de SpoT. Durante la inanición de ácidos grasos, la proteína portadora de acilo (ACP) se une al dominio TGS y activa alostéricamente a SpoT. El dominio sintetasa (SD) es el responsable de la síntesis de ppGpp. Tomado y modificado de Dympi *et al.*, (2013).

1.4 Efecto de ppGpp en la expresión génica.

Se ha reportado que ppGpp regula procesos importantes como crecimiento, estrés y sobrevivencia (Vikas *et al.*, 2006; Potrikus & Cashel 2008). Reportes en bacterias patógenas como *Vibrio cholera* y *Salmonella*, así como patógenas oportunistas como *Legionella* y *Pseudomonas* han demostrado que ppGpp también regula la virulencia (Bachman & Swanson, 2001; Erickson, *et al.*, 2004). Se sabe que el aumento en los niveles basales de ppGpp inhibe rápidamente el crecimiento, así como la síntesis de proteínas en la fase exponencial (Svitil *et al.*, 1993; Ferullo & Lovett, 2008).

El mecanismo a través del cual ppGpp regula diversas funciones fisiológicas es mediante su unión a la subunidad β de la RNAPol (RNA polimerasa) actuando como un regulador alostérico cambiando la afinidad de la RNAPol hacia diversos genes (Chatterji *et al.*, 1998; Touloukhonov *et al.*, 2001). En conjunto con ppGpp, la proteína reguladora DKsa, codificada por el gen homónimo, se une a la RNAPol en sitios opuestos y desestabilizan su afinidad hacia diversos promotores (Tagami *et al.*, 2010; Lennon *et al.*, 2012). La regulación puede ser negativa sobre aquellos promotores relacionados con inhibición de la transcripción, a partir de la alteración de la síntesis del RNA estable, proteínas ribosomales, ácidos grasos, etc. La regulación positiva se da en promotores implicados en la síntesis de aminoácidos entre otros (Lemke *et al.*, 2009, MyL *et al.*, 2013) (Figura 3). Además de su afinidad por la RNAPol, ppGpp puede interactuar con el factor de iniciación traduccional IF2, lo cual inhibe la formación del complejo de iniciación y, así evita la generación de un di-peptido, que es el paso inicial de la traducción (Milon *et al.*, 2006).

En conjunto, las interacciones de ppGpp con diversas proteínas celulares, generan cambios fisiológicos complejos en las bacterias, los cuales difieren de una especie a otra (Boutte & Crosson 2013). Esto provoca que la función de proteínas asociadas a su regulación no pueda ser extrapolada entre géneros y, en la mayoría de los casos, es necesario evaluar la función de proteínas homólogas en diferentes géneros bacterianos.

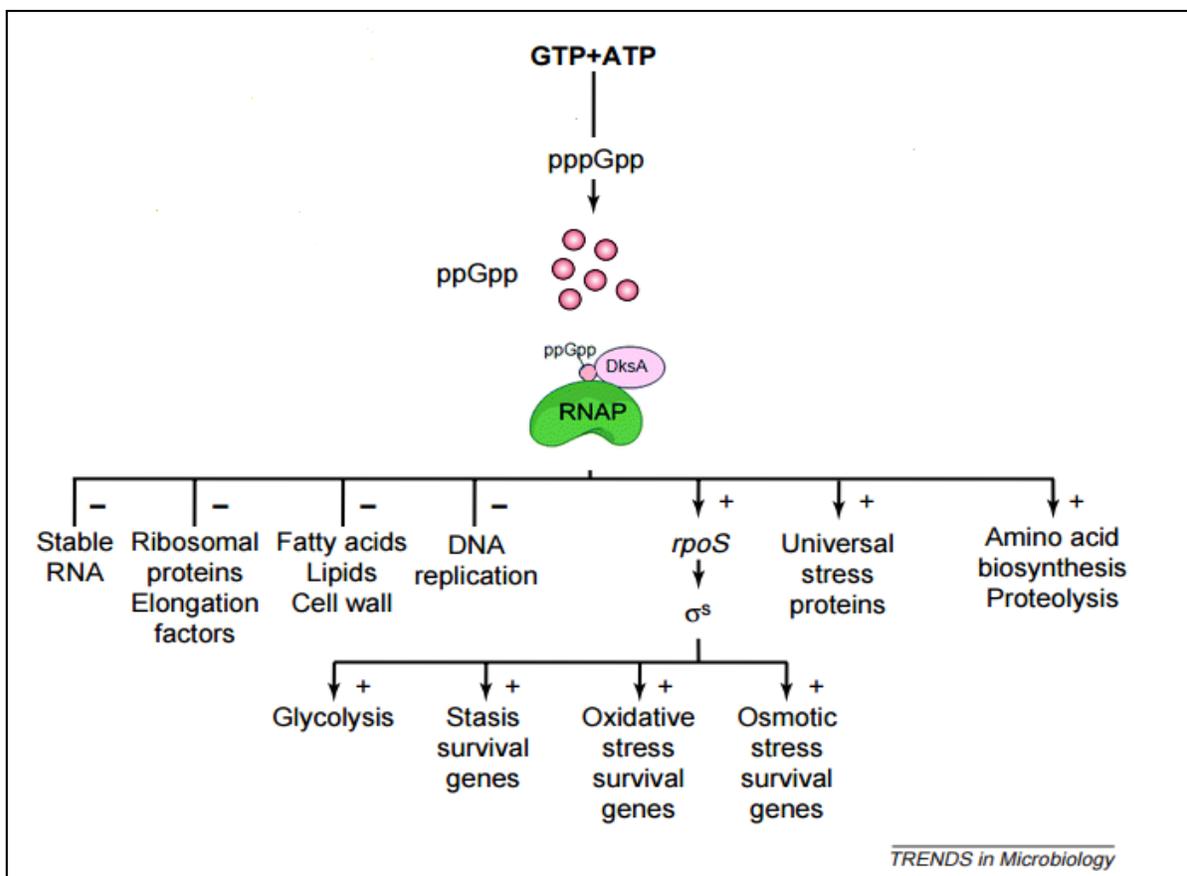


Figura 3. Efecto de ppGpp en la regulación génica de *E. coli*. Una vez que ppGpp se sintetiza a partir de GTP y ATP, esta molécula se une a la RNAPol y, junto con DksA, regula la expresión de genes. Tomado y modificado de Magnusson *et al.* (2005).

1.5 Stringent response y MazG en *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a las gamma-proteobacterias y a la familia *Pseudomonodaceae*. Se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, como agua, aceite, plantas, aguas residuales, así como en insectos y animales incluyendo al humano (Hardalo & Edberg 1997). Todas las cepas de *P. aeruginosa* son potencialmente patógenas para el hombre. No obstante se han obtenido aislados de esta bacteria en un 2% y 8% en heces de personas sanas (Shooter, 1971) ya que el contacto con esta bacteria no es una amenaza para la salud por tratarse de un patógeno oportunista (Kreger *et al.*, 1980).

Una de las características más sobresalientes de esta bacteria es su remarcable versatilidad nutricional que le permite colonizar una gran diversidad de nichos, inclusive con escasos nutrientes; considerándose un organismo ubicuo (Stanier RY *et al.*, 1966; Holloway, 1969). La versatilidad de *P. aeruginosa* ha despertado el interés sobre los mecanismos relacionados a su metabolismo y capacidad de sobrevivencia en condiciones adversas. Tal es el caso de la *stringent response*.

Aunque la *stringent response* ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*, también ha sido observada en *P. aeruginosa* (Viducic *et al.*, 2006; Battesti & Bouveret 2009). Como se ha mencionado, las proteínas que controlan esta respuesta son muy conservadas en diversas especies bacterianas, incluyendo *P. aeruginosa*, la cual cuenta con un gen homólogo a *relA* capaz de sintetizar ppGpp bajo limitación de aminoácidos y activar la *stringent response* (Greenway & England, 1999). A pesar de que ésta respuesta es muy conservada, recientes trabajos han demostrado que existe una diversidad en las señales de activación y en los mecanismos que regulan las proteínas involucradas en este fenómeno desde diferentes hábitats y diferentes bacterias (Boutte & Crosson 2013).

En *P. aeruginosa* se ha demostrado que la activación de *relA* genera un cambio metabólico en la bacteria incluyendo la activación del gen *rpoS* que codifica el factor σ^s vía ppGpp, afectando de esta manera factores del fenómeno conocido como *quórum sensing* (Erickson *et al.*, 2004). Por otro lado, diversos reportes han demostrado que la acumulación de ppGpp afecta directa e indirectamente la regulación de factores de virulencia importantes para la colonización y sobrevivencia de *P. aeruginosa*, como la formación de *biofilm* (De la fuente *et al.*, 2014), resistencia a antibióticos e incluso su capacidad infectiva (Nquyen *et al.*, 2011; Vogt *et al.*, 2011).

II. ANTECEDENTES:

MazG se ha descrito como una pirofosfohidrolasa capaz de hidrolizar los ocho ribo- y desoxirribonucleósidos trifosfato canónicos (Moroz *et al.*, 2005). Sin embargo, su función fisiológica parece variar en cada especie bacteriana. Los primeros estudios de MazG fueron realizados en *E. coli* en el 2002, donde mediante el sistema del doble híbrido se demostró la interacción de esta proteína con Era, una GTPasa esencial altamente conservada e implicada en diversas funciones celulares, como: la regulación de la apoptosis, viabilidad y posiblemente en la regulación del ciclo celular (Zhang & Inouye, 2002). No obstante, aún se desconoce la relación fisiológica que tiene esta interacción. En esta misma especie, Gross, y colaboradores (2006), determinaron que EcMazG actúa como un regulador de la muerte celular programada, bajo condiciones de estrés por falta de aminoácidos, disminuyendo la concentración de ppGpp intracelular permitiendo la expresión de la antitoxina MazE, la cual contrarresta la toxicidad de la proteína MazF. Cabe señalar que en *E. coli* los genes de *mazG*, *relA* y del sistema toxina-antitoxina, *mazE* y *mazF*, se localizan dentro del mismo operón (Gross *et al.*, 2006).

En otras bacterias como *T. marítima*, se ha demostrado que TmMazG tiene actividad pirofosfohidrolasa y pirofosfatasa hidrolizando los 8 ribo- y deoxirribonucleosidos en su correspondiente PPi y subsecuentemente hidrolizando el PPi resultante en Pi con ambas funciones coordinadas (Zhang *et al.*, 2003). En *M. tuberculosis* la proteína MazG-Like actúa removiendo los nucleótidos no canónicos producidos por estrés oxidativo (Lu *et al.*, 2010, 2013).

Estudios previos en *E. coli*, mediante cristalización y mutaciones puntuales determinaron el sitio activo de MazG con los motivos EEXXE/D, sin embargo en esta bacteria solo se demostró actividad NTP-PPasa en el dominio C-terminal. Estos motivos han servido para identificar proteínas MazG-Like en otras especies bacterianas e incluso en bacteriófagos.

En nuestro grupo de trabajo, Arenas-Luna (Tesis de maestría, 2014) demostró la actividad pirofosfohidrolasa *in vitro*, mediante cromatografía de capa fina, de una proteína MazG-like, presente en el bacteriófago PaMx25 que infecta a *P. aeruginosa*. Sin embargo, el efecto de esta proteína sobre su hospedero, así como su función en PaMx25, se desconoce.

Para conocer el papel de esta proteína en PaMx25 es necesario evaluar la función de su homólogo en *P. aeruginosa*.

Gracias a la obtención y anotación de secuencias de diversas cepas de *P. aeruginosa*, ha sido posible identificar un gen homólogo a *mazG*. Mediante análisis de secuencias se encontró que este gen, así como el gen de *relA*, tienen una alta identidad en todas las cepas bacterianas de *P. aeruginosa*. Sin embargo aún no hay datos de su posible función en esta bacteria.

III. JUSTIFICACIÓN:

MazG, además de ser una proteína muy conservada y ampliamente distribuida en especies bacterianas, parece desempeñar diversos roles celulares que aún no han sido esclarecidos en su totalidad. En *P. aeruginosa* se ha encontrado la presencia del gen *mazG* codificando una proteína MazG. Esta proteína presentó homología a nivel estructural, y aminoacídica con respecto a MazG de *E. coli* y *T. marítima*. Sin embargo, hasta el momento no hay reportes experimentales de la función de MazG en *P. aeruginosa*. Siendo *P. aeruginosa* un patógeno importante, con habilidades de sobrevivencia en condiciones adversas. Resulta interesante e importante descifrar el posible papel biológico que tiene esta proteína tan versátil en *P. aeruginosa* para comprender los mecanismos de sobrevivencia de este patógeno.

IV. HIPÓTESIS

Si *P. aeruginosa* y *E. coli* son miembros de la clase gamma-proteo bacterias y presentan similitud a nivel nucleotídico y estructural de la proteína MazG, entonces esta proteína en *P. aeruginosa* podría estar relacionada con la vía de la *stringent response*, y con la molécula efectora ppGpp cuando se encuentra bajo condiciones de inanición de aminoácidos.

V. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto *in vivo* de PsmazG sobre la vía del fenómeno conocido como *stringent response*.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Analizar bioinformáticamente a nivel de estructura la proteína MazG, y el contexto genómico de *mazG* en *P. aeruginosa* PA14
- 2.- Evaluar el efecto de privación de serina sobre los niveles de expresión del mensajero de *mazG* de *P. aeruginosa* PA14
- 3.- Determinar la sobrevivencia celular de una cepa *P. aeruginosa* PAO1 mutante en *mazG* bajo condiciones de inanición de serina.
- 4.- Y evaluar, cualitativa y cuantitativamente, los niveles de ppGpp en células silvestre y mutante en PsmazG.

VI. METODOLOGIA

Material biológico utilizado.

Tabla 2. Cepas y plásmidos

Cepas	Características	Referencia
<i>P. aeruginosa</i> PA14	Silvestre	Davidson <i>et al.</i> , 2015
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Silvestre	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PW2696	<i>relA_lacZbp03q1C11</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PW2699	<i>mazG_phoAwp02q1H02</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PW2700	<i>mazG_phoAwp02q4F08</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>E. coli</i> DH5 α	Silvestre	
Plásmidos		
pHERD30T	Resistencia: Gentamicina	EU603326
	<i>Escherichia-Pseudomonas</i> , Promotor pBAD, Regulador: araC, porción α del gen lacZ. 5200 pb.	
pJET1.2	B-lactámicos	Thermo Fisher

*A continuación se presentan los *primers* usados.

Tabla 3. Primers usados

Nombre del oligo	Secuencia 5'→ 3'	Amplicón tamaño	Tm °C	Plantilla
1.F- <i>mazG</i> msj	5' <i>tcgtgctcgtgagatgttggg</i> 3'	280 pb	62.5	PA14(DNA)
1.R- <i>mazG</i> msj	5' <i>attactagcgttccgacttcaac</i> 3'		65.0	
2.-F- <i>relA</i> msj	5' <i>atcgtcggctacatcacgct</i> 3'	300 pb	59.0	PA14(DNA)
2.-R- <i>relA</i> msj	5' <i>cgatggtcagttgcatggc</i> 3'		62.0	
3.-5.-F-16S	5' <i>tcgtgctcgtgagatgttggg</i> 3'	290 pb	62.0	PA14(DNA)
3.-6.-R-16S	5' <i>cgatggtcagttgcatggc</i> 3'		62.0	
4.-.-F- <i>mazGc</i>	5' ggccatgg -gacgactcgcgacactgct 3'	831 pb	56.0	PA14(DNA)
4.-.-R- <i>mazGc</i>	5' ggccataatggcc -tttccattaacagccgg 3'		54.0	
5.-F-pJET	5'-cgactcactatagggagagcggc-3'	930pb	60.0	pJET1.2/ <i>mazG</i>
5.-R-pJET	5'-aagaacatcgatttccatggcag-3'		60.0	
8.-F- <i>mazGc</i>	5' <i>atgggatctgataagaattcga</i> 3'	291pb	64.70	PW2699
8.-R- <i>PhoA</i>	5' <i>gcagatgaccgacaaagcca</i> 3'	526pb	62.24	PW2700
F- <i>relA</i>	5' <i>atggtacaggtgagagcgca</i> 3'	1897pb	66.2	
Rv- <i>ISlacZ</i>	5' <i>tgtcgtccacaaggtaaacag</i> 3'		64.5	PW2696

6.1 Análisis bioinformático

6.1.1 Análisis comparativo *in silico* de las proteínas MazG de *P. aeruginosa* versus *E. coli*.

Predicción de estructura por plataforma *I-Tasser* y análisis con *software* PYMOL. Previamente se identificó el gen de *mazG* en la cepa PA14 de *P. aeruginosa* en el *GenBank*: AE004091.2. Las secuencias aminoacídicas se modelaron con el servidor *I-TASSER* para posteriormente hacer un análisis comparativo mediante el programa PYMOL v1.6.

6.1.2 Alineamiento de secuencias y análisis comparativo del locus *mazG-relA*.

Las secuencias del operón que incluye los genes *relA* y *mazG* de las cepas *Escherichia coli* K12, (GenBank: AE004091.2), *Thermotoga marítima*_MSB8 (GenBank: AE000512.1), *Solfolubus solfataricus*_P2 (GenBank: AE006641.1), *Mycobacterium tuberculosis* (GenBank: AL123456.3), y *Pseudomonas aeruginosa* (GenBank: AE004091.2) fueron alineados usando *software* ClustalX2.

6.2 Análisis del nivel de transcripción de *mazG* en condición de estrés.

6.2.1 Estandarización de inducción de estrés.

A partir de un cultivo de toda la noche de PA14 en medio mínimo MOPS 1X suplementado, se hizo una dilución 1:100 en 50 mL de MOPS 1X suplementado fresco (ver anexo-métodos). Se separaron los cultivos en tres y se dejaron crecer a 37°C hasta una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.2. En este punto se agregó SHX (hidroxamato de serina) en 3 concentraciones diferentes: 100µg/mL, 250µg/mL, y 400µg/ mL, un cultivo sin SHX funcionó como control. Se monitoreó la densidad óptica y se hicieron diluciones en intervalos de dos horas por un tiempo total de 11 horas. Se plaquearon en cajas de LB las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} ; y se incubaron toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se contaron las colonias obtenidas en cada dilución para determinar el número de UFC/mL en cada condición. Los datos obtenidos se graficaron.

6.2.2 Extracción de RNA a partir de cultivos con y sin SHX.

A partir de un cultivo de toda la noche de PA14, se hizo una dilución 1:100 en medio mínimo MOPS fresco, y se dejó crecer a 37°C hasta una $OD_{600nm} = 0.2$. Posteriormente, el cultivo se separó en dos matraces, y se agregó 250µg/mL de SHX al matraz inducido para estrés, mientras que el otro se mantuvo sin SHX, a 37°C con agitación. Se monitorearon cada dos horas y se recolectaron muestras en tubos de 1.5 mL (con un volumen equivalente a una $OD_{600nm}=1.2$). A cada muestra recolectada se agregaron 300µg/mL de rifampicina y 300µg/mL de cloranfenicol, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 1' a 4°C y se decantó el sobrenadante. Una vez recolectadas todas las muestras se guardaron a -70 °C para extraer RNA total.

Extracción de RNA bacteriano

Se resuspendió la pastilla de PA14 en 500 μ L de LB y 500 μ L de etanol absoluto, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular en 600 μ L de solución de lisis (anexo) y 600 μ L de fenol ácido.

Se incubaron las células a 65°C por 10 minutos agitando por inversión cada minuto y posteriormente se volvieron a centrifugar a 5000 rpm 10 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa de cada tubo y se agregaron 600 μ L de fenol ácido, se mezcló suavemente y centrifugó a 5000 rpm 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se tomó la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a 5000 rpm 10 minutos a 4°C. Se tomó la fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol, se agitó por inversión e incubó 20 minutos a T.A (temperatura ambiente). Posteriormente se volvió a centrifugar a 14,000 rpm, 20 minutos a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla 10 minutos a T.A sobre un papel absorbente. Las muestras, ya secas, se resuspendieron en 350 μ L de agua, 49 μ L de acetato de sodio 3M pH 5.2, y 1 mL de etanol absoluto, incubando 2 horas a -70 °C (puede ser toda la noche).

Al siguiente día se centrifugaron las muestras a 15,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm a 10 minutos a T.A, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la muestra en 25 μ L de agua DEPC. Finalmente se hicieron alícuotas de uso diario y otras de reserva y se almacenaron las muestras a -70°C hasta su uso.

6.2.3 Determinación de la concentración e integridad de RNA total.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría mediante el uso de *Nanodrop*, considerando la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} para conocer la pureza del RNA, tomando un rango de 1.9-2.0 como aceptable. Para verificar la integridad del extracto de RNA se corrió 1 μ g de cada muestra en un gel de agarosa 1% con buffer TBE 1X.

6.2.4 Tratamiento con DNAsa

Para eliminar DNA del extracto de RNA se usó el kit *DNase I, RNase-free* (Thermo Fisher). Los reactivos se agregaron en el siguiente orden:

Reactivo	Concentración
ARN	1 μ g
Buffer 10X	1 μ L
DNAsa	1 μ L
Agua DEPC	7 μ L
Total	10 μ L

Se incubó la mezcla 30 minutos a 37°C, se agregó 1 μ L de EDTA 50mM y se dejó incubar 10 minutos a 65°C, para inactivar la enzima.

6.2.5 Obtención de DNA complementario (cDNA) por retrotranscripción

Para la obtención de cDNA se utilizó el *kit iScript™* reverse transcriptasa (*BioRad*)

Los reactivos se agregaron en el siguiente orden:

Reactivos	Volumen
Agua libre de nucleasas	3µL
<i>Random primer</i>	2 µL
RNA (1pg-1µgde RNA total)	10 µL (tratado con DNAsa)

Se incubó a 65°C por 5 minutos y se pasó inmediatamente a hielo por 2 minutos y se adicionaron 4 µL de *iscript select reaction mix* y 1 µL de transcriptasa reversa.

Se corrieron las siguientes condiciones en el termociclador:

Tiempo	Temperatura
5 minutos	25°C
30 minutos	42°C
5 minutos	85°C
Almacenar	-20°C

6.2.6 Validación de ensayos para expresión génica de *mazG* con SYBR Green.

El proceso de validación tiene la finalidad de probar que los productos de PCR a medir (gen endógeno y gen problema) amplifican con la misma eficiencia, esto es conocido como rango dinámico. Para determinar esto se realizaron ampliificaciones con diferentes cantidades de cDNA (diluciones seriales). Las cantidades de cDNA de cada muestra fueron 0.025 μL , 0.5 μL , 1 μL , 1.5 μL , para realizar las diluciones que se amplificaron por PCR cuantitativa (qPCR) obteniendo los valores de Ct, el cual es proporcional a la cantidad del templado. El equipo usado fue un 7500 de *applied biosystem*, y el kit máxima SYBR Green de *Thermo scientific*. Una vez terminada la qPCR se analizaron los datos con el *software* 7500 v2.0.6. Los cálculos de la reacción de qPCR se muestran a continuación.

componentes	10 μL rxn
<i>Master mix 2X</i>	5 μL
<i>Primer forward 10 μM</i>	0.3 μL
<i>Primer Reverse 10 μM</i>	0.3 μL
cDNA	2.0 μL
Agua libre de nucleasa	2.4 μL

Las condiciones utilizadas para la qPCR fueron las siguientes.

Paso	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	Tiempo
Pre-tratamiento UDG	50	2 min
Desnaturalización inicial	95	10 min
Desnaturalización	95	15 s
Alineamiento	60	30 s
Extensión	72	30 s

} 40 ciclos

Para evaluar la similitud en las eficiencias de amplificación de cada gen, se hizo un curva del rango dinámico para el gen blanco y el gen endógeno, y se obtuvo el ΔCt (Ct blanco –

Ct control endógeno) para cada uno de los puntos. Este ΔCt se graficó con respecto a la concentración de cada uno de los puntos (anexo 3). De la línea generada se obtuvo una pendiente, la cual debe ser menor o igual a 0.1 (anexo 4) para validar el uso del método $\Delta\Delta Ct$, que requiere que ambos genes tengan eficiencias de amplificación similares.

Una vez validado el rango dinámico se procedió a realizar el ensayo de cuantificación relativa del nivel de expresión de *mazG* usando el método $\Delta\Delta Ct$. Para esto se utilizaron las muestras obtenidas en el punto 5.5.2. Los datos de Ct obtenidos para cada muestra se evaluaron aplicando el método $\Delta\Delta Ct$ (Tabla-anexo 2), los resultados fueron analizados y graficados directamente por el *software* 7500 v2.0.6.

6.3 Clonación de *mazG* en el vector de expresión pHERD30T.

El plásmido pHERD30T fue propagado en la cepa *E. coli* DH5 α para su extracción y purificación. Sus características se describen en la tabla 2. Para la clonación sitio dirigida el plásmido fue restringido por las enzimas *Nco*1 y *Sfi*1. Por su parte el gen *mazG*, fue amplificado usando como molde DNA de PA14, con los *primers* N° 4 mostrados en la tabla 3. El producto de PCR fue sub-clonado en pJET1.2 e identificado con los *primers* correspondientes a este vector (tabla 3). El mapa de este vector (figura 4) y las etapas del proceso de clonación en pHERD30T, se describen a continuación.

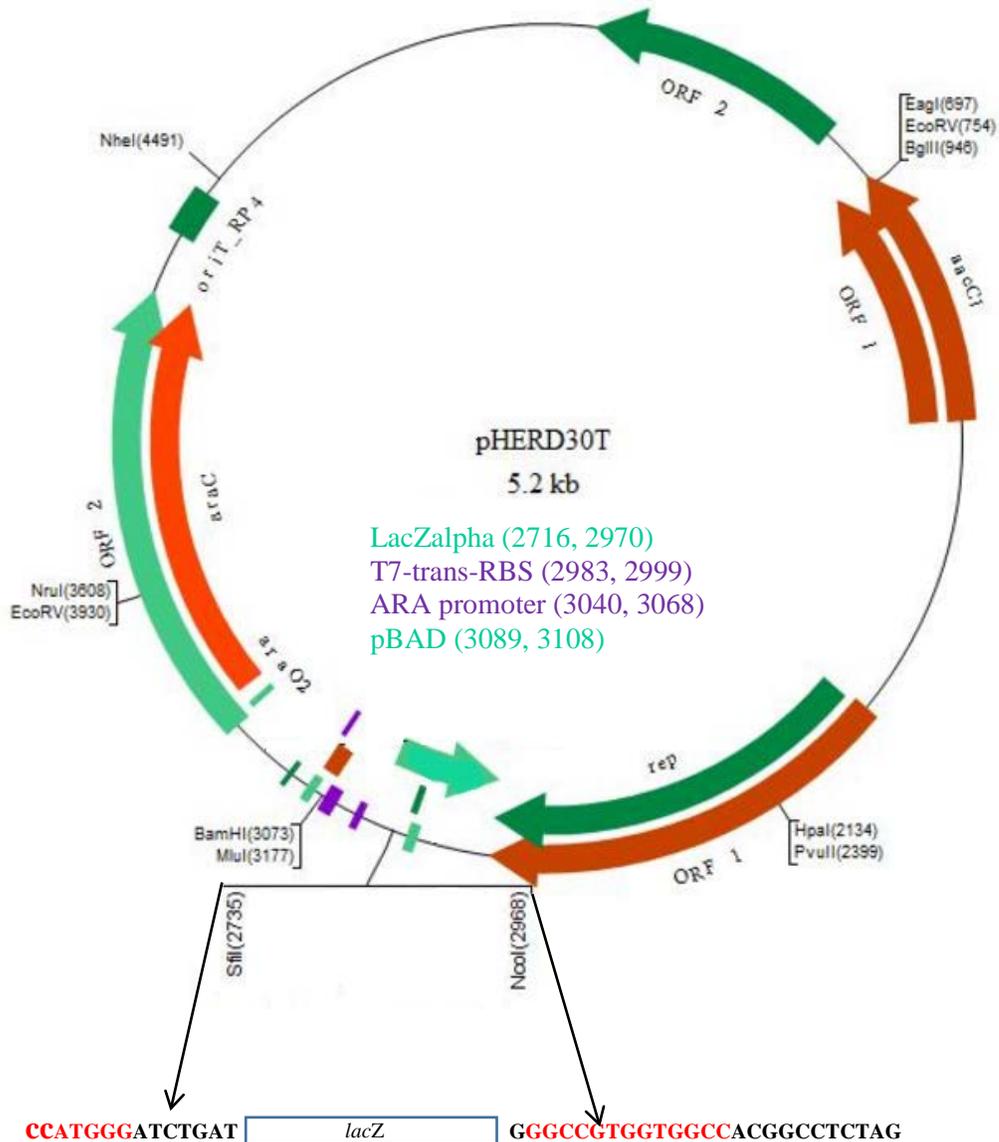


Figura 4. Mapa del vector pHER30T. Las flechas de colores corresponden a los ORF nombrados en la flecha paralela. En el centro se muestra la posición dentro del vector de gen *lacZ*alpha, el promotor ARA, el represor pBAD, y el sitio de unión a ribosoma. Los colores de cada uno de estos sitios están representados en el sitio de clonación múltiple. En la parte inferior se muestran en rojo las secuencias reconocidas por las enzimas *sfi*I y *Nco*I en el gen *lacZ*. Tomado y modificado de Dongru Qiu *et al.*, (2008).

6.3.1 Extracción de DNA bacteriano.

Se tomaron 1.5 mL de un cultivo saturado de PA14 y se cosecharon las células a 12,000 rpm por 3 minutos. La pastilla se resuspendió en 200 μ L de *buffer* de lisis (ver anexo) con vigoroso pipeteo y se agregaron 66 μ L de NaCl 5M y se agitó por inversión. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante claro fue trasferido a un nuevo tubo y se agregó un volumen igual de cloroformo y se invirtió unas 50 veces hasta que se formó una solución lechosa. Se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 3 minutos y se tomó el sobrenadante al cual se le agregó 1 mL de alcohol absoluto (GBM).

Una vez precipitado el DNA se hicieron 2 lavados con etanol al 70%. Y finalmente el DNA se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas, listo para su uso o para almacenar a -70°C.

6.3.2 Amplificación por PCR de *mazG* de PA14.

Para amplificar el gen de *mazG* a partir de DNA de PA14 se utilizó la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo scientific), los *primers* No. 4 (F-*mazGc*, R-*mazGc*) de la tabla 3. Las condiciones de amplificación usadas fueron las siguientes:

Reactivo	Concentración	Volumen (μ L)
Agua	-	3.3
Buffer 5X Phusión GC	1X	2
dNTPs (10 mM)	200 μ M c/u	0.8
Oligos Fw y Rv (10mM)	0.2 μ M c/u	0.4
Phusión DNA polimerasa	0.02 U/ μ L	0.1
DNA molde	20 ng/ μ L	1
Betaina 5M	1M	2

Y las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes:

Condición	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	3 min
Desnaturalización	98°C	30 s
Alineamiento	50°C	30 s
Extensión	72°C	30 s
Extensión final	72°C	10 min

} 35 ciclos

6.3.3 Clonación en el vector de transición.

Se clonó el producto de PCR en el vector de transición pJET1.2., siguiendo el procedimiento descrito en el inserto del kit *CloneJET PCR Cloning*:

Reacción de ligación de *mazG* en pJET1.2

Componente	Volumen
2X buffer de reacción	10 µL
Producto de PCR no purificado	1 µL
pJET1.2 (50ng/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasa	17 µL
T4 DNA ligasa	1 µL

Procedimiento:

Se incubó la mezcla de ligación a temperatura ambiente (22°C) por 5 minutos. De la reacción anterior se usaron 10µL para transformar 100 µL de células quimio-competentes *E. coli* DH5α. Posteriormente se incubó en hielo por 30 minutos se dio un choque térmico de 3 minutos a 42°C. Después del choque térmico las células se pusieron en hielo 2 minutos para después agregarles 1 mL de LB e incubar para su recuperación a 37°C con 200 rpm de agitación por 2 horas. Posterior a la recuperación se centrifugaron 10,000 rpm 2 minutos. Y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 100 µL de LB y se espatuló sobre cajas de ampicilina [100 µg/mL] y se incubaron por 16 horas a 37°C.

6.3.4 Selección de clones:

Se seleccionaron 10 colonias que fueron crecidas toda la noche a 37°C en agitación de 200 rpm en 5 mL de LB con [100 µg/mL] de ampicilina. Posteriormente, se cosecharon a 10,000 rpm por 5 minutos y mediante el *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* se extrajo DNA plasmídico y mediante restricción con las enzimas *Nco1* y *Sfi1* se verificó la presencia del inserto de *mazG* en pJET1.2. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo a 37°C por 12 horas. Las condiciones de restricción se presentan a continuación.

Reactivo	Concentración	Volumen
Agua	-	15 µL
Buffer <i>CutSmart</i> 10X	1X	3 µL
<i>Nco1</i>	1U/ µL c/u	1 µL
<i>Sfi1</i>	1U/ µL c/u	1 µL
DNA	5 µg	10µL

6.3.5 Sub-clonación en el vector de expresión pHERD30T.

Para clonar el gen de *mazG* en el vector pHERD30T se usaron las enzimas *Nco1* y *Sfi1* para cortar el vector y el gen insertado en el gen de transición pJET1.2.

Una vez terminada la restricción se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 100 volts, por 1 hora y media, posteriormente se cortaron las bandas correspondientes al inserto y al vector, y se purificaron con el *kit wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*. Se cuantificaron por *Nano-Drop*. Para la reacción de ligación se colocaron 150 ng de vector con 150 ng de inserto agregando en el siguiente orden:

Reactivo	Cantidad
Agua	7 μ L
Vector	5 μ L
inserto	5 μ L
Buffer	2 μ L
T4 ligase	1 μ L

La reacción se incubó a 16°C por 16 horas y, posteriormente, se transformó la reacción en 100 μ L de células DH5 α quimio-competentes (anexo). Una vez transformada la ligación se seleccionaron candidatas por resistencia a gentamicina, y éstas se confirmaron por PCR. De una de las candidatas se extrajo el plásmido pHERD30T-*mazG* con el *kit wizard® Plus SV minipreps DNA purification System* y se electroporó a la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* previamente tratada para ser electro-competente con 3 lavados con sacarosa 300mM. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 25 μ FD, 200 Ω , y 2.2 kV usando el equipo *Gene Pulser™* de *BioRad*.

6.4. Análisis de expresión de *mazG* en el vector pHERD30T.

6.4.1 Inducción

Para evaluar la expresión del gen clonado se siguió una cinética de crecimiento a partir de un cultivo de toda la noche de PAO1 wt y PAO1 previamente transformada con el vector pHERT30T- *mazG*. Se hizo una dilución 1:100 en 30 mL de LB fresco y se incubó a 37°C a 200 rpm, hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4, en este punto se agregó arabinosa a una concentración final de 1mM. Para recolectar muestras tras la inducción se tomó la cantidad correspondiente a una OD_{600nm} = 1.2 en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 13,000 rpm a 4°C por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante después de la centrifugación y se agregaron 200µL de *buffer* de lisis. Las muestras recolectadas se mantuvieron en hielo hasta la obtención de todas. Posteriormente se hirvieron todas las muestras por 5 minutos y se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 15 minutos, se tomó el sobrenadante y se pasó a otro tubo para volver a hervir por otros 5 minutos. Al término de esto se almacenaron las muestras a -20°C hasta su uso.

6.4.2 Preparación de gel de acrilamida

Se preparó un gel SDS-PAGE al 15 %. Los reactivos para la preparación del gen fueron en el siguiente orden.

Separador		Concentrador	
Amortiguador pH 8.8	1.875 mL	Amortiguador pH 8.8	0.562 mL
Acrilamida	3.75 mL	Acrilamida	0.375 mL
Agua	1.875 mL	Agua	1.312 mL
APS 10%	75 µL	APS 10%	30 µL
TEMED	3.75 µL	TEMED	1.5 µL

Una vez montados y polimerizados los geles de acrilamida, se cargaron las muestras. Las condiciones fueron 0.02A, por 1 hora y media. El gel fue teñido con azul de *Coomassie* toda la noche y se destiñó con solución de desteñido (ver anexo) por 3 horas.

6.5 Confirmación de inserción de transposón en cepas PAO1.

Para analizar la función de *mazG in vivo* se solicitaron las cepas mutantes por inserción de transposón en PAO1 de la colección Manoli Lab.

Las cepas contienen los transposones ilustrados en la figura 5 y las posiciones se representan en la siguiente tabla.

# Cepa	Transposón	Gen interrumpido	Posición dentro del gen
PW2696	ISlacZ/hah-tc	<i>relA</i>	1729
PW2699	ISphoA/hah-tc	<i>mazG</i>	145
PW2700	ISphoA/hah-tc	<i>mazG</i>	381

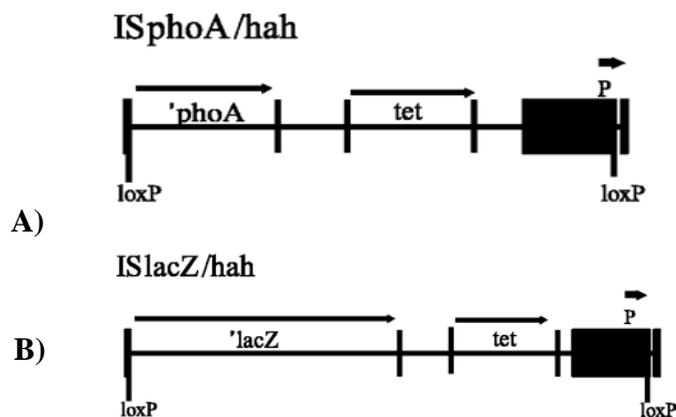


Figura 5. Mapa de los transposones insertados en las mutantes. A) Transposón ISphoA/hah (4.83 kbp) contiene un elemento del transposón Tn5 que genera una fusión con la proteína fosfatasa alcalina si el transposón entra en marco, también contiene el gen de resistencia a tetraciclina, y en los extremos contiene sitios *loxP* que median la recombinación mediante el sistema Cre. B) Transposón ISlacZ/hah (6.16 kbp) que contiene además del gen de resistencia a tetraciclina, y los sitios *loxP* el gen de β -Galactosidasa, el cual puede generar una fusión de acuerdo al sitio de inserción.

6.5.1 Corroboración de la inserción de los transposón en las cepas mutantes

Para la corroboración de la correcta inserción del transposón en las cepas mutantes, se hicieron PCRs, con los *primers* 6, 7 y 8 de la tabla 3. A partir de DNA genómico. Las condiciones se muestran a continuación:

Condiciones de PCR para corroborar la inserción de *mazG*.

Reactivo	Concentración
Buffer (10X)	1X
MgCl ₂ (50mM)	1.25mM
dNTPs (10 mM)	0.2mM
Oligo F (10 mM)	0.2 μM
Oligo R (10 mM)	0.2 μM
<i>DreamTaq DNA Polymerase</i>	0.02 U/μL
DNA (20 ng/ μL)	20 ng/μL
Agua	----

Condiciones de amplificación

Condición	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
Desnaturalización	95°C	30 s
Alineamiento	61°C	30 s
Extensión	72°C	30 s
Extensión final	72°C	10 min

} 35 ciclos

6.6 Cinética de crecimiento y supervivencia de cepas PAO1 wt, PAO1 mutante-*mazG*, con SHX.

Para evaluar el efecto de *mazG* en la supervivencia celular de *P. aeruginosa* bajo condiciones de inanición por falta de aminoácidos se usó SHX a una concentración de 300 µg/mL.

A partir de un cultivo de toda la noche de PAO1 wt, y PAO1 mutante-*mazG* en medio mínimo MOPS IX suplementado. Se hizo una dilución 1:100 en MOPS IX suplementado y se cultivó bajo las siguientes condiciones: 37°C de temperatura, y 200 rpm, hasta alcanzar una $OD_{600nm} = 0.2$. En este punto se agregó SHX para inducir estrés. Cada dos horas fue tomado 1mL de cultivo para medir la OD_{600nm} de cada cepa y se separaron 100µL para hacer diluciones y extender otros 100 µL de las diluciones en cajas de LB-agar por triplicado.

La cinética de crecimiento fue seguida por 10 horas y al término se incubaron las cajas de LB a 37°C toda la noche. Al otro día se contaron las colonias usando la siguiente fórmula:

$$\text{Log UFC} = \frac{\# \text{ Colonias}}{\text{Volumen } \mu\text{L}} \quad \times \quad \text{inverso de la dilución}$$

6.7 Medición de los niveles de ppGpp.

Para medir los niveles de ppGpp se usó el método descrito por Cashel (1994).

Este método se basa en el uso de ácido orto-fosfórico [^{32}P]H₃PO₄, el cual se incorpora *in vivo* a los nucleótidos en un cultivo en medio mínimo MOPS IX suplementado, con bajas o nulas concentraciones de PO₄. Y una separación por cromatografía de capa fina con placas de PEI (polietilenimina) celulosa, de los nucleótidos previamente extraídos con ácido fórmico 13M. Los pasos se describen a continuación:

6.7.1 Marcaje *in vivo*

A partir de un cultivo de las cepas PAO1 silvestre, PAO1 mutante-*mazG* y PAO1 pHERD30T-*mazG* en medio mínimo MOPS 1X suplementado (ver anexo) que contenía KH₂PO₄ 2 mM se hizo una dilución 1:100 en medio MOPS 1X suplementado y libre de KH₂PO₄. Se dejó crecer a 37°C con agitación por media hora (aproximadamente) para llegar a una OD_{600nm} = 0.02-0.08. En este momento se separaron 100 µL del medio y se agregó ácido orto-fosfórico [^{32}P] a [10 µCi/mL] y se restauró la incubación. Los cultivos se dejaron en incubación hasta alcanzar una D.O_{600nm} = 0.2 donde se agregó SHX a una concentración final de 400µg/mL. La D.O se monitoreo en un cultivo sin marca de [^{32}P]. Después de 30 minutos con SHX se recolectaron muestras y se almacenaron a -20°C.

6.7.2 Extracción de Nucleótidos

De cada muestra marcada se tomaron 20 µL y se agregaron a un tubo eppendorf que contenía un volumen igual (20 µL) de ácido fórmico 13M congelado. Posteriormente cada muestra fue sometida a tres ciclos de congelado en hielo seco o nitrógeno líquido y descongelado usando un *termoblot* a 90 °C. Finalmente para bajar los debris celulares se centrifugaron todas las muestras a 14,000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.

6.7.3 Separación cromatográfica

Una vez que fueron centrifugadas todas las muestras se colocaron 5 μ L de cada una en una placa de cromatografía polietilenimina (PEI)-celulosa (previamente marcada con lápiz para indicar el largo de corrida) y se colocó en un contenedor con la fase móvil KH_2PO_4 1.5 M. Se dejaron correr hasta que el frente de migración llegara a la marca establecida en la placa, entonces se dejaron secar sobre papel absorbente unos 10 minutos, para posteriormente exponerlas en un cassette con la pantalla de almacenamiento de fósforo por 20 minutos. Finalmente, se reveló la pantalla con el *scanner thypoon* y las imágenes fueron cuantificadas con el programa *Imagej*. Los patrones de acumulación que sugiere el protocolo, se muestran en la figura 6. Se usaron como control una mutante en *relA* o su homólogo.

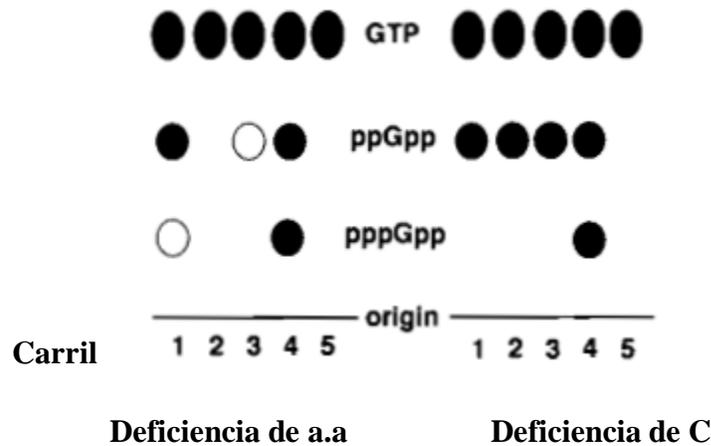


Figura 6. Patrón de acumulación de ppGpp bajo condiciones de inanición. Carril 1 cepa silvestre, carril 2: mutante *relA*, carril 3, mutante *spoT*, carril 4: mutante *gppA*, carril 5 mutante, *relA* y *spoT*. Tomada de Cashel (1994).

VII. RESULTADOS

7.1 Comparación del contexto genómico de *mazG*.

Para poder vislumbrar la posible función de PsMazG, se hizo un análisis comparativo del contexto genómico del gen *PsmazG* y de los genes homólogos a *mazG* previamente descritos en otras bacterias (Gross *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003). Para este análisis se obtuvieron las secuencias nucleotídicas del *locus* correspondiente a los genes *mazG* y genes aledaños tomando una longitud de 10,000 pb para cada genoma. Se eligieron las cepas de *P. aeruginosa* PA14 (GenBank: AE004091.2), *Escherichia coli* K12 (GenBank: AE004091.2), *Thermotoga marítima* MSB8 (GenBank: AE000512.1) y *Mycobacterium tuberculosis* ATCC (GenBank: AL123456.3). El análisis comparativo a nivel de aminoácidos (Blastp) de PsMazG arrojó un porcentaje de identidad del 55% con el gen de *E. coli*, 45% con el de *Thermotoga marítima*, y 29% con el de *Mycobacterium tuberculosis*. También se identificaron los residuos importantes para la actividad NTP-PPase en *P. aeruginosa* en un alineamiento de secuencias de MazG de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Thermotoga marítima* (anexos). Con base en el porcentaje de identidad obtenido y el arreglo genético, para cada gen se construyeron los diagramas mostrados en la figura 7. En dicha figura se observa que sólo entre *E. coli* y *P. aeruginosa* existe cierta similitud en el contexto genómico, ya que en ambos los genes *rumA* y *relA* se encuentran río arriba de *mazG*. El gen *relA*, cuyo producto participa en el fenómeno llamado *stringent response* (Greenway & England, 1999; Edlin & Broda, 1968), mostró en el análisis un 46% de identidad entre *E. coli* y *P. aeruginosa*. Por su parte el gen *rumA*, del cual se sabe que codifica para una metilasa de RNA (Agarwalla *et al.*, 2002), arrojó una identidad del 45% entre ambas cepas,. Sin embargo, aún no existen datos relevantes de una posible relación de esta proteína con *mazG*, tanto para *E. coli* como para *P. aeruginosa*. Otra observación interesante fue la presencia de los genes *mazE* y *mazF* entre *relA* y *mazG* en *E. coli* pero no en *P. aeruginosa*. Estos genes codifican para una toxina y una antitoxina, respectivamente (Aizenman *et al.*, 1996).

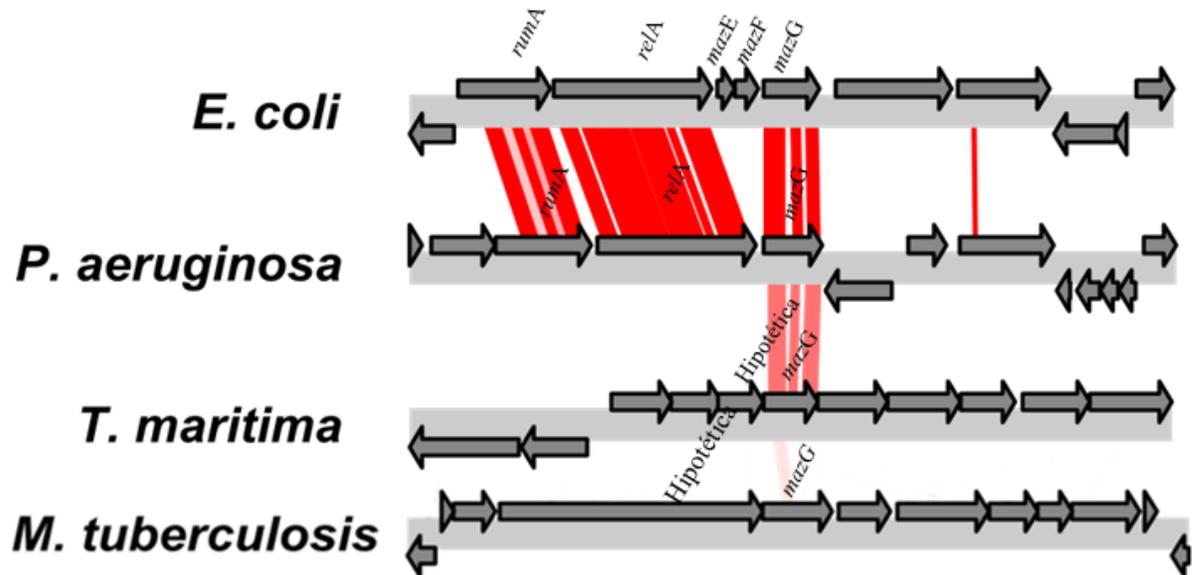


Figura. 7 Comparación genómica de *mazG* en cepas tipo. Análisis del contexto genómico de *mazG* en las principales cepas bacterianas donde se ha estudiado su función (*E. coli*, *Thermotoga marítima* y *M. tuberculosis*). Cada flecha corresponde a un gen. En rojo se señalan los genes que tiene homología a nivel de aminoácidos. La intensidad del rojo es proporcional al grado de homología entre los genes. En la parte superior de las flechas se indica el nombre de los genes aledaños a *mazG* y los que presentan homología.

7.2 Comparación estructural de MazG – *E. coli* versus MazG – *P. aeruginosa*

Para conocer la similitud a nivel de estructura entre las proteínas MazGs de *E. coli* y *P. aeruginosa* se obtuvo el modelo de la estructura secundaria de la proteína MazG-*P. aeruginosa* usando el servidor *I-Tasser*. Con esta se realizó su comparación con la estructura cristalina reportada para EcMazG (Lee *et al.*, 2008) mediante el uso del programa *Pymol*. El análisis comparativo reveló que existe una gran similitud a nivel estructural entre ambas proteínas (Figura 8).

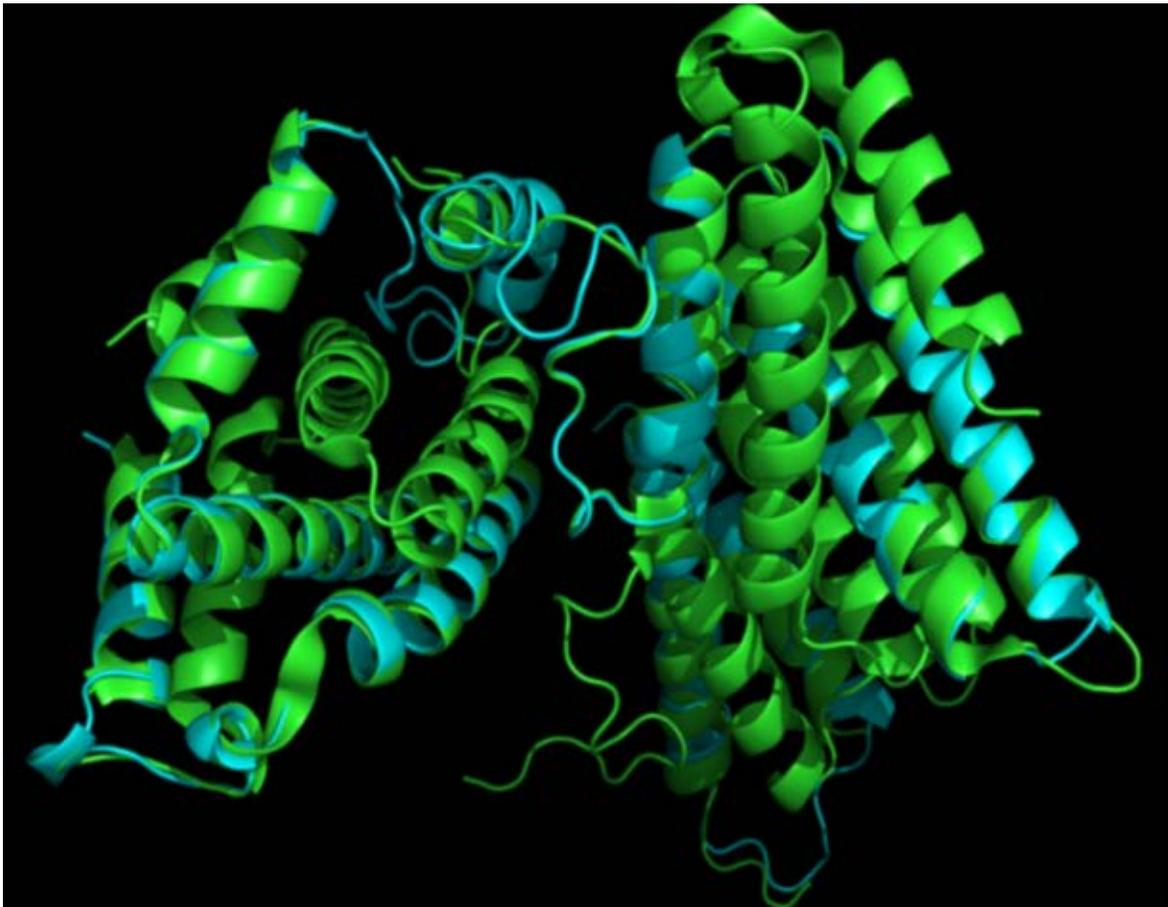


Figura 8. Comparación de la estructura secundaria de MazG de *E. coli* versus MazG de *P. aeruginosa*. En verde se muestra la estructura secundaria obtenida por *I-Tasser* de MazG de *P. aeruginosa* y en azul la estructura de MazG de *E. coli* obtenida por cristalografía de rayos X (Lee *et al.*, 2008). La comparación fue hecha con *Pymol*.

7. 3. 2 PCR de punto final a partir de cDNA.

Una vez comprobada la calidad del RNA total, se realizó una retro-transcripción de cada muestra con el objetivo de obtener cDNA. Para ello fue necesario igualar la concentración de cada muestra (ver métodos). Con el fin de verificar el funcionamiento de los *primers* diseñados, se corrió una PCR de punto final a partir de DNA genómico de la cual se obtuvieron los amplicones esperados para los genes *relA* (control positivo), *mazG* (gen de interés) y *16S* (gen endógeno) (Figura 10A). Una vez verificados los *primers*, se usaron para amplificar los transcritos correspondientes a cada gen, a partir del cDNA obtenido de cada muestra. En cada muestra se usó la misma cantidad de cDNA. La PCR de punto final no mostró diferencia en las concentraciones de los amplicados de las muestras 4 y 5 con SHX con respecto a las muestras 4 y 5 sin SHX. Por el contrario, fue notoria la presencia de una banda más abundante en los punto 4 y 5 de la cinética en comparación con las bandas 1, 2 y 3. Esto sugiere un aumento en los transcritos tomados en tiempos tardíos del crecimiento con respecto a muestras de tiempos tempranos del crecimiento (Figura 10B).

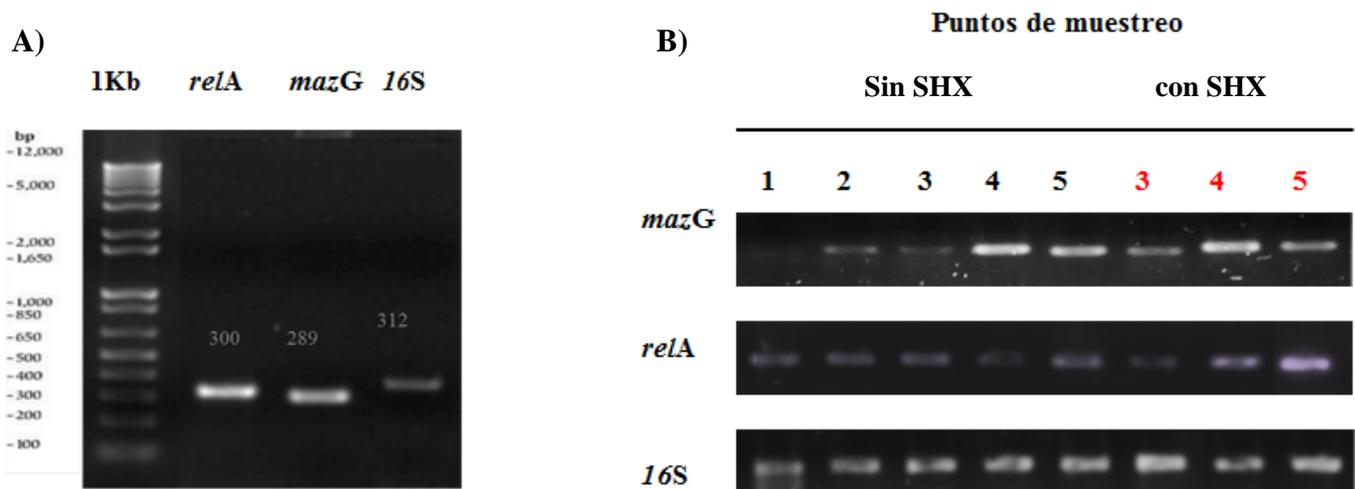


Figura 10. PCR a partir de DNA genómico y cDNA de los genes *relA*, *mazG*, y *16S*. A) PCR, usando DNA genómico como molde, de los genes de interés. En el carril 1: gen control *relA* de 300 pb, carril 2: gen problema *mazG* de 289 pb, carril 3: endógeno *16S* de 312 pb. B) PCR usando cDNA obtenido del extracto de RNA total. Cada columna corresponde a los puntos tomados en la cinética. Los números en negro corresponden la cinética de crecimiento. Sin SHX, los números en rojo corresponden a la cinética tratada con SHX (Figura 3A). Las filas corresponden a cada gen analizado.

7.3.3 Medición de la expresión relativa del mRNA de *mazG* por qRT-PCR.

A partir de la observación obtenida en el último punto de la cinética fue necesario evaluar de una manera más exacta el nivel de expresión de *mazG*, para ello se usó el método de PCR en tiempo real, el cual se basa en la cuantificación de un producto amplificado a partir de cDNA. Este se detecta por una señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto amplificado producido en cada ciclo. Los valores de fluorescencia se registran en forma de una curva similar a una cinética de crecimiento. El ciclo donde empieza a ser detectable la señal de fluorescencia por arriba del ruido de fondo se conoce como umbral del ciclo o Ct (*cycle threshold*). Por lo que el valor de Ct nos indica cuantos ciclos le tomó a cada muestra generar una cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección. Para poder medir la expresión relativa de *mazG* se empleó el método conocido como doble delta Ct. Éste tiene como requisito que los genes a evaluar tengan la misma eficiencia de amplificación para que puedan ser comparados entre ellos.

Para evaluar el método, fue necesario construir una curva de rango dinámico para el gen blanco (*mazG*) y el gen endógeno (*16S*) mediante diluciones y obtener el $\Delta Ct = (Ct_{mazG} - Ct_{16S})$ para cada uno de los puntos (diluciones). Este ΔCt se graficó vs la concentración de cada punto, y la línea obtenida debe tener una pendiente menor o igual a 0.1, esto validó que la eficiencia de amplificación de ambos genes es similar (anexo 3 y 4).

7.3.4 $\Delta\Delta Ct$

Una vez que se comprobó que los genes a evaluar tenía una eficiencia similar, se usó el método comparativo $\Delta\Delta Ct$, En donde se compara cuantitativamente el transcrito de las muestras a analizar con respecto a una muestra de referencia, que en este caso fue la muestra 3, (figura 10B). Los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un mRNA se expresa en una muestra con respecto a la muestra de referencia (muestra 3). Este cambio puede ser positivo o negativo, ya que la referencia por definición tiene un valor de 1 o bien del 100%. Las ecuaciones aplicadas fueron las siguientes:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{gen endógeno}}$$

Con el valor obtenido de la ecuación anterior se pudo usar la formula general $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ muestra interés} - \Delta Ct \text{ muestra calibrador o referencia.}$$

En donde el gen de interés es *mazG*, y el gen endógeno es *16S*. Las muestras de interés son los puntos de la cinética de crecimiento y como referencia se seleccionó la muestra 3 por ser donde se notó menos amplificación y por tratarse de un punto en fase temprana de crecimiento. De los resultados (por triplicado) se obtuvo una desviación estándar y se graficaron en unidades relativas de expresión, la tabla de los parámetros graficados se muestra en la tabla-anexo 2. Los resultados muestran que no existe diferencia en la expresión de *mazG* en una condición de estrés por SHX *versus* una condición sin SHX (Figura 11). Sin embargo, se observó una mayor expresión en fases tardías del crecimiento con respecto a fases tempranas, corroborando lo observado por PCR de punto final.

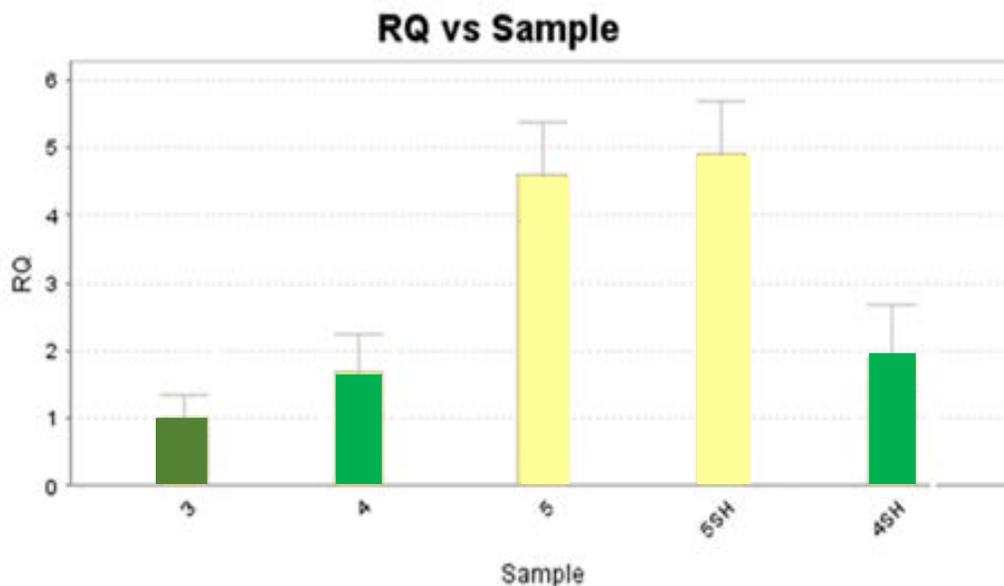


Figura 11. Niveles relativos del mRNA de *mazG*. Representación gráfica de la expresión relativa de las muestras analizadas por medio del parámetro $2\Delta Ct$, cada barra corresponde al promedio de tres muestras. El número de cada grafica corresponde al número asignado en la cinética de crecimiento (figura 3A). RQ se refiere a cuantificación relativa

7.4 Cepas PAO1 mutantes por inserción de transposón

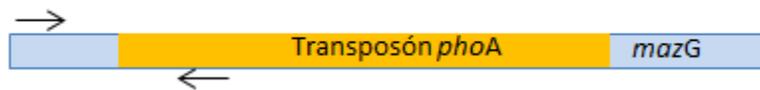
Considerando las similitudes en el contexto genómico de MazG-*P. aeruginosa* y MazG-*E. coli*, así como su similitud a nivel estructural, se propuso que la delección de *mazG* tendría un impacto en la sobrevivencia celular en *P. aeruginosa*, tal como se ha reportado para *E. coli* (Gross *et al.*, 2006). Para corroborar este punto se planteó evaluar el efecto de la falta de *mazG* en condiciones de inanición por limitación de serina. Como primer paso se obtuvieron cepas mutantes de la colección de Manoil Lab - University of Washington. Estas mutantes son generadas sobre la cepa de PAO1 de *P. aeruginosa* mediante la inserción de un transposón en el cromosoma de la bacteria. El transposón interrumpe genes y confiere resistencia a tetraciclina (Jacobs *et al.*, 2003). Las cepas solicitadas corresponden a dos versiones de mutantes para el gen *mazG*: mutante PW2669 (*mazG*-69), y PW2670 (*mazG* 70), y gen *relA* (PW2696); esta última se utilizó como un control por tener mutado el gen responsable de la síntesis de ppGpp.

Para corroborar la correcta inserción del transposón en el sitio indicado en la información de las mutantes, se diseñaron *primers* (tabla 3) que hibridan dentro del gen desde el codón ATG en dirección 5'→3' y otros dentro del transposón en dirección 3'→5' (Figura 12), obteniendo amplicones de diversos tamaños dependiendo de la posición del transposón dentro del gen y la posición del *primer* reverse dentro del transposón. Esto se hizo para cada cepa mutante. Los resultados y el tamaño esperado de cada amplicón se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Descripción de la posición de los transposón empleados para cada mutante.

	PAO1 mutante en <i>mazG-69</i>	PAO1 mutante en <i>mazG-70</i>	PAO1 mutante en <i>relA-</i>
Transposón	ISphoA/hah-Tc	ISphoA/hah-Tc	ISlacZ/hah-Tc
Posición del transposón dentro del gen	146pb	381pb	1729pb
Posición de primer forward dentro del gen	1pb	1pb	1pb
Posición de primer reverse dentro transposón	145pb	145pb	168pb
Tamaño del amplicón	291pb	526pb	1897pb

Primers para *mazG- 69* y *70*



Primers para Mut-*relA-*

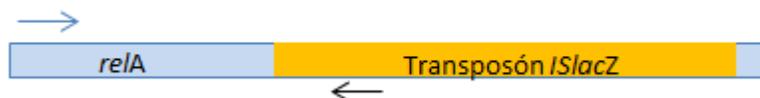


Figura 12. Mapas de la posición de los primers para la comprobación de las cepas mutantes. Las flechas corresponden a los primers diseñados para las cepas mutantes (tabla 3). Y la posición dentro del transposón o gen interrumpido.

7.4.1 Comprobación por PCR de la correcta inserción del transposón dentro del gen.

Para las mutantes en el gen *mazG* y *relA* se hizo una PCR de colonia para cada cepa. Los resultados mostraron los amplicones esperados, comprobando la inserción del transposón en el sitio dentro del gen reportado (Jacobs, 2003) (Figura 13). Para el caso de la mutante en *relA* el transposón entró en marco con el gen, lo cual genera una fusión con el gen *lacZα* que porta el transposón, por lo cual su fenotipo se pudo demostrar en cajas con Xgal dando colonias azules (figura 14).

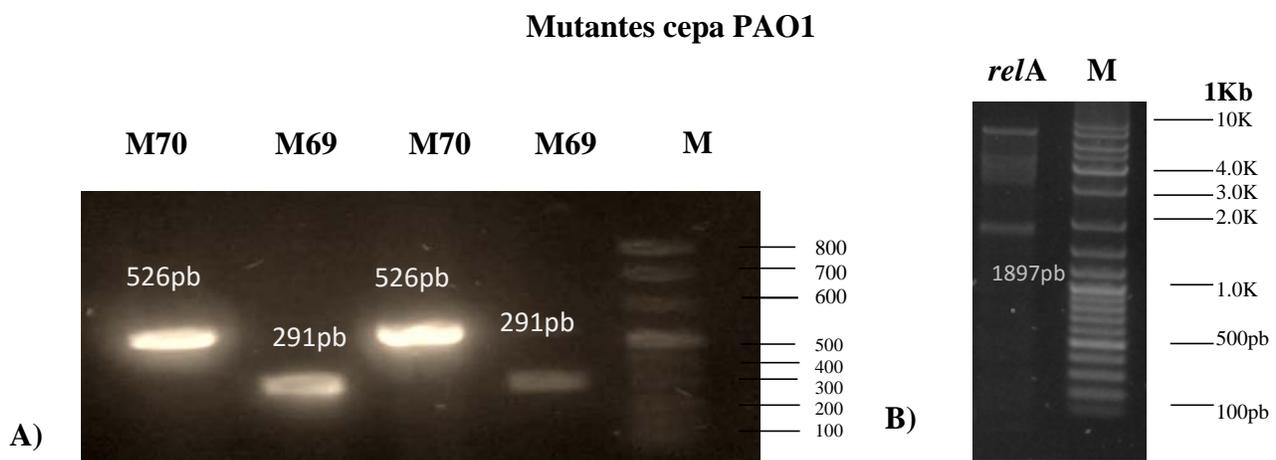


Figura 13. Comprobación de la interrupción de los genes *mazG* y *relA*. PCR de colonia corroborando la correcta inserción del transposón en las cepas mutantes en *mazG* (A) y *relA* (B). Los 2 geles de agarosa se prepararon al 1%.

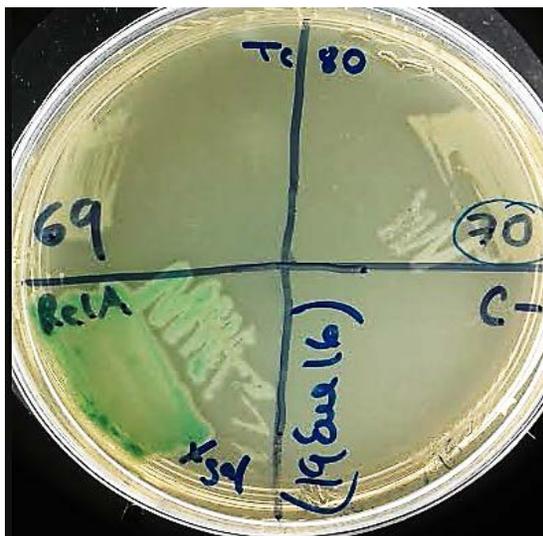


Figura 14. Comprobación del fenotipo del transposón IS*lacZ* dentro del gen *relA*. Cepas de las mutantes en *mazG* 69 y 70 y mutante en *relA* estriadas en cajas de LB con tetraciclina a 80µg/mL y Xgal 40µg/mL. Incubadas toda la noche a 37°C.

7.5 Evaluación del efecto de *mazG* sobre la supervivencia celular.

Una vez corroboradas las mutantes a utilizar se procedió a evaluar el efecto del estrés por SHX sobre ellas. Para esto se siguió una cinética de crecimiento en medio mínimo MOPS con SHX a una concentración final de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y una condición sin SHX como control. Los resultados se graficaron y se encontró una disminución en el crecimiento de las cepas mutantes en *mazG* versus la cepa silvestre en condiciones de estrés por SHX (Figura 15A), así como una disminución en la supervivencia celular de al menos un orden de magnitud después de 9 horas de exposición con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de SHX (Figura 15B).

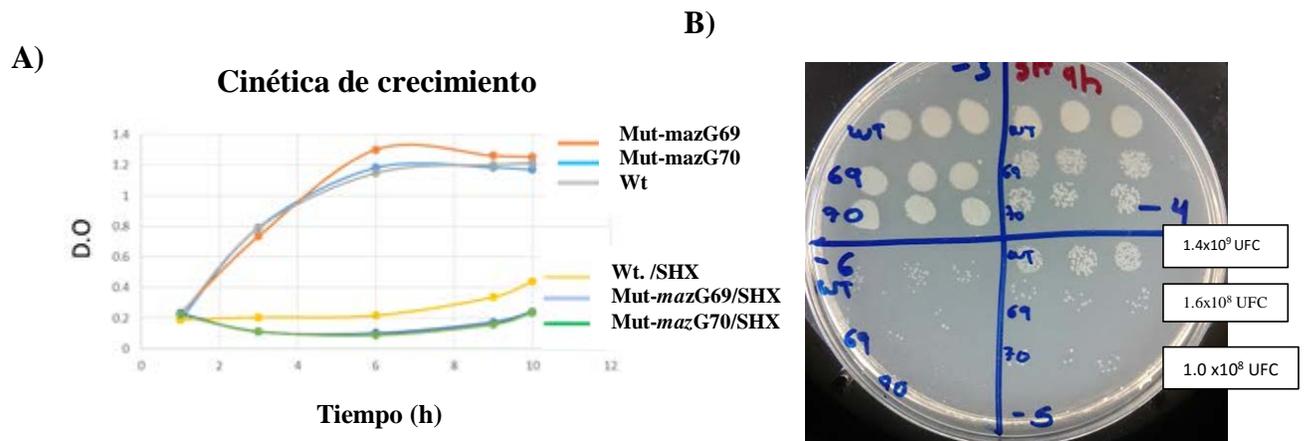


Figura 15. Efecto de la ausencia de *mazG* sobre la supervivencia celular con SHX. A) Representación gráfica del crecimiento de las cepas mutantes en *mazG* (68 y 70) con respecto a la cepa silvestre (wt). La gráfica muestra las densidades ópticas a 600nm de cada muestra en el transcurso del tiempo, en la parte derecha se señala con rectas de diferentes colores la línea correspondiente a cada cepa y condición. B) Supervivencia celular después de 10 horas de exposición con SHX determinado mediante ensayo de goteo de las cepas WT y las mutantes en *mazG* 69 y 70. Los títulos obtenidos se muestran en la parte derecha de la figura B, en recuadros.

7.6 Clonación de *mazG* en pHERD30T

Teniendo en cuenta que en *E. coli* el efector principal de la *stringent response* es el tetrafosfato de guanosina (ppGpp) y MazG indirectamente baja sus niveles, es indispensable saber si MazG tiene un efecto sobre los niveles de ppGpp cuando se sobreexpresa. Para poder realizar ensayos de complementación es necesaria la construcción de un plásmido que pueda expresar la proteína, por lo que se prosiguió a clonar el gen de *mazG* (831 pb) en el vector de expresión pHERD30T. Para esto se amplificó el gen de *mazG* de la cepa PAO1 a partir de DNA genómico, para posteriormente clonarse en el vector de transición pJET1.2 (con resistencia a ampicilina) que es transformado en *E. coli* DH5 α . Las candidatas se seleccionaron en cajas de ampicilina [100 μ g/ml] y se corroboraron por PCR de colonia (datos no incluidos). Para la clonación del gen *mazG* en el vector de expresión pHERD30T se hicieron restricciones dobles con las enzimas *Nco*I y *Sfi*I en el vector pHERD30T (Figura 16A) y pJET 1.2 con inserto (Figura 16B).

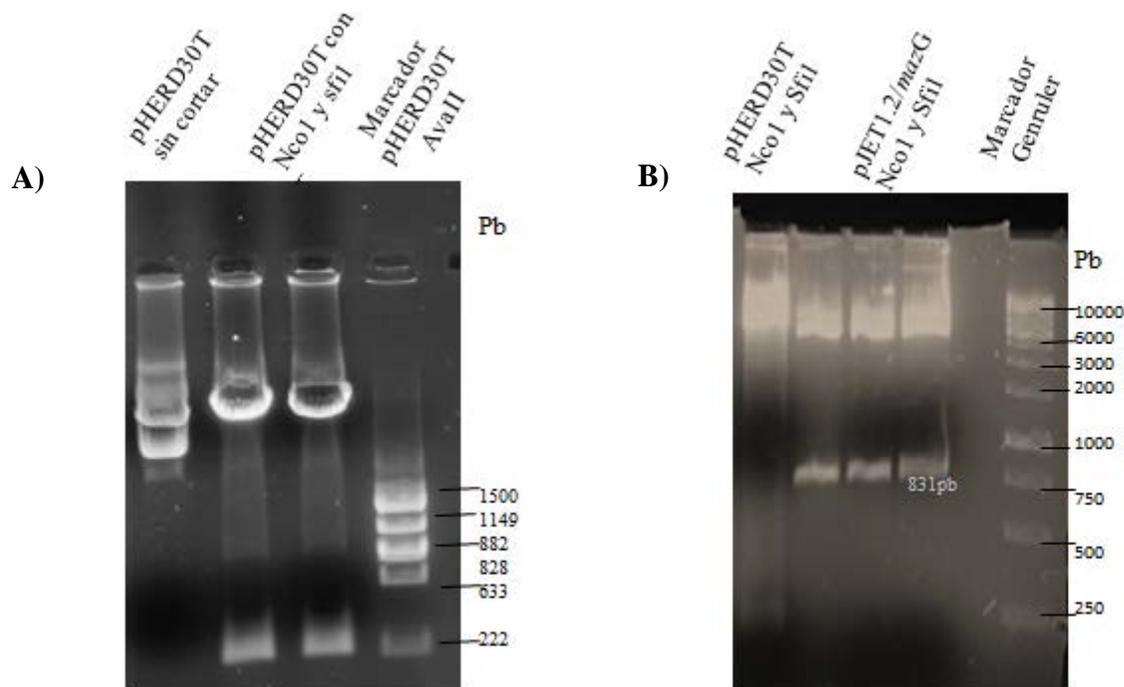
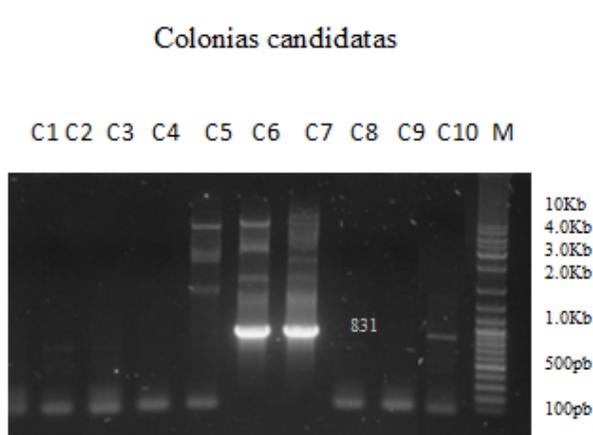


Figura 16. Obtención de vector e inserto cortado. A) Restricciones del vector, en la parte de superior del gel se indica el nombre del vector y las enzimas utilizadas, el marcador fue el vector pHERD30T cortado con la enzima *Ava*II como se indica en la imagen. B) Restricción de los vectores pHERD30T y pJET1.2 con inserto (*mazG*), el tamaño del inserto se indica en números, el último carril muestra el marcador genruler, y los números indican los tamaños de cada banda. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1 %.

7.6.1 Selección de candidatas de clonación.

Después de la reacción de ligación entre el vector pHERD30T y el inserto *mazG* restringidos (ver métodos), la reacción fue transformada en la cepa DH5 α de *E. coli*. Las candidatas seleccionadas fueron analizadas por PCR de colonia con los *primers* que amplifican el gen, las colonias que mostraron un amplicón de 831pb se seleccionaron como positivas (Figura 17) y se les extrajo el plásmido con el kit Wizard® Plus SV minipreps (ver métodos). Sobre los plásmidos extraídos se realizó una doble restricción para corroborar la presencia del inserto de *mazG*, únicamente la candidata 7 mostró la banda esperada (Figura 18).



Figura_17. Candidatas de clonación identificadas por PCR. En la parte superior se muestra el número asignado a cada colonia candidata, el último carril muestra el marcador de peso molecular. Los números corresponden al tamaño en pb de cada banda.

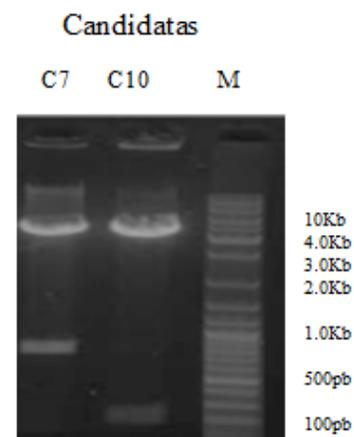


Figura 18. Restricción de plásmidos candidatos. Plásmido de la candidata 7 y la candidata 10 restringidos con las enzimas Sfi1 y Nco1, el último carril muestra el marcador y los números indican el tamaño en pb (pares de bases) de cada banda.

7.7 Expresión de *mazG* a partir de la construcción en el vector pHERD30T.

Para saber si la construcción obtenida expresaba la proteína MazG, se obtuvieron extractos totales de proteínas a partir de un cultivo de la cepa PAO1 transformada con la construcción pHERD30T-*mazG* e inducida con arabinosa al 1%. Se tomaron muestras después de 30 minutos y 60 minutos de inducción. Los 30 μ L de cada extracto total de proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 15%. Para visualizar las proteínas se tiñó el gel con azul de *Coomassie*. Se logró evidenciar la sobreexpresión de MazG con un peso de 31,33 Da, al comparar con una cepa sin inducción (Figura 19).

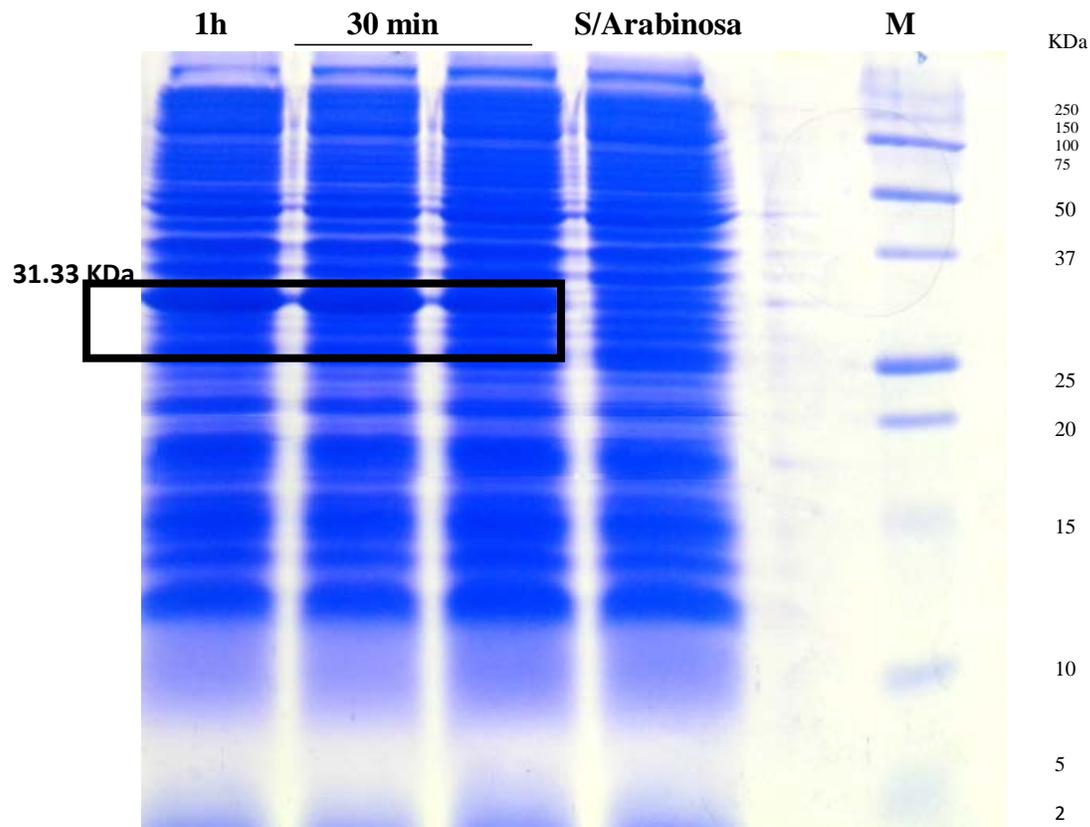


Figura 19. Expresión de *mazG* a partir del vector pHERD30T. La imagen muestra el corrimiento de un gel desnaturalizante de poliacrilamida, donde se corrieron extractos de proteínas totales. En la parte superior se indica el tiempo post-inducción en el cual se tomó cada muestra, el carril 1 corresponde a la muestra tomada a 1 hora, y los carriles 2 y 3 muestran un duplicado de la muestra tomada 30 minutos después de la inducción, el carril cuatro en una muestra sin inducción. El último carril corresponde al marcador de peso molecular de proteínas, los números corresponden al tamaño de cada banda en kilodaltones.

7.8 Evaluación de los niveles de ppGpp.

7.8.1 Limitación de fosfato en medio mínimo.

Otro aspecto relevante fue la estandarización de la evaluación de ppGpp, dado que el método descrito por Cashel (1994) para medir niveles celulares de ppGpp *in vivo*, se basa en el uso de $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$. Es necesario comprobar la correcta limitación de PO_4 en el medio de cultivo. Para ello se siguió una curva de crecimiento con diferentes concentraciones de fosfato para garantizar su correcta eliminación del medio y materiales usados y así obtener una mejor absorción del $^{32}\text{PO}_4$. En la figura 20 se muestra que la eliminación del fosfato disminuye el crecimiento bacteriano. Por lo que se puede usar la marca radioactiva con una correcta absorción.

Curva de crecimiento de PAO1 en MOPS con distintas concentraciones de fosfato

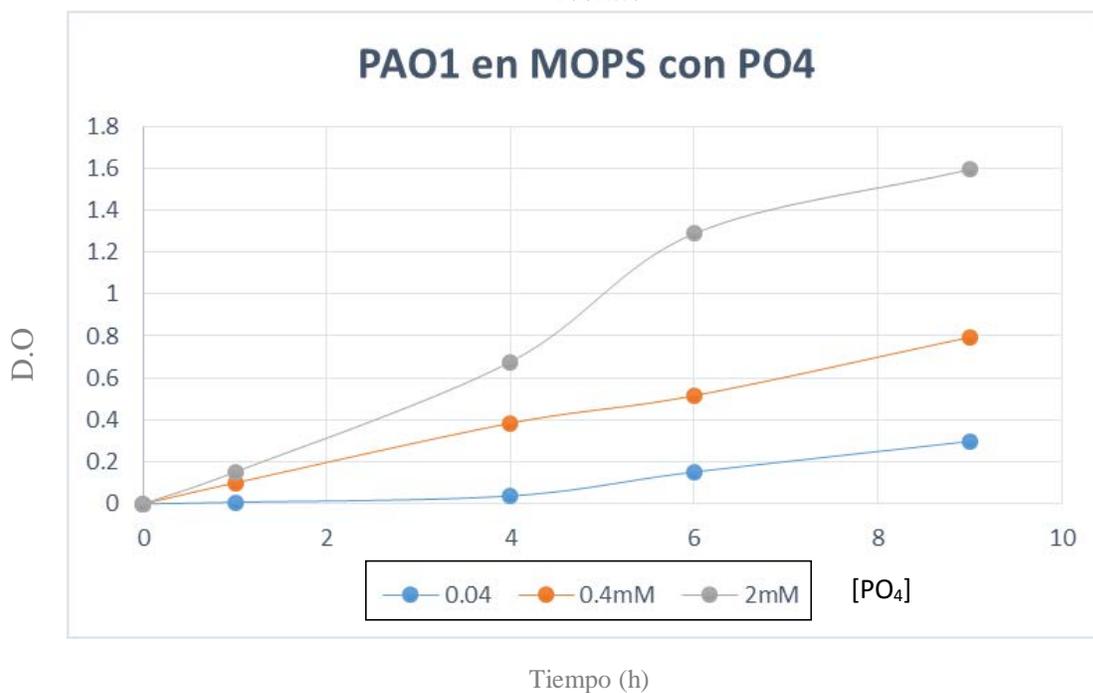


Figura 20. Efecto de la limitación de fosfato en PAO1. Representación gráfica del crecimiento de PAO1 con en medio mínimo MOPS con diferentes concentraciones de fosfato. En la parte inferior de la gráfica se muestra el color designado para la concentración de fosfato usada, correspondiente a cada curva en la gráfica.

7.8.2 Identificación de ppGpp mediante cromatografía de placa.

Una vez estandarizadas las condiciones de crecimiento, se procedió a identificar la molécula ppGpp. Para ello se requiere hacer el marcaje *in vivo* usando $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$, para después extraer los nucleótidos y separarlos según el protocolo de cromatografía en placa descrito por Cashel (1994) (Ver métodos). Previamente se corrieron ATP y GTP como controles en una placa de cromatografía y se revelaron con UV (Figura 21A), y para identificar al ppGpp se corrieron extractos de cultivos marcados con $^{32}\text{P}\text{-HPO}_4$, usando la cepa mutante-*relA* como control negativo de la síntesis de ppGpp, donde se espera que no haya producción de ppGpp, y ATP- ^{32}P , para identificar la mancha correspondiente a GTP.

En la placa control se observa una diferencia en la migración entre las moléculas ATP y GTP (Figura 21A). Cuando se analizaron los extractos de las diferentes cepas se corroboró, de acuerdo a los marcadores utilizados, que la cepa mutante en *relA* no presenta síntesis de ppGpp como se esperaba (Figura 21B) Con esta observación y la marca de ATP - ^{32}P se logró localizar la mancha de ppGpp en las placas.

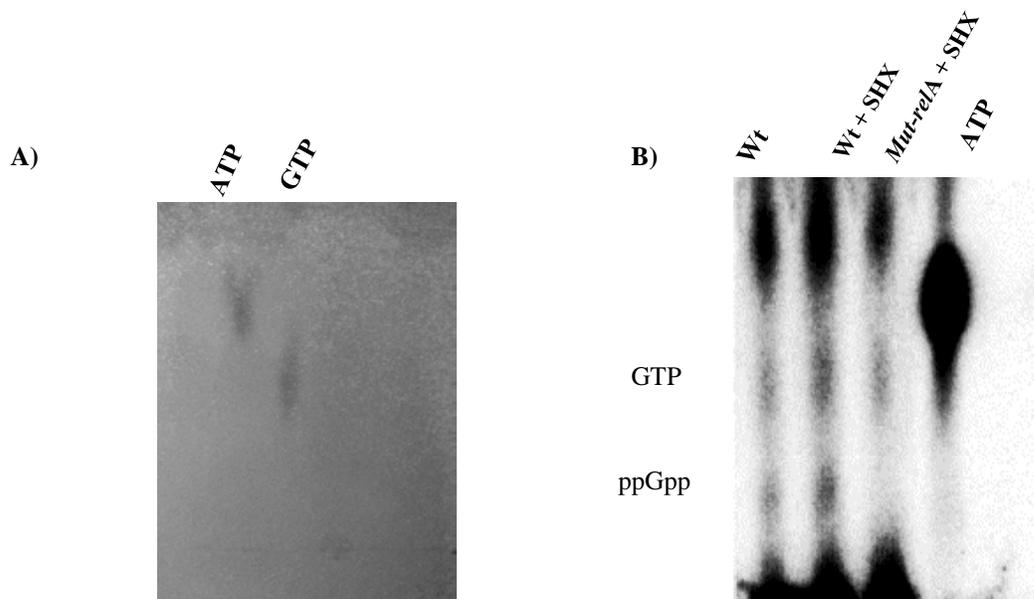


Figura 21. Identificación de ppGpp de una cepa wt versus una cepa mutante-*relA* bajo condiciones de inanición por falta de aminoácidos. A) Cromatografía de los nucleótidos ATP y GTP revelados por UV. B) identificación de ppGpp a partir de extractos marcados con ^{32}P , en el carril uno se corrió un extracto de un cultivo de la cepa silvestre PAO1, en el carril 2 muestra la cepa wt con inducción de estrés por el uso de SHX, en el carril 3 se muestra el extracto de la cepa control mutante-*relA*. En el carril 4 se cargó una muestra de ATP- ^{32}P . Las manchas fueron reveladas por el uso de un scanner THYPOON.

7.9 Efecto de MazG sobre los niveles de ppGpp

Con base en la identificación del ppGpp sobre las placas cromatográficas, se procedió al análisis de los niveles de ppGpp en las cepas silvestre y mutante-*mazG* de *P. aeruginosa* PAO1, complementadas o no con *mazG* (construcción pHERD30T). Para garantizar la expresión de la proteína se agregó el inductor arabinosa a una concentración del 1 % y se realizaron tres ensayos independientes, usando como control de migración el ATP-³²P. Las placas fueron observadas mediante el equipo Typhon. Se observó una disminución del spot correspondiente a ppGpp cuando es inducida la sobreexpresión de MazG. En la figura 22A se evidencia la diferencia en concentración de ppGpp entre la cepa silvestre y la cepa mutante para *mazG*. Sin embargo, al ser complementada la mutante parece restablecer la condición silvestre (comparación entre el carril 1 y 4), mientras que al sobreexpresar *mazG* en la cepa silvestre que ya expresa *mazG* de forma constitutiva la disminución de ppGpp es mayor.

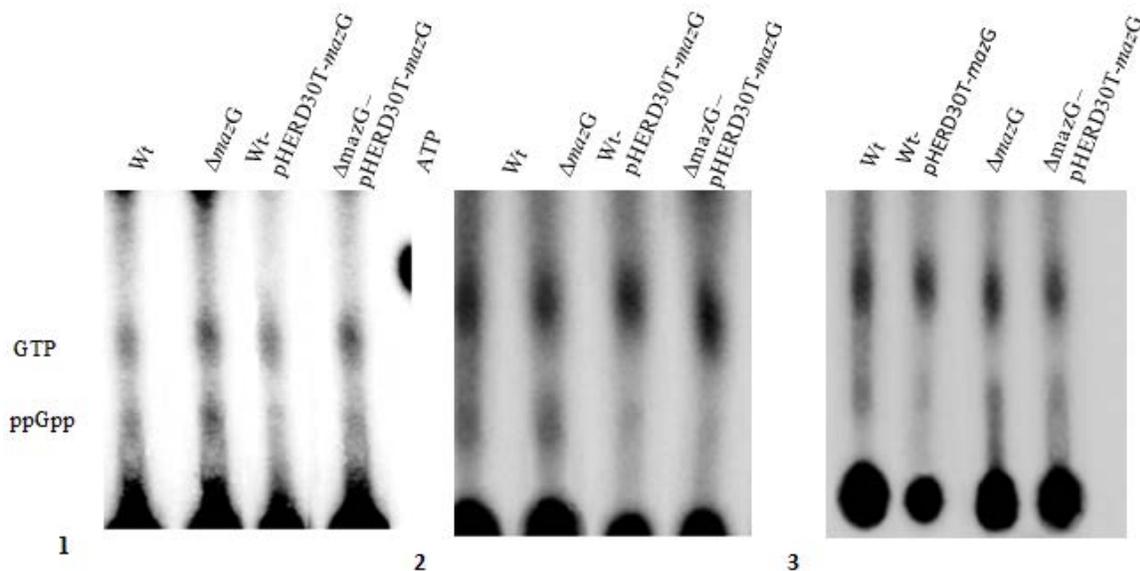


Figura 22. Efecto de MazG sobre los niveles de ppGpp. Las imágenes muestran la extracción y separación de ppGpp a partir de cultivos marcados radioactivamente con ³²P-H₃PO₄ bajo condiciones de inanición por limitación de serina por adición de SHX. Las imágenes corresponden a tres experimentos independientes. Las cepas a analizar fueron wt de la cepa PAO1, Wt-transformada con el vector pHERD30T-*mazG*, la cepa mut-*mazG*-PAO1, y la cepa mut-*mazG*/pHERD30T-*mazG*, a cada muestra se le agregó 0.2mM de arabinosa y a las que contenían el vector pHERD30T-*mazG* se suplementaron con 30μg/mL de gentamicina. La cromatografía fue realizada en placas de cromatografía en capa fina PEI-Celulosa, y se obtuvieron las imágenes por scanner con THYPOON.

7.9.1 Cuantificación de los niveles de ppGpp mediante análisis de imagen.

Finalmente, para corroborar las observaciones realizadas sobre las placas cromatográficas se realizó la cuantificación de los niveles de ppGpp. La cuantificación fue hecha usando el programa *Imagej* con base en el porcentaje de pixeles de cada mancha observada en las placas cromatográficas. El porcentaje de pixeles obtenido para ppGpp fue normalizado con respecto al porcentaje de pixeles obtenido para GTP, los valores obtenidos fueron graficados (Figura 23). Los niveles de ppGpp fueron disminuidos al menos un 30% en la cepa silvestre con sobreexpresión de MazG con respecto a la misma cepa sin sobreexpresión. Sin embargo, en la cepa mutante para *mazG* no se logró observar una diferencia significativa en los niveles de ppGpp. Nótese que la sobreexpresión de MazG se hizo en cultivos con gentamicina mientras que los cultivos de bacterias sin el plásmido no contenían el antibiótico. También es de notar que las muestras sin gentamicina no llevan el vector vacío. Este diseño experimental dejó abierta la posibilidad de que las diferencias en ppGpp pudieran ser debidas a estas variables

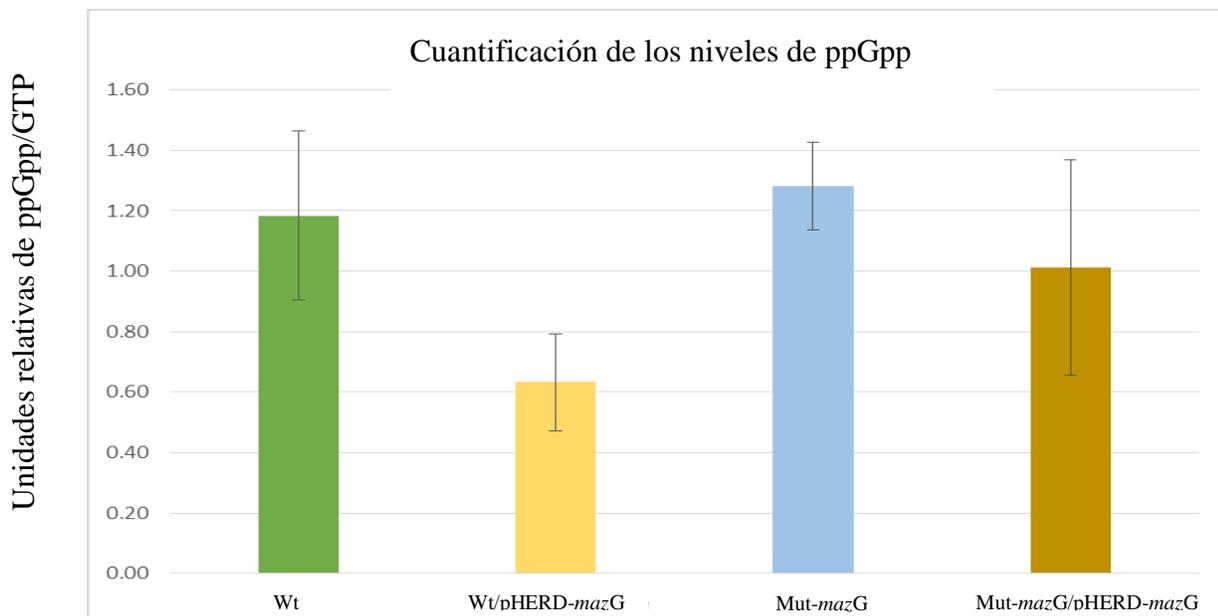


Figura 23. Cuantificación de los niveles de ppGpp por la sobreexpresión de MazG. Cada barra corresponde a un promedio de tres experimentos y se graficó la razón del porcentaje de pixeles de ppGpp con respecto al porcentaje de pixeles de GTP. Los datos crudos fueron obtenidos por el programa *Imagej*.

DISCUSIÓN

MazG ha sido descrita como una proteína altamente conservada y distribuida en varias especies bacterianas (Moroz *et al.*, 2005; Galperin *et al.*, 2006). Sin embargo, existe poca información sobre su papel en el metabolismo bacteriano.

Nuestros resultados indican que la proteína PsMazG contiene los residuos consenso del dominio pirofosfohidrolasa (EEXXE/D y F-W y K-R) comparables a los presentes en *E. coli* y *Thermotoga marítima*. En ambos casos, se ha demostrado su actividad bioquímica (Zhang *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2006) por lo que PsMazG es una potencial pirofosfohidrolasa capaz de hidrolizar dNTPs.

Otro indicio de la posible función de PsmazG es la similitud del contexto genómico del gen *mazG* con respecto a *E. coli*. Varios estudios de análisis funcional han sugerido que la conservación de la sintenia entre genes en diferentes géneros bacterianos es capaz de predecir asociaciones funcionales entre sus proteínas (Galperin & Koonin, 2000). El análisis comparativo del contexto genómico reveló que en el genoma de *E. coli*, *relA* se encuentra cercano a *mazG*, esta ubicación se conserva en *P. aeruginosa* (Figura 7) por lo que se hipotetizó una posible similitud funcional entre MazG de *P. aeruginosa* y *E. coli*.

MazG en *E. coli* disminuye los niveles de ppGpp inducidos por el uso de SHX, lo que se traduce en una mayor sobrevivencia de la bacteria bajo dichas condiciones de estrés por SHX (Gross *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluó si la función de MazG en *P. aeruginosa* es comparable con la observada en *E. coli*, para ello se analizó una cepa mutante en *mazG* *versus* la cepa parental. Los resultados mostraron un arresto del crecimiento al agregar SHX, lo cual es esperado por ser un análogo de serina que funciona como un inhibidor competitivo de la enzima tRNA sintetasa, inhibiendo la aminoacilación de seril-tRNA (Tosa & Pizer, 1971), lo que desencadena la activación del *stringent response*, vía RelA. Sin embargo, en ausencia de *mazG* hay una menor sobrevivencia celular con respecto a la cepa silvestre de al menos un orden de magnitud bajo estrés con SHX, este efecto es mucho menor al observado en *E. coli*, donde la sobrevivencia bajo las mismas condiciones de

estrés fue afectada por al menos 3 órdenes de magnitud, sugiriendo un mayor efecto protector de MazG en *E. coli* bajo condiciones de estrés similares (Gross *et al.*, 2006). Alternativamente, la diferencia observada entre ambas especies puede deberse a la presencia de dos genes conocidos como *mazF* y *mazE*, los cuales codifican para una toxina y antitoxina respectivamente. La expresión de estos genes es reprimida por el aumento de ppGpp ante una falta de aminoácidos, desencadenando una rápida degradación de la antitoxina MazE, mientras que MazF, se mantiene ya que es más estable. La mayor concentración de la toxina resulta en un arresto del crecimiento y eventualmente la muerte celular (Gross *et al.*, 2006). Por su otra parte en una búsqueda por BLAST no se encontraron homólogos a los genes *mazF* y *mazE* en *P. aeruginosa*.

Para evaluar los niveles de ppGpp, *mazG* se clonó en pHERD30T. La inducción con arabinosa durante media hora y una hora reveló la sobreexpresión de una proteína de 31,33 Da correspondiente a al tamaño de MazG, (figura 19). Es posible que la proteína sea más evidente a tiempos mayores de inducción, ya que solo se muestreó por una hora post-inducción. La identificación de ppGpp se realizó mediante cromatografía en capa fina usando el método publicado (Cashel 1994). Primero se identificó GTP, por su perfil de migración con respecto a ATP, probados en una placa sin marca radioactiva (figura 21-A). Usando una mutante en *relA*, incapaz de sintetizar ppGpp, se observó la ausencia de una mancha justo abajo del correspondiente a GTP, que con base a los datos de Cashel y otros (Cashel 1994; Erickson *et al.*, 2004) corresponde a ppGpp (figura 21-B).

Se sabe que el tratamiento con SHX aumenta los niveles de ppGpp en *P. aeruginosa* (Gross *et al.*, 2006 Ferullo & Lovett, 2008) En esta tesis, al analizar una muestra con SHX y otra sin SHX, no se observó un aumento en la mancha de ppGpp en relación a la intensidad de la mancha de GTP en la muestra con SHX (figura 21). Es posible que con una concentración mayor de SHX permita un mayor incremento de la mancha de ppGpp pues es posible que la solución de SHX se haya degradado con el tiempo. Otra opción es un mayor tiempo de exposición a SHX, ya que en este ensayo se expuso sólo media hora. Una vez identificada la mancha correspondiente a ppGpp, se observó que la sobreexpresión de MazG disminuyó la mancha de ppGpp. Esta disminución podría explicar por qué una cepa

mutante en *mazG* disminuye su sobrevivencia, ya que el aumento de ppGpp por falta de aminoácidos genera cambios metabólicos que incluyen un arresto del crecimiento (Potrykus & Cashel 2008).

Teniendo en cuenta el efecto de MazG sobre los niveles de ppGpp tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*, hipotetizamos que la expresión del gen *mazG* podría verse modificada como respuesta al incremento de ppGpp inducido por SHX. Ensayos preliminares de RT-PCR a punto final, no mostraron diferencias importantes en la eficiencia de amplificación del transcrito de *mazG* entre cultivos con y sin SHX. En su lugar, se observó un aumento en las bandas de *mazG*-cDNA que corresponden a tiempos tardíos del crecimiento. En todos los casos se amplificaron cantidades iguales de cDNA, sin embargo, este método es poco exacto para la cuantificación del producto final.

Para obtener resultados cuantitativos de la síntesis del mensajero de *mazG* en diferentes condiciones de crecimiento bacteriano, se empleó un método comparativo a partir de cDNA por PCR cuantitativa en tiempo real. Los resultados de la estandarización a través de las curvas de disociación de los productos de PCR usando SYBR Green como indicador mostraron un pico para cada curva, que indica la presencia de un solo producto específico para cada gen amplificado (*mazG* y *16S*), y la ausencia de productos inespecíficos que afectarían la cuantificación final. Se comprobó que ambos genes amplifican con una eficiencia similar (anexo 7), por lo que el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ es adecuado para la cuantificación del mensajero *mazG* (Anexo 6).

Los resultados cuantitativos corroboraron lo observado por PCR de punto final, sin diferencia aparente entre la expresión de *mazG* cuando se induce estrés con SHX *versus* una condición sin SHX. El aumento en los niveles de expresión de *mazG* solo fue observado a tiempos tardíos de crecimiento (fase estacionaria) pero fueron independientes de la presencia de SHX (figura 11). Por lo que es necesario probar que efecto tiene la mutación de *mazG* en los niveles de ppGpp en fases tardías del crecimiento. Los resultados obtenidos sugieren que no existe una relación directa entre *mazG* y la *stringent response*, sin embargo, *mazG* podría jugar un papel importante en la fase estacionaria. El significado del aumento de la expresión de *mazG* en fases tardías de crecimiento es una incógnita, que

tendría que averiguarse. No obstante, se ha reportado que en la fase estacionaria diversos genes relacionados con el estrés son activados, tal es el caso del factor sigma codificado por el gen *rpoS* (Fujita *et al.*, 1994; Munro *et al.*, 1994), el cual está regulado positivamente por los niveles de ppGpp en *P. aeruginosa* (Erickson *et al.*, 2004).

En *Mycobacterium smegmatis* se ha determinado que las mutaciones por estrés oxidativo aumentan en la fase estacionaria en cepas $\Delta mazG$ (Lu *et al.*, 2013). Además, se observó que la expresión de *mazG* a nivel mensajero aumenta significativamente bajo condiciones oxidativas por H₂O₂ (Lu *et al.*, 2009) Es posible que el aumento de la expresión de *mazG* en *P. aeruginosa* en la fase estacionaria esté relacionada con estrés oxidativo.

A pesar de que MazG se ha asociado con la disminución de ppGpp, el mecanismo por el cual esto ocurre aun es discutido, Gross y colaboradores han propuesto que esta regulación podría ser mediante la hidrólisis de los sustratos (dNTPs) necesarios para su síntesis. Sin embargo, en *Mycobacterium* se ha observado que *mazG* también regula la expresión de *relA*, este mecanismo tendría que probarse en *P. aeruginosa* (Lu *et al.*, 2009) ya que no obtuvimos evidencia de que MazG disminuya los niveles de dGTP.

A pesar de las variaciones de MazG a nivel estructura, los análisis comparativos del alineamiento de secuencia de MazG en diferentes bacterias, muestran una alta conservación en los residuos importantes para su actividad NTP-PPasa la cual ha sido relacionada con la regulación de diversos tipos de estrés. No obstante en *Thermotoga marítima* MazG tiene actividad tanto pirofosfohidrolasa, como pirofosfatasa. Dada la similitud de ésta proteína con PsMazG y EcMazG donde no se ha probado esta dualidad. Es posible que ambas tengan también esta función.

MazG al parecer es una proteína muy versátil, que regula diversos tipos de estrés en diversas especies bacterianas (Lu *et al.*, 2010) ayudando a la bacteria a hacer frente a cambios adversos en su crecimiento.

CONCLUSIONES:

En este trabajo se evaluó la similitud funcional de MazG de *P. aeruginosa* versus MazG de otras especies bacterianas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se hacen las siguientes observaciones:

- La estructura y el contexto genómico de MazG en *P. aeruginosa* son más parecidos a los de *E. coli* que a los de otras bacterias analizadas.
- MazG de *P. aeruginosa* disminuye los niveles de ppGpp y ayuda a la sobrevivencia celular bajo condiciones de estrés por falta de serina.
- Sin embargo la función de esta proteína no es igual a su homólogo en *E. coli*. Ya que aunque en ambas bacterias *mazG* está involucrada en la *stringent response* en *P. aeruginosa* esta relación no es directa.
- Ya que los genes *mazE* y *mazF* regulados por ppGpp en *E. coli*, no fueron encontrados en *P. aeruginosa*. Es posible que la diferencia en letalidad sea explicada por esta diferencia.

PERSPECTIVAS.

- Determinar que genes se ven afectados por MazG vía ppGpp.
- Evaluar el efecto de MazG sobre ppGpp, en la fase estacionaria del crecimiento.
- Probar *in vitro* la capacidad de pirofosfohidrolasa de MazG de *P. aeruginosa* sobre nucleótidos canónicos y no canónicos como: 8-oxo-dGTP, dUTP, dITP, 2-oxo-dATP.
- Evaluar *in vivo* el efecto de *mazG* sobre el estrés oxidativo.
- Evaluar *in vitro* la actividad pirofosfatasa de MazG de *P. aeruginosa*.
- Evaluar que proteínas interaccionan con MazG de *P. aeruginosa*.

ANEXOS (METODOLOGÍA)**Extracción de plásmido Wizard plus**

1. Un cultivo de toda la noche (O.N), se concentró por centrifugación 8,000 rpm x 5min.
2. Se resuspendió la pastilla en 250 μ L de la solución de resuspensión celular.
3. Se agregaron 250 μ L en solución de lisis celular y se invierte 4 veces.
4. Se agregaron 10 μ L de proteasa alcalina.
5. Se incubó 5 min. a temperatura ambiente (T.A)
6. Se agregaron 350 μ L de solución neutralizadora.
7. Se centrifugó a velocidad máxima (vel. max) / 10' T.A.
8. Se agregó lisado en columna.
9. Se agregaron 750 μ L de solución de lavado y se centrifugó a vel. max/ 1' T.A.
10. Se agregaron 250 μ L de solución de lavado y se centrifugó a vel. max/ 2' T.A.
11. Se eluyó en un tubo con 100 μ L de agua libre de nucleasas.

Preparación de cepas *E.coli* quimio-competentes (Green & Rogers, 2013):**TFBI**

KAc 30mM
RbCl 100mM
CaCl₂ 10 mM
MnCl 50 mM
Glicerol 15%

Ajustar a pH 5.8
con HOAc 0.2M

TFB II

MOPS o PIPES 10mM
CaCl₂ 75mM
RbCl 10mM
Glicerol 15%

Ajustar a pH 6.5 con KOH 1M

*Esterilizar por filtración.

Procedimiento:

- Cultivo O.N de 5 mL de SOB (2mM de Mg₂Cl)
- Hacer dilución 1:100 en 50 mL de SOB y crecer hasta OD_{600nm} = 0.45- 0.55.
- Enfriar en hielo por 10´.
- Centrifugar a 4000 rpm /5´/ 4°C.
- Resuspender en 20 mL de solución TFB I fría.
- Centrifugar a 4000 rpm/ 5´/ 4°C decantar y resuspender en 2 mL TFBII fría.
- Mantener en hielo 10´.
- Congelar con hielo seco o nitrógeno líquido y almacenar a -70°C en alícuotas de 100µL.

MEDIOS Y SOLUCIONES

Medios:

LB (Luria Bertani): Bacto triptona 10.0 g, extracto de levadura 5.0 g, NaCl 5.0 g. en 1 L de agua. Esterilización por autoclave.

SOB: Bacto triptona 20.0 g, extracto de levadura 5.0 g, NaCl 0.6 g MgCl₂ 2 mM y/o MgSO₄ 2 mM. Esterilización por autoclave.

MOPS 10X (sales): MOPS 1M (400mL), tricina 1M (40 mL), FeSO₄ 0.01 M (10 mL), NH₄Cl 1.9M (50 mL), K₂SO₄ 0.26M (10 mL), CaCl₂ 0.5mM (10mL), MgCl₂ 0.528M (20mL), NaCl 5M (100 mL). Se afora a 900 mL y se ajusta a pH 7.4 con KOH y se afora a 1L. Se esteriliza por filtración y se almacena a -20°C.

Suplementos:

Micronutrientes: (NH₄)₆(MO₇)₂₄ 3 μM, H₃BO₄ 0.4 μM, CoCl₂ 30 μM, CuSO₄ 10 μM, MnCl₂ 80 μM, ZnSO₄ 10 μM. Se esteriliza por filtración.

*Glucosa 0.2%, aminoácidos 40μg /mL de cada uno, 20 μg /mL de cada nucleósido ó 10 μg/mL de cada nucleobase, 1μg/mL de tiamina.

Soluciones:

Solución de lisis (RNA): sacarosa 150mM, acetato de sodio 20mM, SDS 1%. Se prepara con agua *MilliQ* y se filtra.

Solución lisis (DNA): Tris-acetato pH 7.8 40mM, acetato de sodio 20mM, EDTA 1mM, SDS 1%.

Buffer lisis (Proteínas): Glicerol 5%, Tris-HCl pH 6.8 30 mM, SDS 1%, 2-β-mercaptoetanol 2.5%.

Colorante azul de Coomassie: Azul *Coomassie* R-250 0.025%, metanol 40%, ácido acético 7%

Solución de teñido: Azul de *comassie* 0.25g, metanol 125 mL, ácido acético Glacial 25mL.

Solución desteñido: metanol 50%, ácido acético 10%.

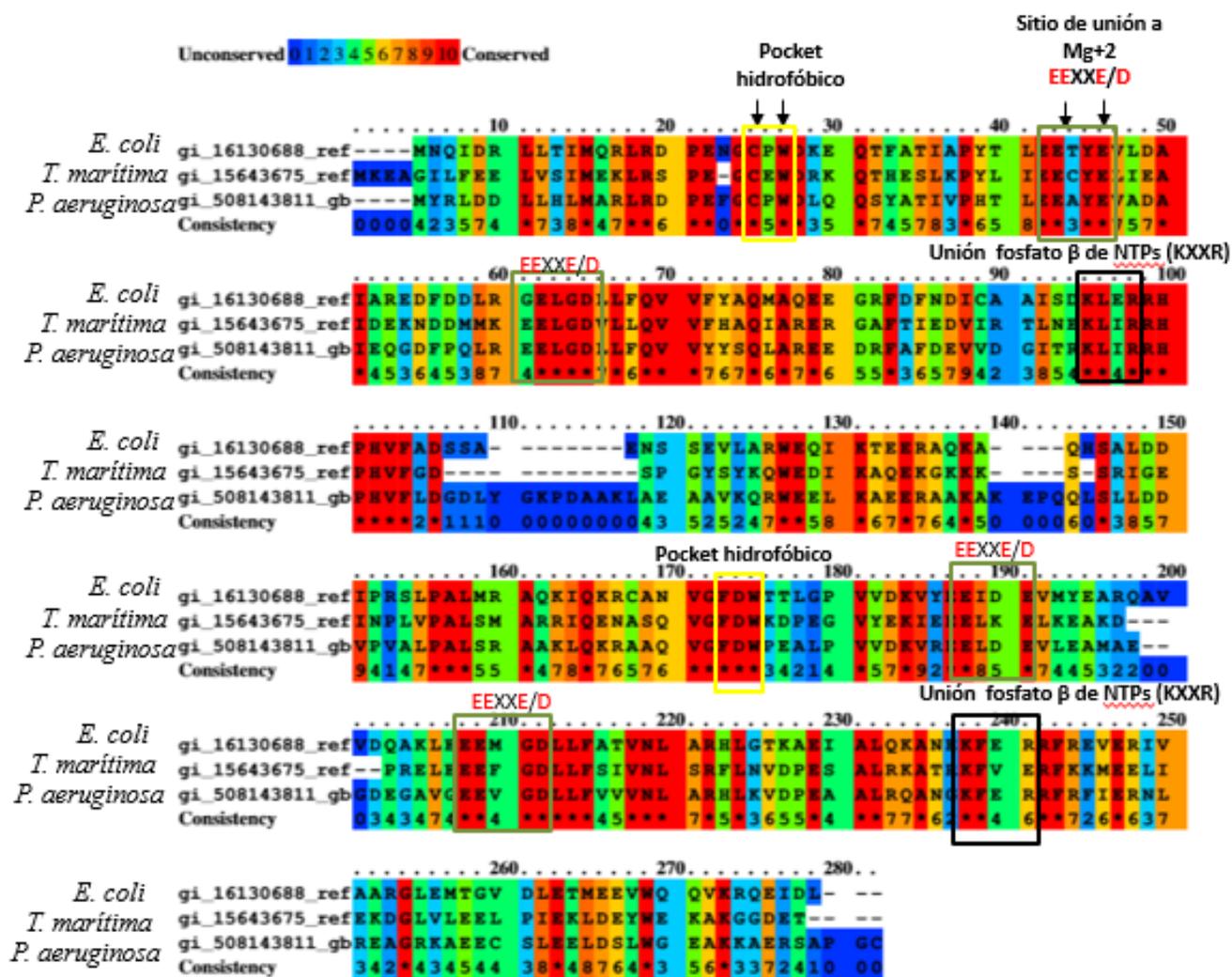
Fase Móvil: KH₂PO₄ ,1.5 M pH 3.4.

Lista de equipos usados:

- Espectrofotometro marca: Beckman, modelo DU 640.
- Termociclador Gene Amp [®], **marca applied biosystem, modelo 9700.**
- **Centrifuga marca: eppendorf, modelo 5804R.**
- **Nanodrop, marca: Thermo scientific, modelo 2000/2000c.**
- **Typhoon: Marca GE Healthcare.**
- **Thermoblot: Marca eppendorf, modelo: thermoStart Plus.**

ANEXOS (RESULTADOS)

Alineamiento de proteínas MazG



mazG en *P. aeruginosa* vs *Mycobacterium*

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

	10	20	30	40	50						
mazG-M_msm		MIVV	LVDP	RR	PALV	PVDA	VE	FLTG	DVQY	TE	EMPV	KVPW	SL	PSAR	PAYD	GE
mazG-M_Tb		-----	-----	-----	PVEA	IE	FLRG	EVQY	TE	EMPV	AVPW	SL	PAAR	SAHA	GN	
mazG-PAO1		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
E_coli-mazG		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Consistency		0000	0000	0000	0111	1111	1101	1111	1111	1111	0111	1111	1111	0100	1010	
	60	70	80	90	100						
mazG-M_msm		DAPV	LLSS	DDP	EHPV	VKAR	LA	AGDR	LIAA	PE	POPGE	RLVDA	VALM	DKLR	TS	
mazG-M_Tb		DAPV	LLSS	DDP	NHPA	VITR	LA	AGAR	LISAP	D	SQRGE	RLVDA	VAMM	DKLR	TA	
mazG-PAO1		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MYRL	DDLL	HLMAR	LRDP	EF	
E_coli-mazG		-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MNQI	DRLL	TI	MQRL	RDPE	
Consistency		1111	1111	1111	0110	1001	1111	1101	1111	1111	4442	76*	735	764	8454	635
	110	120	130	140	150						
mazG-M_msm		GPWE	SEQTH	SLRR	YLLE	ET	YELF	DAVR	SG	NADE	LREEL	GDVLL	QVLF	FHA		
mazG-M_Tb		GPWE	SEQTH	SLRR	YLLE	ET	YELL	DAVR	SG	SVDQ	LREEL	GDVLL	QVLF	FHA		
mazG-PAO1		CPWD	LQQSYA	TIVP	HTLEE	A	YEVAD	AIEQ	G	DFPQ	LREEL	GDVLL	QVVF	YS		
E_coli-mazG		CPWD	KQTF	A	TIAP	YTL	EET	YEVLD	AIA	RE	DFDD	LRGEL	GDVLL	QVVF		
Consistency		3**7	48*	754	784	475	**7	**74	**94	56	5466	**6***	*8*6*	*7868		
	160	170	180	190	200						
mazG-M_msm		RIAED	APHP	FSID	DVAD	AL	VRKL	GNRV	EA	VLAGE	SI	-----	-----	SLDE		
mazG-M_Tb		RIAED	ASQP	FTID	DVAD	TL	MRKL	GNRA	EG	VLAGE	SI	-----	-----	SLED		
mazG-PAO1		QLARE	EDR--	FAFD	EVVD	GI	TRKL	IRRH	EH	VFLD	GDLY	GK	PDAAK	LAEAA		
E_coli-mazG		QMAQE	EGR--	FDFN	DICAA	I	SDKL	ERRH	EH	VFAD	SSA	-----	-----	ENSSE		
Consistency		77*	67535	01	*46789	5658	46**	26*	3*3	*665476	000	000000	5345			
	210	220	230	240	250						
mazG-M_msm		QLAQ	WEER	KA	QEKK	VKA	---	-RAS	SMDD	VPTG	QPAL	ALAL	QKVL	ARVS		
mazG-M_Tb		QLAQ	WEAA	KA	SEKA	RK	---	---SV	ADDV	H	TGQP	ALAL	QKVI	QRAQ		
mazG-PAO1		VKQR	WEEL	KA	EERA	AKA	KEP	QQLS	LLDD	VPTG	VALP	ALSRA	AKLQ	KRAA		
E_coli-mazG		VLAR	WEQI	KT	EERA	AKA	---	-QHS	ALDD	IP	RSLP	ALMRA	QKIQ	KRCAN		
Consistency		4667	**53*	7	6*763	*5000	031	*45*	**95	454	**54*	6	*745*	*5556*		
	260	270	280	290	300						
mazG-M_msm		LPA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	EL	IPAS	ITSV	SV			
mazG-M_Tb		LPA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	HL	IPDE	ITSV	SV			
mazG-PAO1		FDWPE	ALPV	V	DKVRE	GLDEV	LEAMA	EG--	D	EGAV	GEEV	GD	LLFV			
E_coli-mazG		FDWT	TGLPV	V	DKVYE	EIDEV	MYEAR	QAVVD	QAKL	EEMGD	LLFAT	VNLAR				
Consistency		653	0000	111	1110	1011	1111	1000	0100	01	1001	1033	8434			

	260.	270.	280.	290.	300
mazG-M_msm	LPA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	EL	IPASLTSVSV	
mazG-M_Tb	LPA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	HL	IPDEITSVSV	
mazG-PAO1	FDWPEALPVV	DKVREGLDEV	LEAMAEG	--D	EGAVGEEVGD	LLFVVVNLAR				
E_coli-mazG	FDWTTLGPVV	DKVYEEIDEV	MYEARQAVVD	QAKLEEEMGD	LLFATVNLAR					
Consistency	653	0000111	1110101111	1000010001	1001011033	8434567774				

	310.	320.	330.	340.	350
mazG-M_msm	SADT	SENEL	RTAVLEFMDT	VREVEAAVAA	GRRGEDVPEE	LDVAPLGVIS				
mazG-M_Tb	SADVDAENTL	RTAVLDFIDR	LRCAERIAIV	ARRG	-----	-----	-----	-----	-----	-----
mazG-PAO1	HLKVDPEAAL	RQANGKFERR	FRFIERNLRE	AGR	-----	-----	-----	-----	KAE ECS	
E_coli-mazG	HLGTKAEIAL	QKANEKFERR	FREVERIVAA	RGL	-----	-----	-----	-----	EMTGVD	
Consistency	554	665	*34	*7	*4	*2	*6	*3	*7	*6

Alineamiento de RelA de *P. aeruginosa* vs *E. coli*

Unconserved 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Conserved

	10	20	30	40	50
RelA_P_aeruginoso	MVQ	VRAHQPV	NTDGSINLEA	WLDHVQNLVP	GLDRQGLLEA	CEFARESEQR				
RelA_Ecoli	MVA	VRSAH-I	NKAGEFDP EK	WIASLGIT-S	QKSCECLAET	WAYCLOQTQG				
Consistency	**3	**6	2308	*32	*4451	*3	*7	236	21303	224060*3*4

	60	70	80	90	100
RelA_P_aeruginoso	AIAAQNSWAE	GTSSFQ TGLE	IAEILADLKL	DOESLVAAVI	YRGVREGKIT					
RelA_Ecoli	H-----	PDASLLLRGVE	MVEILSTLSM	DIDTLRAALL	FPLADANVVS					
Consistency	20000000	36	4522413	*6*	55***63	*47	*1	65*1**67	6205234285	

	110	120	130	140	150
RelA_P_aeruginoso	LEAVNKHF	GPVVAKLI	EGVLRMAAISASLN	PRHSMVLGTQ	AQVENLRKML					
RelA_Ecoli	EDVLR	RESVVK	SVVNLHGV	RDMAAIRQLKA	THT--DSVSS	EQVDNVRRL				
Consistency	165	64533	*3	2*54	**3*	*2	2***	33222	3310012154	3**6*6*6**

	160	170	180	190	200
RelA_P_aeruginoso	VAMVDD	VRVALIKLAERTCA	IRAVKNAD	EEKRHRVAREVF	DIYAPLAHRL					
RelA_Ecoli	LAMVDD	FRCVVIKLAERIAH	LREVKDAP	EDERVLAAKECT	NIYAPLANRL					
Consistency	6*	**3*	25	6*****	332	7*3**5*	2*6	5*125*	6*22	5*****4**

 160. 170. 180. 190. 200
Rela_P_aerugino	VAMVDDVRVA L IKLAERTCA I RAVKNADEE KRHRVAREVF DIYAPLAHRL
Rela_Ecoli	LAMVDDFRV VIKLAERIAH LREVKDAPED ERVLAAKECT NIYAPLANRL
Consistency	6*****3*25 6*****332 7*3**5*2*6 5*125*6*22 5*****4**
 210. 220. 230. 240. 250
Rela_P_aerugino	GIGHIKWELE DLSFRYLEPD QYKQIAKLLH ERRLDREQYI ANVMSQLKEA
Rela_Ecoli	GIGQLKWELE DYCFRYLHPT EYKRIAKLLH ERRLDREHYI EEFVGHLEAE
Consistency	**37***** *32****3*3 6**5***** *****3** 343543*633
 260. 270. 280. 290. 300
Rela_P_aerugino	LAATGVQADL SGRAKHIYSI WRKMQRKGLD FSQIYDVRVAV RVLVPEMRDC
Rela_Ecoli	MKAEGVKAEV YGRPCKHIYSI WRKMQKKNLA EDELFDVRVAV RIVAERLQDC
Consistency	73*3**5*66 2**3***** *****6*4*2 *4676***** *8653475**
 310. 320. 330. 340. 350
Rela_P_aerugino	YTALGIVHTL WRHIPKEFDD YIANPKENGY RSLHTAVIGP EGKVLLEVQIR
Rela_Ecoli	YAALGIVHTH YRHLPDEFDD YVANPKPNGY QSIHTVVLGP GGKTVVEIQIR
Consistency	*4*****1 4**7*3***** *8***3*** 5*7**5*7** 2**46*8***
 360. 370. 380. 390. 400
Rela_P_aerugino	THSMHEEAEL GVCAHWRYKG TDVK-ASSNH YEEKISWLRQ VLEWHHEELGD
Rela_Ecoli	TKQMHEDAEL GVAAHWKYKE GAAAGGARS G HEDRIAWLRK LIAMQEEMAD
Consistency	*24***6*** **3***6**2 2253046351 5*66*6***5 673*3**74*
 410. 420. 430. 440. 450
Rela_P_aerugino	IGGLAEQLRV DIEPDRVYVF TPDGHAIDLK KATPLDFAY RVHTEVGHNC
Rela_Ecoli	SGEMLDEVRS QVFDLDRVYVF TPKGDVVDLP AGSTPLDFAY HIHSDVGHRC
Consistency	2*273666*2 4812***** **3*258*** 3*6***** 38*56***4*
 460. 470. 480. 490. 500
Rela_P_aerugino	RGAKINGRIV PLNYSLOTGE QVEIITGKHS GPSRDWLN SN LGYVTTSRAR
Rela_Ecoli	IGAKIGGRIV PFTYQLQMGD QIEIITQKQP NPSRDWLNPN LGYVTTSRGR
Consistency	1****4***** *44*4**3*6 *8***2*33 4*****3* *****4*
 510. 520. 530. 540. 550
Rela_P_aerugino	AKIVHWFKLQ ARDQNVAAAGK ALIERELSL AL-PPVDFDR LAEKANVRTA
Rela_Ecoli	SKIHAWFRKQ DRDKNILAGR QILDDELEHL GISLKEAEKH LLPRYNFNDV
Consistency	6**12**62* 2**5*83**6 37762**43* 4701322133 *3362*3435
 560. 570. 580. 590. 600
Rela_P_aerugino	EDMFAALGAG DLRLAHLVNY AQLLVEPDR- ---DSEQLEL IPRK--PSKI
Rela_Ecoli	DELLAAIGGG DIRLNQMVNF LOSQFNKPSA EEQDAAALKQ LQOKSYTPQN
Consistency	6674**7*4* *7**237**6 3*42343230 000*633*52 735*003351
 610. 620. 630. 640. 650
Rela_P_aerugino	GHGKRGDVQI QGVGNLLTQM AGCCQPLPGD PIVGYITLGR GVTIHRQDCA
Rela_Ecoli	RSKDNGRVVV EGVGNLMHHI ARCCQPIPGD EIVGFITQGR GISVHRADCE
Consistency	23234*2*28 6*****7135 *2***7*** 3***6**2** *858**3**3

```

..... 660..... 670..... 680..... 690..... 700
RelA_P_aerugino TALQLAGREP ERMIVSWGP EPVRTYPVDI AIRAYDRSGL LRDVSQVLLN
RelA_Ecoli       QLAELRSHAP ERIVDAVWGE SYSAGYSLVV RVVANDRSGL LRDITLILAN
Consistency      3336*3433* **58452**3 40232*3618 381*1***** **8538*3*

```

```

..... 710..... 720..... 730..... 740..... 750
RelA_P_aerugino ERINVLAVNT RSNKEDNTAT MQLTIEIPGL DALGRLLARV SQLPNIEEAR
RelA_Ecoli       EKVNVLGVAS RSDTKQQLAT IDMTIEIYNL QVLGRVLGKL NQVPDVIDAR
Consistency      *68***4*25 **535443** 547***04* 45***6*466 5*6*58*6**

```

```

.....
RelA_P_aerugino RN RTP
RelA_Ecoli       RLHGS
Consistency      *1323

```

Tabla anexo 1. Términos comúnmente usados en PCR tiempo real.

Termino	Definición
Plot de amplificación	Gráfica de la señal de fluorescencia vs el número de ciclos.
Línea base	Los ciclos iniciales de la PCR, en los cuales el cambio en la señal de fluorescencia es mínimo.
Threshold	Promedio de la desviación estándar de la fluorescencia de los primeros ciclos de la PCR. Umbral de detección de fluorescencia.
Ct (Threshold cycle)	El número en el cual la fluorescencia alcanza el threshold.
Rn	Magnitud de la señal generada por el juego de condiciones de PCR.

Validación de método $\Delta\Delta C_t$

Rango dinámico: Para verificar que los genes son amplificados con la misma eficiencia y pueden ser comparados se realizaron diluciones para obtener una mínima y máxima cantidad de cada muestra.

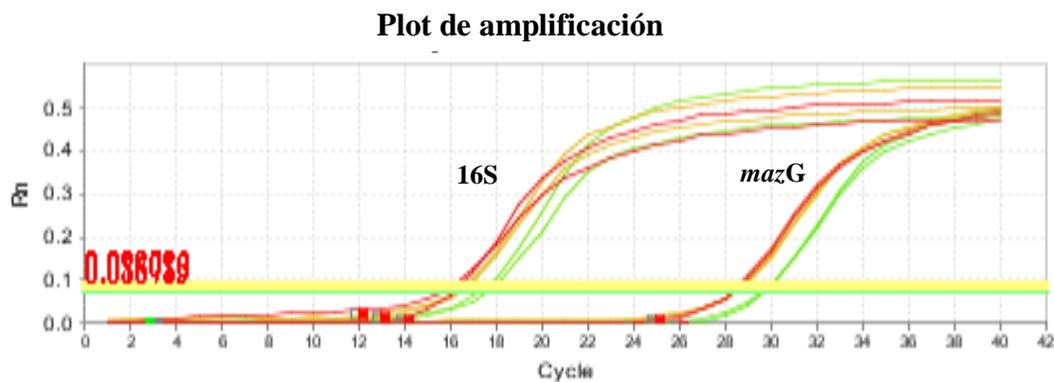


Figura-Anexo 1. Curvas de amplificación de las diluciones seriadas de cDNA. Las amplificaciones fueron obtenidas en el equipo 7500 de qRT-PCR de applied biosystems. Cada dilución se realizó por duplicado. El gráfico muestra la detección de fluorescencia con respecto a los ciclos de amplificación de los genes 16S y *mazG*. Los diferentes colores son asignados por el software para cada muestra (dilución).

Ensayo de disociación.

Con la finalidad de corroborar que sólo un producto de amplificación se está generando en la reacción, y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos o dímeros de *primers*. Se realizó un ensayo de disociación. En donde la temperatura se incrementa gradualmente hasta 96°C, registrando la intensidad de fluorescencia durante este proceso. La derivada negativa (realizada por el equipo) resulta en un solo pico, que corresponde a la temperatura de desnaturalización del producto de cada gen.

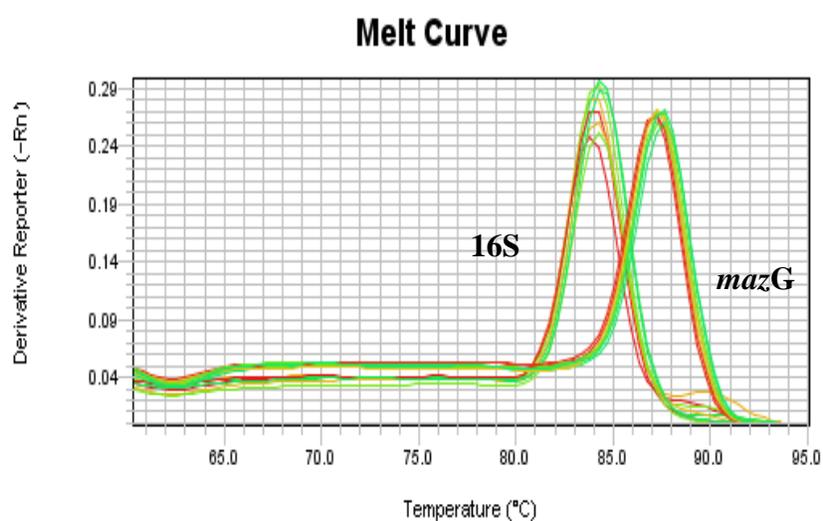


Figura-Anexo 2. Curva de disociación de producto de PCR de los genes 16S y mazG. Representación de la presencia de un producto específico de amplificación para cada juego de *primers*, con una temperatura de fusión de 84.23 ° C para el gen 16S y de 87.63 ° C para el gen *mazG*.

Evaluación del rango dinámico

Validación por pendiente de la recta ΔC_t

Para usar el método ΔC_t , es necesario construir una curva de rango dinámico para cada gen a analizar (incluyendo el gen endógeno) y obtener el ΔC_t (C_t gen blanco – C_t gen endógeno). Para cada punto de la gráfica (dilución), este ΔC_t se grafica vs la concentración de cada uno de los puntos, y la línea obtenida debe tener una pendiente menor o igual a 0.1.

Esto valida el uso del método, que requiere que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blanco) sea la misma.

Los datos obtenidos por el equipo de qRT-PCR 7500 fueron evaluados en excel para obtener dos curvas estándar. Posteriormente, se aplicó la fórmula $\Delta Ct = Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen endógeno}$, y estos datos se graficaron para obtener una recta con su pendiente.

A)

CURVA STD RELATIVA	CANTIDAD	LOG10	PROM Ct mazG	PROM Ct 16S	Delta Ct
STD 1	1	0.0	28.65	16.47	12.2
STD 2	0.5	-0.3	28.99	16.85	12.1
STD 3	0.25	-0.6	29.95	17.81	12.1
STD 4	0.125	-0.9	30.25	17.99	12.3

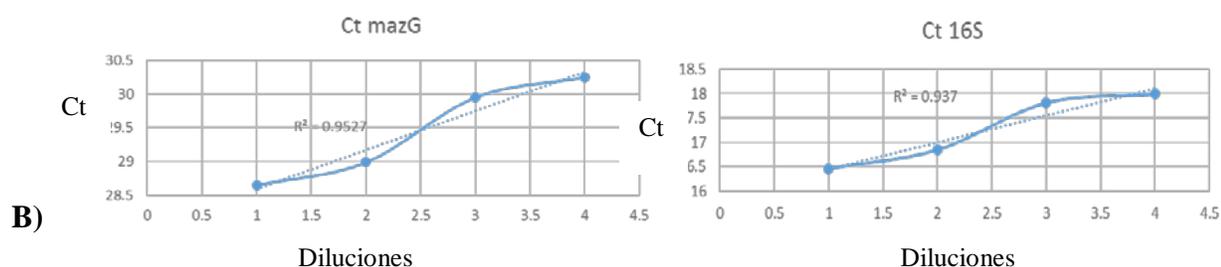


Figura-Anexo 3. Evaluación del rango dinámico por excel. A) Valores obtenidos de los promedios de Ct de las diluciones medidas, que van desde 0.125, 0.25, 0.5 y 1 μL de cada muestra de ADNc para cada gen 16S y mazG. Se obtiene de estos datos la diferencia de Cts para cada dilución y así obtener la pendiente. B) Tendencia de las diluciones donde se grafica la relación de Cts obtenidos con respecto a la concentración de cada dilución.

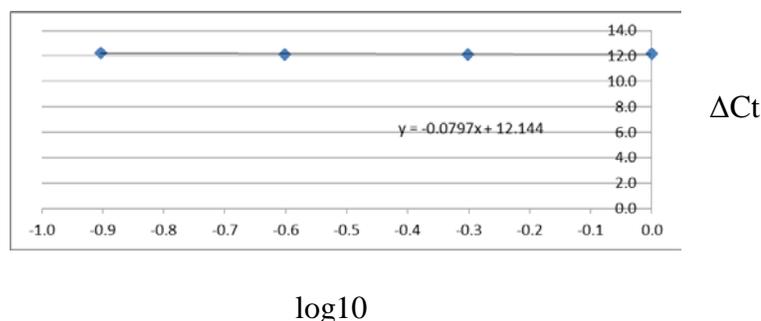


Figura-Anexo 4. Validación de las eficiencias de amplificación de los dos genes *mazG* y 16S. Pendiente de la recta, la cual debe de estar entre los valores ≥ -0.1 , y ≤ 0.1 .

Cuantificación relativa del mRNA de *mazG* por el método $\Delta\Delta Ct$

Una vez que se comprobó que la amplificación de los genes a evaluar es similar se usó el método comparativo $\Delta\Delta Ct$, normalizando los datos para compensar diferencias entre las muestras. Esto se hizo con la fórmula $\Delta Ct1 = Ct_{mazG} - Ct_{16S}$, el segundo paso fue buscar una muestra de referencia (a la cual siempre se le asignara el valor de 1). Se tomó el punto 3 de la cinética de crecimiento sin SHX como referencia. Aplicando finalmente la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct} = Ct1(\text{de } c/\text{muestra}) - Ct(\text{muestra referencia})$.

Tabla –anexo 2. Datos obtenidos para la gráfica de expresión relativa de *mazG*

#	Omit	Sample	Target	Ct Mean	ΔCt Mean	ΔCt SD	$\Delta\Delta Ct$	RQ	RQ Min	RQ Max
1	<input type="checkbox"/>	3	16S	13.57						
2	<input type="checkbox"/>	3	mazg	29.026	15.456	0.107	0	1	0.79	1.265
3	<input type="checkbox"/>	4	16S	13.698						
4	<input type="checkbox"/>	4	mazg	27.275	13.577	0.168	-1.879	3.679	2.539	5.331
5	<input type="checkbox"/>	5	mazg	24.813	11.58	0.268	-3.877	14.691	8.777	24.591
6	<input type="checkbox"/>	5	16S	13.233						
7	<input type="checkbox"/>	5sx	16S	13.499						
8	<input type="checkbox"/>	5sx	mazg	24.434	10.935	0.224	-4.521	22.964	14.021	37.613
9	<input type="checkbox"/>	4sx	mazg	26.646	13.346	0.199	-2.11	4.318	2.781	6.703
10	<input type="checkbox"/>	4sx	16S	13.3						

DATOS CRUDOS DEL Ct DE CADA DILUCIÓN

Rango dinámico:

A)

	1	2	3	4	5
A	S 16S 1 Ct: 16.76	S 16S 1 Ct: 16.2		S mazg 1 Ct: 28.65	S mazg 1 Ct: 28.66
B	S 16S 0.5 Ct: 16.79	S 16S 0.5 Ct: 16.91		S mazg 0.5 Ct: 28.95	S mazg 0.5 Ct: 29.03
C	S 16S 0.25 Ct: 17.68	S 16S 0.25 Ct: 17.95		S mazg 0.25 Ct: 29.96	S mazg 0.25 Ct: 29.95
D	S 16S 0.12 Ct: 17.90	S 16S 0.12 Ct: 18.08		S mazg 0.12 Ct: 30.32	S mazg 0.12 Ct: 30.19

Ct de las diluciones de cada muestra

Para el rango dinámico se trabajaron dos muestras, de las cuales se hicieron 4 diluciones: 0.25, 0.5, 1 y 1.5 μL de concentración. Se corrieron en el equipo 7500 de Applied-biosystems por duplicado cada muestra. La figura A) muestra el panel donde se reporta el Ct de las dos muestras y de cada dilución.

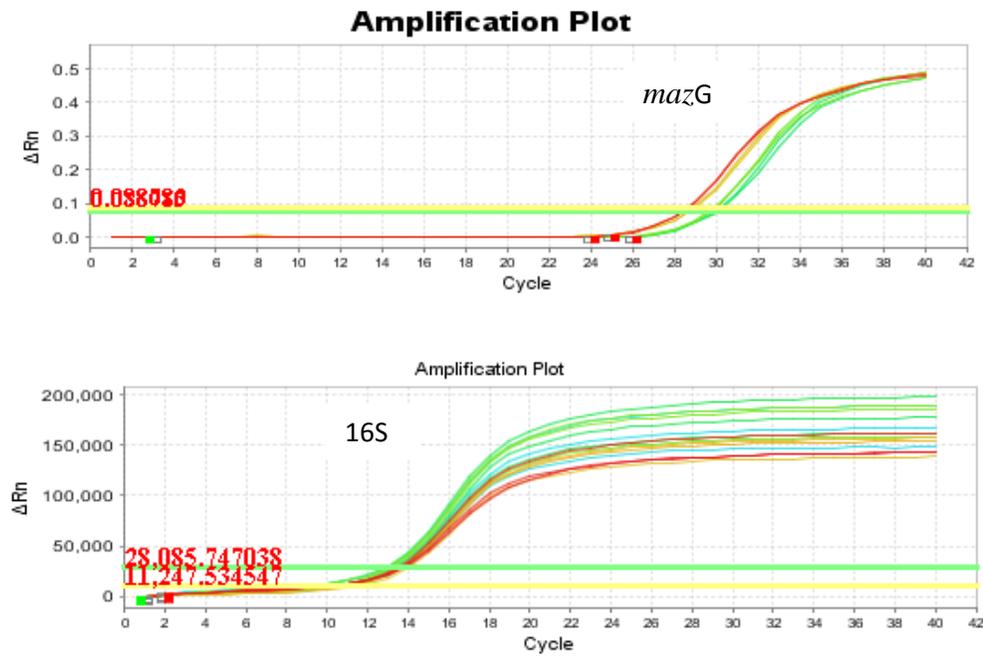


Figura-anexo 5. Plots de amplificación de la cuantificación relativa de *mazG*. Los diferentes colores corresponden a las diferentes muestras analizadas.

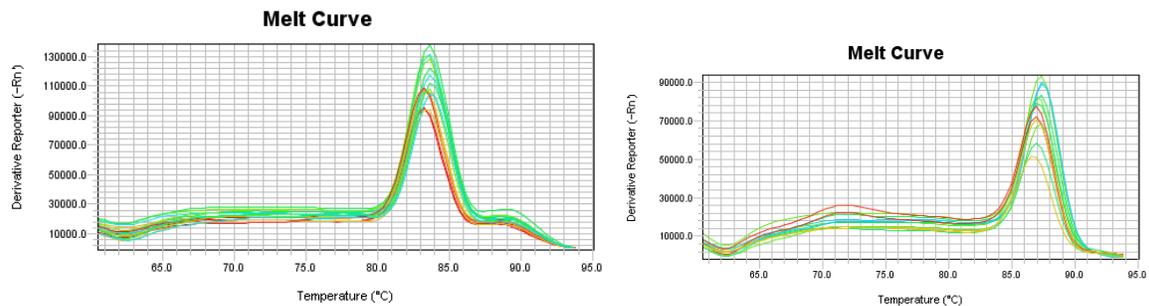
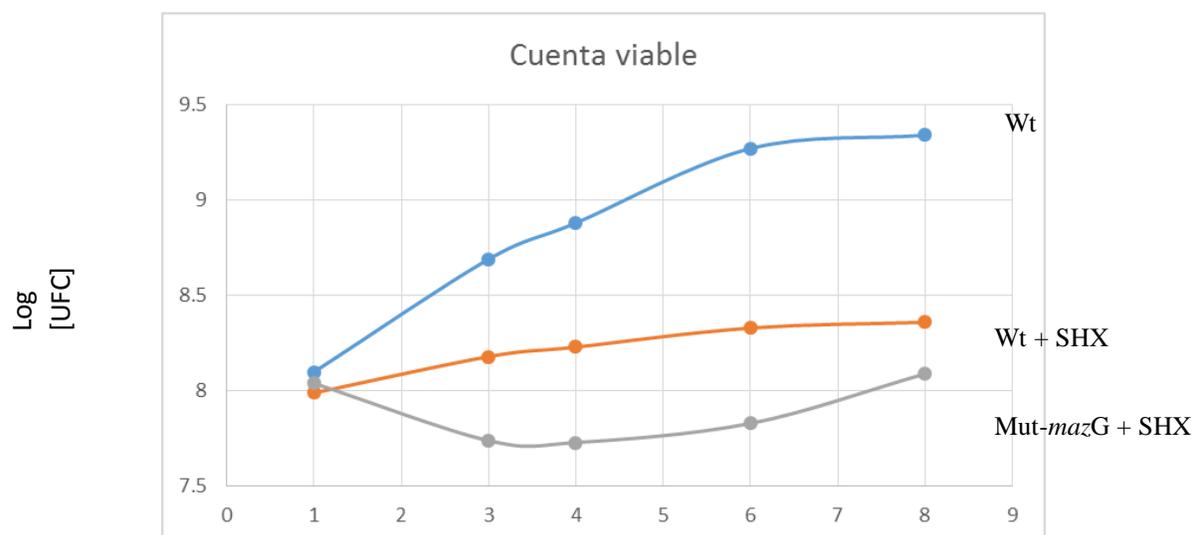


Figura- anexo 6. Curvas de disociación de las muestras analizadas: cada color indica una muestra por triplicado. Un solo pico nos da indicio de un solo producto amplificado.

Datos crudos (Cts de cada muestra)

	1	2	3	4	5	6
A	3 U 16S Ct. 13.71	3 U 16S Ct. 13.57	3 U 16S Ct. 13.43	3 U mazg Ct. 28.96	3 U mazg Ct. 30.13	3 U mazg Ct. 29.1
B	4 U 16S Ct. 13.49	4 U 16S Ct. 13.66	4 U 16S Ct. 13.95	4 U mazg Ct. 27.64	4 U mazg Ct. 27.38	4 U mazg Ct. 27.17
C	5 U 16S Ct. 12.93	5 U 16S Ct. 13.17	5 U 16S Ct. 13.6	5 U mazg Ct. 24.45	5 U mazg Ct. 24.99	5 U mazg Ct. 24.99
D	4sx U 16S Ct. 12.94	4sx U 16S Ct. 13.34	4sx U 16S Ct. 13.62	4sx U mazg Ct. 26.33	4sx U mazg Ct. 26.61	4sx U mazg Ct. 26.69
E	U 16S Ct. 6.04	5sx U 16S Ct. 13.29	5sx U 16S Ct. 13.71	5sx U mazg Ct. 24.44	5sx U mazg Ct. 24.55	5sx U mazg Ct. 24.31

Cuenta viable de $\Delta mazG$ vs wt de PAO1



Cuenta viable de la cepa mutante en *mazG* versus wt, bajo condiciones de estrés. En la gráfica se reporta el log de UFC (unidades formadoras de colonias con respecto al tiempo. Cada punto corresponde al log del promedio de un triplicado de la cuenta de UFC. En parte externa izquierda se señala a que cepa corresponde cada gráfica y la condición. Donde SH es hidroxamato de serina.

Tabla- anexo 3. Datos crudos de la cuantificación de los niveles de ppGpp.

Porcentaje de pixeles de GTP y ppGpp

GTP	wt	26.389	22.553	23.103
	wt-pHmG	25.724	25.175	25.166
	Δ mazG	27.581	24.723	27.814
	Δ mazG-pHmG	20.306	27.549	23.917
ppGPP	wt	23.633	32.794	27.763
	wt-pHmG	11.527	17.899	18.599
	Δ maz	38.604	32.85	31.162
	Δ mazG-pHmG	27.236	17.458	25.475

Razón ppGpp/GTP

EXP1	EXP2	EXP3
0.90	1.45408593	1.20170541
0.45	0.71098312	0.73905269
1.40	1.32872224	1.12037104
1.34	0.63370721	1.06514195

PROMEDIO	DESVSTAN
1.18	0.27969262
0.63	0.16049177
1.28	0.14516895
1.01	0.35661472

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agarwalla, Kealey, Santi and Stroud.** Characterization of the 23 S ribosomal RNA m5U1939 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* (2002); 8835–8840.
2. **Bachman MA & Swanson MS.** RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Molecular Microbiology* (2001) 40 (5) 1201-1214.
3. **Battesti A, Bouveret EJ.** Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction. *Bacteriol.* (2009) Jan; 191(2):616-24.
4. **Boer HA, Weyer WJ, de Boer JG, van der Heide S, Gruber M.** Synthesis of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate in spot mutants of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta.* (1977) Jan 20; 474(2):165-72.
5. **Boutte CC & Crosson S.** Bacterial lifestyle shapes the regulation of stringent response activation. *Trends Microbiol.* (2013) April; 21(4): 174–180.
6. **Bryan MJ, Burroughs NJ, Spence EM, Clokie MR, Mann NH, Bryan SJ.** Evidence for the intense exchange of MazG in marine cyanophages by horizontal gene transfer. *PLoS One.* (2008) Apr 23; 3(4):e2048.
7. **Cashel M.** Detection of (p) ppGpp accumulation patterns in *Escherichia coli* mutants. *Methods in molecular genetics.* (1994); 18: 341-356
8. **Cashel M, Gallant J.** Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature.* 1969 Mar 1; 221(5183):838-41.
9. **Cashel M, Kalbacher B.** The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. *J Biol Chem.* 1970 May 10;245(9):2309-18
10. **Chatterji D, Fujita N, Ishihama A.** The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta- subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells.* (1998); 15:279–87.
11. **Craig EA.** The heat shock response. *Rev Biochem.* (1985); 18(3):239-80.
12. **Dabrowska G, Prusińska J, Goc A.** The stringent response--bacterial mechanism of an adaptive stress response. *Postepy Biochem.* (2006); 52(1):87-93. Review.
13. **De la Fuente NC, Reffuveille F, Haney EF, Straus SK, Hancock RE.** Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* (2014) May 22;10(5)
14. **Donini P.** Turnover of ribosomal RNA during the stringent response in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* (1972) Dec 30; 72(3):553-69.
15. **Edlin & Broda.** Genetics of the "Ribonucleic Acid Control" Locus in *Escherichia coli*. *Bacteriological reviews.* (1968) Sept; (32)206-226.

16. **Erickson DL, Lines JL, Pesci EC, Venturi and Storey DG.** *Pseudomonas aeruginosa relA* Contributes to Virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infection and immunity*. (2004); 72: 5638–5645.
17. **Erickson DL, Lines JL, Pesci EC, Venturi V, Storey DG.** *Pseudomonas aeruginosa relA* contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun*. (2004); 72(10):5638-45.
18. **Ferullo DJ, Lovett ST.** The Stringent Response and Cell Cycle Arrest in *Escherichia coli*. *PLoS Genet*. (2008); 4(12).
19. **Fujita M, Tanaka K, Takahashi H, Amemura A.** Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol Microbiol*. (1994); 13(6):1071-7.
20. **Galperin MY & Koonin EV.** Who's your neighbor? New computational approaches for functional genomics. *Nat Biotechnol*. (2000); 18(6):609-13.
21. **Galperin MY, Moroz OV, Wilson KS, Murzin AG.** House cleaning, a part of good housekeeping. *Mol Microbiol*. (2006);59(1):5-19.
22. **Greenway DL, England RR.** PpGpp accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens* subjected to nutrient limitation and biocide exposure. *Lett Appl Microbiol*. (1999); 29(5):298-302.
23. **Green & Rogers.** Chemical Transformation of *E. coli*. *Methods Enzymol*. (2013); 529: 329–336
24. **Gross M, Marianovsky I, Glaser G.** MazG a regulator of programmed cell death in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. (2006); 59(2):590-601.
25. **Gonçalves AM, de Sanctis D, McSweeney SM.** Structural and functional insights into DR2231 protein, the MazG-like nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase from *Deinococcus radiodurans*. *J Biol Chem*. (2011)2; 286(35):30691-705.
26. **Hardalo & Edberg.** *Pseudomonas aeruginosa*. Assessment of Risk from Drinking Water. *Critical Reviews in Microbiology*. (1997); 23(1):47-75.
27. **Holloway BH.** Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev*. (1969) Sep; 33(3): 419–443.
28. **Imlay JA.** Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr Opin Microbiol*. (2015) Apr; 24:124-31.
29. **Kasai K1, Usami S, Yamada T, Endo Y, Ochi K, Tozawa Y.** A RelA-SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor in vivo and localizes to chloroplasts in vitro. *Nucleic Acids Res*. (2002)15; 30(22):4985-92.
30. **Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR.** Gram-negative bacteremia. *Am J Med*. (1980); 68(3):332-43.
31. **Lazzarini R & Cashel.** On the Regulation of Guanosine Tetraphosphate Levels in Stringent and Relaxed Strains of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. (1971): 4381-4385.

32. **Lee S, Kim MH, Kang BS, Kim JS, Kim GH, Kim YG, Kim KJ.** Crystal structure of *Escherichia coli* MazG, the regulator of nutritional stress response. *J Biol Chem.* (2008) 30; 283(22):15232-40.
33. **Lemke JJ, Durfee T, Gourse RL.** DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. *Mol Microbiol.* (2009), 74:1368-1379.
34. **Lennon CW1, Ross W, Martin-Tumasch S, Touloukhonov I, Vrentas CE, Rutherford ST, Lee JH, Butcher SE, Gourse RL.** Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes Dev.* (2012) Dec 1; 26(23):2634-46.
35. **Lu LD, Sun Q, Fan XY, Zhong Y, Yao YF, Zhao GP.** *Mycobacterial* MazG is a novel NTP pyrophosphohydrolase involved in oxidative stress response. *J Biol Chem.* (2010); 285(36):28076-85.
36. **Matsuoka Y, Shimisu K.** Metabolic regulation in *Escherichia coli* in response to culture environments via global regulators. *Biotechnol J.* (2011); (11):1330-41.
37. **Mechold U, Potrykus K, Murphy H, Murakami KS, Cashel M.** Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* (2013) Jul; 41(12):6175-89.
38. **Milon P, Tischenko E, Tomsic J, Caserta E, Folkers G, La Teana A, Rodnina MV, Pon CL, Boelens R, Gualerzi CO.** The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) Sep 19; 103(38):13962-7
39. **Moroz OV, Murzin AG, Makarova KS, Koonin EV, Wilson KS, Galperin MY.** Dimeric dUTPases, HisE, and MazG belong to a new superfamily of all-alpha NTP pyrophosphohydrolases with potential "house-cleaning" functions. *J Mol Biol.* (2005) Mar 25; 347(2):243-55. Epub 2005 Jan 27
40. **Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Barrell D.** Brings increased coverage and new features. *The InterPro Database*, (2003); *Nucl. Acids Res.* 31, 315–318.
41. **Munro PL, Ment, Flatau GN, Gauthier MJ.** Effect of Thermal, Oxidative, Acidic, Osmotic, or Nutritional Stresses on Subsequent Culturability of *Escherichia coli* in Seawater. *Microb Ecol* (1994) 27:57-63
42. **Murray KD, Bremer H.** Control of spoT-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* (1996) May 31; 259(1):41-57.
43. **My L, Rekoske B, Lemke JJ, Viala JP, Gourse RL, Bouveret E.** Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabH* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *J Bacteriol* (2013), 195:3784-3795.
44. **Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, McKay G, Siehnel R, Schafhauser J, Wang Y, Britigan BE, Singh PK.** Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science.* (2011) Nov 18; 334(6058):982-6.

45. **Ochi K, Nishizawa T, Inaoka T, Yamada A, Hashimoto K, Hosaka T, Okamoto S, Ozeki Y.** Heterologous expression of a plant RelA-SpoT homologue results in increased stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by accumulation of the bacterial alarmone ppGpp. *Microbiology*. (2012) Aug; 158:2213-24.
46. **Potrykus K, Cashel M (p)** ppGpp: still magical. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:35-5
47. **Poole K.** Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Canadian Journal of Microbiology*, 2014, 60(12): 783-791.
48. **Robinson A, Guilfoyle AP, Harrop SJ, Boucher Y, Stokes HW, Curmi PM, Mabbutt BC.** A putative house-cleaning enzyme encoded within an integron array a crystal structure defines a new MazG subtype. *Mol Microbiol*. (2007) Nov; 66 (3):610-21.
49. **Seyfzadeh M, Keener J, and Nomura.** SpoT-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci*. (1993) Dec 1; 90(23): 11004–11008.
50. **Shooter RA.** Colonization of hospital patients by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Proc R Soc Med*. (1971) Sep; 64(9): 989–990.
51. **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M.** The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. (1966) May; 43(2):159-271.
52. **Svitil AL, Cashel M, Zyskind JW.** Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. (1993) Feb 5; 268(4):2307-11.
53. **Tagami S, Sekine S, Kumarevel T, Hino N, Murayama Y, Kamegamori S, Yamamoto M, Sakamoto K, Yokoyama S.** Crystal structure of bacterial RNA polymerase bound with a transcription inhibitor protein. *Nature*. (2010) Dec 16; 468 (7326):978-82.
54. **Tosa T, Pizer LI.** Biochemical bases for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J Bacteriol*. (1971) Jun; 106(3):972-82
55. **Tosa T, Pizer LI.** Effect of serine hydroxamate on the growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. (1971) Jun; 106(3):966-71
56. **Toulokhonov, Shulgina, Hernandez VJ.** Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the β -subunit. *J. Biol. Chem*. (2001). 276:1220–25.
57. **Viducic D, Ono T, Murakami K, Susilowati H, Kayama S, Hirota K, Miyake Y.** Functional analysis of spoT, relA and dksA genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol Immunol*. (2006); 50(4):349-57.
58. **Vikas Jain, Manish Kumar and Dipankar Chatterji.** PpGpp: Stringent Response and Survival. *The Journal of Microbiology*. (2006) Feb; 1:10-44.

59. **Vogt SL, Green C, Stevens KM, Day B, Erickson DL, Woods DE, Storey DG.** The stringent response is essential for *Pseudomonas aeruginosa* virulence in the rat lung agar bead and *Drosophila melanogaster* feeding models of infection. *Infect Immun.* (2011)Oct;79(10):4094-104
60. **Watson K.** Microbial stress proteins. *Adv Microb Physiol.* (1990); 31:183-223. Review.
61. **Wendrich TM, Blaha G, Wilson DN, Marahiel MA, Nierhaus KH.** Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell.* (2002) Oct; 10(4):779-88.
62. **Wood TK.** Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol Bioeng.* (2015) Mar; 113(3):476-83.
63. **Zhang J, Zhang Y, and Inouye M.** *Thermotoga maritima* MazG Protein Has Both NucleosideTriphosphate Pyrophosphohydrolase and Pyrophosphatase Activities. *J Biol Chem.* (2003) Jun 13; 278(24):21408-14.