



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

“La proteína Gp14 del bacteriófago temperado H66, homóloga de LexA de la bacteria, afecta la transcripción de los genes de la respuesta SOS en *Pseudomonas aeruginosa* y regula la expresión de genes del fago”

TESIS

Que presenta

Q.B.P. Jair Martínez Martínez

Para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

CIUDAD DE MÉXICO

MARZO, 2023

ASESORES

Dra. Rosa Ma. Bermúdez Cruz

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN

Dr. Luis Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN

Dra. Norma Oviedo de Anda

Unidad de Investigación en Infectología e Inmunología, Centro Médico Nacional La Raza,
IMSS

El presente trabajo se realizará bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña en el laboratorio 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. El autor agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante la realización del proyecto (CVU: 912002).

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Respuesta SOS	8
1.2 Represor LexA	8
1.3 Autoprocesamiento de LexA.....	9
1.4 Respuesta SOS en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.5 Gp6 del bacteriófago GIL01 de <i>Bacillus thuringiensis</i> , homóloga de LexA.	11
2. ANTECEDENTES.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	13
4. OBJETIVO GENERAL	14
5. HIPOTESIS.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Bacterias, fagos y plásmidos.	16
6.2 Diseño de iniciadores	17
6.3 Clonación de proteínas recombinantes en pHERD26T.....	17
6.3 Amplificación por PCR y clonación en pGEM-T Easy vector.	17
6.4 PCR de colonia.....	18
6.5 Digestión enzimática de DNA plasmídico	18
6.6 Subclonación en pHERD26T	19
6.7 Comprobación de clonaciones en pHERD26T	20
6.8 Secuenciación de construcciones	20
6.9 Transformación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	20
6.10 Ensayo de sobrevivencia en respuesta a la luz UV.	21
6.11 Expresión diferencial en presencia de mitomicina C.	21
6.12 Purificación de RNA total	22
6.13 Digestión del DNA contaminante	22
6.14 Reacción de retrotranscripción.....	23
6.15 Estandarización y validación de iniciadores para PCR cuantitativa (qPCR)	23
6.16 PCR punto final a partir de cDNA	23
6.17 Eficiencia de amplificación y curva de disociación	24
6.18 PCR cuantitativa.....	24
6.19 Análisis de expresión diferencial	24
7. RESULTADOS	26
7.1 Clonaciones en pHERD26T	26
7.2 Ensayo de respuesta a la luz UV	28

7.3	Validación de iniciadores para qPCR.....	29
7.4	Purificación de RNA total.....	32
7.5	Inducción de la respuesta SOS en <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	33
7.6	Análisis transcripcional del gen <i>gp14</i> de H66.....	33
7.7	Análisis transcripcional de los ORFs 32 y 70 de H66.....	34
7.8	Efecto de Gp14 sobre la transcripción de genes SOS.....	35
7.9	Efecto de la expresión de Gp14 sobre la morfología celular de PAO1.....	36
8.	DISCUSION.....	38
9.	CONCLUSIONES.....	42
10.	PERSPECTIVAS.....	43
11.	REFERENCIAS.....	44

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del represor LexA de <i>E. coli</i>	9
Figura 2.	Mecanismo de inducción de la respuesta SOS.....	10
Figura 3.	Elevada identidad a nivel de secuencia entre LexA-NTD de <i>P. aeruginosa</i> y Gp14 de H66, así como las posibles señales de degradación de LexA-NTD en la clase Gamma proteobacteria....	26
Figura 4.	Clonación de LexA-NTD y Gp14 en el vector de expresión pHERD26T.....	27
Figura 5.	El análisis de los electroferogramas indica que las construcciones obtenidas son útiles para la expresión de Gp14 y LexA-NTD.....	28
Figura 6.	La presencia de los residuos VAA en el extremo C-terminal de LexA-NTD y Gp14 son determinantes en su actividad represora sobre la respuesta SOS en <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 7.	Los iniciadores diseñados cumplen con los requerimientos de especificidad y eficiencia para ser utilizados en ensayos de qPCR.....	31
Figura 8.	Análisis de calidad de las muestras de RNA..	32
Figura 9.	La expresión de Gp14 en la lisógena de H66 es independiente de la transición al ciclo lítico mientras que los ORFs 32 y 70 del profago son regulados por LexA.....	34
Figura 10.	El represor LexA reprime la expresión de los ORFs 32 y 70 del fago durante la lisogenia.....	35
Figura 11.	Gp14 promueve un incremento en la expresión de los transcritos de algunos genes SOS..	36
Figura 12.	La expresión de Gp14 a partir de pHERD26T induce el crecimiento filamentoso en PAO1.....	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Genotipo y origen de las cepas bacterianas y fagos.....	16
Tabla 2.	Secuencia de iniciadores de DNA.....	19

RESUMEN

El bacteriófago temperado H66 es capaz de lisogenizar a la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. La secuencia completa del genoma del fago lo clasifica filogenéticamente cercano al grupo de F116 o género *Hollowayvirus* según la clasificación del ICTV. Por homología con genes caracterizados en las bases de datos, se han asignado funciones putativas a algunos marcos abiertos de lectura (ORFs) en el genoma de H66. Entre ellos destacan los que codifican proteínas estructurales del virión, el represor, el antirepresor y la integrasa. La proteína codificada en el ORF14, Gp14, muestra una evidente homología con el dominio amino terminal del represor de la respuesta SOS, LexA, de *Escherichia coli*. Previamente se demostró que la ausencia de este gen en H66 causa una disminución en los niveles de inducción espontánea del profago, aunque no es determinante en desarrollo de éste. De forma complementaria se ha identificado la presencia de secuencias palindrómicas homólogas a los operadores de unión de la proteína LexA, llamadas cajas SOS, en el genoma de H66. En este trabajo se demuestra que dichas cajas SOS son funcionales en el genoma del fago, dado que LexA reprime la transcripción de los ORFs 32 y 70 del mismo modo en que regula los genes SOS bacterianos. Por otra parte, *gp14* presenta las propiedades moleculares y funcionales de un “*moron*”, es decir, su expresión parece ser independiente del represor del fago durante la lisogenia, obedeciendo a un promotor y un terminador de la transcripción propios. Durante la lisogenia y en competencia con LexA, Gp14 influye en la expresión de genes de la bacteria y del fago, mostrando un discreto efecto activador y opuesto a la función represora de LexA. Iniciado el ciclo lítico y la respuesta SOS, Gp14 parece atenuar la activación del ORF32 como gen SOS, y al mismo tiempo mantener la activación de otros genes. De manera complementaria, se presenta evidencia que indica que el efecto de Gp14 sobre la expresión de los genes SOS, es favorecido debido a la ausencia de una señal de degradación en su extremo carboxilo terminal.

ABSTRACT

The temperate bacteriophage H66 infects *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. The sequence of the phage genome showed that it is phylogenetically close to the F116 group or *Hollowayvirus* genus according to the ICTV classification. Putative functions have been assigned to some open reading frames (ORFs) in the H66 genome by homology with genes characterized in the databases. Among them are those encoding structural proteins of the virion, lysogenic repressor and antirepressor, and integrase. The protein encoded in ORF14, Gp14, shows apparent homology to the N-terminal domain of the *Escherichia coli* SOS response repressor, LexA. It was previously found that the absence of this gene in H66 leads to a decrease in the spontaneous induction of the prophage, although it is not critical to its development. In addition, the presence of palindromic sequences homologous to the operators of the LexA protein, called SOS boxes, were identified in the H66 genome. In this work it is shown that these SOS boxes are functional in the phage genome as LexA represses transcription of ORFs 32 and 70 in the same way it regulates bacterial SOS genes. On the other hand, *gp14* exhibits the molecular and functional properties of a “moron” gene, meaning that it is flanked by a constitutive promoter and an intrinsic transcription terminator, resulting in Gp14 being expressed during lysogeny. During lysogenic cycle and in competition with LexA, Gp14 affects the expression of bacterial and phage genes; It shows a moderate activating effect counteracting the repressor function of LexA. Once the lytic cycle and SOS response have begun, Gp14 appears to attenuate activation of ORF32 while maintaining activation of other genes. In addition, evidence is presented indicating that the effect of Gp14 on the expression of SOS genes is favored due to the absence of a degradation motif at its carboxy-terminal sequence.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Respuesta SOS

En *Escherichia coli* la exposición a agentes físicos y químicos que comprometen la integridad del DNA resulta en la activación de funciones de “salvación” no expresadas en condiciones normales de crecimiento. La inhibición de la división celular, la inducción de profagos en cepas lisógenas y la activación de vías de reparación del DNA propensas a causar mutaciones, son algunos de los rasgos fenotípicos descritos de manera clásica durante la respuesta “SOS” (Blanco & Devoret, 1973; Boyle & Setlow, 1970; Radman, 1975; Witkin, 1976). Análisis de cepas mutantes defectuosas en la activación de dichas funciones o, que las expresan de manera constitutiva, permitieron definir los productos de los genes *recA* y *lexA* como los reguladores del *switch* activación-represión de esta ruta (Clark, 1973; Mount et al., 1976). Brevemente, tras la irradiación con luz UV los niveles de RecA se incrementan de manera significativa, a la vez que disminuye la presencia de LexA y con ello se observa la activación de genes como *uvrA*, *uvrB*, *dinA*, *dinB* y *sulA*, entre otros (Little & Mount, 1982; McEntee, 1977). Finalmente, si el daño ha sido reparado los niveles de LexA se reestablecen y se reprimen las funciones ya descritas.

1.2 Represor LexA

El gen *lexA* de *E. coli* codifica para el represor de la respuesta SOS, LexA (Little & Harper, 1979). Consta de 609 nucleótidos en su región codificante que resultan en una proteína de 202 residuos de aminoácidos con un peso aproximado de 22.7 kDa (Horii, Ogawa, & Ogawa, 1981). La transcripción del gen se encuentra reprimida por su mismo producto, con lo que se regulan los niveles basales de LexA en la célula bajo condiciones de crecimiento óptimo (Brent & Ptashne, 1980; Little et al., 1981). Desde el punto de vista estructural un monómero de LexA presenta dos dominios claramente definidos, unidos por una región corta altamente hidrofílica (Fig. 1A) (Luo et al., 2001). En primer lugar, el dominio amino terminal (NTD por sus siglas en inglés, *N-terminal domain*), presenta 3 α -hélices que conforman en conjunto un motivo hélice-vuelta-hélice particularmente variable del motivo HTH clásico (HTH por *Helix-turn-helix*) comprendido entre los residuos 28 y 48 (Fogh et al., 1994; Hurstel et al., 1986). Por otro lado, el dominio carboxilo terminal (CTD), esta predominantemente conformado por láminas beta, al igual que en otros represores como CI de λ y LacI de *E. coli* (Fogh et al., 1994). Una característica adicional en común con otros represores es la capacidad de LexA para formar dímeros y tetrámeros mediante el contacto entre CTD's de dos y cuatro monómeros, respectivamente (Hurstel et al., 1986; Schnarr et al., 1988).

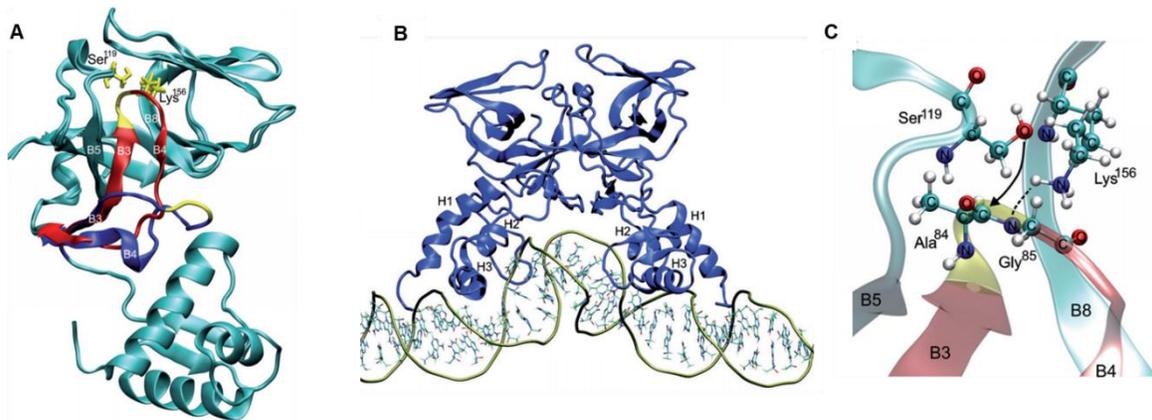


Figura 1. Estructura del represor LexA de *E. coli*. A. Estructura terciaria de un monómero de LexA, se muestra el dominio amino terminal con tres alfa hélices conformando el motivo HTH y el dominio carboxilo terminal rico en láminas beta. En este se señalan los residuos catalíticos Ser119 y Lys156 (amarillo) y el sitio de corte entre las láminas B3 y B4 (amarillo). B. Modelo de unión de un dímero de LexA a una caja SOS en el DNA; la hélice 3 (H3) de cada monómero de encuentra incrustada en el surco mayor de DNA reconociendo así el palíndromo CTGT-N₈-ACAG. C. Mecanismo de autoprocésamiento de LexA, dónde el grupo hidroxilo activado de Ser119 realiza un ataque nucleofílico al carbono carbonilo del enlace peptídico entre Ala84 y Gly85. Tomado y adaptado de (Butala et al., 2009).

La regulación transcripcional ejercida por LexA es establecida por la unión específica de un dímero (Fig. 1B) a secuencias de 16 pares de bases denominadas “cajas SOS” localizadas río arriba de los genes SOS y cuya secuencia consenso se ha determinado como 5´ CTGTATATATACAG 3´. Como es apreciable, la secuencia reconocida es un palíndromo en relación con la cadena complementaria, es decir, el extremo 5´ CTGT es complementario a la secuencia ACAG del extremo 3´ (Brent & Ptashne, 1981; Little et al., 1981). Este modelo, dónde la mitad de una caja es reconocida por un monómero de LexA y una caja es ocupada por un dímero, es apoyado por evidencia experimental *in vitro*, así como en mutantes que expresan de manera constitutiva genes debido a cambios en la secuencia y estructura de dichas cajas. La inhibición del inicio de la transcripción por la RNA polimerasa determinada por la unión a una o más cajas SOS ubicadas sobre la región promotora de los genes ha sido reportada en el mismo gen *lexA*, *recA*, *sulA*, *uvrA*, *polB*, *umuD* y el gen de la colicina E1, por mencionar algunos (Ebina et al., 1983; Iwasaki et al., 1990; Little et al., 1981; Mizusawa et al., 1983; A. Sancar et al., 1982; G. B. Sancar et al., 1982).

1.3 Autoprocésamiento de LexA

Como se mencionó previamente, RecA y LexA se expresan de manera basal en las células bacterianas. La proteína RecA cumple con tres tareas fundamentales para el mantenimiento de la integridad del genoma; la primera es su función de recombinasa en el mecanismo de recombinación homóloga, le siguen la resolución de lesiones que bloquean la progresión de la replicación y por último la inducción del autoprocésamiento de LexA en presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA)

y ATP (Bell & Kowalczykowski, 2016). La exposición del DNA a agentes que comprometen la integridad, tales como la luz UV o mitomicina C, genera los productos necesarios para la activación de RecA a su forma RecA*, en este sentido es conocida a detalle la elevada afinidad de RecA* por el DNA irradiado con luz UV, donde se forman lesiones como los anillos de ciclobutano entre pirimidinas adyacentes o fotoproductos 6-4 (Lu & Echols, 1987).

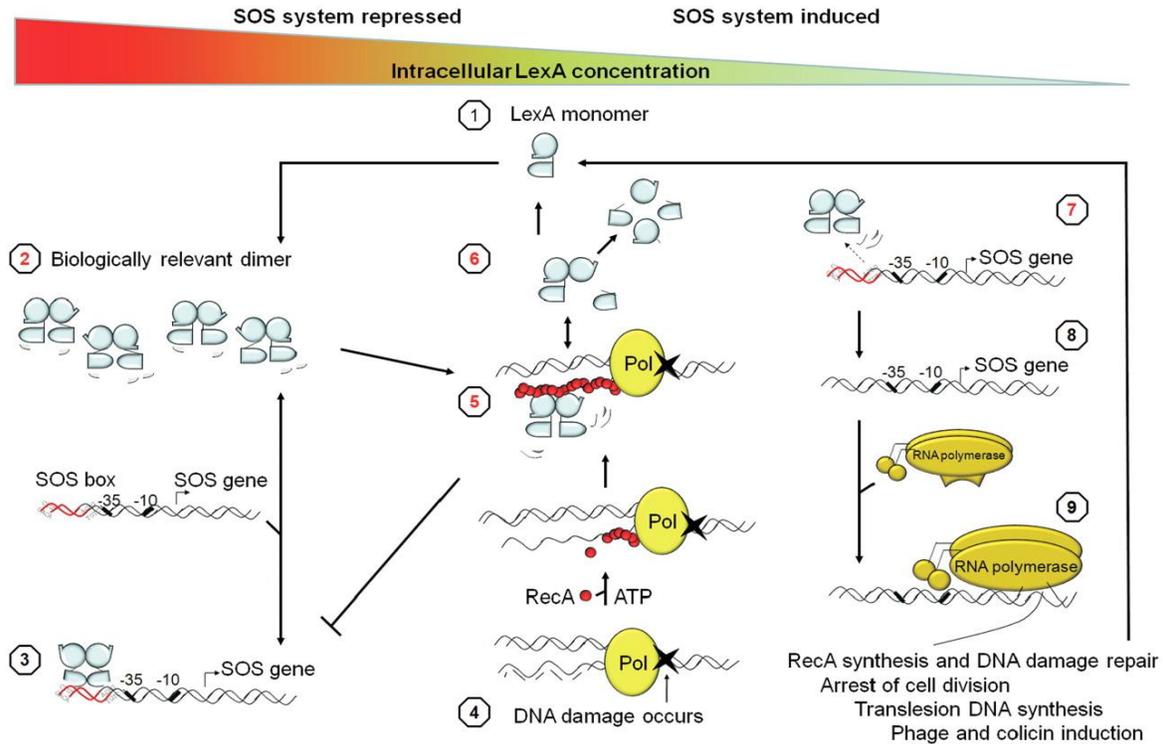


Figura 2. Mecanismo de inducción de la respuesta SOS. (1) Los monómeros de LexA en abundancia se asocian para formar dímeros en solución (2). (3) Los dímeros son la unidad de reconocimiento a las cajas SOS de los genes de la ruta. (4) Como consecuencia del daño al DNA las horquillas de replicación estancadas permiten el reconocimiento y unión de RecA a ssDNA en presencia de ATP, (5) los filamentos de RecA (RecA*) inducen el autoprocésamiento de dímeros de LexA libres en el citosol. La caída de la reserva de dímeros libres trae consigo el desplazamiento del equilibrio y la eventual disociación de LexA unida a las cajas SOS (7), siendo liberadas en primera instancia aquellas de menor afinidad. (8,9) En este punto los promotores de los genes SOS pueden ser reconocidos por la RNA polimerasa y transcritos a mRNA, que serán traducidos a los productos efectores que cumplen con las funciones de reparación del DNA, detención de la división celular, continuación de la replicación e inducción de colicinas y profagos, por mencionar algunos. Tomado de (Butala et al., 2011)

El acoplamiento de varias unidades de RecA con fragmentos de DNA de cadena sencilla forma filamentos de RecA* (Rosenberg & Echols, 1990; Takahashi et al., 1986), dicha forma activa es capaz de inducir un cambio conformacional en LexA que deriva en el aproximamiento de los residuos catalíticos serina 119 y lisina 156 al sitio blanco de corte proteolítico localizado entre alanina 84 y glicina 85 con la subsecuente proteólisis (Fig. 1C). La separación de ambos dominios de LexA provoca una caída abrupta de la afinidad del dominio amino terminal por las cajas SOS, las cuales

son liberadas y los promotores proclives a ser reconocidos por la RNA polimerasa (Fig. 2) (Granger-Schnarr et al., 1988; Horii, Ogawa, Nakatani, et al., 1981; Slilaty & Little, 1987).

1.4 Respuesta SOS en *Pseudomonas aeruginosa*

Genes homólogos de *recA* y *lexA* han sido reportados en una amplia variedad de bacterias de distintos grupos, incluida *Pseudomonas aeruginosa*. Por un lado, el producto del gen *recA* resultó capaz de complementar las cepas de *E. coli* deficientes en este alelo. Por su parte, el homólogo de *lexA* presenta similitudes de secuencias a nivel de nucleótidos y aminoácidos de 61 y 64 %, respectivamente, en comparación con *lexA* de *E. coli*. Adicionalmente, es clara la conservación de residuos activos y sitio blanco tipo Ala-Gly como el ya descrito, así como la presencia de dos cajas SOS putativas río arriba del sitio de inicio de la transcripción del propio gen (Garriga et al., 1992; Kokjohn & Miller, 1987). La activación de promotores presuntamente reprimidos por LexA tras el estímulo de luz UV fue confirmado experimentalmente, lo que sugiere la presencia de una red en respuesta al daño similar a la descrita en *E. coli* (Calero et al., 1993). De manera más concreta, Cirz et al. (2006) describieron la presencia de 15 genes sobreexpresados de manera significativa tras el tratamiento con ciprofloxacino, algunos con clara homología con genes de *E. coli* como *lexA*, *sulA*, *recA*, *recN*, *imuB* o *dinG*, y algunos con funciones por confirmar. Por último, de estos genes se ha confirmado experimentalmente que el operón *imuABC* está implicado en la generación de mutaciones como respuesta al daño causado por luz UV (Lujan et al., 2019).

1.5 Gp6 del bacteriófago GIL01 de *Bacillus thuringiensis*, homóloga de LexA.

Como un caso interesante recientemente reportado se encuentra el modelo de regulación transcripcional del fago GIL01 de *B. thuringiensis* y su relación con la respuesta SOS. En primer lugar, la función de represor de mantenimiento de lisogenia es cumplida por LexA de la bacteria, en cooperación con Gp7, una proteína codificada por el fago que potencia el reconocimiento de secuencias operadores por parte de LexA e interfiere con el autoprocesamiento inducido por RecA*, retrasando la inducción de la respuesta SOS y el cambio hacia el ciclo lítico (Fornelos et al., 2011; Fornelos et al., 2015). Adicionalmente, la proteína gp6 de GIL01, homóloga del dominio amino terminal de LexA, es capaz de unirse al DNA jugando el papel de activador transcripcional del promotor P3, dirigiendo la transcripción de los genes de la fase tardía del fago (Fornelos et al., 2018). De este modo la proteína Gp6 de GIL01 representa el único precedente de un homólogo de LexA codificado por el fago con regulación transcripcional determinante en la replicación de este.

2. ANTECEDENTES

El bacteriófago H66 es un fago temperado capaz de lisogenizar a *P. aeruginosa* PAO1. La microscopía electrónica de transmisión y la secuenciación completa de su genoma permitió clasificarlo como un podovirus y miembro del grupo de F116 por presentar porcentajes de identidad de entre 73 y 77 % a nivel de nucleótidos en comparación con el resto de los virus (Pourcel et al., 2017). El estudio a profundidad de los fagos F116 y phiC725A indica que el receptor de infección es el pili tipo IV de *P. aeruginosa* (Pemberton, 1973; Pourcel et al., 2017). Adicionalmente, la secuenciación del genoma de estos fagos revela que pueden llevar a cabo transducción generalizada como resultado de su integración en el genoma bacteriano (Byrne & Kropinski, 2005; Pourcel et al., 2017). Finalmente, una propiedad interesante es la capacidad del DNA de estos fagos para integrarse en el genoma de la célula hospedera o alternativamente permanecer como episoma en el citosol durante la lisogenia (Byrne & Kropinski, 2005; Cazares, 2016; Pourcel et al., 2017).

El genoma de H66 contiene 71 ORFs y de estos solo a algunos fue posible asignarles funciones putativas por homología con proteínas de referencia (Maya-Lucas, 2012). La proteína codificada en el ORF 14, nombrada Gp14 en adelante, presenta una clara homología con el NTD de LexA de *E. coli*, con una identidad aminoacídica cercana al 30 %. En conjunto, la evidencia obtenida por la unión de Gp14 a cajas SOS, sumado a la hipersensibilidad a la luz UV debido a la sobreexpresión de Gp14, es indicativo de una posible función de Gp14 como regulador maestro actuando sobre genes con cajas SOS en su región promotora. Al mismo tiempo, la presencia de secuencias homólogas a los operadores canónicos de LexA, contiguas a las regiones codificantes de los ORFs 32 y 70, colocan en perspectiva una posible regulación de Gp14 y/o LexA sobre la expresión de los genes del fago (Ortega-Oliva, 2020)

3. JUSTIFICACIÓN

La estrecha relación entre las bacterias y los virus que las infectan es de particular interés debido a la información obtenida en el sentido de la adquisición horizontal de genes y, en consecuencia, su impacto sobre la diversidad de las poblaciones microbianas. Adicional a la variedad de funciones celulares que se ven afectadas durante la replicación de los fagos en la célula hospedera, a la fecha se siguen reportando nuevos genes con influencia en procesos genéticos y metabólicos previamente no considerados. La evidencia genética y molecular compilada en este punto sugiere que la proteína Gp14 del fago H66, homóloga de LexA de *E. coli*, puede interferir la respuesta SOS en *P. aeruginosa*, limitando de este modo la sobrevivencia ante el daño al DNA generado por agentes físicos y químicos, a la par que podría regular la expresión de genes propios del fago jugando un papel relevante en su ciclo de replicación. La profunda caracterización de esta proteína y sus efectos finales en la relación bacteria-bacteriófago representaría un nuevo modelo de regulación en este rubro.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la proteína Gp14 codificada por el bacteriófago H66 en la expresión de los genes de la respuesta SOS en *Pseudomonas aeruginosa*, así como la posible regulación sobre genes del genoma viral con cajas SOS putativas.

Objetivos particulares

- Clonación de Gp14 y LexA-NTD en pHERD26T, así como las mutantes LexA-NTD₈₇ y Gp14_{VAA}.
- Sobreexpresión de Gp14 y LexA-NTD en PAO1 para la determinación de la respuesta al daño por luz UV.
- Diseño y validación de iniciadores para PCR cuantitativa.
- Purificación de RNA total de las cepas *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAO1 (H66) y *P. aeruginosa* PAO1 (H66- γ), en presencia de mitomicina C como inductor de la respuesta SOS.
- Análisis estadístico de la expresión diferencial de los genes mediante RT-qPCR.

5. HIPOTESIS

La proteína Gp14 del fago H66 afecta la expresión de los genes de la respuesta SOS en la cepa lisógena de *P. aeruginosa* PAO1 y podría modificar la expresión de genes propios del fago. Dicha función es favorecida por la posible resistencia de Gp14 a la degradación por ClpXP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Bacterias, fagos y plásmidos.

La cepa de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada en este trabajo fue PAO1, perteneciente a la colección Manoil (Jacobs et al., 2003), el fago temperado H66 forma parte de la colección de fagos de los laboratorios 3 y 8 del departamento de genética y biología molecular del Cinvestav Unidad Zacatenco. El fago H66- γ es un mutante cuyo ORF14 (codificante para Gp14) fue sustituido por el *cassette* de resistencia a gentamicina *aacC1* (Ortega-Oliva, 2020). La cepa de referencia PAO1 y sus lisógenas derivadas se utilizaron en los ensayos de expresión diferencial en presencia de mitomicina C. Las construcciones genéticas se obtuvieron en la cepa de *Escherichia coli* DH5 α . Las características fenotípicas y genotípicas más relevantes para cada caso se resumen en la tabla 1.

El vector utilizado para la expresión de Gp14 de H66 y el dominio amino terminal de LexA (LexA-NTD en adelante) de *P. aeruginosa* PAO1, así como sus respectivas mutantes, fue pHERD26T. Las bacterias transformadas con este plásmido cuentan con resistencia a tetraciclina y la expresión de los genes clonados está bajo el control del promotor pBAD, inducible por L-(+)-arabinosa (Qiu, Damron, et al., 2008).

Tabla 1. Genotipo y origen de las cepas bacterianas y fagos.

Cepa o Fago	Genotipo	Referencia u origen
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZAM15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(<i>r_k⁻ m_k⁺</i>), λ.</i>	
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	PAO1 silvestre	(Jacobs et al., 2003)
PAO1 (H66)	PAO1 lisógena para H66	Éste trabajo
Fago H66	Podofago F116-like.	
Fago H66- γ	Fago derivado de H66, el ORF_14 fue sustituido el casete de resistencia a gentamicina <i>aacC1</i> obtenido por recombinación homóloga.	(Ortega-Oliva, 2020)

6.2 Diseño de iniciadores

Pares de iniciadores fueron diseñados manualmente con el objetivo de clonar de manera dirigida las regiones codificantes del ORF14 de H66 y *lexA*-NTD de *P. aeruginosa* PAO1. Un sitio de corte para la enzima *NcoI* se añadió río arriba del codón de inicio en los iniciadores sentido; por su parte, los iniciadores antisentido portan el sitio de corte para la enzima *HindIII* inmediatamente después del codón de paro TAA. Adicionalmente, se utilizaron iniciadores para eliminar o adicionar el péptido señal de degradación putativo valina-alanina-alanina (VAA) en el extremo carboxilo terminal de LexA-N y Gp14, respectivamente. Finalmente, todos los iniciadores “sentido” codifican para una secuencia de 6 histidinas consecutivas inmediatamente después del codón ATG, con el objetivo de corroborar la expresión de las proteínas recombinantes mediante *Western-blot*.

Por otra parte, los iniciadores para la amplificación y detección por PCR cuantitativa se diseñaron tomando la secuencia de los genes *lexA*, *sulA*, *yebG* y *recN*, depositadas en la base de datos de *Pseudomonas* Genome DB (<https://www.pseudomonas.com/>), específicamente aquellas reportadas en PAO1. De manera similar, para el diseño de iniciadores dirigidos a la amplificación de genes del fago se tomaron las secuencias a partir del genoma de H66 almacenado en la base de datos Genbank del NCBI, con el número de acceso KC262634.1. En ambos casos se asistió del programa Primer3Plus (Untergasser et al., 2012) para el diseño de iniciadores específicos bajo los siguientes criterios de inclusión; temperatura de alineamiento de $58\text{ °C} \pm 1$, longitud de $20\text{ pb} \pm 5$, porcentaje de GC $50\% \pm 10$, tamaño de la región amplificada entre 75-150 pb. La secuencia y características en cada par se enlistan en la tabla 3.

6.3 Clonación de proteínas recombinantes en pHERD26T.

A fin de evaluar las diferencias en la estabilidad de Gp14 de H66 y el dominio amino terminal de LexA, LexA-NTD, se generaron las construcciones pHERD26T_gp14, pHERD26T_lexA-NTD, pHERD26T_gp14vaa y pHERD26T_lexA-NTD87, las cuales se transformaron en PAO1, cepa dónde se estudió la capacidad de sobrevivencia a la exposición con luz UV en presencia de las cuatro proteínas.

6.3 Amplificación por PCR y clonación en pGEM-T Easy vector.

Usando DNA total de *P. aeruginosa* PAO1 y de la lisógena *P. aeruginosa* PAO1 (H66) se amplificaron por PCR las secuencias codificantes de *lexA*-NTD y Gp14, respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron: I) desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, II) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, III) alineamiento a 69 °C por 30 segundos y IV) extensión a 72 °C por 1 minuto; los pasos II, III y IV se repitieron 35 ciclos para concluir con la extensión final

a 72 °C durante 5 minutos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL con concentraciones finales de iniciadores de 200 nM, dNTPs 200 nM, 0.5 U/µL de Taq polimerasa (DreamTaq DNA Polymerase, ThermoFisher Scientific) y 100 ng de DNA molde. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. Para la confirmación por tamaño se cargó en todos los casos un carril con *LongRange DNA Ladder* (Jena Bioscience). Posteriormente se procedió a clonar los productos de PCR en el vector de transición pGEM-T Easy vector (Promega). Para ello se mezcló 1 µL de producto de PCR con 5 µL de *2X Rapid Ligation Buffer*, 1 µL de ligasa de T4 y 3 µL de agua destilada estéril para aforar a un volumen de reacción de 10 µL. Las reacciones de ligación se incubaron toda la noche a 4 °C y el contenido total se transformó mediante choque térmico en células quimiocompetentes (Hanahan et al., 1991) de *E. coli* DH5α. Las bacterias transformantes se seleccionaron en cajas de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL tras su incubación toda la noche a 37 °C.

6.4 PCR de colonia

Colonias transformantes con los plásmidos recombinantes pGEM_gp14, pGEM_lexA-NTD, pGEM_gp14vaa y pGEM_lexA-NTD87 se analizaron mediante PCR a fin de demostrar la presencia del producto clonado. Brevemente, tras un pase en cajas de LB/ampicilina, colonias aisladas para cada caso se disgregaron en 50 µL de agua destilada estéril y se hirvieron en baño maría por 10 minutos. 3 µL del extracto obtenido se utilizaron como DNA molde en reacciones de PCR punto final y se seleccionaron aquellos aislados positivos a la presencia de la banda de tamaño esperado.

6.5 Digestión enzimática de DNA plasmídico

De las cepas seleccionadas en el punto anterior se obtuvieron cultivos de toda la noche en medio líquido LB suplementado con ampicilina, incubados a 37 °C en agitación constante. Paralelamente se sembró un cultivo de la cepa *E. coli* DH5α, previamente transformada con el vector de expresión vacío pHERD26T, en medio LB suplementado con tetraciclina en una concentración final de 15 µg/mL. 3 mL de cada cultivo se centrifugaron a máxima velocidad y a partir de la pastilla se purificó el DNA plasmídico siguiendo las indicaciones del fabricante (*Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit*, Jena Bioscience). 3 µg de DNA plasmídico se digirieron toda la noche a 37 °C con las enzimas *NcoI* y *HindIII* (5 unidades), así como en presencia de ambas esperando ver la liberación de fragmentos de aproximadamente 200 pb. Los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en agarosa bajo las condiciones ya mencionadas.

Tabla 2. Secuencia de iniciadores de DNA.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)	Ensayo
16SPA01_Fwd	CTTGACATGCTGAGAACTTTCC	22	qPCR
16SPA01_Rvs	CGAGGTGCTGGTAACTAAGG	20	qPCR
LexAPA01_Fwd	CGTATCAATCCCGCCTTCTT	20	qPCR
LexAPA01_Rvs	CCGATGTCCTTCATGCTCAT	20	qPCR
SulAPA01_Fwd	GTTGCCACTGTTCCAGGAA	19	qPCR
SulAPA01_Rvs	GAAGGGCTGTTCGATGACATC	25	qPCR
RecNPA01_Fwd	ACCAGCCAGGAAGCTCGAA	18	qPCR
RecNPA01_Rvs	GGCTTTCCAGTTCGTTTTTCG	20	qPCR
YebGPA01_Fwd	GGATCAGGAGCGTTTTGTTC	20	qPCR
YebGPA01_Rvs	CCGAGTTCCTCCACCTGTTC	20	qPCR
ORF32_Fwd	CAAGAACTTCGGACGGTAACTA	22	qPCR
ORF32_Rvs	GGACAACACTTCCATAACTCCTT	23	qPCR
ORF70_Fwd	CCTTGGACGGGATAACATACTT	22	qPCR
ORF70_Rvs	CGGAAGTCATCGGGTATCTG	20	qPCR
ORF14_Fwd	CGAGGTTCTGTCGTGAAGTC	20	qPCR
ORF14_Rvs	TAGCCTTTCTCCGTCCAGAA	20	qPCR
gp14his6_Fwd	ACCCATGGTGCATCACCATCACCATCACAAGTCGGCCCCCTC	43	Clonación
gp14WT_Rvs	GCAAGCTTTTAGAGEGGGCGGATACT	26	Clonación
gp14VAA_Rvs	CAGTACCAAGVTTTTAGGCGGCGACGAGCGGCGGATACTG	41	Clonación
lexANhis6_Fwd	ACCCATGGTGCATCACCATCACCATCACCAGAAGCTGACGCCCC	46	Clonación
lexANWT_Rvs	GCAAGCTTTTAGGCGGCGACCG	23	Clonación
lexAN87_Rvs	CAGTGCCAAGCTTTTACCGTCCGATCACCGGC	32	Clonación
Seq26T_Fwd	TCGCAACTCTCTACTGTTTCTC	22	Secuenciación
Seq26T_Rvs	GAAAGGGGGATGTGCTGC	18	Secuenciación

6.6 Subclonación en pHERD26T

Las 4 bandas liberadas de pGEM-T por acción de las enzimas *NcoI* y *HindIII*, al igual que pHERD26T linealizado, se recuperaron de gel de agarosa. El DNA presente en cada fragmento se purificó haciendo uso del kit *GeneJET Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posterior a la cuantificación se realizaron 4 mezclas de ligación con las siguientes especificaciones: relación 10:1 inserto-vector vacío (100 ng de pHERD26T), 1 μ L de *buffer* de ligación, 1 μ L de ligasa de T4 (Thermo Fisher Scientific) y agua estéril necesaria para llevar a 10 μ L finales. Las reacciones de ligación y la reacción control (sin inserto) se incubaron toda la noche a 20 °C. Al día siguiente el contenido total se transformó en células de *E. coli* DH5 α

quimiocompetentes. La selección de colonias transformantes se realizó en cajas de LB tetraciclina 15 µg/mL, incubadas a 37 °C toda la noche.

6.7 Comprobación de clonaciones en pHERD26T

Colonias de *E. coli* DH5α resistentes a tetraciclina se analizaron por PCR de colonia siguiendo el protocolo ya descrito, esta vez utilizando el par de iniciadores seq26T_forward y seq26T_reverse, con una temperatura de alineamiento de 55 °C. Debido a que los iniciadores sentido y antisentido hibridan flanqueando el sitio de clonación múltiple de pHERD26T, se seleccionaron a aquellos aislados positivos para un producto de amplificación de 400 pb (vector más inserto) y se descartaron aquellos con una banda cerca del marcador de 200 pb (vector vacío). El DNA plasmídico aislado positivo de cada clonación se sometió a doble digestión enzimática con NcoI y HindIII, esperando ver la liberación de fragmentos entre 200 y 300 pb, correspondientes a gp14, gp14_{VAA}, lexA-NTD y lexA-NTD₈₇.

6.8 Secuenciación de construcciones

Para concluir la verificación de las construcciones generadas se procedió a realizar reacciones de secuenciación haciendo uso de los iniciadores seq26T_forward y seq26T_reverse. Para esto, en un volumen final de 10 µL, se mezclaron 500 ng de DNA plasmídico, iniciador sentido o antisentido para una concentración final a 500 nM, 2 µL de buffer de reacción 5x y 1 µL de *Mix BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: I) desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos, II) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, III) 30 segundos de alineamiento a 55 °C y IV) extensión a 60 °C por 2 minutos. Los pasos del II al IV se repitieron por 30 ciclos para concluir con un paso de extensión final a 60 °C por 5 minutos. El total de cada reacción se precipitó con isopropanol y el exceso de sales se eliminó mediante lavados con etanol frío al 70 %. La pastilla se secó al vacío y la secuencia amplificada se determinó mediante electroforesis capilar en el equipo 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

6.9 Transformación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa* PAO1.

20 mL de medio LB se inocularon con una colonia aislada de la cepa *P. aeruginosa* PAO1. Después de la incubación toda la noche a 37 °C en agitación, se concentró el total del cultivo centrifugando por 10 minutos a 11, 000 rpm a 4 °C. La pastilla se lavó 3 veces con 10 mL de sacarosa 300 mM y finalmente se resuspendieron las células en 2 mL de la misma solución. Alícuotas de 200 µL de almacenaron a – 20°C hasta el momento de su uso. Para llevar a cabo la electroporación de las 4 construcciones generadas, se mezclaron 200 µL de células de PAO1 con 100 ng de DNA plasmídico en celdas de electroporación que se incubaron durante 20 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo se dio un pulso de 2200 V, 25 F, y 200 Ω en el equipo *Gene Pulser XCell Electroporation System*

(Bio-Rad). Las bacterias se recuperaron con 1 mL de LB incubado a 37 °C por 2 horas. Las colonias transformantes se aislaron en cajas de LB suplementado con tetraciclina a 80 µg/mL.

6.10 Ensayo de sobrevivencia en respuesta a la luz UV.

Aislados de *P. aeruginosa* PAO1 transformante para los plásmidos pHERD26T_gp14, pHERD26T_lexA-N, pHERD26T_gp14vaa, pHERD26T_lexA-N87 y pHERD26T (control) se crecieron toda la noche a 37 °C en medio LB con antibiótico. A la mañana siguiente se determinó la densidad óptica y se ajustaron a 1.0 OD_{600nm} con medio LB fresco. Diluciones seriadas con factor 10 se realizaron en *buffer* TMG frío (Tris-HCl, Cloruro de magnesio, Gelatina) y 10 µL de cada dilución se goteó en 2 cajas independientes de medio LB suplementado con tetraciclina. A la par se goteó en 2 cajas independientes de LB con tetraciclina y L-(+)-arabinosa al 0.2 % como inductor de sobreexpresión a partir del promotor pBAD. Cuando las gotas se absorbieron a la superficie del medio, una caja de cada condición (con y sin arabinosa) se expuso a 40 cm de distancia durante 10 segundos a la luz UV, con una lampara de mano con potencia de 6 watts y longitud de onda de 254nm. Inmediatamente después de la exposición las cajas se envolvieron en papel aluminio y se incubaron junto a las cajas no expuestas toda la noche a 37 °C. El porcentaje de sobrevivencia relativo se determinó calculando las unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) y comparándolo con la caja control (considerando el 100 % de crecimiento en la caja sin exposición a la luz UV).

6.11 Expresión diferencial en presencia de mitomicina C.

A fin de estudiar el efecto de la proteína Gp14 sobre los genes SOS de PAO1, así como los ORFs 32 y 70 propios del fago, se montó un ensayo de expresión diferencial mediante RT-qPCR utilizando como modelos de estudio las lisógenas de H66 silvestre (*Wild type*) y la lisógena para el fago mutante H66-γ (*Δgp14*). De manera general se buscó obtener datos sobre 3 aspectos generales; (1) Determinar si Gp14 es una proteína del ciclo lítico de H66, (2) confirmar si los genes 32 y 70 de H66 están controlados por LexA de la bacteria, y (3) calcular algún efecto de Gp14 sobre la expresión de los genes de la respuesta SOS.

Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 (H66) y PAO1 (H66-γ) se sembraron, a partir de criotubos mantenidos a –70 °C, en 3 series de cajas LB sin antibiótico (9 cajas totales). Después de una primera incubación a 37 °C toda la noche, se realizaron dos pases más en cajas LB, procurando tomar siempre colonias aisladas. En el caso de la lisógena del fago mutante los pases finales se hicieron en presencia de gentamicina a 50 µg/mL. Finalmente, se formaron 3 grupos con cada una de las cepas para formar 3 réplicas biológicas.

6.12 Purificación de RNA total

Los 3 ensayos (réplicas) independientes comenzaron con cultivos de toda la noche de PAO1, PAO1 (H66) y PAO1 (H66- γ) incubados en agitación a 200 rpm y una temperatura de 37 °C. A la mañana siguiente se hicieron diluciones 1:100 en 50 mL de medio LB fresco (suplementado con gentamicina para la mutante H66- γ) y se crecieron a 200 rpm a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.3. En este punto las 3 cepas se separaron en dos matraces para obtener una serie control (sin daño) y una serie problema (con daño), en esta última se adicionó mitomicina C necesaria para una concentración final de 4 μ g/mL. Después de 20 minutos de inducción a 37 °C se tomaron 700 μ L de cada cultivo y se mezcló con 700 μ L de fenol ácido pH 4.8 (Sigma-Aldrich) precalentado a 65 °C en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Todas las muestras se incubaron 10 minutos a 65 °C, mezclando por inversión cada minuto. Para separar ambas fases (orgánica y acuosa) se centrifugó por 10 minutos a 5,000 rpm a 4°C. La fase acuosa se recuperó en un tubo con 600 μ L de fenol ácido: cloroformo (1:1) precalentado a 65 °C y se incubó a 65 °C con agitación suave (400 rpm) durante 3 minutos. Los tubos se pasaron a hielo y se agitaron con vórtex en tres etapas (una de 30 segundos y dos de 60 segundos) con descansos de 1 minuto en hielo entre cada una. Una vez más se separaron ambas fases centrifugando en frío a máxima velocidad por 15 minutos. La fase acuosa recuperada se mezcló con 1 volumen de fenol ácido: cloroformo y posterior a la homogenización completa se centrifugaron las muestras en las condiciones ya especificadas. Finalmente, se realizó una última extracción orgánica con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1), esta mezcla se agitó por 60 segundos y se dejó en hielo por 2 minutos. Después de centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a 4 °C se precipitó el RNA presente en la fase acuosa transfiriéndolo a un tubo con 2.5 mL de etanol absoluto frío, 1 μ L de glicógeno (20 mg/mL) y 30 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.0. Tras incubar toda la noche a -70 °C se centrifugó a máxima velocidad y 4 °C durante 30 minutos y la pastilla se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70 % en agua tratada con DEPC (Dietil-policarbonato, Sigma-Aldrich). El botón final se secó al vacío sin calor en un lapso de 20 minutos y el RNA purificado se resuspendió en 30 μ L de agua DEPC.

6.13 Digestión del DNA contaminante

2.2 μ g de RNA total se mezclaron con 1 μ L de *buffer* 10 x y 1 μ L (1 unidad) de DNasa I (ThermoFisher Scientific) en un volumen final de 10 μ L con agua DEPC. La digestión enzimática del DNA presente en las muestras se consiguió incubando por 1 hora a 37 °C. Transcurrido este tiempo se añadió 1 μ L de EDTA 50 mM y se inactivó la DNasa calentando a 65 °C por 10 minutos. Para corroborar la eliminación completa de DNA se realizó una PCR punto final con cada muestra de RNA, buscando amplificar una región de aproximadamente 300 pb del gel del RNA ribosomal 16s de PAO1 con los iniciadores 16sP_fwd y 16sP_rvs (Ramírez-Sánchez., 2022. Tesis de doctorado).

Las condiciones de amplificación fueron: I) desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, II) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, III) alineamiento a 52 °C por 30 segundos y IV) extensión a 72 °C por 30 segundos; los pasos II, III y IV se repitieron 35 ciclos para concluir con la extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Las concentraciones finales de cada componente en 10 µL de reacción fueron: iniciadores 200 nM, dNTPs 200 nM, 0.5 U/µL de Taq polimerasa y 1 µL de RNA tratado con DNasa I (~ 200 ng). En caso de no observar la amplificación del producto de 300 pb se consideró a la muestra libre de DNA.

6.14 Reacción de retrotranscripción

Las muestras de RNA total libres de DNA se utilizaron como molde para la síntesis de DNA complementario (cDNA) con el kit *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche). 10 µL de RNA total obtenido en el paso anterior se mezclaron con 2 µL de *random primers* (concentración final de 60 µM) y se incubó por 10 minutos a 65 °C. Inmediatamente después se pasó a hielo. En este paso se añadieron los demás componentes de la reacción cuya concentración final se indica entre paréntesis: 4 µL de *buffer* de reacción 5x (MgCl₂ 8 mM), 0.5 µL de inhibidor de RNasa (20 unidades), 2 µL de la mezcla de desoxirribonucleótidos (1 mM), 1 µL de DTT (5 mM) y 1.1 µL de transcriptasa reversa de alta fidelidad (22 unidades). La síntesis del cDNA se llevó a cabo incubando a 29 °C durante 10 minutos para el alineamiento de los iniciadores, 60 minutos a 60 °C para la retro transcripción e inactivación de la enzima a 85 °C por 5 minutos. Se comprobó la formación de cDNA mediante PCR punto final con los iniciadores 16sP_fwd y 16sP_rvs, bajo las condiciones previamente descritas. La amplificación del fragmento de ~ 300 pb fue confirmatorio. Las muestras de cDNA se diluyeron en agua destilada estéril con un factor de 1:5, derivando en una concentración teórica de 20 ng/µL de cDNA.

6.15 Estandarización y validación de iniciadores para PCR cuantitativa (qPCR)

En cumplimiento con los requerimientos mínimos necesarios para obtener resultados confiables en un ensayo de RT-qPCR se buscó establecer las condiciones óptimas de amplificación, así como demostrar la especificidad y eficiencia de esta.

6.16 PCR punto final a partir de cDNA

El primer paso en la validación fue preparar un *pool* de cDNA de la lisógena PAO1 (H66) mezclando en misma proporción muestras obtenidas en ausencia de daño (tiempo 0) y 4 tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos) después de la adición de mitomicina C. La amplificación de productos del tamaño esperado, así como una sola banda después del corrimiento de electroforesis en gel de agarosa al 2 %, se determinó para cada uno de los pares de iniciadores diseñados. En reacciones PCR punto final de 10 µL se mezclaron iniciadores a una concentración final de 200 nM, dNTPs 200 nM, 0.5 U/µL de Taq polimerasa y 40 ng (2 µL) del *pool* de cDNA. Las condiciones en el termociclador fueron: I)

desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, II) desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, III) alineamiento a 58 °C por 30 segundos y IV) extensión a 72 °C por 1 minuto; los pasos II, III y IV se repitieron 40 veces para finalizar con la extensión final a 72 °C por 5 minutos.

6.17 Eficiencia de amplificación y curva de disociación

La eficiencia de amplificación se calculó mediante curvas estándar para cada uno de los pares de iniciadores. Partiendo del *pool* de cDNA (20 ng/μL) se prepararon diluciones seriadas con factor de dilución 1:5 o 1:4 según sea el caso. Las 5 concentraciones de cada serie y 2 controles negativos (sin cDNA) se analizaron mediante qPCR por duplicado. Los pozos de una placa de 48 se cargaron incorporando 5 μL de SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*), 1μL de mezcla de iniciadores 2 mM (concentración final 200 nM*) y 4 μL de cDNA o agua. La amplificación y detección se llevó a cabo en el termociclador StepOne Real Time PCR System (*Applied Biosystems*) de la siguiente manera: I) desnaturalización inicial a 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de II) 15 segundos de desnaturalización a 95 °C, III) alineamiento a 58 °C durante 15 segundos y IV) extensión a 60 °C por 1 minuto. Posteriormente se generó la curva de disociación en 3 pasos: 15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95 °C. De manera automática se obtuvieron los gráficos con los valores de C_T (eje Y) contra el logaritmo de la cantidad de cDNA (eje X) y se calculó la eficiencia sustituyendo el valor de la pendiente (m) en la ecuación $E = 10^{(-1/m)-1}$. Se catalogaron como óptimos aquellos iniciadores con eficiencia entre 90 y 110 %, así como curva de disociación con 1 solo pico apreciable.

6.18 PCR cuantitativa

Los niveles de expresión de 7 genes de interés, junto con el gen del RNA ribosomal 16s de PAO1 (gen normalizador), se cuantificaron por duplicado en las 18 muestras de cDNA. Las condiciones de desnaturalización, alineamiento (58 °C) y extensión fueron las ya referidas en la validación. En cuanto a los componentes de la reacción se utilizó la concentración final de iniciadores de 200 nM, con excepción de *recN* (100 nM) y *ORF_70* (50 nM). En todas las reacciones se añadieron 5 μL de SYBR Green PCR Master mix, 40 ng de cDNA (2 μL) y agua suficiente para 10 μL.

6.19 Análisis de expresión diferencial

Las diferencias en los niveles de transcritos se determinaron por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Dado que este método permite calcular las discrepancias en la abundancia del mRNA entre dos condiciones (Ej. grupo con tratamiento/grupo sin tratamiento o cepa silvestre/cepa mutante) se analizó el efecto de Gp14 en la expresión basal de los genes SOS, así como su repercusión después de inducir daño con mitomicina C. Como prueba estadística se utilizó la “t” de student entre muestras pareadas cuando se comparó entre grupos tratados y no tratados con mitomicina C; una

prueba de muestras no pareadas se realizó para comparar entre la lisógena silvestre y la mutante *Δgp14*.

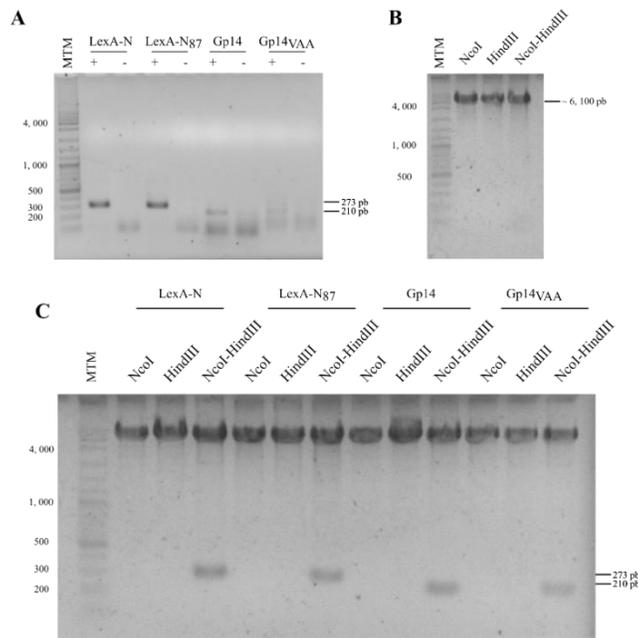


Figura 4. Clonación de LexA-NTD y Gp14 en el vector de expresión pHERD26T. (A) La secuencia codificante para Gp14 y LexA-NTD, junto con sus mutantes, se amplificaron por PCR punto final, se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se clonaron en el vector de transición pGEM Easy T (no mostrado). (B) En el vector pHERD26T, previamente linealizado con las enzimas *NcoI* y *HindIII*, se ligaron los fragmentos recuperados con las mismas enzimas a partir de las construcciones en pGEM Easy T. (C) Por último, se muestra un gel de electroforesis representativo para cada clonación, con la subsecuente liberación de fragmentos de tamaño esperado debido a la doble digestión.

Los productos de PCR se clonaron en el vector de transición pGEM-T, de donde se recuperaron tras de la digestión con las enzimas *NcoI* y *HindIII*. Los 4 fragmentos se ligaron en el vector pHERD26T previamente cortado con las mismas enzimas (Fig. 4. B). Como corroboración, el DNA plasmídico de una candidata para cada clonación se digirió de manera independiente con las enzimas arriba mencionadas, dónde se observa la linealización de los plásmidos. Finalmente, la doble digestión derivó en la liberación de fragmentos del tamaño predicho para cada construcción a partir del vector de aproximadamente 6, 100 pb (Fig. 4. C).

En la última etapa se secuenciaron las cuatro clonaciones con iniciadores que hibridan fuera del sitio de clonación múltiple de pHERD26T. El alineamiento de la región promotora no mostró cambios respecto al vector parental en ninguno de los casos (Fig. 5. A). Sumado a esto, se verificó en el inicio en las 4 construcciones el codón ATG dentro del sitio de corte *NcoI*, seguido por GTG y 6 codones codificantes para histidina. Todas estas características aseguran una misma regulación de la expresión a nivel transcripcional e inicio de la traducción en LexA-NTD, Gp14 y las mutantes Gp14_{VAA} y LexA-NTD₈₇, dejando como principal punto de control las señales de degradación del extremo carboxilo terminal. En este sentido, los electroferogramas correspondientes no mostraron la presencia de mutaciones causantes de cambios a nivel de aminoácidos en el caso de Gp14 y su mutante (Fig. 5.

C). Caso contrario, en la construcción pHERD26T_LexA-NTD se identificó una sustitución de adenina por guanina, que a su vez genera un cambio en el residuo 59, de treonina a alanina (T59A). Dado que dicho cambio se localiza fuera del motivo de unión al DNA, además de no encontrarse conservado entre LexA de *E. coli*, LexA de *P. aeruginosa* y Gp14 de H66, puede considerarse un residuo no determinante en la función de la proteína (Fig. 5. B).

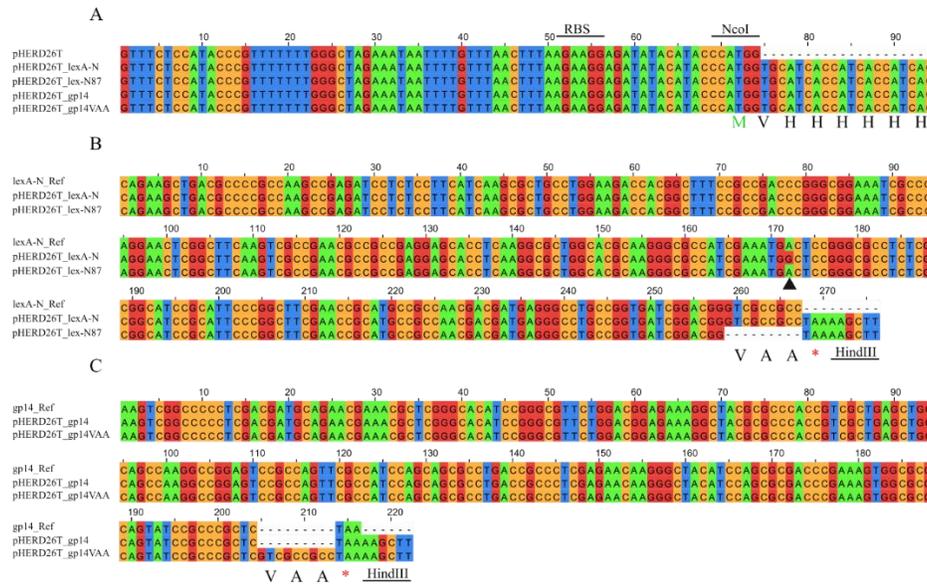


Figura 5. El análisis de los electroferogramas indica que las construcciones obtenidas son útiles para la expresión de Gp14 y LexA-N. (A) En el alineamiento a nivel de nucleótidos se muestra que no hay cambios en el promotor pBAD de las 4 construcciones obtenidas, lo anterior por comparación con el vector parental. Se señala la secuencia de unión al ribosoma (RBS) y el sitio de corte para NcoI; dentro del mismo, el codón de inicio de la traducción ATG, seguido de 6 codones codificantes para histidina. (B) Las secuencias codificantes clonadas para lexA-NTD y lexA-NTD₈₇ se comparan con la secuencia de referencia reportada. Con una cabeza de flecha color negro se señala un cambio de adenina por guanina que genera el cambio T59A, al final se resalta la eliminación de los 3 codones codificantes para el péptido señal Val-Ala-Ala en pHERD26T_lexA-NTD₈₇. (C) Mismo análisis que en (B) se obtuvo para las construcciones con gp14 y gp14VAA. Se realizó la comparación con la secuencia de referencia reportada en el genoma de H66, respecto a la cual no se encontraron cambios. En pHERD26T_gp14VAA se señala la inserción de la etiqueta VAA.

7.2 Ensayo de respuesta a la luz UV

Se evaluó la tasa de sobrevivencia al daño causado por la luz UV en la cepa PAO1, en presencia de LexA-NTD y Gp14 (Fig. 6.). Como control se utilizó a la misma cepa transformada con el vector vacío pHERD26T (línea 1). Al inducir la expresión de LexA-NTD e irradiar con luz UV, se observa un porcentaje de sobrevivencia parecido al que se obtiene en presencia del vector vacío (comparar líneas 1 y 2). De este resultado se infiere que el NTD de LexA es degradado y en consecuencia no presenta actividad represora sobre los genes SOS. Acorde a lo esperado, la proteína mutante LexA-N₈₇ parece tener mayor estabilidad debido a la eliminación de los 3 últimos residuos VAA y en consecuencia un efecto represor sobre los genes SOS. Lo anterior se deduce debido a una reducción de aproximadamente 10 veces en la viabilidad celular tras la irradiación en la cepa que expresa la

proteína (comparación de líneas 3 y 2). Asimismo, este fenómeno se asemeja al previamente reportado por la persistencia del NTD de LexA en *E. coli*, cuando este carece de señales de degradación (Neher et al., 2003). Por su parte, la expresión de Gp14 causó una mínima capacidad de sobrevivencia al daño bajo las mismas condiciones, en correspondencia con lo ya reportado (línea 4) (Ortega-Oliva, 2020). De manera complementaria, la adición del tripéptido VAA en el extremo C-terminal aminora los efectos de Gp14, obteniéndose porcentajes de sobrevivencia ~ 10 veces mayores comparados con la proteína silvestre (comparar líneas 5 y 4). Notablemente, el efecto negativo de Gp14 sobre la viabilidad celular es evidente aún en ausencia de daño por luz UV (línea 4, UV-). En este sentido, incluso la mutante degradable de la proteína del fago, Gp14_{VAA}, causa un menor porcentaje de sobrevivencia que la mutante de LexA-NTD sin señal de degradación (líneas 5 y 3). En conclusión, Gp14 de H66 parece ser una proteína resistente a la degradación por la proteasa ClpXP, en contraste con el NTD de LexA. Lo anterior supone, además, que su efecto sobre los genes SOS puede llevarse a cabo aún con niveles de expresión mínimos.

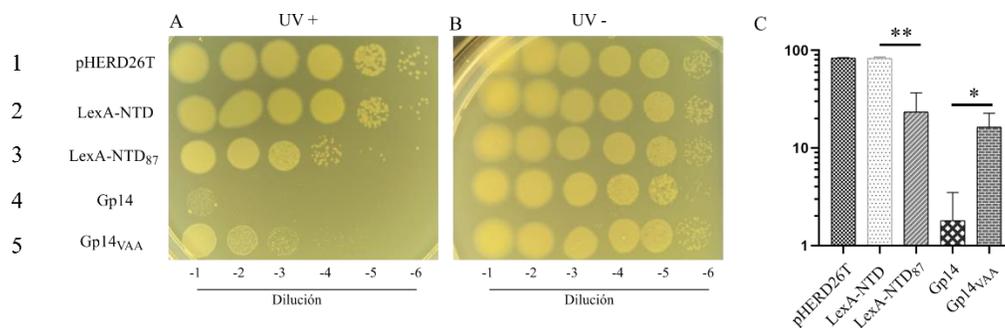
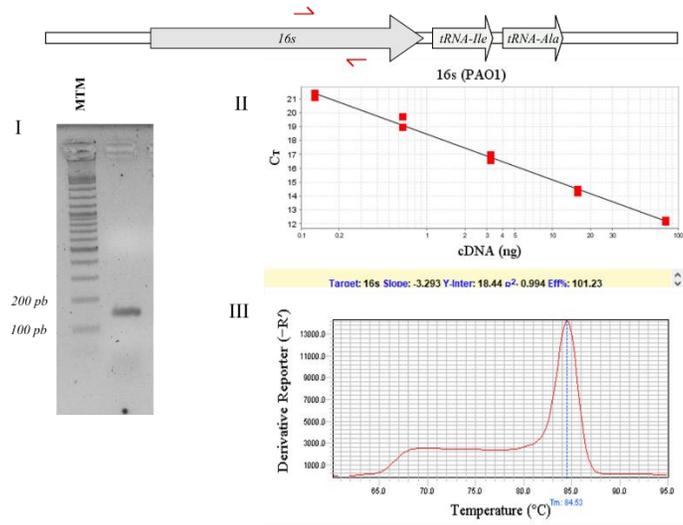


Figura 6. La presencia de los residuos VAA en el extremo C-terminal de LexA-NTD y Gp14 son determinantes en su actividad represora sobre la respuesta SOS en *P. aeruginosa*. (A) En cajas de LB suplementadas con arabinosa al 0.2 % como inductor se sembró *P. aeruginosa* PAO1 transformada con las diferentes construcciones y con el vector vacío como control, se irradiaron con luz UV (10 segundos de irradiación a 40 cm, 6 watts y 254nm) e incubaron toda la noche para analizar el crecimiento. (B) Caja control de crecimiento con arabinosa al 0.2 % sin irradiar. (C) El porcentaje de sobrevivencia de cada cepa se calculó respecto al control con 100 % de crecimiento (cajas no irradiadas y sin arabinosa) y se graficó en escala logarítmica. En caso de diferencias estadísticamente significativas debido a las mutaciones en el extremo C-terminal de ambas proteínas de señala con * un valor de $p < 0.05$ y con ** una $p < 0.01$.

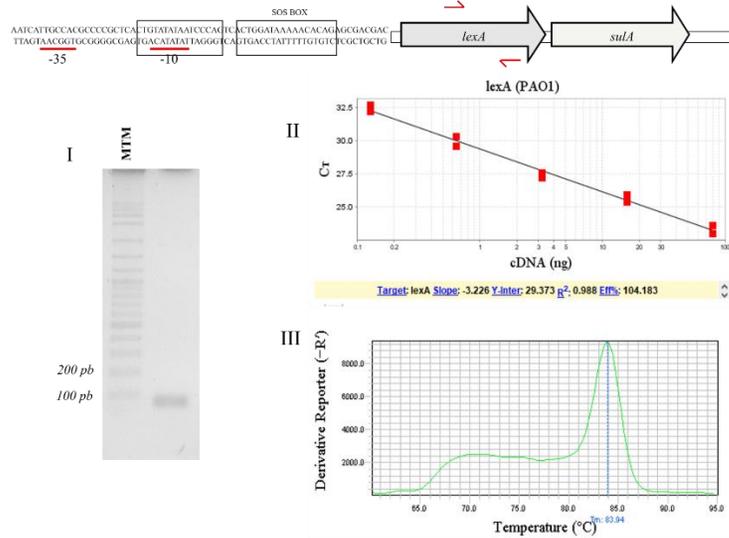
7.3 Validación de iniciadores para qPCR

Con el objetivo de estudiar la influencia de Gp14 sobre la transcripción de genes regulados por LexA, se diseñaron y validaron 8 pares de iniciadores para PCR cuantitativa. Los iniciadores para detectar el transcrito del gen *gp14* de H66 se utilizaron con el fin de determinar la temporalidad de expresión de Gp14 (lisis o lisogenia). Como genes blanco parte del regulón SOS de *P. aeruginosa* PAO1 se analizaron *lexA*, *sulA*, *yebG* y *recN*, y los ORFs 32 y 70 de H66 debido a la presencia de cajas SOS

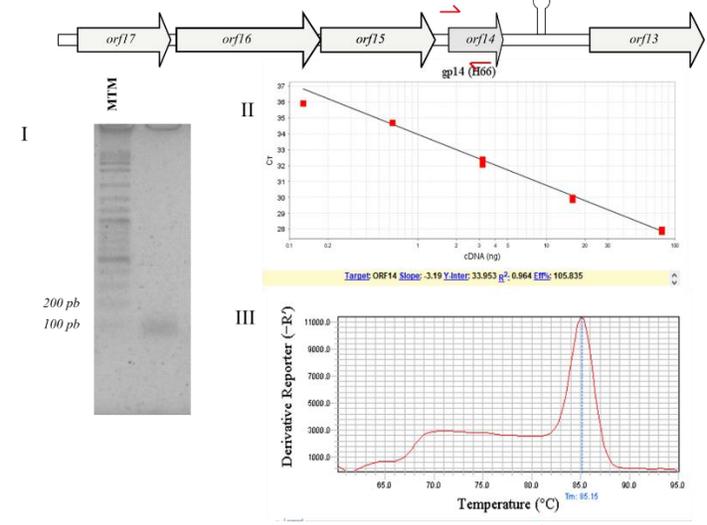
A



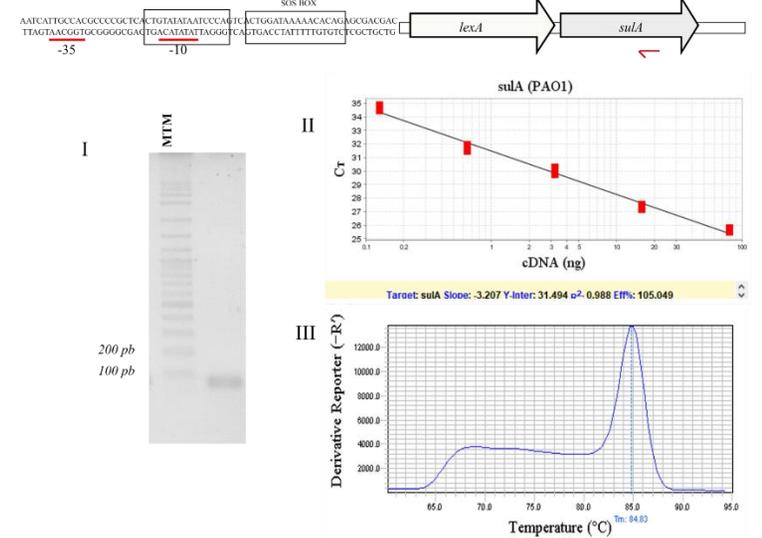
C



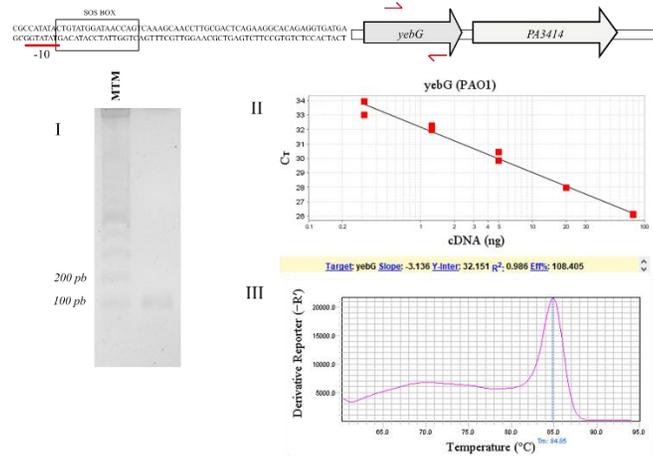
B



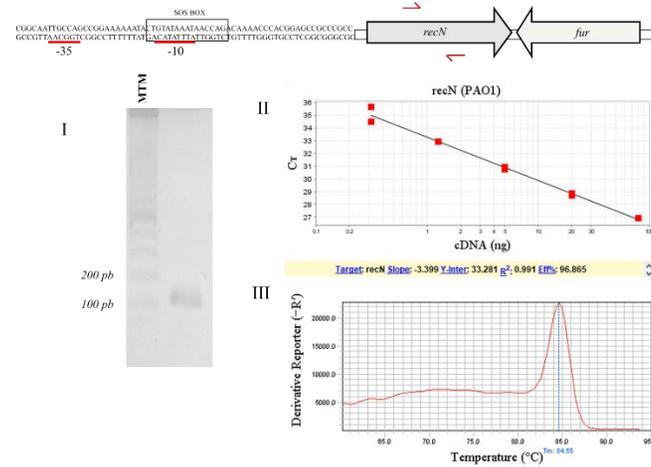
D



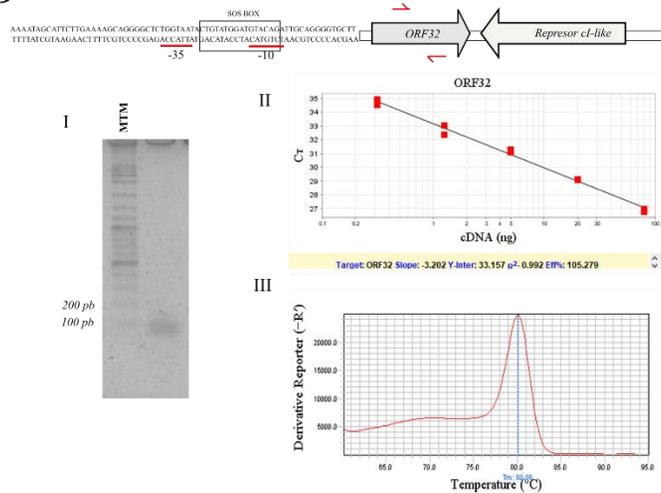
E



F



G



H

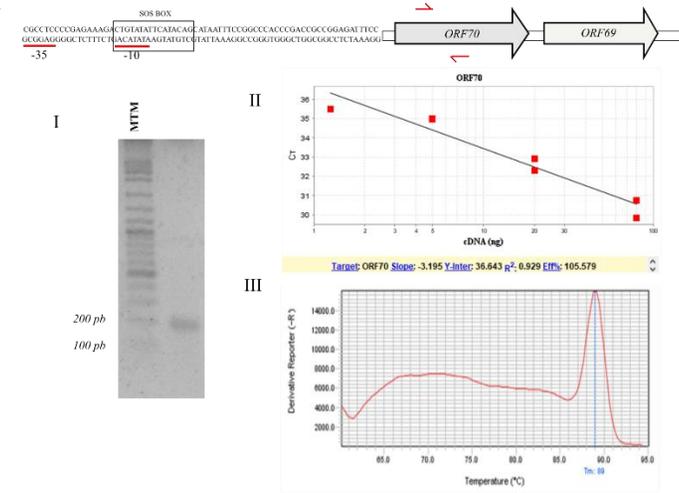


Figura 7. Los iniciadores diseñados cumplen con los requerimientos de especificidad y eficiencia para ser utilizados en ensayos de qPCR. (A-H) I. Producto de amplificación resuelto en gel de agarosa al 2 % a una temperatura de alineamiento de 58 °C. II. Curva estándar de eficiencia en intervalos dinámicos de cDNA y 40 ciclos de amplificación. III. Curva de disociación (*melt curve*) del producto final de amplificación determinado por el cambio en la intensidad de fluorescencia en presencia de *SYBR Green*.

putativas sobre sus regiones promotoras. El gen del RNA ribosomal 16s se utilizó para normalizar la abundancia de transcritos en relación con el RNA total.

Bajo condiciones de amplificación a 58 °C mediante PCR punto final, todos los iniciadores diseñados generaron un solo producto a partir de cDNA de la lisógena PAO1 (H66), lo anterior fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa. Este resultado se corroboró analizando la curva de disociación al final de la amplificación por PCR cuantitativa en presencia de SYBR Green, con la aparición de un solo pico en el gráfico. Para este punto fue necesario optimizar la concentración final de iniciadores para detectar *recN* (100 nM) y el ORF70 (50 nM). En conjunto estos datos confirman la especificidad de los iniciadores. Por último, se determinó la eficiencia de amplificación de cada par. En intervalos de 80 a 0.128, 80 a 0.312 u 80 a 0.98 ng de cDNA; se observó en todos los casos una relación lineal entre el Ct (ciclo donde la señal es detectada debido a la acumulación de productos) y la cantidad de cDNA introducido a la reacción. Los valores de eficiencia rondaron entre el 96 y el 108 %, con coeficientes de correlación lineal (R^2) entre 0.92 y 0.99 (Fig. 7. A-H).

7.4 Purificación de RNA total

Cultivos de la cepa de referencia PAO1, así como las lisógenas PAO1 (H66) y PAO1 (H66- γ), se crecieron en presencia y ausencia de mitomicina C como inductor de la respuesta SOS. Las muestras de RNA total de 3 réplicas biológicas (18 en total) se obtuvieron mediante extracción con fenol ácido caliente. En la figura 8.A se muestra el análisis de integridad de todas las muestras.

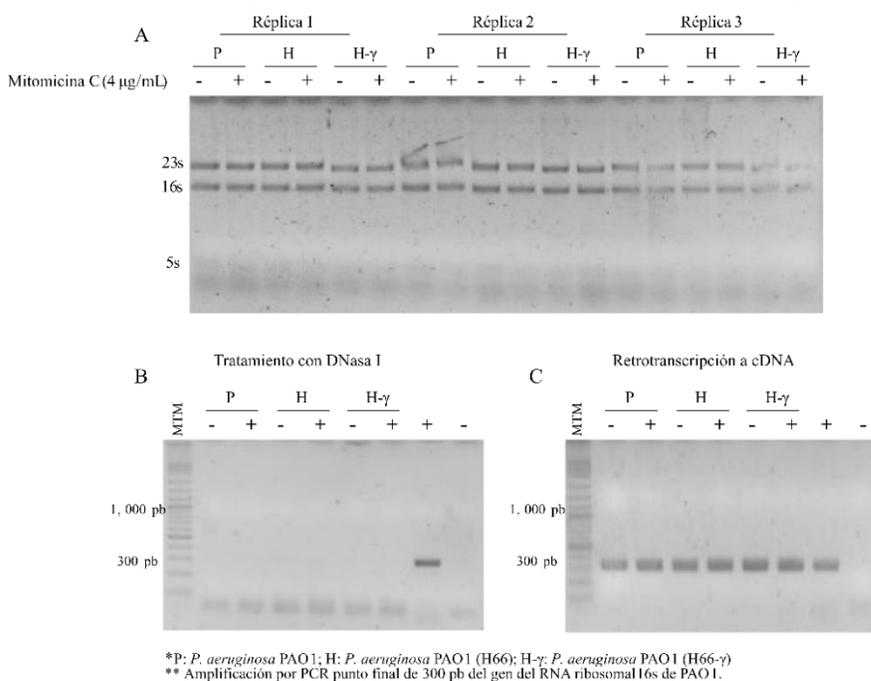


Figura 8. Análisis de calidad de las muestras de RNA Dividido en 3 réplicas independientes las cepas *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 (H66) y PAO1 (H66- γ) se crecieron en ausencia y presencia de mitomicina C como

inductor de la respuesta SOS. (A) La integridad de las 18 muestras de RNA total se determinó por la presencia de bandas correspondientes a los RNA ribosomales 23s, 16s y 5s. (B) Se descartó la presencia de DNA genómico contaminante después del tratamiento con DNasa I y posterior a la reacción de retrotranscripción (C) se demostró la presencia de cDNA debido a la amplificación de una región (~ 300 pb) del gen del RNA ribosomal 16s de PAO1.

En todos los carriles es posible observar las bandas correspondientes a los RNA ribosomales 23s, 16s y 5s. En un paso posterior, la ausencia de producto de PCR después del tratamiento con DNasa I descarta la contaminación con DNA genómico (Fig. 8. B). Finalmente, después de la reacción de retrotranscripción, la amplificación de una región de 300 pb presente en el gen del RNA ribosomal 16s fue confirmatorio de la síntesis de cDNA (Fig. 8. C). De manera general puede considerarse que las muestras cumplen con los controles de calidad mínimos para ser utilizadas en reacciones de qPCR.

7.5 Inducción de la respuesta SOS en *P. aeruginosa* PAO1

En *P. aeruginosa* la respuesta SOS consta de 15 genes diferencialmente activados tras la generación de daño al DNA (Cirz et al., 2006; Lujan et al., 2019). Todos los genes descritos al momento cumplen con la característica de poseer sitios de unión para LexA traslapados sobre la región promotora, algunos de ellos codificantes para proteínas homólogas de la respuesta SOS de *E. coli*. Bajo las condiciones planteadas en este trabajo, 4 genes de la cepa PAO1 se encontraron sobreexpresados de manera significativa 20 minutos después de la adición de mitomicina C al cultivo. Los niveles del mRNA de *yebG*, *recN*, *lexA* y *sulA* (estos últimos dos genes regulados por una misma región promotor-operadora) aumentaron en al menos 4 veces respecto al control sin daño. El incremento en la transcripción de estos genes concuerda con lo reportado por Cirz y colaboradores (2006), a la vez que valida las condiciones del ensayo y la capacidad de detección de los iniciadores.

7.6 Análisis transcripcional del gen *gp14* de H66

En el genoma de H66, el gen *gp14* se localiza dentro del módulo donde se predice están codificadas proteínas involucradas en la replicación y reparación del DNA (Maya-Lucas., 2012. Tesis de maestría). Adicionalmente, el conjunto de estos genes comparte una misma región promotora putativa, sitio donde además se ha demostrado la unión específica del represor del fago (Martínez-Martínez, 2020) (Tesis de licenciatura). Estas características sugieren que Gp14 es una proteína presente primordialmente durante el ciclo lítico. Sorpresivamente, después de la inducción de daño con mitomicina C, los niveles del transcrito de Gp14 no se vieron modificados en la lisógena silvestre de H66 (Fig. 9.A). La conversión del profago del estado lisogénico a un ciclo productivo se manifestó por la caída en la densidad óptica de los cultivos y el aumento del título fágico en el sobrenadante ~150 minutos después de la adición del antibiótico (datos no mostrados). Este resultado pone en perspectiva la presencia de un posible promotor interno, que permite la transcripción de *gp14* en la lisógena estable y que es independiente del *switch* al ciclo lítico. Con el objetivo de dar soporte a esta

aseveración, mediante herramientas bioinformáticas se analizó la región comprendida entre los ORFs 31 y 15 en la cadena antisentido en el genoma de H66, a fin de identificar posibles señales de promotores bacterianos. La secuencia con mayor probabilidad de corresponder a un promotor funcional, con base en los valores de significancia generados con dos *softwares* independientes (SAPPHIRE.CNN (Coppens et al., 2022) con un valor de $p < 0.000014$ y BProm (Solovyev & Salamov, 2013) con puntajes de 67 y 18 para las señales -10 y -35, respectivamente), se localizó dentro de la región codificante del ORF15, aproximadamente 900 pb río arriba del codón de inicio de Gp14. La búsqueda de promotores de expresión constitutiva previamente identificados en *P. aeruginosa* PAO1 muestra una elevada coincidencia en secuencia con el promotor constitutivo del gen *rpoD*, codificante de la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa (Aramaki & Fujita, 1999). En conjunto, los resultados indican que Gp14 se expresa de manera constante e independiente del represor de mantenimiento de lisogenia en el profago de H66.

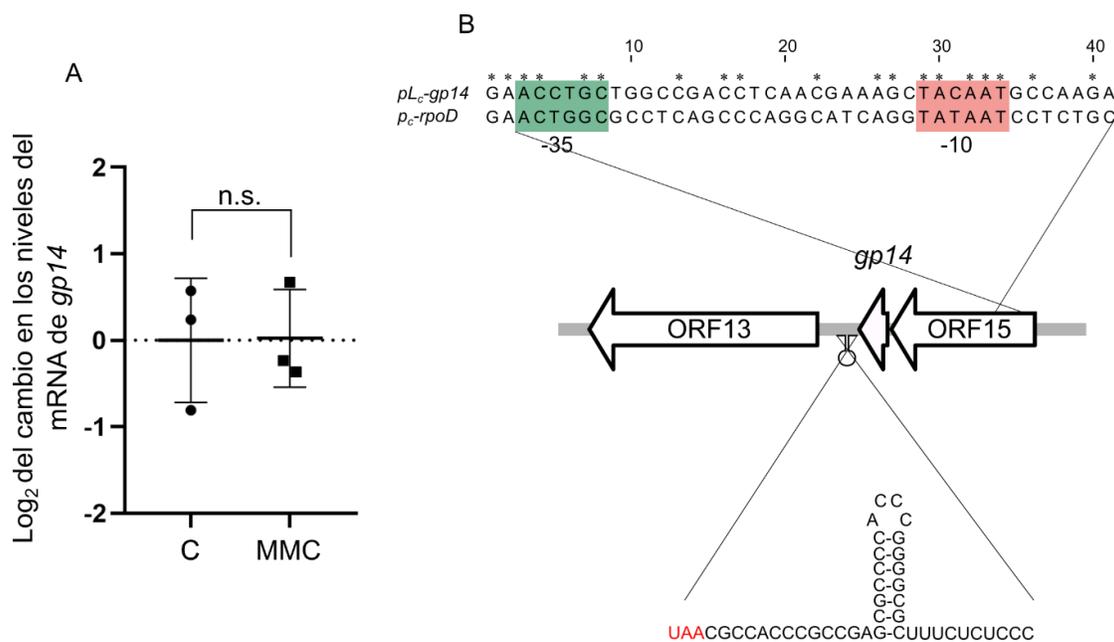


Figura 9. La expresión de Gp14 en la lisógena de H66 es independiente de la transición al ciclo lítico mientras que los ORFs 32 y 70 del profago son regulados por LexA. (A) Cambio en los niveles de mRNA del ORF_14 inducidos por mitomicina C [MMC] respecto al control sin daño [C] en la lisógena silvestre de H66. (B) Secuencia del promotor identificado con las herramientas SAPPHIRE y BProm y su comparación con el promotor constitutivo del gen *rpoD* reportado en PAO1. En la parte inferior se muestra la estructura secundaria del terminador putativo anotado en río debajo de *gp14* en el genoma de H66. El cambio en los niveles de mRNA debido al tratamiento con mitomicina C se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los niveles de inducción se expresan como el Log₂ del incremento respecto al control sin daño (0).

7.7 Análisis transcripcional de los ORFs 32 y 70 de H66

Paralelamente al análisis de la transcripción de los genes de la bacteria y el mensajero de *gp14*, se estudió el cambio en la expresión de los ORFs 32 y 70 de H66 en respuesta al daño por MMC de una lisógena. Como se mencionó previamente, estos genes de función desconocida comparten la

característica de poseer cajas SOS putativas en su región promotora (Fig. 10. A). En la lisógena mutante de H66 en PAO1, es decir, un sistema libre de Gp14, el patrón de expresión de ambos ORFs se asemejó a aquel mostrado por los genes SOS de la bacteria, con niveles de inducción de aproximadamente 4 veces respecto al control sin mitomicina C. (Fig. 10. B). Lo anterior, junto con la evidencia a nivel de secuencia y los ensayos de retardamiento en gel, indican la existencia de una regulación en *trans*, dictada por LexA de PAO1 sobre genes del fago, cuya transcripción es reprimida durante la lisogenia y responden en coordinación con los genes SOS ante el daño al DNA.

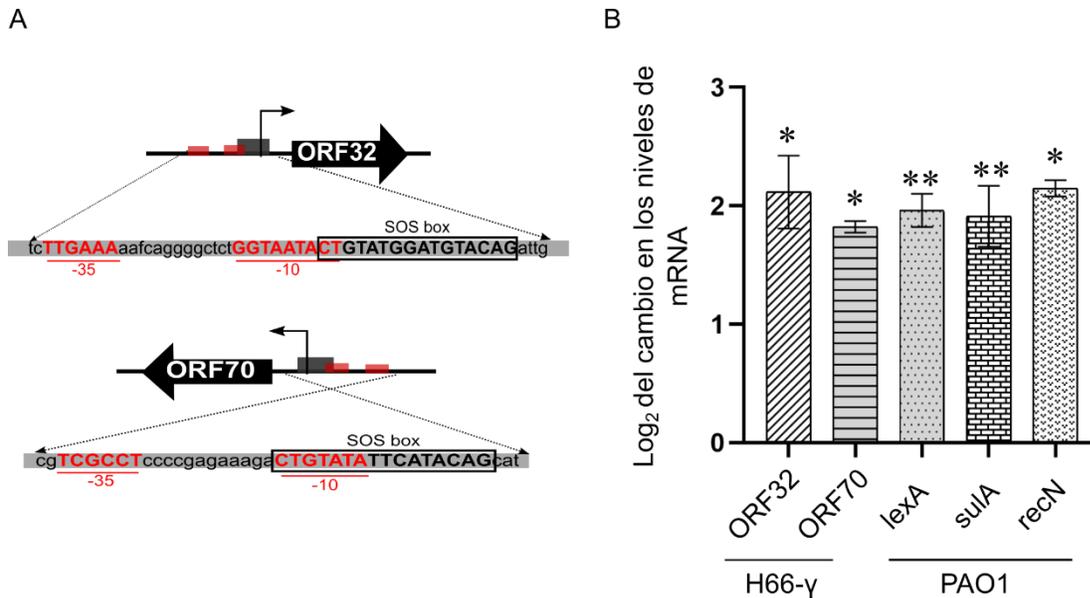


Figura 10. El represor LexA reprime la expresión de los ORFs 32 y 70 del fago durante la lisogenia. (A) Estructura de los promotores putativos localizados río arriba de los ORFs 32 y 70 de H66. En rojo se marcan las señales -35, -10 y en recuadros las cajas SOS. Tomado de Ortega-Oliva, 2020. (B) El cambio en los niveles relativos del transcrito de los ORFs 32 y 70 en la lisógena mutante $\Delta gp14$ se determinó posterior al tratamiento con mitomicina C junto con 3 genes SOS bacterianos. En todos los casos se calculó el cambio en los niveles de mRNA debido al tratamiento con mitomicina C mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los niveles de inducción se expresan como el Log_2 del incremento respecto al control sin daño (0) y en caso de diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba “t” *student* de muestras pareadas se denota * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$.

7.8 Efecto de Gp14 sobre la transcripción de genes SOS

En el siguiente punto y dada la aparente expresión constitutiva de Gp14 en la lisógena de H66, se buscó identificar una posible alteración en los niveles del mensajero de genes SOS en ausencia de daño al DNA. En este sentido, la expresión basal de *lexA* y *sulA* de la bacteria, así como el ORF_70 de H66, mostró una tendencia al alza en aproximadamente 2 veces debido a la presencia de Gp14 en el sistema (Fig. 11. A). Por otra parte, el ORF_32 no mostraron un cambio significativo respecto a la lisógena del fago mutante ($\Delta gp14$). Lo anterior pone en entredicho el papel de Gp14 como un represor transcripcional y sugiere, más bien, que la función de esta proteína es la activación discreta de algunos genes SOS, probablemente debido a su influencia sobre el equilibrio de unión de LexA a las cajas

SOS. Mismo análisis se realizó entre ambas cepas durante la respuesta SOS francamente activa y el ciclo lítico de H66. 20 minutos después de la adición de mitomicina C se observa aproximadamente el mismo patrón, con niveles de mRNA significativamente incrementados para los genes *lexA* y *sulA* en presencia de Gp14 (Fig. 11. B), en contraste se detectó un discreto efecto represor sobre la transcripción del ORF32 de H66. En conclusión, la proteína Gp14 de H66 parece estar favoreciendo, de manera antagónica a su homóloga LexA, la transcripción de algunos genes SOS.

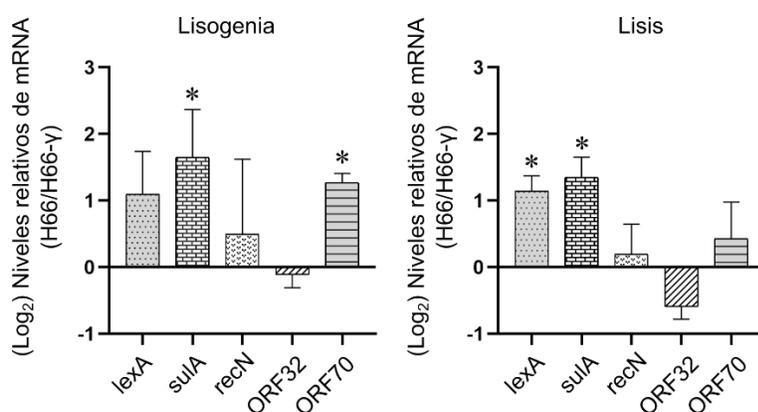


Figura 11. Gp14 promueve un incremento en la expresión de los transcritos de algunos genes SOS. (A) Expresión basal relativa de los genes SOS en la lisógena de H66 respecto a la mutante H66- γ , creciendo en agitación a 37 °C. (B) Expresión relativa de los mismos genes determinada 20 minutos después de la generación de daño al DNA con mitomicina C, igual que en (A) las barras indican los niveles de mRNA en la lisógena silvestre respecto a la mutante H66- γ . Las diferencias de niveles de mRNA entre cepas se determinaron por el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, siendo la mutante PAO1 (H66- γ) el control (0). En caso de diferencia estadísticamente significativa se indica.

7.9 Efecto de la expresión de Gp14 sobre la morfología celular de PAO1

Dentro de las funciones asociadas a la respuesta SOS y reparación del DNA se encuentra la inhibición de la progresión del ciclo celular. El producto del gen *sulA* es un inhibidor de la nucleación entre monómeros de FtsZ, proteína encargada de formar el anillo Z necesario para llevar a cabo la citocinesis (Huisman et al., 1984; Trusca et al., 1998). Luego entonces, las bacterias con una respuesta SOS activa muestran una morfología filamentosa debido a la presencia de Sula. Tomando ventaja de este fenotipo fácilmente rastreable y con el objetivo de dar soporte a los resultados de expresión diferencial, se estudió la morfología celular de PAO1 ante la expresión de Gp14. La sobreexpresión de Gp14 a través del plásmido pHERD26T provocó un aumento en la longitud de los bacilos después de 1 hora, efecto que se vio acentuado tras 2 horas de crecimiento en presencia de arabinosa como inductor del promotor pBAD (Fig. 12). Por su parte la presencia del vector vacío en PAO1 no provocó un cambio significativo en la morfología celular bajo las mismas condiciones. Este resultado da soporte a la activación parcial de las funciones SOS inducida por la proteína del fago, específicamente, la del operón *lexA-sulA*.

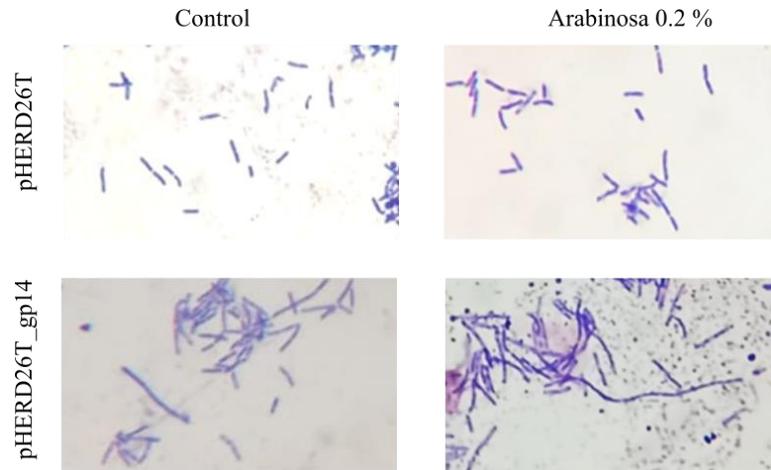


Figura 12. La expresión de Gp14 a partir de pHERD26T induce el crecimiento filamentoso en PAO1. Morfología celular de *P aeruginosa* PAO1 transformada con la construcción que expresa Gp14 y con el vector vacío como control. Ambas bacterias se crecieron en agitación a 37 °C y en la fase de crecimiento exponencial se adicionó de arabinosa a una concentración final de 0.2 %. Tras 2 horas de inducción se tomaron muestras que se tiñeron y se observaron por microscopía óptica de campo claro.

8. DISCUSION

Además del papel de la respuesta SOS como mecanismo de salvación ante la acumulación excesiva de lesiones en el DNA, la activación transitoria o parcial de algunas de estas funciones se ha asociado a la generación de cepas persistentes a dosis moderadas de agentes bactericidas (Podlesek & Zgur Bertok, 2020). Por ejemplo, la expresión de polimerasas de baja fidelidad contribuye de manera significativa a la tolerancia a estos compuestos, aumentando la frecuencia de mutaciones y con ello la variación alélica. Del mismo modo, la inducción de elementos móviles asociada a la respuesta SOS incrementa los eventos de transferencia horizontal de genes, abonando a la plasticidad genómica bacteriana (Beaber et al., 2004). En el fago H66, capaz de lisogenizar a la cepa *P. aeruginosa* PAO1, la presencia de una proteína homóloga al dominio N-terminal del represor LexA bacteriano es objeto de estudio debido a las posibles repercusiones que su expresión causa en la célula hospedera.

Los resultados mostrados en este trabajo hacen énfasis en la importancia de la degradación de LexA-NTD durante la respuesta SOS en *P. aeruginosa*. De manera general, el efecto de las proteínas LexA-NTD y Gp14 sobre la tasa de sobrevivencia, sumado a la evidencia informática a nivel de secuencia, sugiere la conservación de un sistema crucial de regulación ejercido por la proteasa ClpXP sobre el dominio N-terminal de LexA, sistema evadido por Gp14 dada la ausencia de señales de degradación (Fig. 3 y 6). La presencia de genes codificantes para ClpP y la proteína chaperona ClpX se ha reportado en distintas especies bacterianas (Ahlawat & Morrison, 2009; Flynn et al., 2003; Kock et al., 2004; Tomoyasu et al., 2002). En *P. aeruginosa* la presencia de dos alelos para esta proteasa (*clpP1* y *clpP2*) sugiere la diversificación de funciones en esta especie. La isoforma ClpP1 es claramente homóloga de la proteína modelo ampliamente estudiada en *E. coli*. Al igual que esta, ClpP1 de PAO1 se asocia a ClpX; una vez en complejo presentan actividad de ATPasa y llevan a cabo la degradación de sustratos marcados por la etiqueta SsrA canónica. A nivel fenotípico, la delección del gen *clpP1* influye de manera negativa en la producción de alginato, piocianina y pioverdina; asimismo en la capacidad de movilidad y formación de biopelícula (Hall et al., 2017; Qiu, Eisinger, et al., 2008). Resulta interesante la marcada divergencia entre Gp14 y LexA-NTD hacia el extremo C-terminal, y la clara conservación de función debido a la presencia del motivo de unión al DNA wHTH. Bajo esta premisa se infiere, en conclusión, que Gp14 podría llevar a cabo su función aun cuando su expresión este determinada por niveles de RNA mensajero discretos.

Genes del fago son regulados por LexA

El experimento de PCR en tiempo real indica que la expresión de los genes 32 y 70 del fago aumenta significativamente en respuesta al daño al DNA, del mismo modo en que responden los genes SOS bacterianos. Este dato, sumado al hecho de que LexA es capaz unirse de manera secuencia-específica

a cajas SOS putativas localizadas en la región promotora de ambos ORFs, apoyan un modelo en el que LexA mantiene apagados dichos promotores durante la lisogenia. Lo anterior tiene significancia dado que la orientación de los ORFs 32 y 70 del fago es opuesta en ambos casos a los módulos dónde se predice se codifican proteínas del ciclo lítico. Del conjunto de los resultados presentados se puede inferir que 32 y 70 son genes del ciclo lítico de H66 independientes del represor y controlados por el sistema SOS bacteriano.

Gp14 promueve la expresión de algunos genes SOS de PAO1

Los análisis a nivel transcripcional posicionan a Gp14, de manera sorpresiva, como una proteína de expresión constante durante el ciclo lisogénico y en la transición al ciclo lítico del fago (Fig. 11. A). La expresión de genes del profago que no participan en el mantenimiento de la lisogenia, pero se expresan de manera constitutiva, se ha reportado en otros sistemas. Estos genes, comúnmente designados como *moron* (Juhala et al., 2000) (del inglés “*more on*” al ser DNA extra en el genoma), suelen caracterizarse por no ser esenciales en la replicación del fago, sin embargo, pueden dotar a la célula hospedera de funciones “adicionales” que optimizan su metabolismo y por ende desarrollo. Entre los ejemplos más frecuentes suelen encontrarse genes de exclusión a la superinfección (Cumby et al., 2012), factores de virulencia (Brussow et al., 2004), entre otros. En el caso de Gp14, se sabe que su expresión no es determinante para el establecimiento de la lisogenia y tampoco en la formación de partículas virales infectivas. El único rasgo asociado a la ausencia de Gp14 en el genoma de H66 parece ser la cantidad de fago liberado de manera espontánea al sobrenadante cultivos de la cepa lisógena (Ortega-Oliva, 2020). A nivel molecular, los *morones* deben estar acompañados por un promotor a partir del cual expresarse durante la lisogenia, así como un terminador Rho-independiente, cuya función es inhibir la transcripción de genes localizados río abajo del gen *moron*. Mediante herramientas bioinformáticas se pudo identificar la presencia de un promotor putativo localizado aproximadamente 900 pb río arriba del codón de inicio del gen *gp14*. Previamente, en la anotación del genoma de H66, se había identificado un posible terminador estructural 14 pb después del codón de paro del mismo gen. Experimentos adicionales deben ser realizados con el objetivo demostrar la funcionalidad de ambos elementos en la expresión de Gp14 a partir del profago.

Asociado a las observaciones anteriores están los patrones de expresión a nivel de mRNA en las cepas lisógenas. En primer lugar, la presencia de Gp14 en bacterias con una respuesta SOS inactiva, produce una tendencia a incrementar la transcripción basal de algunos genes, incluido el ORF70 del fago. Interesantemente, este efecto se mantiene aproximadamente en la misma medida durante la respuesta SOS activa, en congruencia con la expresión constante de Gp14 durante ambos ciclos replicativos (Fig. 9 y 11). Contrario a los evidentes fenotipos inhibitorios relacionados con la expresión de Gp14

a partir de un plásmido (Ortega-Oliva, 2020), la expresión de esta proteína a partir del profago tiende a favorecer la expresión de ciertos genes SOS. En este sentido, una posible explicación es que la competencia de Gp14 con LexA impacta en el equilibrio de LexA libre y LexA unida al DNA, aumentando indirectamente la transcripción basal de los genes. Por otro lado, una proteína LexA con actividad dual, es decir, tanto activadora como represora, ha sido reportada previamente en la bacteria *Rhodobacter sphaeroides* (Tapias et al., 2002). En este modelo, a bajas concentraciones LexA promueve la formación del complejo iniciador de la transcripción entre la RNA polimerasa y las señales del promotor. En contraste, a altas concentraciones de LexA, se ve inhibida la transcripción. En el trabajo se propone, además, que una de las ventajas de la actividad dual de LexA de *R. sphaeroides* podría ser un efecto amortiguador en la activación de la respuesta SOS. Un análisis más extenso debe llevarse a cabo con el objetivo de determinar si dicha función activadora de Gp14 es global o solo se presenta en promotores particulares.

De manera paralela a la expresión de los sistemas de reparación está la inhibición de la división celular determinada por SulA. La unión de SulA a FtsZ, principal componente del divisoma en *E. coli* y otras especies bacterianas, induce el crecimiento filamentoso como punto de control ante el daño (Cordell et al., 2003; Huisman et al., 1984; Trusca et al., 1998). Genes de origen viral asociados a la inducción de crecimiento filamentoso han sido descritos con anterioridad, y la expresión de algunos de ellos se ha asociado con una eficiente replicación del DNA del fago (Ansari et al., 2021; Ballesteros-Plaza et al., 2013; Cam et al., 1988; Conter et al., 1996; Kiro et al., 2013; Tetart & Bouche, 1992). En este trabajo se muestra el aumento en la expresión basal de SulA influenciado por Gp14, resultado que es apoyado por la morfología celular observada al expresar la proteína a través de un plásmido (Fig. 12). Como perspectiva, los niveles de progenie producidos de manera espontánea deben ser evaluados en una lisógena de PAO1 *ΔsulA*, a fin de determinar si el crecimiento filamentoso es un factor crítico para el correcto ciclo replicativo de H66, como lo es en otros modelos.

Bacteriófagos y la respuesta SOS

Desde un panorama general, se han descrito otros casos dónde un fago interfiere o hace uso de elementos de respuesta SOS bacteriana en beneficio de su correcto ciclo replicativo. El fago GIL01 capaz de infectar a *B. thuringiensis* muestra una interesante red de regulación entre elementos de la respuesta SOS bacteriana y proteínas y señales codificadas en el genoma viral. En primer lugar, la función de proteína represora encargada del mantenimiento del ciclo lisogénico es llevada a cabo por LexA de la bacteria, en unión a cajas *SOS-like* traslapadas con los promotores del ciclo lítico. Además, la unión a dichas secuencias es favorecida por la proteína Gp7 codificada en el fago, que al mismo tiempo interfiere la función de co-proteasa de RecA* (Fornelos et al., 2011; Fornelos et al.,

2015). Paralelamente, la proteína Gp6 de GIL01 es homóloga al dominio amino terminal de LexA. Su unión a una secuencia localizada inmediatamente río arriba del elemento -35 del promotor P3 del fago, activa la transcripción de los genes tardíos una vez iniciado el ciclo lítico (Fornelos et al., 2018). Recientemente se ha reportado el caso de *Listeria monocytogenes* Φ 10403S, cepa que porta el profago Φ 10403S y un fago críptico que codifica para una bacteriocina; ambos son inducidos al ciclo lítico en coordinación de la respuesta SOS bacteriana. La expresión de una proteína codificada por el fago Φ 10403S, AriS, causa la atenuación de la expresión de los genes SOS y en consecuencia el desarrollo del ciclo lítico. Además, similar al caso de Gp14 en H66, mutantes para este gen presentan una disminución en la cantidad de viriones producidos a partir de la cepa lisógena (Azulay et al., 2022).

9. CONCLUSIONES

- Fue posible detectar un aumento significativo de ~ 4 veces en los niveles de mRNA de los genes SOS *lexA*, *sulA* y *recN* bajo el tratamiento con Mitomicina C.
- La expresión de la proteína Gp14 del fago H66 es constitutiva: muestra una expresión constante durante los ciclos lítico y lisogénico.
- La presencia de Gp14 en la lisógena de H66 promueve el incremento en los niveles del mensajero de *lexA* y *sulA* de PAO1, así como del ORF70 de H66.
- No se detectaron genes SOS de la bacteria reprimidos por Gp14 cuando esta se expresa del profago.
- La expresión de los ORFs 32 y 70 del fago es controlado primordialmente por la proteína LexA bacteriana.
- Probablemente Gp14 es resistente a la degradación por ClpXP de la bacteria.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la influencia de Gp14 sobre la transcripción de otros genes de la respuesta SOS de *P. aeruginosa*, como *recA*, *dinG*, *dnaE2*, entre otros.
- Confirmar experimentalmente la funcionalidad del promotor constitutivo del gen *gp14* de H66.
- Determinar la traducibilidad de las proteínas codificadas en los ORFs 32 y 70 del fago H66.
- Investigar el efecto de la expresión de los ORFs 32 y 70 sobre la infección de H66 en *P. aeruginosa*, mediante la generación de mutantes nulas y de expresión constitutiva para estos genes.
- Determinar el tiempo de vida media de Gp14 y el dominio amino terminal (NTD) de LexA mediante *Western blot*.

11. REFERENCIAS

- Ahlawat, S., & Morrison, D. A. (2009). ClpXP degrades SsrA-tagged proteins in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, *191*(8), 2894-2898. <https://doi.org/10.1128/JB.01715-08>
- Ansari, S., Walsh, J. C., Bottomley, A. L., Duggin, I. G., Burke, C., & Harry, E. J. (2021). A newly identified prophage-encoded gene, ymfM, causes SOS-inducible filamentation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. <https://doi.org/10.1128/JB.00646-20>
- Aramaki, H., & Fujita, M. (1999). In vitro transcription analysis of rpoD in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *FEMS Microbiol Lett*, *180*(2), 311-316. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08811.x>
- Azulay, G., Pasechnek, A., Stadnyuk, O., Ran-Sapir, S., Fleischer, A. M., Borovok, I., Sigal, N., & Herskovits, A. A. (2022). A dual-function phage regulator controls the response of cohabiting phage elements via regulation of the bacterial SOS response. *Cell Rep*, *39*(3), 110723. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110723>
- Ballesteros-Plaza, D., Holguera, I., Scheffers, D. J., Salas, M., & Munoz-Espin, D. (2013). Phage 29 phi protein p1 promotes replication by associating with the FtsZ ring of the divisome in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(30), 12313-12318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1311524110>
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, *427*(6969), 72-74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>
- Bell, J. C., & Kowalczykowski, S. C. (2016). RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine: (Trends in Biochemical Sciences, June 2016, Vol. 41, No. 6, 491--507). *Trends Biochem Sci*, *41*(7), 646. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.05.006>
- Blanco, M., & Devoret, R. (1973). Repair mechanisms involved in prophage reactivation and UV reactivation of UV-irradiated phage lambda. *Mutat Res*, *17*(3), 293-305. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(73\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0027-5107(73)90001-8)
- Boyle, J. M., & Setlow, R. B. (1970). Correlations between host-cell reactivation, ultraviolet reactivation and pyrimidine dimer excision in the DNA of bacteriophage lambda. *J Mol Biol*, *51*(1), 131-144. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90275-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90275-5)
- Brent, R., & Ptashne, M. (1980). The lexA gene product represses its own promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *77*(4), 1932-1936. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.4.1932>
- Brent, R., & Ptashne, M. (1981). Mechanism of action of the lexA gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(7), 4204-4208. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4204>
- Brussow, H., Canchaya, C., & Hardt, W. D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev*, *68*(3), 560-602, table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004>
- Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J. P., Anderluh, G., Busby, S. J., Steinhoff, H. J., & Zgur-Bertok, D. (2011). Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Res*, *39*(15), 6546-6557. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr265>
- Butala, M., Zgur-Bertok, D., & Busby, S. J. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci*, *66*(1), 82-93. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8378-6>
- Byrne, M., & Kropinski, A. M. (2005). The genome of the *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing bacteriophage F116. *Gene*, *346*, 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.11.001>
- Calero, S., Garriga, X., & Barbe, J. (1993). Analysis of the DNA damage-mediated induction of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* lexA genes. *FEMS Microbiol Lett*, *110*(1), 65-70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06296.x>
- Cam, K., Bejar, S., Gil, D., & Bouche, J. P. (1988). Identification and sequence of gene dicB: translation of the division inhibitor from an in-phase internal start. *Nucleic Acids Res*, *16*(14A), 6327-6338. <https://doi.org/10.1093/nar/16.14.6327>

- Cazares, A. (2016). *Genómica comparativa y funcional de fagos que infectan Pseudomonas aeruginosa* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados de Intituto Politécnico Nacional]. Ciudad de México.
- Cirz, R. T., O'Neill, B. M., Hammond, J. A., Head, S. R., & Romesberg, F. E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol*, *188*(20), 7101-7110. <https://doi.org/10.1128/JB.00807-06>
- Clark, A. J. (1973). Recombination deficient mutants of *E. coli* and other bacteria. *Annu Rev Genet*, *7*, 67-86. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.07.120173.000435>
- Conter, A., Bouche, J. P., & Dassain, M. (1996). Identification of a new inhibitor of essential division gene *ftsZ* as the *kil* gene of defective prophage *Rac*. *J Bacteriol*, *178*(17), 5100-5104. <https://doi.org/10.1128/jb.178.17.5100-5104.1996>
- Coppens, L., Wicke, L., & Lavigne, R. (2022). SAPPHERE.CNN: Implementation of dRNA-seq-driven, species-specific promoter prediction using convolutional neural networks. *Comput Struct Biotechnol J*, *20*, 4969-4974. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.006>
- Cordell, S. C., Robinson, E. J., & Lowe, J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor *SulA* and in complex with *FtsZ*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(13), 7889-7894. <https://doi.org/10.1073/pnas.1330742100>
- Cumby, N., Edwards, A. M., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2012). The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein. *J Bacteriol*, *194*(18), 5012-5019. <https://doi.org/10.1128/JB.00843-12>
- Ebina, Y., Takahara, Y., Kishi, F., Nakazawa, A., & Brent, R. (1983). LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene. *J Biol Chem*, *258*(21), 13258-13261. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6355108>
- Flynn, J. M., Neher, S. B., Kim, Y. I., Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2003). Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell*, *11*(3), 671-683. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00060-1)
- Fogh, R. H., Otteleben, G., Ruterjans, H., Schnarr, M., Boelens, R., & Kaptein, R. (1994). Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. *EMBO J*, *13*(17), 3936-3944. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06709.x>
- Fornelos, N., Bamford, J. K., & Mahillon, J. (2011). Phage-borne factors and host LexA regulate the lytic switch in phage GIL01. *J Bacteriol*, *193*(21), 6008-6019. <https://doi.org/10.1128/JB.05618-11>
- Fornelos, N., Browning, D. F., Pavlin, A., Podlesek, Z., Hodnik, V., Salas, M., & Butala, M. (2018). Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue. *Nucleic Acids Res*, *46*(18), 9432-9443. <https://doi.org/10.1093/nar/gky646>
- Fornelos, N., Butala, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Bamford, J. K., & Salas, M. (2015). Bacteriophage GIL01 gp7 interacts with host LexA repressor to enhance DNA binding and inhibit RecA-mediated auto-cleavage. *Nucleic Acids Res*, *43*(15), 7315-7329. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv634>
- Garriga, X., Calero, S., & Barbe, J. (1992). Nucleotide sequence analysis and comparison of the *lexA* genes from *Salmonella typhimurium*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *Mol Gen Genet*, *236*(1), 125-134. <https://doi.org/10.1007/BF00279651>
- Granger-Schnarr, M., Oertel, P., & Schnarr, M. (1988). A mutant LexA repressor harboring a cleavage motif cysteine-glycine remains inducible. *FEBS Lett*, *231*(2), 437-439. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80866-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80866-4)
- Hall, B. M., Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Nunez, C., Reffuveille, F., Mawla, G. D., Hancock, R. E. W., & Baker, T. A. (2017). Two Isoforms of Clp Peptidase in *Pseudomonas aeruginosa* Control Distinct Aspects of Cellular Physiology. *J Bacteriol*, *199*(3). <https://doi.org/10.1128/JB.00568-16>
- Hanahan, D., Jessee, J., & Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol*, *204*, 63-113. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)04006-a](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)04006-a)

- Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H., & Ogawa, H. (1981). Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell*, 27(3 Pt 2), 515-522. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90393-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90393-7)
- Horii, T., Ogawa, T., & Ogawa, H. (1981). Nucleotide sequence of the *lexA* gene of *E. coli*. *Cell*, 23(3), 689-697. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90432-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90432-3)
- Huisman, O., D'Ari, R., & Gottesman, S. (1984). Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(14), 4490-4494. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4490>
- Hurstel, S., Granger-Schnarr, M., Daune, M., & Schnarr, M. (1986). In vitro binding of LexA repressor to DNA: evidence for the involvement of the amino-terminal domain. *EMBO J*, 5(4), 793-798. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04283.x>
- Iwasaki, H., Nakata, A., Walker, G. C., & Shinagawa, H. (1990). The *Escherichia coli* *polB* gene, which encodes DNA polymerase II, is regulated by the SOS system. *J Bacteriol*, 172(11), 6268-6273. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6268-6273.1990>
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V., & Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14339-14344. <https://doi.org/10.1073/pnas.2036282100>
- Juhala, R. J., Ford, M. E., Duda, R. L., Youlton, A., Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2000). Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages. *J Mol Biol*, 299(1), 27-51. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3729>
- Kiro, R., Molshanski-Mor, S., Yosef, I., Milam, S. L., Erickson, H. P., & Qimron, U. (2013). Gene product 0.4 increases bacteriophage T7 competitiveness by inhibiting host cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(48), 19549-19554. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314096110>
- Kock, H., Gerth, U., & Hecker, M. (2004). The ClpP peptidase is the major determinant of bulk protein turnover in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 186(17), 5856-5864. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5856-5864.2004>
- Kokjohn, T. A., & Miller, R. V. (1987). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *recA* analog and its protein product: *rec-102* is a mutant allele of the *P. aeruginosa* PAO *recA* gene. *J Bacteriol*, 169(4), 1499-1508. <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1499-1508.1987>
- Little, J. W., & Harper, J. E. (1979). Identification of the *lexA* gene product of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(12), 6147-6151. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.12.6147>
- Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*, 29(1), 11-22. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90085-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90085-x)
- Little, J. W., Mount, D. W., & Yanisch-Perron, C. R. (1981). Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(7), 4199-4203. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4199>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, C., & Echols, H. (1987). RecA protein and SOS. Correlation of mutagenesis phenotype with binding of mutant RecA proteins to duplex DNA and LexA cleavage. *J Mol Biol*, 196(3), 497-504. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90027-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90027-1)
- Lujan, A. M., Moyano, A. J., Martino, R. A., Feliziani, S., Urretavizcaya, M., & Smania, A. M. (2019). ImuB and ImuC contribute to UV-induced mutagenesis as part of the SOS regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Mol Mutagen*, 60(7), 594-601. <https://doi.org/10.1002/em.22290>
- Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W., & Strynadka, N. C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for

- regulation of self-cleavage. *Cell*, 106(5), 585-594. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00479-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00479-2)
- Martínez-Martínez, J. (2020). *Caracterización del ORF_33 del bacteriófago temperado H66 de Pseudomonas aeruginosa*. Instituto Politécnico Nacional].
- Maya-Lucas, O. (2012). *Genómica comparativa y funcional de fagos que infectan Pseudomonas aeruginosa* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional]. Ciudad de México.
- McEntee, K. (1977). Protein X is the product of the recA gene of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5275-5279. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5275>
- Mizusawa, S., Court, D., & Gottesman, S. (1983). Transcription of the sulA gene and repression by LexA. *J Mol Biol*, 171(3), 337-343. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(83\)90097-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(83)90097-9)
- Mount, D. W., Kosel, C. K., & Walker, A. (1976). Inducible, error-free DNA Repair in tsl recA mutants of E. coli. *Mol Gen Genet*, 146(1), 37-41. <https://doi.org/10.1007/BF00267980>
- Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T., & Baker, T. A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev*, 17(9), 1084-1089. <https://doi.org/10.1101/gad.1078003>
- Ortega-Oliva, S. (2020). *Determinación de la función de la proteína LexA-like del fago H66 como posible represor transcripcional* Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional]. Ciudad de México.
- Pemberton, J. M. (1973). F116: a DNA bacteriophage specific for the pili of Pseudomonas aeruginosa strain PAO. *Virology*, 55(2), 558-560. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(73\)90203-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(73)90203-1)
- Podlesek, Z., & Zgur Bertok, D. (2020). The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Front Microbiol*, 11, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785>
- Pourcel, C., Midoux, C., Hauck, Y., Vergnaud, G., & Latino, L. (2017). Large Preferred Region for Packaging of Bacterial DNA by phiC725A, a Novel Pseudomonas aeruginosa F116-Like Bacteriophage. *PLoS One*, 12(1), e0169684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169684>
- Qiu, D., Damron, F. H., Mima, T., Schweizer, H. P., & Yu, H. D. (2008). PBAD-based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in Pseudomonas and Burkholderia spp. and other bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 74(23), 7422-7426. <https://doi.org/10.1128/AEM.01369-08>
- Qiu, D., Eisinger, V. M., Head, N. E., Pier, G. B., & Yu, H. D. (2008). ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiology (Reading)*, 154(Pt 7), 2119-2130. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017368-0>
- Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci*, 5A, 355-367. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2895-7_48
- Rosenberg, M., & Echols, H. (1990). Differential recognition of ultraviolet lesions by RecA protein. Possible mechanism for preferential targeting of SOS mutagenesis to (6-4) dipyrimidine sites. *J Biol Chem*, 265(33), 20641-20645. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147025>
- Sancar, A., Sancar, G. B., Rupp, W. D., Little, J. W., & Mount, D. W. (1982). LexA protein inhibits transcription of the E. coli uvrA gene in vitro. *Nature*, 298(5869), 96-98. <https://doi.org/10.1038/298096a0>
- Sancar, G. B., Sancar, A., Little, J. W., & Rupp, W. D. (1982). The uvrB gene of Escherichia coli has both lexA-repressed and lexA-independent promoters. *Cell*, 28(3), 523-530. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90207-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90207-0)
- Schnarr, M., Granger-Schnarr, M., Hurstel, S., & Pouyet, J. (1988). The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS Lett*, 234(1), 56-60. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)81302-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)81302-4)

- Slilaty, S. N., & Little, J. W. (1987). Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(12), 3987-3991. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.3987>
- Solovyev, V. V., & Salamov, A. A. (2013). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences 3 MATERIAL AND METHODS Learning Parameters and Prediction of Protein-Coding Genes.
- Takahashi, M., Daune, M., & Schnarr, M. (1986). Fluorescence study of the RecA-dependent proteolysis of LexA, the repressor of the SOS system in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, *196*(2), 215-218. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80249-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80249-6)
- Tapias, A., Fernandez, S., Alonso, J. C., & Barbe, J. (2002). *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res*, *30*(7), 1539-1546. <https://doi.org/10.1093/nar/30.7.1539>
- Tetart, F., & Bouche, J. P. (1992). Regulation of the expression of the cell-cycle gene *ftsZ* by DicF antisense RNA. Division does not require a fixed number of FtsZ molecules. *Mol Microbiol*, *6*(5), 615-620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01508.x>
- Tomoyasu, T., Ohkishi, T., Ukyo, Y., Tokumitsu, A., Takaya, A., Suzuki, M., Sekiya, K., Matsui, H., Kutsukake, K., & Yamamoto, T. (2002). The ClpXP ATP-dependent protease regulates flagellum synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol*, *184*(3), 645-653. <https://doi.org/10.1128/JB.184.3.645-653.2002>
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C., & Bramhill, D. (1998). Bacterial SOS checkpoint protein Sula inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein. *J Bacteriol*, *180*(15), 3946-3953. <https://doi.org/10.1128/JB.180.15.3946-3953.1998>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, *40*(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Witkin, E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev*, *40*(4), 869-907. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.869-907.1976>