



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Análisis preliminar de la tRNA guanosin-transglicosilasa de dos fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*”

**Tesis que presenta:**

QFB. GERARDO CORTÉS PEÑA

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE:**

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**DIRECTOR DE TESIS:**

DR. GABRIEL GUARNEROS PEÑA

CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2017

## **ASESORES**

**DR. LUIS YOSHIO KAMEYAMA KAWABE**

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN

**DRA. ROSA MARIA DEL REFUGIO BERMUDEZ CRUZ**

Departamento de Genética y Biología Molecular, Cinvestav-IPN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Dr. Gabriel Guarneros Peña, en el Centro de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz, el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y el Dr. Gabriel Guarneros Peña.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el periodo de octubre 2014 a agosto 2016, número de becario: 335985.

## **Agradecimientos**

A mi familia:

A mis padres. A mi madre Leticia por encaminarme en las áreas de estudio de las ciencias médicas. A mi padre Isaías por el apoyo brindado durante mis estudios. A mi hermano Daniel por mostrarme el espíritu de la competitividad y mantenerme alentado a finalizar este proyecto, muchas gracias.

A mis amigos:

Cristal Maya, Octavio Romero, Loan Edel Villalobos, Ana Isabel de la Cruz, Nelby Ivonne Cruz, Saida Briones, Yuritza Olguín, Rodolfo Montes, Lilia Carolina León, Marco Carballo, Sandra Angélica Ortega, Víctor Flores, Irais Ramírez, Ricardo Amador, Juan Carlos Cifuentes, Lizbeth Hernández, Salma Jiménez, Sandra Paúl y a los que me faltan mencionar.

Por la ayuda técnica de los auxiliares:

M. en C. José Guadalupe Bueno Martínez y M. en C. Marco Antonio Magos Castro.

Por el apoyo técnico a:

María Luisa Bazán Tejeda, Ma. Guadalupe Aguilar González

A mis sinodales:

A la Dra. Rosa María Bermúdez, por todos sus consejos que contribuyeron a la culminación de este trabajo, gracias.

Al Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe, por todo el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto, gracias.

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme llevar a cabo este proyecto, por fungir como un director de tesis crítico y objetivo hacia mi trabajo, lo cual, contribuyó a mi formación y entendimiento sobre las áreas de investigación, gracias.

## Índice

Contenido .....	Página
Índice .....	I
Índice de Figuras .....	III
Índice de Tablas .....	IV
Resumen .....	V
Abstract .....	VI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Bacteriófagos .....	1
1.2 Bacterias del genero <i>Pseudomonas</i> .....	1
1.3 Fagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.4 Genes metabólicos en fagos. ....	2
1.5 Queuosina .....	3
1.5.1 Biosíntesis de la Queuosina .....	3
1.6 tRNAs GUN .....	5
1.7 tRNA guaninosin-transglicosilasa .....	6
1.7.1 Estructura .....	6
1.7.2 Función.....	8
1.7.3 Mecanismo de acción de la proteína Tgt. ....	8
2 ANTECEDENTES.....	11
2.1 Hibridación de PaMx25 a PaMx55 .....	12
2.2 Importancia de la modificación de tRNAs por queuosina .....	14
3 JUSTIFICACIÓN .....	15
4 HIPÓTESIS .....	16
5 OBJETIVOS.....	17
5.1 Objetivo General.....	17
5.2 Objetivos particulares .....	17
6 MATERIAL Y MÉTODOS .....	18
6.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína putativa Tgt .....	18
6.1.1 Identificación por BLAST.....	18
6.1.2 Predicción de la posible estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt.....	18
6.1.3 Alineamiento de secuencias.....	18
6.2 Cepas bacterianas y fágicas.....	18
6.3 Detección de la presencia de la inserción <i>lsLacZ::tgt</i> en la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 .....	19
6.4 Propagación de fagos.....	20
6.5 Titulación fágica .....	21
6.6 Purificación fágica por gradientes de cloruro de cesio (CsCl).....	22
6.7 Extracción de DNA fágico .....	22
6.8 Diseño de iniciadores .....	23
6.9 Amplificación por PCR del gen <i>tgt</i> fágico putativo.....	24
6.10 Preparación de quimiocompetentes de <i>E. coli</i> por Cloruro de Calcio .....	24
6.11 Clonación en el vector de transición pJET 1.2 .....	25
6.12 Transformación de células quimiocompetentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	26
6.13 Selección de clones .....	26
6.14 Clonación en el vector pHERD30T.....	29
6.15 Expresión de la proteína Tgt fágica .....	30
6.16 Gel de acrilamida-urea desnaturalizante para proteínas. ....	31
6.17 Tinción con azul de Coomassie. ....	32
6.18 Electroporación en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32

6.19 Extracción de RNA total .....	32
6.20 Deacilación de los tRNAs.....	34
6.21 Marcaje de sonda Radioactiva .....	34
6.22 Northern blot .....	35
6.23 Autoradiografía.....	36
6.24 Uso del Typhoon .....	37
7 RESULTADOS.....	38
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína putativa Tgt .....	38
7.1.1 Identificación por BLAST.....	38
7.1.2 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt del fago PaMx25. ....	38
7.1.3 Identificación de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico.....	39
7.2 Clonación de <i>tgt</i> del fago PaMx55 .....	41
7.2.1 Amplificación del gen <i>tgt</i> del fago PaMx55.....	41
7.2.2 Clonación de <i>tgt</i> fágico putativo .....	42
7.2.3 Subclonación de <i>tgt</i> de PaMx55 en pHERD30T .....	44
7.2.4 Secuenciación de <i>tgt</i> en pHERD30T .....	46
7.3 Alineamiento múltiple de secuencias .....	47
7.4 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt del fago PaMx55. ....	49
7.5 Clonación de <i>tgt</i> de PaMx25 en pJET 1.2 .....	51
7.5.1 Secuenciación <i>tgt</i> 25-pJET1.2.....	52
7.6 Subclonación de <i>tgt</i> del fago PaMx25 en pHERD30T .....	53
7.6.1 Secuenciación construcción <i>tgt-lacZ</i> /pHERD30T.....	55
7.6.2 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína Tgt-lacZ .....	56
7.7 Análisis de la expresión de la proteína Tgt putativa.....	57
7.8 Verificación de cepas deficientes del gen <i>tgt</i> .....	59
7.8.1 Northern blot de los controles para analizar la función de Tgt .....	60
8 DISCUSIÓN .....	63
9 CONCLUSIONES.....	66
10 PERSPECTIVAS.....	67
11 ANEXO.....	68
11.1 Medios de Cultivo .....	68
11.2 Buffers.....	68
11.3 Metodologías .....	69
11.4 Figuras suplementarias .....	72
12 REFERENCIAS .....	78

## Índice de Figuras

Contenido .....	Página
Figura 1. Ruta biosintética de queuosina a partir de GTP e incorporación a los tRNAs .....	4
Figura 2. Representación de la actividad de las diversas enzimas Tgt en los diferentes órdenes de la vida .....	6
Figura 3. Estructura de la tRNA guanosin-transglicosilasa .....	7
Figura 4. Ataque nucleofílico del aspartato 249 sobre el tRNA GUN. ....	9
Figura 5. Formación del complejo intermediario Tgt-tRNA. ....	9
Figura 6. Unión de preQ <sub>1</sub> al tRNA. ....	10
Figura 7. tRNA modificado con preQ <sub>1</sub> . ....	10
Figura 8. Comparación entre los <i>clusters</i> de genes, que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de preQ <sub>0</sub> .....	11
Figura 9. Mapa genómico del fago PaMx25 .....	12
Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2. ....	26
Figura 12. Mapa del vector pHER30T.....	30
Figura 13. Comparación de las proteínas Tgt de los organismos <i>P. aeruginosa</i> , PaMx25 y <i>Pyrococcus horikoshii</i> .....	38
Figura 14. Comparación entre los aminoácidos presentes en el sitio catalítico de Tgt de <i>Pyrococcus horikoshii</i> y PaMx25 ...	39
Figura 15. Mapa de la posición de los <i>primers</i> para amplificar <i>tgt</i> del fago PaMx25.....	41
Figura 16. Amplificación del gen <i>tgt</i> en los fagos PaMx25 y PaMx55 .....	41
Figura 17. Mapa de la construcción <i>tgt/pJET1.2</i> .....	42
Figura 18. Selección de construcciones <i>tgt55/pJET1.2</i> .....	43
Figura 19. Análisis por restricción de las construcciones <i>tgt55-pJET1.2</i> .....	43
Figura 20. Selección de construcciones <i>tgt55/pHERD30T</i> por PCR.....	44
Figura 21. Análisis por restricción de las construcciones <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	44
Figura 22. Secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	45
Figura 23. Secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	46
Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas de Tgt de los fagos de <i>P. aeruginosa</i> PaMx25 y PaMx55 .....	47
Figura 25. Comparación de la estructura cristalina de las proteínas Tgt.....	48
Figura 26. Modelo tridimensional de la proteína Tgt del fago PaMx55 .....	49
Figura 27. Selección de construcciones <i>tgt25/pJET1.2</i> .....	51
Figura 28. Análisis por restricción de las construcciones <i>tgt25-pJET1.2</i> .....	51
Figura 29. Secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt25-pJET1.2</i> .....	52
Figura 30. Secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt25/pJET1.2</i> .....	52
Figura 31. Mapa de la construcción <i>tgt-lacZ/pHERD30T</i> .....	53
Figura 32. Análisis por restricción de las construcciones <i>tgt25-pHERD30T</i> .....	53
Figura 33. Secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt-lacZ/pHERD30T</i> .....	54
Figura 34. Secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt-lacZ/pHERD30T</i> .....	55
Figura 35. Modelo tridimensional de la proteína de fusión Tgt-LacZ.....	56
Figura 36. Ensayo de inducción de la expresión de proteína Tgt putativa .....	57
Figura 37. Curva de migración proteica de marcadores de peso molecular .....	57
Figura 38. Mapa de la posición de los <i>primers</i> para comprobar la posición del transposón <i>IsLacZ/hah-tc</i> .....	58
Figura 39. Amplificación por PCR del fragmento del gen <i>tgt</i> bacteriano al transposón <i>IsLacZ</i> .....	59
Figura 40. Análisis de la modificación de tRNAs de tirosina.....	60
Figura 41. Análisis de tRNAs de glutamina .....	61
Figura suplementaria 1. Secuencia de nucleotídica del gen <i>tgt</i> del fago PaMx55 .....	72
Figura suplementaria 2. Electroferograma de la secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	73
Figura Suplementaria 3. Electroferograma de la secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	74
Figura Suplementaria 4. Electroferograma de la secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt25-pJET1.2</i> .....	75
Figura Suplementaria 5. Electroferograma de la secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt55/pHERD30T</i> .....	76
Figura Suplementaria 6. Electroferograma de la secuenciación <i>forward</i> de la construcción <i>tgt-lacZ/pHERD30T</i> .....	76
Figura Suplementaria 7. Electroferograma de la secuenciación <i>reverse</i> de la construcción <i>tgt-lacZ/pHERD30T</i> .....	77



## Indice de Tablas

Contenido .....	Pagina
Tabla 1. Cepas Bacterianas .....	19
Tabla 2. Cepas fágicas .....	19
Tabla 3. <i>Primers</i> utilizados para amplificar y clonar <i>tgt</i> fágico .....	23
Tabla 4. <i>Primers</i> usados para analizar cepas candidatas en pJET 1.2.....	23
Tabla 5. <i>Primers</i> utilizados para verificar las cepas mutantes.....	23
Tabla 6. <i>Primers</i> usados como sondas para Northern blot .....	24
Tabla 7. Mezcla de Reacción de PCR para amplificar genes de fagos .....	24
Tabla 8. Condiciones de Reacción.....	24
Tabla 9. Mezcla para clonación en pJET 1.2.....	26
Tabla 10. Preparación de Mezcla de Reacción de PCR para <i>colony</i> PCR.....	27
Tabla 11. Condiciones de Reacción con los <i>primers</i> de pJET1.2.....	27
Tabla 12. Condiciones de reacción de restricción .....	28
Tabla 13. Preparación de Mezcla de Reacción para Secuenciación .....	28
Tabla 14. Condiciones de Reacción de secuenciación con los <i>primers</i> de pJET1.2 .....	29
Tabla 15. Reacción de ligación <i>tgt</i> fágico en pHERD30T .....	29
Tabla 16. Gel separador 10% .....	31
Tabla 17. Gel concentrador 5% .....	31
Tabla 18. Marcaje de Sonda Radioactiva .....	34
Tabla 19. Solución de prehibridación.....	35
Tabla 20. Solución de lavado de marcaje radioactivo.....	36
Tabla 21. Comparación de la presencia de los genes de biosíntesis de queuosina en diferentes genomas fágicos.....	40
Tabla 22. Comparación de los aminoácidos del sitio catalítico.....	49

## Resumen

Análisis preliminar de la tRNA guanosa-transglicosilasa de dos fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*.

Los fagos son organismos que infectan diversas bacterias y que pueden obtener, de estas, genes que mejoran su capacidad de supervivencia.

Mediante análisis bioinformáticos se encontró un grupo de genes presentes en diversos fagos que codifican para enzimas que muestran una gran similitud con enzimas bacterianas. Dichas enzimas tienen la función de síntesis e incorporación de 7-aminometil-7-deazaguanina (preQ<sub>1</sub>). Estas proteínas modifican los tRNAs que presentan el anticodon GUN (Guanina, Uracilo y cualquier otro Nucleótido) en la posición “wobble”.

De este grupo de genes, se eligió el gen correspondiente a la proteína homóloga a Tgt (tRNA guanosa-transglicosilasa) del fago PaMx25. Tgt es una enzima necesaria para generar la modificación, ya que incorpora preQ<sub>1</sub> al tRNA, substituyendo la Guanina 34.

En este trabajo evaluamos por Northern blot el fenotipo de corrimiento de tRNAs de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* silvestres y mutantes (modificadas en el gen *tgt*). Las diferencias en la migración de los tRNAs nos permitió usarlas como modelo para evaluar la modificación de la proteína Tgt fágica sobre los tRNAs. Se buscará otro modelo fágico que presente el gen *tgt* e infecte las cepas ya antes mencionadas.

Encontramos que el fago PaMx55 presenta el gen *tgt* con una identidad del 94% con respecto al gen *tgt* del fago PaMx25. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 silvestre y mutante en *tgt* mostraron un fenotipo de corrimiento diferente, donde se diferencia la presencia de modificaciones de sus tRNAs. Se construyó un plásmido que expresa la proteína Tgt fusionada al fragmento alfa de la beta galactosidasa.

Palabras clave: TGT, queuosina, 7-aminometil-7-deazaguanina, anticodón GUN, fago lítico

## Abstract

Preliminary analysis of the tRNA guanosin-transglycosylase from two infecting *Pseudomonas aeruginosa* phages

The phages are organisms that infect miscellaneous bacteria and they have been obtaining genes from them that upgrade their survival capacities.

In diverse phages, a group of enzymatic genes like bacterial ones was found by bioinformatic analysis. These enzymes have the 7-amino methyl 7- deazaguanine (preQ<sub>1</sub>) synthesis and incorporation functions. These proteins modify the “wobble” position of the anticodon GUN (Guanine, Uracil and any other nucleotide) tRNAs.

tRNA guanosin-transglycosylase (Tgt) protein from the PaMx25 phage was chosen. Tgt is a necessary protein which generate the tRNA modification by exchange of the 34<sup>th</sup> guanine for the precursor preQ<sub>1</sub> in to the tRNA.

In this work the tRNAs migration phenotypes from wild type and mutant (*tgt* interrupted) *Pseudomonas aeruginosa*'s strains were evaluated by Northern blot. The differences on the tRNA's migration between strains let us use them as model to evaluate the tRNA's modifications by phage's Tgt protein. Another *tgt* gene containing phage model that infect, the already mentioned strains, will be searched.

We found the *tgt* gene in PaMx55 phage with a 94% of identity respect PaMx25 phage's *tgt* gene. The wild type and mutant *Pseudomonas aeruginosa*'s strains shown a differential migration phenotype in which we can observe the differences between modified and unmodified tRNAs.

Although, a Tgt-lacZ plasmid coding a merged Tgt protein with the alpha fragment from the Beta galactosidase protein was constructed.

Keyword: Tgt, queuine, 7-aminometil-7-deazaguanine, GUN tRNA, lytic phage

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (o fagos) son las entidades biológicas más abundantes en la tierra, y se estima que superan en número a sus presas bacterianas hasta por 10 veces (Brüssow y Hendrix 2002). Los bacteriófagos no son un grupo homogéneo. Ellos actualmente son clasificados en base a su genoma (cadena sencilla contra cadena doble, RNA contra DNA) y su morfología en 10 familias de fagos (Brüssow y Hendrix 2002).

Los bacteriófagos en base a su ciclo de replicación se han dividido en dos grupos: fagos virulentos y fagos temperados. Los primeros se replican a través de un ciclo lítico que resulta en la lisis celular, y con ello, la liberación de las partículas fágicas resultantes del proceso de infección. Los fagos temperados además de seguir un ciclo lítico, pueden entrar en un estado llamado lisogénico, en el que la mayoría de los genes virales no se expresan y el genoma viral se replica en sincronía con el cromosoma celular, transmitiéndose de una generación a la siguiente (Kutter y Sulakvelidze 2005)

## 1.2 Bacterias del genero *Pseudomonas*

*P. aeruginosa* es un importante patógeno Gram negativo, aerobio y no esporulado, que pertenece a la clase *Gammaproteobacteria*, son de distribución ambiental mundial, con localización preferencial en ambientes húmedos como suelo, habitats marinos, plantas y tejidos animales. Son oportunista que causa serias infecciones en pacientes con fibrosis cística, cáncer y otros individuos inmunocomprometidos (Wolfgang, et. al., 2003).

## 1.3 Fagos de *Pseudomonas aeruginosa*.

La mayoría de los fagos descritos que infectan *Pseudomonas aeruginosa* son miembros del orden *Caudovirales* caracterizados por tener una morfología de cabeza y cola, con un genoma de DNA de doble cadena. Dentro de este orden se describen tres

familias *Siphoviridae* (fagos con cola flexible), *Myoviridae* (fagos con cola contráctil) y *Podoviridae* (fagos con cola corta). Estas familias a su vez se clasifican en géneros y subgéneros con base en su rango de hospedero, organización y similitud genómica (Nelson, 2004)

Estos fagos han sido estudiados a nivel molecular por perfiles de restricción, hibridación de ácidos nucleicos (DNA-DNA) y secuenciación genómica (Krylov, *et al.*, 2003, Sepulveda, *et al.*, 2012). Los resultados de dichos estudios han revelado una gran diversidad en estos fagos, y se sabe que más del 50% de los genes encontrados en sus genomas, codifican proteínas cuya función se desconoce, más aún, dichos genes no muestran similitud con secuencias depositadas en bases de datos (Kwan, *et al.*, 2006).

#### **1.4 Genes metabólicos en fagos.**

Debido a la extensa interacción entre los fagos y sus hospederos, así como a los fenómenos de transferencia horizontal de material genético, el acarreo de genes entre el fago y el hospedero es relativamente común, y en recientes fechas se han identificado en genomas fágicos, la presencia de genes relacionados con distintos procesos metabólicos. Estos genes accesorios se ha mostrado que afectan drásticamente la biología bacteriana, y presuntamente incrementan el éxito de supervivencia del fago (Hargreaves, 2014) tal es el caso del miovirus phiCDHMI que presenta genes homologos a los genes *agr* bacterianos.

Otros ejemplos de genes accesorios son aquellos que codifican para proteínas del fotosistema II, encontrados en genomas de fagos de cianobacterias (Sullivan, *et al.*, 2006). Estos genes son expresados durante la infección y parecen conferirle cierta ventaja adaptativa a los fagos que los portan. Entre otros genes acarreados por los fagos, podemos encontrar genes que en bacterias están involucrados con la respuesta al estrés nutricional, tales como *phoH* (Goldsmith, *et al.*, 2011) y *mazG* (Bryan 2008). Se han identificado en diversos fagos, genes relacionados con la biosíntesis de un nucleótido hipermodificado llamado queuosina (Morris, *et al.*, 2001, Mourad, *et al.*, 2011, Letarov, *et*

*al.*, 2014). Sin embargo, no se realizaron experimentos que puedan demostrar su función o su importancia en los fagos que los portan.

## 1.5 Queuosina.

La queuosina es un nucleósido hipermodificado localizado en la posición *wobble* (G34) del anticodón de cuatro tipos de tRNAs (Tirosina, Histidina, Asparagina y Aspartato). Esta modificación está distribuida con uniformidad en casi todas las formas de vida encontradas en el planeta (Elliott, *et al.*, 2001). A pesar de ello, los mecanismos involucrados en dicha modificación son diferentes entre organismos procariontes y eucariotes: mientras que las bacterias sintetizan la queuosina *de novo* a partir de una molécula inicial de GTP (Kuchino, *et al.*, 1976), en cambio los eucariontes importan dicha base. Lo anterior sugiere que estos mecanismos fueron formados por evolución convergente de un proceso metabólico de gran importancia (Elliott, *et al.*, 2001).

### 1.5.1 Biosíntesis de la Queuosina

La biosíntesis e integración de la queuosina [Figura 1] comienza con la GTP ciclohidrolasa I (codificada en el gen *fo/E*), la cual transforma guanósil trifosfato (GTP) en 7,8-dihidroneopterin trifosfato (H<sub>2</sub>NTP) en presencia de zinc (Rebelo, *et al.*, 2003, Tanaka, *et al.*, 2005). Posteriormente, la enzima QueD, transforma dicho intermediario en 6-carboxi-5,6,7,8-tetrahydropterina (CPH<sub>4</sub>) (McCarty, *et al.*, 2009). Por su parte, CPH<sub>4</sub> es transformada en 7-carboxi-7-deazaguanina (CDG) por la enzima QueE (CDG sintasa) dependiente de S-adenosil metionina (SAM) (Dowling *et al.* 2014).

Las siguientes reacciones transforman CDG en 7-ciano-7-deazaguanina (preQ<sub>0</sub>) por la enzima QueC (preQ<sub>0</sub> sintasa) (Gaur y Varshney, 2005), y posteriormente en 7-aminometil-7-deazaguanina (pre-Q<sub>1</sub>) por la enzima QueF (preQ<sub>0</sub> reductasa) dependiente de NADPH (Lanen, *et al.*, 2005).

Tanto preQ<sub>1</sub> como preQ<sub>0</sub> pueden ser intercambiados por la guanina de la posición 34 de los tRNAs tipo GUN (Ishitani, *et al.*, 2002), decodificantes de tirosina, histidina, asparagina y aspartato. Dicho intercambio es catalizado por la enzima tRNA

guanosintransglicosilasa (Tgt) (Reader, et al., 2004, Okada, et al., 1979). Una vez que preQ<sub>0</sub> o preQ<sub>1</sub> han sido incorporados al tRNA, la enzima QueA (tRNA ribosiltransferasa isomerasa) los convierte a epoxiqueosine (epoxiQ) (Kinzie, et al., 2000). El paso final de la ruta consta de la reducción de epoxiQ a queosina y es llevado a cabo por la enzima QueG (epoxiQ reductasa) dependiente de vitamina B12 (Dowling, et al., 2014, Lanen, et al., 2005, McCloskey 1988, Miles ZD 2011)

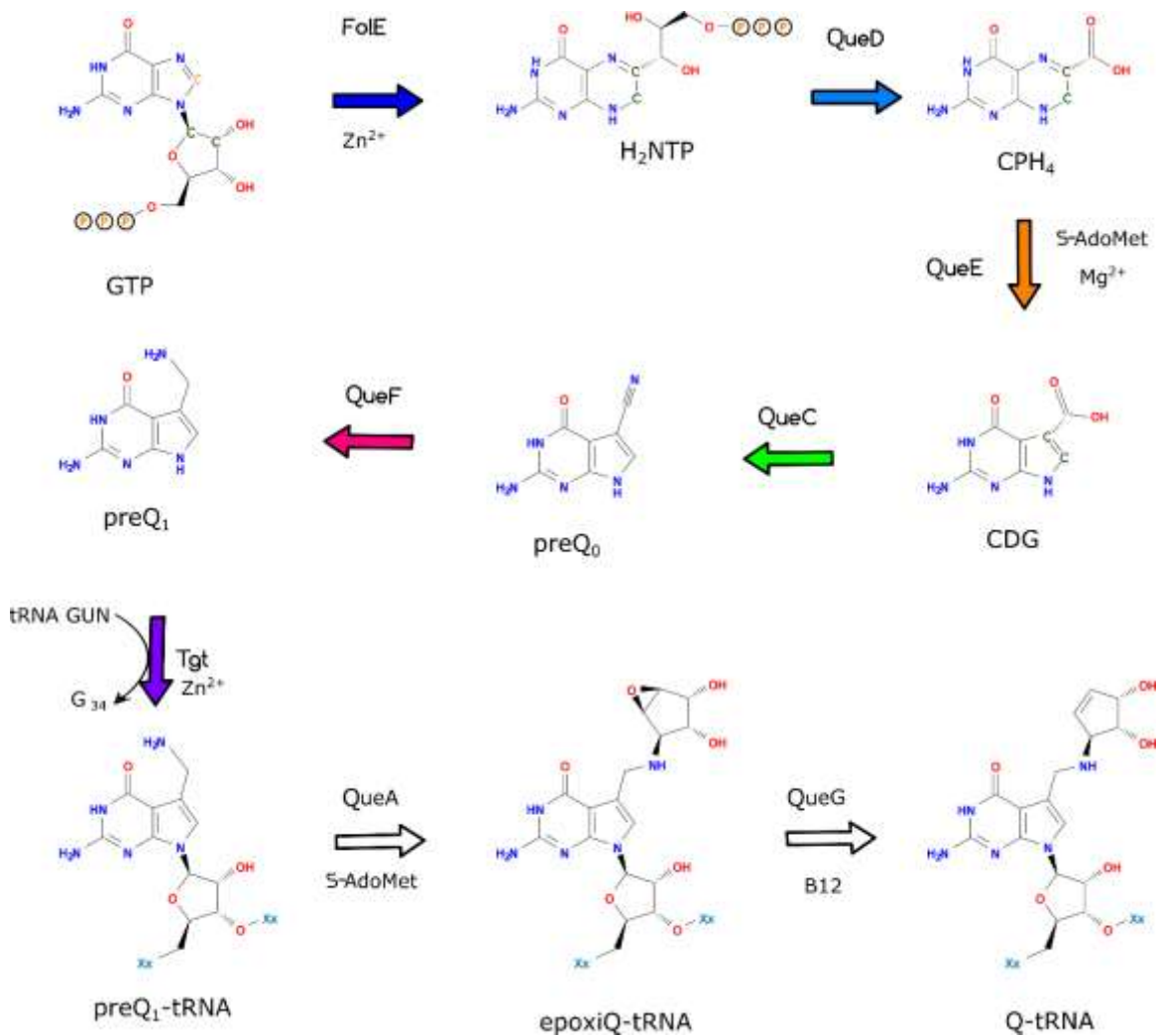


Figura 1. Ruta biosintética de queuosina a partir de GTP e incorporación a los tRNAs (Dowling, et al., 2014, Lanen et al., 2005, Biela et al., 2013)

## 1.6 tRNAs GUN.

Los tRNAs (Transfer Ribonucleic Acid) son RNAs que transportan aminoácidos al ribosoma y permiten llevar a cabo la traducción. Para realizar dicha función hibridan con los tripletes de nucleótidos de los RNA mensajeros, acción denominada reconocimiento codón-anticodón (Lagerkvist, *et. al.*, 1966).

Los tRNAs GUN reconocen los tripletes NAC los cuales codifican para los aminoácidos Asparagina (AAC), Aspartato (GAC), Histidina (CAC) y Tirosina (UAC). La modificación por queuosina de los tRNAs GUN resulta importante en la fidelidad del reconocimiento codón-anticodón. Como ejemplo de ello se tiene al tRNA de tirosina UAC, el cual, en ausencia de queuosina puede reconocer erróneamente el codón de paro UAG impidiendo el paro normal de la traducción de las proteínas. Sin embargo, al contar con la modificación por queuosina, se vuelve específica la selección del codón (Bienz, *et. al.* 1981, Beier *et. al.*, 1984).

Por otro lado, se ha propuesto que la interacción de los tRNAs adyacentes tRNA<sup>Asn</sup> modificado con queuosina y tRNA<sup>Phe</sup> modificado con wyeosina, es esencial en eventos de *frame-shifting* en la traducción de los productos del gen *gag-pol* de los virus de inmunodeficiencia humana (VIH), leucemia de células T humanas (HTLV-1) y de leucemia bovina (BLV) (Hatfield, 1989).

La modificación por queuosina en la interacción de los tRNAs con su aminoacilsintetasa correspondiente, incrementa ligeramente la constante de Michaelis-Menten (Km) para tRNA<sup>Tyr</sup> (Noguchi, *et. al.*, 1982), pero la disminuyen para tRNA<sup>Asp</sup> (Singhal y Yakharia, 1983). Adicionalmente se ha observado que los tRNAs<sup>Tyr</sup> modificados con queuosina tienen cerca del doble de eficiencia de unión a complejos ribosomales en comparación con tRNAs<sup>Tyr</sup> no modificados (Noguchi, *et.al.*, 1982).

Finalmente, se ha visto que tRNAs<sup>His</sup> que contienen guanosina tienen fuerte preferencia por secuencias CAC sobre CAU. Sin embargo, los tRNA<sup>His</sup> modificados por queuosina no muestran una preferencia por codón, manifestando que la queuosina elimina la preferencia en el uso de codones en el sistema (Meier *et. al.*, 1985, Smith y Hatfield, 1986).



## 1.7 tRNA guanosin-transglicosilasa.

La enzima tRNA guanosin-transglicosilasa es la enzima clave en la modificación de los tRNAs donde involucra a la queuosina en los eucariontes y eubacterias, en cambio, en las arqueobacterias implica a la arqueuosina [Figura 2]. (Garcia, Kittendorf., 2005)

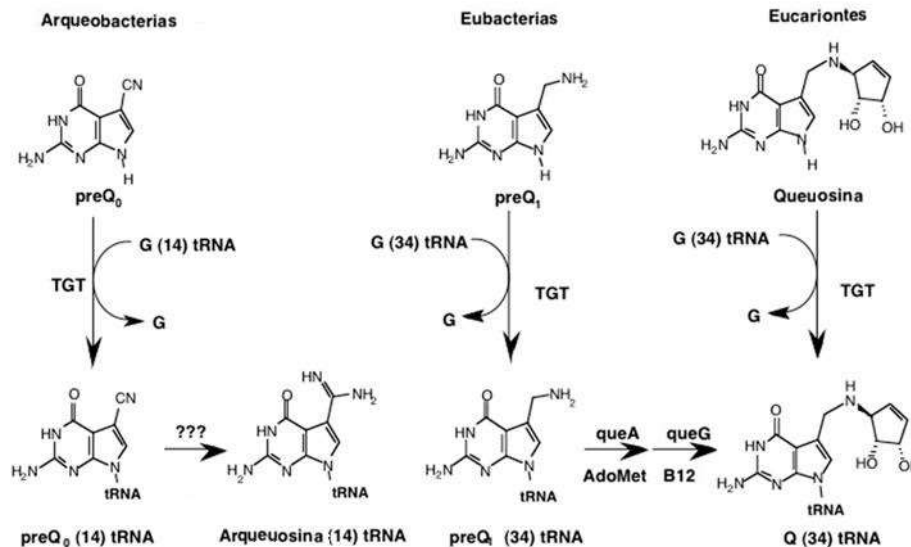


Figura 2. Representación de la actividad de las diversas enzimas Tgt en los diferentes órdenes de la vida. Se representa mediante estructura química la integración de los precursores de queuosina en arqueobacterias y eubacterias en los tRNAs mientras en los eucariontes se lleva a cabo directamente (Garcia, Kittendorf., 2005).

### 1.7.1 Estructura

La estructura que se ha llegado a obtener de la proteína Tgt, mediante cristalización, ha sido la del organismo *Pyrococcus horikoshii* [Figura 3]. Esta estructura reveló la formación de un complejo ternario que comprende el tRNA, la enzima Tgt y como sustrato catalítico inactivo un análogo de la 9-deazaguanina (Ishitani, *et. al.*, 2002).

La proteína Tgt de *Pyrococcus horikoshii* se conforma como homodímero (Ishitani, *et. al.*, 2002) y en el caso de *Zimomonas mobilis* como monómero (Reuter y Ficner, 1995)., En ambos casos toman la conformación de un barril de láminas beta y alfa

hélices, pero en el caso de *Pyrococcus horikoshii* acoge un subdominio de unión a Zinc<sup>2+</sup> cercano al carboxilo terminal (Romier, *et. al.*, 1996). Este dímero está dotado con dos sitios activos, pero por razones estéricas solo es capaz de convertir solo un substrato de RNA a la vez (Ritschel, *et. al.*, 2009).

La estructura cristalina del complejo ternario reveló que el tRNA es fijado a Tgt mediante la cadena lateral de Asp280. Por lo tanto, el aminoácido Asp280 actúa como un nucleófilo para la reacción (Ishitani, *et. al.*, 2002). El RNA substrato adopta una conformación inusual con once nucleótidos volteados hacia afuera en la región del *loop* (Xie, *et. al.*, 2003).

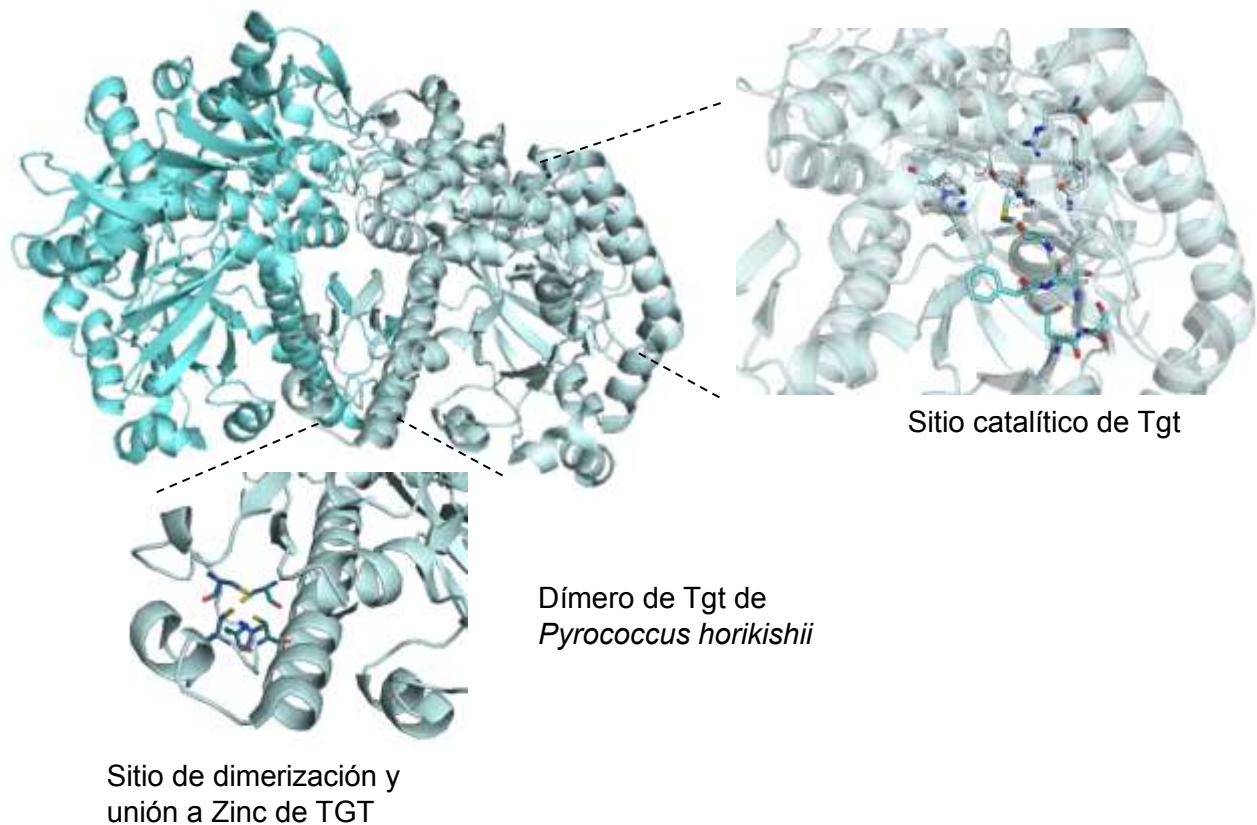


Figura 3. Estructura de la tRNA guanósina-transglicosilasa. (PDB Acc. No. 1IT7). Esta proteína se conforma como homodímero donde el sitio de dimerización de la enzima se encuentra conformado por los mismos aminoácidos que conforman el sitio de unión con Zinc (Ishitani, *et. al.*, 2002).

### 1.7.2 Función

La enzima tRNA guanosin transglicosilasa (Tgt) es una enzima que lleva a cabo la modificación de tRNAs y cataliza el intercambio de guanina por precursores de queuosina en la primera posición del anticodón en la secuencia motivo UGU (Curnow, *et. al.* 1995) de los tRNAs Tyr, His, Asn y Asp (Harada *et. al.* 1972).

Adicionalmente se ha encontrado que la enzima Tgt *in vitro* es capaz de reconocer y modificar oligonucleótidos de DNA análogos a tRNAs donde las timidinas son remplazadas con 2-deoxiuridinas (Nonekowski, *et. al.*, 2002) y sin presentar la guanina característica de la secuencia de reconocimiento UGU.

Por otra parte, en levaduras se ha descubierto que la enzima Tgt es capaz de reconocer el motivo UGU en al menos dos contextos minihelicoidales: en el centro del brazo T $\Psi$ C y en el anticodon del tRNA de fenilalaina en ausencia del uracilo 33 (Nonekowski, *et. al.*, 2001, Kung, *et. al.*, 2000)

### 1.7.3 Mecanismo de acción de la proteína Tgt.

La reacción que se lleva a cabo por la enzima Tgt se denomina transglicosilación que es la reformación de un enlace glicosídico transfiriendo un residuo monosacárido de un donador a un aceptor (Hancock, *et. al.*, 2006) en este caso intercambiando una base por otra. La reacción comienza con un ataque nucleofílico sobre la guanina 34 del tRNA por el aspartato 249 (Kittendorf, *et al.*, 2001) [Figura 4]. La reacción conlleva una cinética de *ping-pong* (Goodenough, Garcia, 2003) que incluye un complejo intermediario Tgt-tRNA [Figura 5] donde se forma un intermediario ion "oxocarbenium" (Kittendorf, *et al.*, 2001). La reacción continua con la substitución de la guanina por el precursor preQ<sub>1</sub> guiado por el ácido aspártico 130 (Todorov A. y Garcia G. 2006) [Figura 5]. El precursor preQ<sub>1</sub> se desprotona mediante el aspartato 95 estabilizándose por los aminoácidos circundantes (García G., Kittendorf J. 2005) [Figura 6] para posteriormente integrarlo en el tRNA [Figura 7] (Romier *et. al.*, 1996, 2013, Grädler, *et. al.*, 2013).

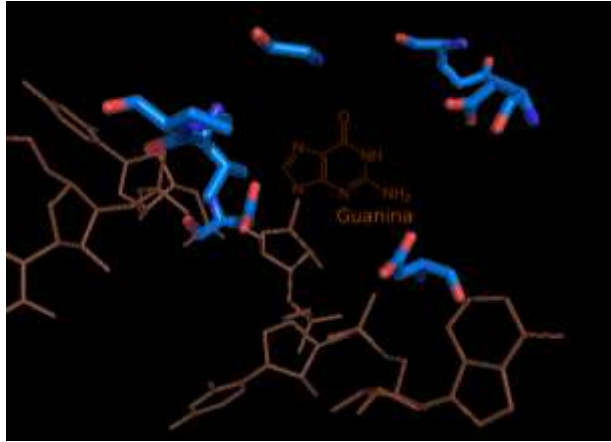


Figura 4. Ataque nucleofílico del aspartato 249 sobre el tRNA GUN. El ataque nucleofílico conlleva el rompimiento del enlace glicosídico entre la guanina y el tRNA donde el aspartato 249 le provee estabilización electrostática tras la disociación de la guanina. El ácido aspártico en la posición 89 de *Escherichia coli* (Asp 95 en el caso de *Pyrococcus horikoshii*) se ha hipotetizado que es el responsable de la protonación de la guanina y/o la desprotonación de preQ<sub>0</sub>, posiblemente mediante agua (García GA, Kittendorf JD. 2005) que facilita el ataque nucleofílico. El tRNA es representado mediante una estructura tridimensional de líneas café mientras que solo se muestran los aminoácidos del sitio catalítico de la proteína Tgt en azul y la guanina en formula esqueletal en rojo.

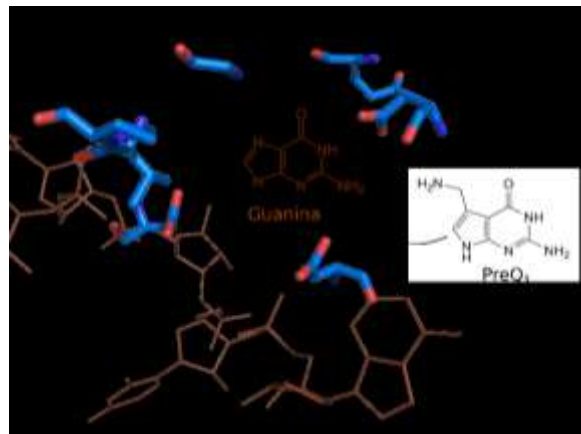


Figura 5. Formación del complejo intermediario Tgt-tRNA. Tras la separación de la guanina se da la formación de un enlace intermediario covalente entre Tgt y el tRNA GUN donde la guanina es estabilizada por puentes de hidrogeno entre los aminoácidos circundantes. La glicina 195 mantiene una unión con la guanina mediante un puente de hidrogeno con su oxígeno seis (Ishitani, *et. al.*, 2002). El ácido aspártico en la posición

130 presenta un homólogo en *Escherichia coli* en la posición 143 el cual se ha reportado que le da especificidad a la selección del sustrato heterocíclico preQ<sub>1</sub> (Todorov A. y Garcia G. 2006). Adicionalmente se ha encontrado que en el caso de la enzima Tgt de *Escherichia coli* el aminoácido serina 103 juega un rol crítico en la apropiada orientación e inmovilización del sustrato preQ<sub>1</sub> en el intercambio de bases (Grädler, *et. al.*, 1999) Posteriormente el precursor preQ<sub>1</sub> substituye a la guanina del sitio catalítico.

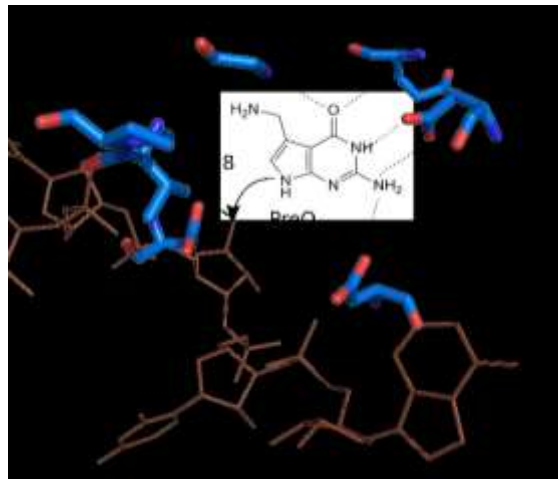


Figura 6. Unión de preQ<sub>1</sub> al tRNA. El nucleosido preQ<sub>1</sub> es incorporado vía ataque nucleofílico en el tRNA en la ribosa 34 en el carbón anumerico por el nitrógeno 9 de preQ<sub>1</sub>

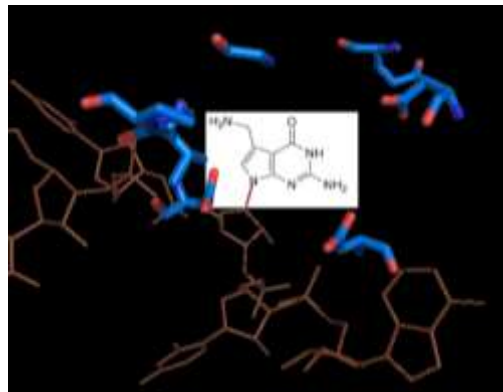


Figura 7. tRNA modificado con preQ<sub>1</sub>. Notablemente el remplazamiento de guanina por preQ<sub>1</sub> en el sitio de unión del tRNA con Tgt induce un volteo de la unión del péptido en los aminoácidos Leucina 231 y Alanina 232 (Biela 2013).

## 2. ANTECEDENTES

La modificación de los tRNAs GUN con queuosina ha sido reportada en una gran variedad de organismos (Vinayak, Pathak, 2010), de igual manera, los genes asociados a la ruta biosintética de dicho nucleótido tienen una amplia distribución en todos los dominios de la vida (Marchetti 2013, Vinayak, Pathak, 2010, Harada 1972). A través de estudios genómicos, dichos genes también han sido encontrados en diversos grupos de fagos (Mourad 2001, Kulikov 2014). Los cuales poseen genes similares a los genes bacterianos responsables de la síntesis de queuosina [Tabla 21].

En nuestro laboratorio se encontraron cinco genes asociados a la biosíntesis de preQ<sub>1</sub> en el genoma del fago PaMx25 (Sepulveda, *et. al.*, 2012). Dichos genes se localizan en los ORF 35 al 41 [Figura 9]. Al comparar estos genes con homólogos en otros fagos [Figura 8], se encontró que son altamente variables tanto en secuencia como en posición (Morris 2001, Kulikov 2014). Sin embargo, genes como *tgt* muestran similitud de secuencia incluso en los fagos más distantes [Figura 8] sugiriendo que *tgt* puede ser de gran importancia dada su conservación.

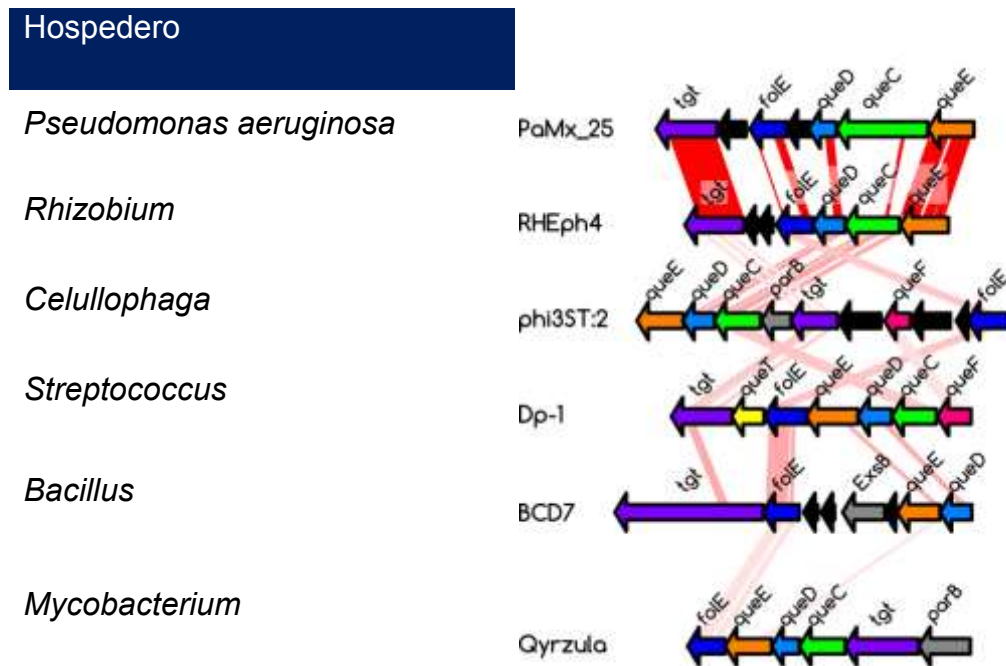


Figura 8. Comparación entre los *clusters* de genes, que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de preQ<sub>0</sub>, en fagos que infectan diferentes especies de bacterias (Flores V. Datos no publicados)

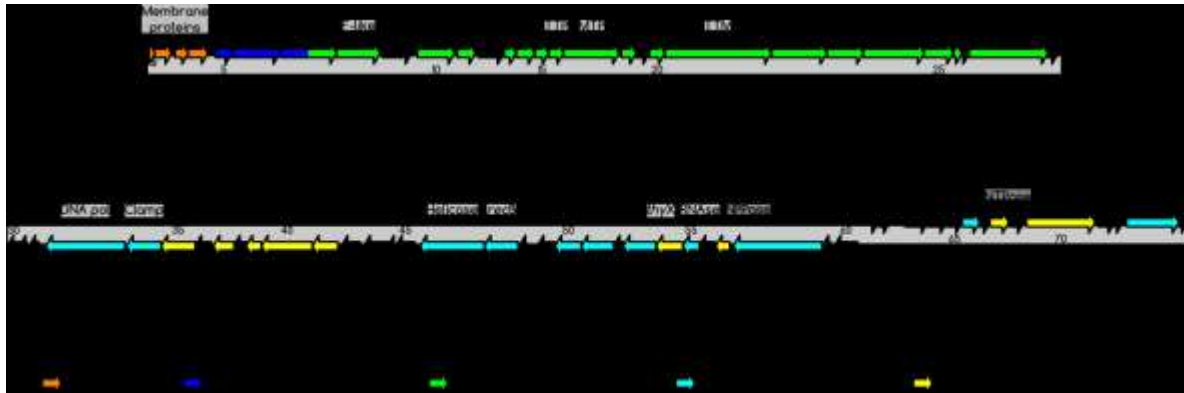


Figura 9. Mapa genómico del fago PaMx25. El mapa genómico fue dividido en dos para su fácil visualización. Las flechas de colores esquematizan los ORFs con la función marcada en las flechas inferiores. Los números dentro de la barra gris muestran el número de ORFs asignado al gen (Flores V. Datos no publicados).

El fago PaMx25 es un fago de la colección del laboratorio que presenta resistencia a la restricción de su DNA genómico por las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Sepulveda O., 2007). Este fago solo infecta a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* Ps17. Dicha cepa aún no está secuenciada y muestra dificultades para llevar a cabo técnicas de manipulación génica sobre la misma. Por lo que se planteó buscar entre la colección de fagos si hay alguno que presente el gen de interés *tgt* y pueda infectar otra cepa de *Pseudomonas aeruginosa* que esté mejor caracterizada.

## 2.1 Hibridación de PaMx25 a PaMx55

En 2012, Sepulveda y colaboradores encontraron similitud entre el fago PaMx25 y el fago PaMx55 mediante análisis de DotBlot. En dicho análisis colocaron DNAs desnaturalizados de fagos en membranas de nylon hibridándolo con sondas marcadas radioactivamente ( $\alpha$ -P<sup>32</sup>) [Figura 10].

Similarmente que el fago PaMx25, se encontró que el fago PaMx55 es un fago que presenta resistencia a la restricción de su DNA genómico por las enzimas *EcoRI* y *HindIII*

(Sepulveda O. 2007). Basándose en la similitud que presentan los fagos PaMx25 y PaMx55 se propuso que utilizando *primers* dirigidos contra el gen *tgt* del fago PaMx25 se podría identificar mediante PCR la presencia del gen *tgt* en el fago PaMx55. Tal hecho, se confirmó con la amplificación de un fragmento del mismo tamaño que el amplicón generado en PaMx25 [Figura 16].

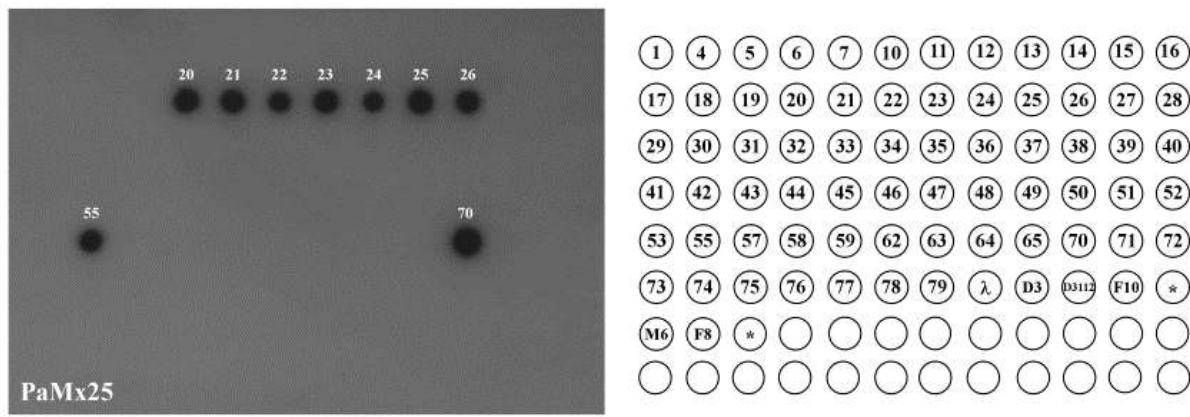


Figura 10. En el cuadro del lado izquierdo se muestran los DNAs de los fagos que hibridaron con el genoma de PaMx25 usado como sonda marcada (PaMx20, PaMx21, PaMx22, PaMx23, PaMx24, PaMx25, PaMx26, PaMx55 y PaMx70) mostrando que por la hibridación son parecidos a nivel genómico. El lado derecho muestra el patrón de puntos de DNA de fagos que se fijaron en la membrana de Nylon (Sepulveda, *et.al.*, 2012).

## 2.2 Importancia de la modificación de tRNAs por queuosina

Aunque las consecuencias de la modificación de los tRNAs por queuosina no están del todo claras, la ausencia de dicha modificación tiene diversos efectos en distintos organismos. Por ejemplo, bacterias como *Sinorhizobium meliloti* y otras rizobias deficientes en la biosíntesis de queuosina, muestran un fenotipo abatido en la fijación de nitrógeno y en el establecimiento y mantención de simbiosis con la planta *Medicago truncatula* (Hatfield, *et. al.*, 1986).



En *Drosophila melanogaster* la deficiencia en la modificación por queuosina causa mayor sensibilidad al estrés por cadmio (Noguchi 1982). La manifestación más dramática de la ausencia de queuosina ocurre en mamíferos, ya que ésta, en conjunción con ausencia de tirosina en ratón derivan en un fenotipo letal (Singhal y Yakharia , 1983). Lo anterior podría estar asociado a la modulación de los receptores de tirosin-cinasas, factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento derivado de plaquetas y un incremento de la oxidación de tetrahidrobiopterina (Singhal y Yakharia, 1983, Meier *et. al.*, 1985, Smith y Haffield, 1986). Múltiples reportes han asociado la modificación por queuosina a la regulación del metabolismo, sistemas de defensa, proliferación celular, señalización celular e incluso al cáncer (Vinayak, Pathak, 2010).

Estudios realizados en *Bacillus subtilis*, han demostrado que las enzimas relacionadas con la síntesis de PreQ<sub>1</sub> son autorreguladas por la concentración del metabolito, a través de un *riboswitch* ubicado en la región 5' UTR del operon queCDEF (Marchetti 2013, Harada 1972). Lo anterior nos indica que la modificación de tRNAs por queuosina, no solamente es ubicua, sino que cumple un papel muy importante asociado a los diversos procesos metabólicos de los organismos en los que se encuentra.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En el genoma del fago virulento de *P. aeruginosa* PaMx25 de la colección del laboratorio se ha encontrado el gen *tgt* codificante del cual se sospecha que está relacionado con la integración de un precursor de la queuosina a los tRNAs. Esta proteína es altamente conservada en otros fagos y bacterias, tanto a nivel de secuencia como a nivel de estructura. Se desconoce si la secuencia en PaMx25 corresponda a *tgt* funcional y si su función está relacionada con el ciclo de dicho fago. Por lo que se ha decidido implementar un sistema para estudiar su función *in vivo*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la proteína Tgt del fago PaMx25 cumple la función de la Tgt de *Pseudomonas aeruginosa*. Es posible que supla la función de las bacterias mutantes en el gen codificante de dicha proteína.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Preparar una metodología para evaluar la función de la proteína putativa Tgt de fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*.

### 5.2 Objetivos particulares

Verificar una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, deficiente de *tgt*

Evaluar la modificación por queuosina de los tRNAs GUN en la cepa de *P. aeruginosa* silvestre y en la cepa deficiente de *tgt*.

Buscar la presencia del gen *tgt* en fagos de la colección.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Análisis *in silico* de la proteína putativa Tgt**

#### **6.1.1 Identificación por BLAST**

Previamente se había identificado en el genoma del fago lítico PaMx25 perteneciente a la colección del laboratorio 3 de Genética y Biología Molecular, genes que mostraban similitud con las proteínas involucradas con la ruta biosintética de la queuosina. Para verificar dicho hallazgo, se sometieron nuevamente a una búsqueda tipo BLAST (Mount, 2007) la secuencia del fago PaMx25.

#### **6.1.2 Predicción de la posible estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt**

La secuencia aminoacídica de la proteína putativa Tgt del fago PaMx25 fue modelada por “*threading*” en el servidor I-TASSER (Roy, *et al.*, 2012), para determinar su posible conformación y función molecular basada en la estructura tridimensional. El análisis de las estructuras tridimensionales, así como la construcción de imágenes fueron realizadas con el programa PyMOL v1.6

#### **6.1.3 Alineamiento de secuencias**

Las secuencias de las proteínas putativas Tgt de los fagos PaMx25 y PaMx55 de *Pseudomonas aeruginosa* fueron alineadas con la proteína putativa Tgt del fago 9g de *Escherichia coli* utilizando TM-align (Zhang, *et al.*, 2005)

### **6.2 Cepas bacterianas y fágicas**

Las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, así como los fagos virulentos PaMx25 y PaMx55 utilizados en este trabajo se mencionan en las Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Cepas Bacterianas		
Cepa	Característica	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Cepa tipo	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa tipo	Stover, et al., 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 IsLacZ $\nabla$ tgt/hah	tgt	Jacobs, et al., 2003
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ps17	Cepa clínica	Sepúlveda-Robles, et al., 2012

Tabla 2. Cepas fágicas			
Fago	Cepas hospederas	Familia morfológica	Referencia
PaMx25	Ps17	<i>Siphoviridae</i>	Sepúlveda-Robles, et al., 2012
PaMx55	PAO1, Ps17	<i>Siphoviridae</i>	Sepúlveda-Robles, et al., 2012

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron conservadas en viales con agar stab (ver Anexo) a temperatura ambiente para su conservación a mediano plazo y en glicerol al 45% a -70°C para su conservación a largo plazo.

La cepa de *Escherichia coli* fue utilizada como sistema de construcción de plásmidos para posteriormente complementar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa fue conservada en glicerol al 45% a -70°C para su conservación a largo plazo.

### 6.3 Detección de la presencia de la inserción IsLacZ $\nabla$ tgt en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1

Para analizar la con la inserción del transposón *IsLacZ* en el gen *tgt* se procedió a extraer ADN de las bacterias por lo que se llenaron tubos cónicos Eppendorf de 1.5mL al tope con cultivos *overnight* de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y PAO1 IsLacZ $\nabla$ tgt/hah. Se centrifugaron a 12,074g por 5 minutos y decantaron. Posteriormente, se agregaron 500 $\mu$ L de Buffer de lisis y se incubaron a 37°C por 30 minutos invirtiendo cada 5 minutos. Se agregó 2  $\mu$ L de RNAsa e incubo a 37°C por 30 minutos invirtiendo, cada 5 minutos. Se agregaron 300  $\mu$ L de NaCl 5M invirtiendo 50 veces. Se incubo 5 minutos en hielo y se centrifugó a 15700g por 15 minutos. Tomando el sobrenadante con

extremo cuidado, de no llevar nada de la pastilla o de la parte superior, colocando la punta pegada a la pared. Se agregó un volumen de cloroformo y posteriormente se centrifugó a 15700g por 15 minutos. Con mucho cuidado se extrajo el sobrenadante en fracciones de 200  $\mu$ L tocando solo la superficie con la punta y transfiriendo a un nuevo tubo de 1.5mL estéril.

Al sobrenadante se le agregó 1 volumen de Etanol absoluto y se invirtió hasta ver la formación de las fibras de DNA. Se centrifugó a 15700g por 15 minutos y decantó para obtener una pastilla. Se agregó 1 mL de Etanol al 70%, resuspendiendo la pastilla para centrifugar a 15700g por 10 minutos. Se repitió el lavado con Etanol al 70%. Se decantó y posteriormente se secó en el equipo DNA SpeedBac120 por 3 minutos. Lo que quedó en el tubo se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua estéril y se dejó a temperatura ambiente toda la noche y para guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **6.4 Propagación de fagos**

Los fagos empleados fueron propagados mezclando 10  $\mu$ L de una dilución que contenga  $10^6$  unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro con 200 $\mu$ L de cultivo líquido *overnight* de la cepa bacteriana hospedera crecida a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación a 210 revoluciones por minuto en medio LB (ver anexo) y 2.5ml de medio T $\phi$  (ver anexo) fundido. Esta mezcla se vertió en una caja Petri con medio T $\phi$  sólido y se dejó solidificar. Incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. De las placas de lisis formadas se picó con un palillo estéril una de ellas y se hizo pasar en línea recta sobre la superficie de una caja de nuevo medio T $\phi$  para posteriormente verterle un tapiz bacteriano. Incubándose en las condiciones anteriormente mencionadas. De las placas obtenidas se picó una nuevamente y se repitió el pasaje tres veces.

Del último pasaje mediante una pipeta Pasteur estéril se tomaron 10 placas y se depositaron en un tubo cónico Eppendorf de 1.5mL con 1 mL de medio TMG-SM (Ver Anexo). El tubo se dejó en agitación durante 12 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 16,770 g por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en otro tubo cónico estéril de 1.5mL a  $4^{\circ}\text{C}$ . Mediante este procedimiento se generó un stock de cada uno de los fagos utilizados en este trabajo.

Para obtener un stock fágico de mayor concentración se procedió a preparar de 5 a 12 tapices bacterianos con placas fágicas confluentes los cuales se preparan utilizando una dilución de fagos intermedia entre el comienzo de la disminución de la saturación de placas y la terminación de la misma, que se observa en la cuantificación fágica, agregando 100  $\mu\text{L}$  de la dilución que genera confluencia del stock de interés con 200  $\mu\text{L}$  de *overnight* de la cepa bacteriana hospedera correspondiente y 2.5mL de medio T $\phi$  caliente, se deja solidificar y se incuba a 37°C por 12 horas.

Una vez transcurrido del tiempo de incubación se recupera el tapiz mediante una espátula, que es esterilizada mediante flameo en mechero y enfriada con medio TMG-SM, colocándolo en un tubo cónico Eppendorf de 50mL. Se añade de 2 a 4mL de medio TMG-SM a cada caja que se le extrajo el tapiz del fago correspondiente y se deja en agitación en un agitador orbital a 100rpm durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente se recupera el medio TMG-SM de las placas y se verte en el tubo cónico de 50mL dejándose en agitación en un agitador rotatorio a 25rpm a 4°C por 12horas. Después se centrifuga a 16,770 g durante 10 minutos y se recupera el mayor volumen posible de sobrenadante, se añaden unas gotas de cloroformo y se invierte 10 veces sometiéndose a centrifugación a 16,770 g por 10 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante en un tubo nuevo y se guarda a 4°C.

## 6.5 Titulación fágica

Para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP) en el stock obtenido se realizaron diluciones centesimales desde  $10^0$  hasta  $10^{-8}$  utilizando 10 $\mu\text{L}$  del stock de fago y 990  $\mu\text{L}$  de TMG-SM posteriormente se colocaron 5 $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones realizadas sobre un tapiz bacteriano con la cepa hospedera en una caja con medio T $\phi$ . Se incuba por 12h a 37°C y se cuentan el número de placas que aparecen en la dilución mayor. El número resultante se aplica a la fórmula siguiente para conocer el número de UFP (Douglas, 1975)



$$\frac{\text{número de placas}}{\text{volumen de alícuota(mL)} * \text{dilución}} = \text{UFP/mL}$$

## 6.6 Purificación fágica por gradientes de cloruro de cesio (CsCl)

El stock del fago PaMx55 obtenido se trató con DNAsa y RNAsa a una concentración de 1µg/mL durante 30 minutos a 37°C. Se adiciona polietilenglicol 8000 (PEG-8000) para dejarlo a una concentración final de 16% y NaCl a 1.4M incubándose en hielo por 8 horas. Una vez precipitado el contenido fágico se centrifuga a 10,509g por 30 minutos, el botón obtenido es resuspendido en 1mL de TMG-SM y se transfiere a un tubo de 1.5mL. Se agrega un volumen de cloroformo para eliminar el exceso de PEG-8000 y se mezcla por inversión 10 veces, se centrifugó a 9,300g y se recupera la fase acuosa en un tubo cónico de 1.5mL. La suspensión fágica obtenida se emplea en gradientes discontinuos de CsCl a densidades de 1.08, 1.3, 1.5 y 1.7 g/cm<sup>3</sup> (Ausubel, *et. al.*, 2003). Dicho gradiente fue centrifugado a 13,000g durante 150 minutos a 4°C en un rotor Beckman SW-40-Ti, obteniéndose los fagos concentrados en una banda la cual es extraída colocando cinta adhesiva y picando el tubo donde se colocó la cinta mediante una jeringa. El fago obtenido es dializado con solución de diálisis durante 12horas a 4°C.

## 6.7 Extracción de DNA fágico

A 500µl de partículas fágicas obtenidas por gradientes de CsCl con un valor de UFP superior a 108 UFP/mL se añade un volumen equivalente de fenol-cloroformo obteniendo una relación 1:1, se agita en vortex y se centrifuga a 15700g por 10 minutos. Se recupera la fase acuosa en un tubo Eppendorf cónico de 1.5mL y se repite el tratamiento con fenol cloroformo tres veces. La fase acuosa recuperada se mezcla con 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcla por inversión. Esta mezcla se centrifuga a 15700g por 10 minutos y se decanta el sobrenadante lavándose la pastilla con 1mL de etanol al 70%. La pastilla obtenida se seca mediante el equipo speedvac y el ADN se resuspende en agua estéril.

La integridad y calidad del DNA extraído es confirmada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% con un corrimiento a 90V en medio TAE por una hora. El gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 1µg/mL y observado mediante luz UV.

## 6.8 Diseño de iniciadores

Los iniciadores específicos para la amplificación del gen codificante de TGT putativa del fago PaMx25 que infecta a *Pseudomonas aeruginosa* se diseñaron utilizando el programa PerlPrimer versión 1.1.21 (Marshall, 2004).

Los iniciadores fueron flanqueados con secuencias que contemplan el sitio de restricción reconocido por la enzima NcoI para el oligonucleótido forward y HindIII para el oligonucleótido reverse [Tabla 3].

Tabla 3. <i>Primers</i> utilizados para amplificar y clonar <i>tgt</i> fágico		
	Dirección :5' → 3'	Tm(°C)
<i>Primer forward para tgt</i> fágico	Ccatggtgaacatctttatggcggcagt	63
<i>Primer Reverse para tgt</i> fágico	Aagcttagaagagctcctgaatacgcg	66

Los *primers* utilizados para analizar las posibles colonias candidatas en la clonación en el vector transitorio pJET 1.2 fueron los que se proveyeron en conjunto con el kit de clonación (CloneJET™ PCR Cloning Kit) [Tabla 4].

Tabla 4. <i>Primers</i> usados para analizar cepas candidatas en pJET 1.2		
	Dirección :5' → 3'	Tm(°C)
Primer pJET1.2 Forward	Cgactcactataggagagcggc	60
Primer pJET1.2 Reverse	Aagaacatcgatttcctggcag	60

Los *primers* que se utilizaron para verificar la presencia del inserto *IsLacZ tgt/hah* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 fueron diseñados utilizando un forward dirigido 20 pares de bases río arriba del codón de inicio del gen *tgt* y 50 pares de bases a partir de la secuencia de inicio de la inserción del transposon *IsLacZ* en el genoma de la bacteria [Tabla 5].

Tabla 5. <i>Primers</i> utilizados para verificar las cepas mutantes		
	Dirección :5' → 3'	Tm(°C)
<i>Primer tgt-Fwd</i>	gccaatgtaccctgtggat	52
<i>Primer tetC-Rvs</i>	gggtaacgccaggggtttcc	54

Los *primers* que se utilizaron como sondas fueron basados en el diseño de sondas para tRNAs utilizados para *Escherichia coli* modificando las bases que daban *mismatch* para que fuesen correspondientes a las secuencias de los tRNAs de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [Tabla 6].

	Dirección :5' → 3'	T <sub>m</sub> (°C)
Sonda Tyr GTA	cttcgaagtctatgacgtcaga	52
Sonda Gln1 CAA	aacgcatggcaggatcaaa	41

### 6.9 Amplificación por PCR del gen *tgt* fágico putativo

La amplificación del gen putativo *tgt* fágico se efectuó mediante la DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion™ Hot Start (Thermo Scientific, Waltman Estados Unidos). Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas variando la temperatura de alineamiento y el uso de aditivos. En las tablas 7 y 8 se muestran las condiciones finales de reacción.

Reactivo	Concentración	Volumen(μL)
Buffer Phusion HF	5X	2
Primer forward	10pM	0.4
Primer Reverse	10pM	0.4
dNTPs	200uM	0.2
Betaina		0.2
DMSO		0.2
ADN Molde	45ng/μl	1
Agua		5.5
DNA polimerasa	0.02U/μl	0.1
Volumen final		10

Paso de Reacción	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	4 min	
Desnaturalización	95	30 seg	36 ciclos
Alineamiento	59.5	30 seg	
Extensión	72	1:15 minutos	
Extensión Final	72	5 min	

## 6.10 Preparación de quimiocompetentes de *E. coli* por Cloruro de Calcio

Se dejaron 5 ml de medio SOC con células de *E. coli* DH5a a 37°C en agitación a 210rpm *overnight*. Y se preparó una dilución 1:100 del *overnight* en 25mL de medio SOC llevándolo a la densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 600nm de longitud de onda y colocar en hielo. Para posteriormente centrifugar a 16,770 g por 5 minutos y decantar el sobrenadante. Se resuspendió el pellet mediante 1mL de solución de cloruro de calcio 0.1M y se agregó solución fría hasta el volumen de 25mL. Se repitió el proceso de centrifugar a 16,770 g por 5 minutos y decantar el sobrenadante, así como resuspender el pellet mediante 1mL de solución de cloruro de calcio 0.1M y agregar solución fría hasta el volumen de 20mL. Para volver a centrifugar a 16,770 g por 5 minutos y decantar el sobrenadante volviendo a resuspender el pellet mediante un ml de solución de cloruro de calcio 0.1M y agregando solución fría hasta el volumen de 15mL. Se centrifugo a 16,770 g por 5 minutos y decanto el sobrenadante. Continuando con una resuspensión del pellet mediante 1 mL de solución de cloruro de calcio 0.1M y agregando solución fría hasta el volumen de 10mL. Se centrifugo la solución de bacterias a 16,770 g por 5 minutos y decanto el sobrenadante. Para continuar con los lavados se resuspendió el pellet mediante 1mL de solución de cloruro de calcio 0.1M y se agregó solución fría hasta el volumen de 5mL. Posteriormente se centrifugó a 16,770 g por 5 minutos y decantó el sobrenadante. Se resuspendio en 2.5mL de solución 0.1M de cloruro de calcio y 250 µL de glicerol al 100%, estéril. Se repartió en alícuotas de 200 a 600 µL en esterilidad en tubos cónicos Eppendorf estériles de 1.5ml, congelándolas con nitrógeno líquido y conservándolas a -70°C.

## 6.11 Clonación en el vector de transición pJET 1.2

Se llevó a cabo la clonación del producto de PCR obtenido en la amplificación por PCR utilizando el protocolo descrito en el CloneJET PCR Cloning Kit mezclando para productos de PCR romos marcado como *Blunt ending protocol*. Se lleva a cabo la reacción en hielo preparando una mezcla según las condiciones de la tabla 9.

Tabla 9. Mezcla para clonación en pJET 1.2		
Reactivo	Concentración	Volumen de Reacción(μl)
Buffer	2X	5
Producto de PCR	220ng	0.5
pJET 1.2	5ng/μl	0.5
T4 DNA ligasa	0.02U/μL	0.5
Agua		3.5
Volumen final		10

Se vortexeó la mezcla de 3 a 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. La mezcla de ligación obtenida se usó directamente para transformar células DH5α quimiocompetentes.

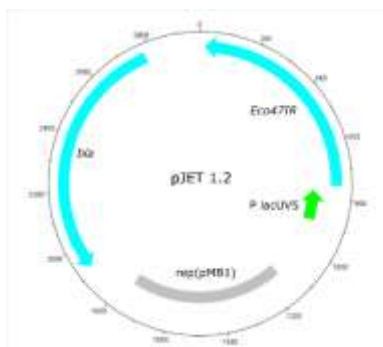


Figura 11. Mapa del vector pJET 1.2. Las flechas de colores corresponden a los ORF nombrados adyacentemente.

### 6.12 Transformación de células quimiocompetentes *E. coli* DH5α

Se colocaron 100 μL de células quimiocompetentes en un tubo Eppendorf de 1.5ml estéril y adicionó plásmido para llevarlo a una concentración final de 1μg/ml por lo que se agregaron 5 μL de reacción de ligación de pJET 1.2 *Blunt end*. Se incuban en hielo durante 30 min. Después se dio un choque térmico sometiendo a incubación a 42°C por 5 minutos. Inmediatamente se incubó en hielo durante 3 min.

Una vez incubado se retiró del hielo y a temperatura ambiente se agregó 1mL de medio LB precalentado a 37°C. Para posteriormente dejar recuperando con movimiento lento durante 1 h a 37°C. Se centrifugó a 8,385g durante 3 minutos, desechando 950 μL del sobrenadante se resuspendió en el sobrenadante restante y plaqueó la reacción en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente. Para dejar incubando la caja a 37°C por 11 horas.

### 6.13 Selección de clonas

De las clonas candidatas obtenidas en la transformación se seleccionan las que presenten un mayor crecimiento, se resiembran en una caja de Lb con el antibiótico correspondiente dejando a incubación a 37°C por 12 horas.

Posteriormente se realiza una PCR de grupos de candidatas colocando para un grupo 50 µL de agua inyectable estéril en un tubo cónico Eppendorf de 1.5mL al cual se le fueron colocando, en condiciones de esterilidad, de 6 a 10 colonias de candidatas obtenidas y se mezclaron en el tubo el cual es incubado en una placa de calentamiento a temperatura de ebullición del agua por 90 segundos e inmediatamente se coloca en hielo por 2 minutos, de la mezcla de bacterias obtenida se efectúa una reacción de PCR utilizando los *primers* específicos según el caso siguiendo las condiciones mostradas en las tablas 10 y 11.

Reactivo	Concentración	Volumen de reacción (µL)
Buffer Master Mix	2X	5
<i>Primer forward</i>	10pM	0.2
<i>Primer reverse</i>	10pM	0.2
Mezcla de <i>colony</i> PCR		3
Agua		1.6
Volumen total		10

Paso de Reacción	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	2 min	
Desnaturalización	95	30 segundos	36 ciclos
Alineamiento	60	30 segundos	
Extensión	72	1:30 minutos	
Extensión Final	72	5 min	

El producto de la reacción de PCR es corrido en un gel de agarosa al 1% por 1 hora a 90V en medio TAE. El gel fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 1µg/mL y observado mediante luz UV.

Se continua con la selección individual de las candidatas de los grupos por *colony* PCR seleccionando solo los grupos que muestran bandas con tamaños de los productos amplificados iguales a los esperados, se siembran las candidatas que mostraron el

producto de amplificación esperado en medio líquido Lb con el correspondiente antibiótico y se incuban a 37°C en agitación a 210 rpm por 12 horas para llevar a cabo la extracción de plásmido.

Al *overnight* obtenido se añade cloranfenicol hasta dejarlo a una concentración final de 50µg/mL y se incuba en las condiciones antes mencionadas de una hora a cuatro horas y se extrae el plásmido usando el kit Wizard Plus (Promega Fitchburg, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El plásmido obtenido es cuantificado mediante el equipo NanoDrop 2000 y se llevan a cabo reacciones de restricción de 500ng a 5µg con las enzimas NcoI, HindIII y XhoI de 1 a 2 horas a 37°C según las condiciones marcadas en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de reacción de restricción		
Reactivo	Concentración	Volumen de Reacción (µL)
Buffer	10X	2
Enzima	10U/µL	1
ADN	0.1-5µg/µL	1-18
Agua		→ 20
Volumen total		20

Los productos de la reacción de restricción se observaron en un gel de agarosa al 1.2% con las condiciones de corrimiento y visualización del corrimiento de productos de PCR del *colony* PCR. Los plásmidos que mostraron un patrón de restricción con los tamaños de peso esperados fueron enviados a secuenciar para verificar que los insertos hubieran sido clonados en el vector de expresión en la dirección correcta y en el marco de lectura adecuado. La secuenciación se realizó utilizando el kit BigDye Terminator v3.3 (Applied Biosystems, Foster City, Estados Unidos) preparando la reacción usando un microgramo de plásmido purificado en las condiciones mostradas en la tabla 13 y 14.

Tabla 13. Preparación de Mezcla de Reacción para Secuenciación		
Reactivo	Concentración	Volumen de reacción (µL)
Buffer	5X	4
Primer ( <i>forward o reverse</i> )	20pM	2
Plásmido	1µg	3
Ready Reaction Mix		4
Agua		→ 20
Volumen total		20

Tabla 14. Condiciones de Reacción de secuenciación con los <i>primers</i> de pJET1.2			
Paso de Reacción	Temperatura °C	Tiempo	
Desnaturalización inicial	95	2 min	
Desnaturalización	95	30 segundos	Ciclos:30
Alineamiento	60	30 segundos	
Extensión	60	1:30 minutos	
Extensión Final	72	5 min	

posteriormente se purificó este producto de PCR mediante columnas Centri-sep de Princeton Separations. Primero se bajó todo el contenido de la columna, se quitó la tapa superior para agregar 800µL de agua destilada estéril y se mezcló con vórtex para hidratar el gel. Se quitaron las burbujas formadas, dejándolas mínimo 2 horas a temperatura ambiente y sin mover. Se quitó la tapa superior de la columna, luego la inferior y se colocó en un tubo colector. Se centrifugó a 4500g durante 2 min en una centrífuga Eppendorf 5415C. Se transfirieron los 20µL de la reacción de PCR con cuidado de no tocar el gel y se centrifugó a 4500g durante 2 min. La muestra fue secada mediante vacío en el equipo speed-vac y fue mandada a secuenciar.

#### 6.14 Clonación en el vector pHERD30T

El plásmido pJET obtenido anteriormente que contenga el inserto de *tgt* fue amplificado mediante una reacción de PCR con los *primers* dirigidos contra sitios a 50 pares de bases fuera del sitio de clonación en un volumen de 50µL y se restringió mediante las enzimas NcoI y HindIII para liberar el fragmento correspondiente a *tgt* del fago PaMx55. Dicho fragmento es ligado mediante la T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Estados Unidos) en el vector pHERD30T previamente cortado con las mismas enzimas y se incubó a 16°C por 16 horas según las proporciones mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 15. Reacción de ligación <i>tgt</i> fágico en pHERD30T		
Reactivo	Concentración	Volumen de reacción (µL)
Buffer	10X	2
<i>tgt</i> restringido	50ng	1
pHERD30 restringido	100ng	1
T4 DNA ligasa	4U/µL	1
Agua		→ 20
Volumen final		20



Posteriormente se transformaron 100 $\mu$ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  con 5 $\mu$ L de producto de ligación siguiendo el protocolo de transformación anteriormente mencionado.

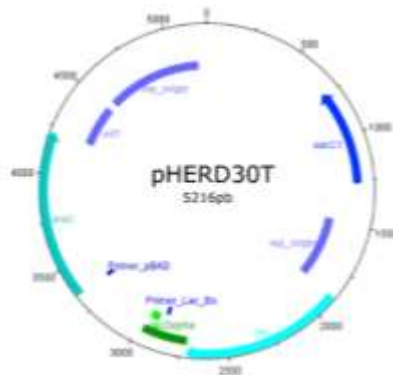


Figura 12. Mapa del vector pHER30T. Las flechas de colores corresponden a los ORF nombrados en letras del mismo color que las mismas (Dongru Qiu, *et. al.*, 2008). Se muestran en barras pequeñas los sitios donde se unen los primer para secuenciar el plásmido con su correspondiente nombre en azul.

### 6.15 Expresión de la proteína Tgt fágica

Se seleccionó una clona para verificar la expresión de la proteína putativa Tgt fágica. Se inocularon 25mL de LB con gentamicina [15 $\mu$ g/mL] con 250 $\mu$ L de un cultivo overnight de la correspondiente clona. Como controles se prepararon las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  sin el vector pHERD30 y con el vector vacío. Los cultivos se hicieron creces hasta una densidad óptica de 0.33 a 600nm y se les adicionó Arabinosa (1%). Se tomaron muestras a los 0, 60 y 120 minutos después de la adición de la Arabinosa ajustando la densidad óptica a 1. Posteriormente las alícuotas obtenidas fueron centrifugadas a 15700g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, dejando la pastilla lo más secas posible y conservando a -20°C.

Las pastillas celulares obtenidas fueron resuspendidas en 100 $\mu$ L de buffer de lisis (ver Anexo), se incubaron a 95°C por 5 minutos y fueron centrifugadas a 14,170g por 10 minutos.

## 6.16 Gel de acrilamida-urea desnaturalizante para proteínas.

Se colocaron vidrios para hacer geles (Mini-Protean ® Short Plates de Bio-rad) de 1.0 mm de grosor y se colocaron en un marco (Mini-Protean® Casting Frame de Bio-rad) sobre una goma (Mini-Protean ® Casting Stand Gasket de Bio-rad) en el soporte para colocar los vidrios (Mini-Protean ® Casting Stand de Bio-rad). Se verificó que no hubiera fuga de líquido y se preparó la mezcla del gel separador en un matraz Erlenmeyer de 20mL. Los reactivos se fueron añadiendo y mezclando en el orden en que aparecen a continuación:

Reactivo	Concentración	Cantidad
Stock de solución de acrilamida	19:1	3.3ml
Buffer Tris:HCl pH 8.8	4 X	2.5ml
Urea		4.8grs
Agua		0.6ml
SDS	10%	100µl
Persulfato de amonio	10%	50µl
TEMED		5µl

Al adicionar el TEMED comienza la polimerización así que enseguida se mezcló todo y se vació con una pipeta de 10 ml en el interior de los vidrios. Rápidamente, pero de manera suave se agregaron 3 ml de isopropanol y se dejó solidificar por 30 min. Luego se retiró el isopropanol y se quitó el exceso en los vidrios con un papel filtro. Se preparó la mezcla para el gel concentrador y se vertió hasta el borde. Inmediatamente se colocó el peine con cuidado de no formar burbujas.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Stock de solución de acrilamida	30:1	0.67ml
Buffer Tris:HCl pH 8.8	4 X	1.0ml
Urea		1.9grs
Agua		0.93ml
SDS	10%	40µl
Persulfato de amonio	10%	30µl
TEMED		5µl

Se dejó polimerizando durante 30 min y luego se retiró el peine. Se hizo otro gel de la misma forma. Ambos fueron colocados en una cámara de electroforesis para proteínas Mini-PROTEAN® Tetra HandcastSystems de Bio-rad. Se vació el buffer TANK en medio de los dos geles hasta que los cubrió. Se verificó que no hubiera fugas y se vació el buffer TANK en el espacio entre la cámara y los geles.

El gel fue cargado con 8  $\mu$ L del sobrenadante obtenido de la lisis de las pastillas, se corrió electroforéticamente a 70 volts hasta que el frente de corrida llegó al límite inferior del gel. Una vez terminado el corrimiento el gel es extraído de los vidrios cuidando de no romperlo.

### **6.17 Tinción con azul de Coomassie.**

Una vez que terminó la electroforesis, un gel fue teñido con azul de Coomassie 15 minutos en agitación. Para visualizar las bandas de proteínas fue necesario desteñir el exceso del colorante azul de Coomassie con la solución para desteñir realizando tantos cambios de la solución como fueran necesarios, hasta que el gel quedó lo más transparente posible. Se cambió la solución de desteñir por agua destilada para permitir la rehidratar del gel a temperatura ambiente.

### **6.18 Electroporación en *Pseudomonas aeruginosa*.**

Se descongelaron, en hielo, 90  $\mu$ L de células electrocompetentes y mezclaron con 250ng de plásmido. Se transferieron a una celda de 1 mm de Bio-rad y se dejaron incubando en hielo durante 10 min. En el electroporador Gene Pulser TM de Biorad se aplicó un pulso a 2.2kV, 25 $\mu$ F y 200 $\Omega$ . Se esperó hasta que marque la eficiencia de transformación que fue marcada por un sonido, dejando de aplicar el pulso. Se realizaron diluciones de las células electroporadas 1 a 10, 1 a 100 y 1 a 1000 y fueron plaqueadas en cajas con medio Lb con el correspondiente antibiótico.

### **6.19 Extracción de RNA total.**

Se obtiene un cultivo fresco en medio Luria Bertani de *Pseudomonas aeruginosa* el cual es enfriando en hielo una vez alcanzada la densidad óptica de 0.4 a 1.1 medida a 600 nanómetros de longitud de onda. Posteriormente, centrifugar el cultivo a 5412g a

una temperatura de 4°C por 10 minutos mediante el equipo Eppendorf Centrifuge 5415C. Una vez centrifugado se desecha el sobrenadante en un Eppendorf de 50ml para posteriormente esterilizarlo y proseguir con su proceso de eliminación de desechos.

La pastilla que queda en el fondo del tubo es resuspendida en 1ml de Acetato de Sodio (NaOAc) 0.3 Molar pH 5.0 frío y se pasa a un tubo Eppendorf de 1.5ml centrifugar a 15000g por 10 minutos y desechar el sobrenadante. Resuspender la pastilla obtenida en 300 µL de NaOAc 0.3M a pH 5 frío y agregar 300 µL de fenol ácido. En hielo se somete a sonicación a una amplitud de 9 micrones por 30 segundos dejando un intervalo de descanso de 1 minuto para una segunda sonicación por 30 segundos mediante el equipo Soniprep 150. Centrifugar el producto a 15700g por 15 minutos a 4°C. Se formarán dos fases una superior que consiste en la solución de NaOAc más el RNA total y la fase inferior que contiene DNA y el resto de constituyentes de la bacteria pasar la fase superior a un tubo cónico Eppendorf nuevo de 1.5mL sin tomar parte de la fase inferior o grumos de la interfase.

Al producto obtenido agregar un volumen equivalente de fenol ácido y aplicar vortex a máxima velocidad por 1 minuto, descansar el ARN en hielo por un minuto y centrifugar a 15700g por 14 minutos a 4°C. Pasar la fase superior a un tubo nuevo y agregar tres volúmenes equivalentes de etanol al 100% frío a -20°C. Dejar a -20°C por una hora mínimamente. Centrifugar a 15700g por 15 minutos a 4°C y decantar el sobrenadante, secar la pastilla formada mediante aspiración del residuo mediante el uso de una punta amarilla acoplada a una punta azul conectada un matraz kitazato con aplicación de vacío.

Una vez seca la pastilla de RNA resuspender en 60 µL de NaOAc 0.3M pH 5 a 4°C y agregar 60 µL de Etanol a -20°C para dejar a -20°C por una hora. Centrifugar a 15700g por 15 minutos a 4°C decantar y secar por aspirado el residuo. Resuspender en 5 µL de NaOAc 10milimolar pH 5 a 4°C y guardar a -20°C. Los tRNAs extraídos se cuantifican preparando una alícuota, con 1µL de tRNAs extraídos y 9 de agua inyectable, de la cual se tomarán 1.5 µL para leer su absorbancia mediante el equipo NanoDrop 2000 y así conocer la concentración de los tRNAs extraídos.

## 6.20 Deacilación de los tRNAs

A 2.5  $\mu\text{L}$  de RNA totales extraídos se les añaden 20  $\mu\text{L}$  de Tris 1Molar pH 9.0 y se incuban a 37°C por una hora. Una vez pasada la hora, se añaden 10  $\mu\text{L}$  de NaOAc 3M pH 5.0 y se añaden a 100 $\mu\text{L}$  con agua destilada estéril. Añadir 300  $\mu\text{L}$  de Etanol al 100% a -20°C y refrigerar a -20°C por una hora. Centrifugar a 15700G por 15 minutos a 4°C, se decanta el sobrenadante y se seca la pastilla por aspirado. La pastilla que queda es resuspendida en 2.5  $\mu\text{L}$  de NaOAc 10milimolar pH 5.0 a 4°C y se guarda a -20°C.

Los tRNAs deacilados se cuantifican preparando una alícuota, con 1  $\mu\text{L}$  de tRNAs deacilados y 9 de agua inyectable, de la cual se tomarán 1.5  $\mu\text{L}$  para leer su absorbancia mediante el equipo NanoDrop 2000 y así conocer la concentración de los tRNAs deacilados.

## 6.21 Marcaje de sonda Radioactiva

El marcaje se efectúa siguiendo las condiciones mostradas en la tabla colocándose en un tubo cónico Eppendorf de 1.5ml en hielo manejando el  $^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP detrás de lucita y en una campana de seguridad colocándolo al final en la reacción e incubando a 37°C por 1 hora y media.

Reactivo	Concentración	Volumen de reacción ( $\mu\text{L}$ )
Oligo	4pmol	1
Buffer de PNK	10X	2
Enzima PNK		1
$^{32}\text{P}$ - $\gamma$ ATP		2.5
H <sub>2</sub> O		13.5
Total		20

La reacción se detiene agregando 70 $\mu\text{L}$  de agua, 10 $\mu\text{L}$  de NaOAc pH5 3M, 2 $\mu\text{L}$  de glicógeno al 20% y 3 volúmenes de etanol al 100% frio mezclando y dejando a -20°C por al menos hora y media. Una vez pasado el tiempo se centrifuga a 15700G en un centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415C por 20minutos y se decanta el sobrenadante en

el contenedor de radioactividad con la posibilidad de conservar la pastilla en condiciones de uso de 2 a 3 días. La pastilla se resuspende en 100  $\mu$ L de agua.

## 6.22 Northenblot

Los tRNAs extraídos acilados y deacilados fueron corridos en un gel ácido de acrilamida al 13% (ver anexo) a 45mA por 24hrs en buffer de Acetato de Sodio 0.1M a 4°C una vez que el primer marcador del buffer de carga salió del gel y el segundo alcanzó un rf de 11cm se detuvo el corrimiento. El buffer es extraído de la cámara de electroforesis vertical de Bethesda Research Laboratories Model V16 y se transfieren los tRNAs a una membrana de nylon por electroblotting formando un “sándwich” que consiste en dos papeles filtro del tamaño del gel a transferir, el gel, una membrana de nylon y dos papeles filtro del mismo tamaño que los anteriores, el sándwich es mojado en buffer TAE 1X quitándole las burbujas con el uso de una varilla de vidrio. El sándwich es colocado en la cámara semi-seca agregándole un poco de solución de TAE 1X cuidando de que no queden burbujas, quitándolas mediante una varilla de vidrio, se transfiere a 360mA por 1hora. Una vez transferido la membrana se deja secar a temperatura ambiente y una vez seca se fija exponiéndola a luz ultravioleta en el equipo UVC 500 UV Crosslinker por 5 minutos pudiéndose conservar durante meses antes de ser revelada por marca radioactiva. Antes de revelar la membrana mediante marca radioactiva se bloquea mediante esperma de salmón utilizando una mezcla de prehibridación siguiendo las condiciones mostradas en la tabla, para preparar la solución de esperma de salmón de la mezcla de prehibridación en un tubo cónico Eppendorf de 1.5ml se colocan 3  $\mu$ L de stock de esperma de salmón y se disuelven en 97 $\mu$ L de agua inyectable incubándolo a 100°C por 5 minutos.

Tabla 19. Solución de prehibridación		
Reactivo	Concentración	Volumen de reacción
SET	16X	3.75mL
Denhardt	100X	150 $\mu$ L
SDS	10%	150 $\mu$ L
Esperma de Salmon	3:100	100 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O		Aforar a 15mL
Total		15

En un tubo de hibridación se coloca la membrana que contenga los tRNAs fijados y se agrega la solución de prehibridación colocando el tubo en el horno de incubación Hibridization Incubation Model 400 de Robbins Scientific a 42°C a 10rpm por al menos 5 horas. Una vez haya transcurrido el tiempo se añade la sonda marcada radioactivamente y se incuba a 42°C a 10rpm por al menos 5 horas. En cuanto hayan pasado las 5 horas se recupera la solución del tubo de hibridación en un tubo Eppendorf de 15mL y se almacena detrás de un cuadro de Lucita a temperatura ambiente con posibilidad de reutilizar la sonda en otro sondeo hasta una semana después.

Se agrega 20mL de solución de lavado, que se prepara según las condiciones mostradas en la tabla 23, al tubo de hibridación y se coloca en el horno de incubación Hibridization Incubation Model 400 de Robbins Scientific a 42°C a 10rpm por al menos 5 horas y se desecha la solución de lavado en el contenedor de desechos radioactivos repitiendo el lavado 3 veces.

Tabla 20. Solución de lavado de marcaje radioactivo		
Reactivo	Concentración	Volumen (mL)
SET	16X	18.75
SDS	10%	1
Agua		Aforar a 100

### 6.23 Autoradiografía

La membrana marcada radioactivamente es colocada en un polipapel detrás de lucita en el área de manejo de radioactividad y fijada mediante cinta adhesiva en un cassette que pueda contener radioactividad y se miden las cuentas por minuto que irradia la membrana mediante el equipo contamination meter model TBM-3S y si la membrana irradia 2000 o más cuentas por minuto es viable para autorradiografiarla. En oscuridad se cortan cuadros de placas para radiografías Kodak y se colocan sobre la membrana fijándolas con cinta adhesiva con la opción de revelar varias placas superponiendo placas, se cierra el cassette y se guarda a -20°C por 15 minutos para revelar una placa. Una vez transcurrido el tiempo el cassette es incubado a 37°C para atemperar la placa y evitar que se condense agua en la misma. En oscuridad se retira la placa y se coloca sobre la solución reveladora por 90 segundos agitando suavemente y se lava al chorro

de agua, la placa se coloca en solución fijadora por 90 segundos agitando suavemente y se lava al chorro de agua.

#### **6.24 Uso del Typhoon**

El equipo Typhoon fue utilizado para obtener las imágenes de la membrana del corrimiento de tRNAs sondeada con la sonda dirigida contra el tRNA de glutamina. La membrana marcada radioactivamente es transportada dentro de polipapel en un cassette Amersharp al cuarto del equipo Typhoon. Primero se limpia la pantalla Kodac mediante un transiluminador de luz blanca durante 10 minutos. En dicho tiempo se enciende el equipo y se espera a que esté listo para su uso. Posteriormente se coloca la pantalla sobre la membrana cuidando de conocer la orientación de los RNAs en la misma y una vez colocada no manipularla demasiado, se cierra el cassette y se deja exponiendo de 10 minutos a una hora dependiendo de las cuentas por minuto que irradie la membrana, una vez transcurrido el tiempo deseado se coloca la pantalla en el equipo y se captura la imagen seleccionando el tipo de fluroforo y la sensibilidad del mismo tomando mediciones que van desde los 5 micrones, tardando más tiempo en este caso. Una vez terminada la lectura la pantalla se limpia de la misma manera que al inicio del procedimiento y se guarda en su respectivo estuche.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis *in silico* de la proteína putativa Tgt

#### 7.1.1 Identificación por BLAST

Mediante búsquedas tipo BLAST empleando la secuencia de la proteína putativa Tgt del fago lítico de *Pseudomonas aeruginosa* PaMx25, se encontró similitud significativa con proteínas identificadas como tRNA guanina-transglicosilasas. Encontrándose el gen codificante para esta proteína en 18 fagos con genomas reportados y la presencia de genes involucrados con la ruta metabólica para obtener preQ<sub>0</sub> en 22 fagos [Tabla 21].

#### 7.1.2 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt del fago PaMx25.

Al obtener modelos tridimensionales, generados I-Tasser, de la estructura de la proteína Tgt del fago PaMx25 se compararon con el modelo tridimensional del cristal de la proteína Tgt de *Pyrococcus horikoshii* (PDB Acc. No. 1IT7) y la estructura generada por I-Tasser de la proteína Tgt de *Pseudomonas aeruginosa*, dado que no se ha llegado a obtener un cristal de la misma. Se encontró gran similitud estructural al sobreponer los modelos tridimensionales con un valor de root mean square deviation (RMSD) de 2.728 comparando la proteína fagica con Tgt de *Escherichia coli* y un RMSD de 3.496 comparando con *Pseudomonas aeruginosa* [Figuras 5 y 6]. Al compararse los sitios catalíticos de la proteína Tgt de *Pyrococcus horikoshii* con respecto a la proteína Tgt del fago PaMx25 se encontró conservación de los residuos aminoacídicos en las posiciones del núcleo catalítico [Figuras 12 y 13] [Tabla 22].



Figura 13. Comparación de las proteínas Tgt de los organismos *P. aeruginosa*, PaMx25 y *Pyrococcus horikoshii*, en A) se muestra la comparación de los modelos generados por

I-TASSER de las proteínas Tgt de *P. aeruginosa* (morado) contra PaMx25 (Verde) y en B) se muestra la comparación del modelo de Tgt de PaMx25 (Verde) contra la estructura cristalina de la proteína Tgt de *Pyrococcus horikoshii* (Gris) (PDB Acc. No. 1IT7)

### 7.1.3 Identificación de los aminoácidos presentes en el sitio catalítico.

Dado que el modelo de la proteína Tgt de PaMx25 tiene un mayor parecido a la proteína Tgt del arqueobacteria *Pyrococcus horikoshii* y esta presenta un cristal al que se ha determinado su estructura tridimensional se llevaron a cabo las comparaciones de posición de aminoácidos del sitio catalítico con respecto a la misma. Los aminoácidos que de la proteína fagica que se encuentran en las mismas posiciones que los de la proteína arqueobacteriana, colocando primero los arqueobacterianos, son: Aspartato 95 – Aspartato 64, Aspartato 130 -Aspartato 97, Glutamina 190 – Glutamina 149, Glicina 195 - Glicina 154, Valina 198 - Valina 157, Prolina 199 - Prolina 158, Glutamina190 – Glutamina 149, Aspartato 249 – Aspartato 207.

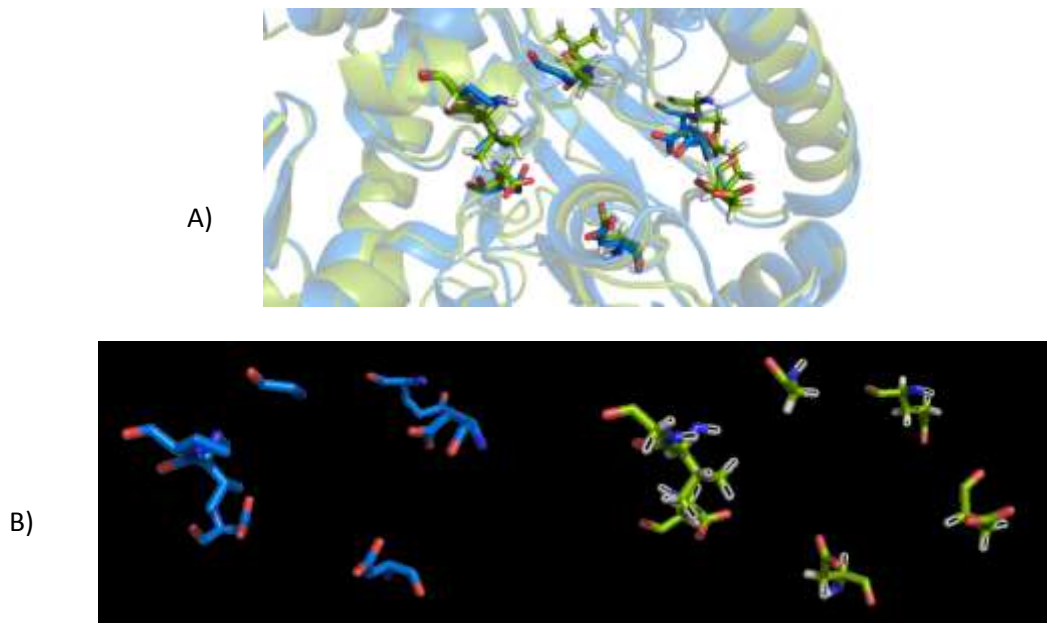


Figura 14. Comparación entre los aminoácidos presentes en el sitio catalítico de Tgt de *Pyrococcus horikoshii* y PaMx25. En A) se muestra el sobrelapamiento de ambas proteínas Tgt en el sitio catalítico. En B) se muestran los aminoácidos del sitio catalítico de *Pyrococcus horikoshii*. En C) se muestran los aminoácidos el sitio catalítico de PaMx25.

Tabla 21. Comparación de la presencia de los genes de biosíntesis de PreQ<sub>0</sub> en diferentes genomas fágicos

	Fago	Gen					Posición Genómica	E-value Tgt
		<i>queC</i>	<i>queD</i>	<i>queE</i>	<i>tgt</i>	<i>foIE</i>		
<b><i>Pseudomonas</i></b>	PaMx25	+	+	+	+	+	23486-28361	
	Qyrzula	+	+	+	+	+	789-4336	6X10 <sup>-24</sup>
	Rosebush	+	+	+	+	+	789-4363	6X10 <sup>-24</sup>
	Arbiter	+	+	+	+	+	789-4336	6X10 <sup>-24</sup>
<b><i>Mycobacterium</i></b>	Hedgerow	+	+	+	+	+	789-4345	6X10 <sup>-24</sup>
	Ares	+	+	+	+	+	789-4246	6X10 <sup>-24</sup>
	TA17A	+	+	+	+	+	789-4246	6X10 <sup>-24</sup>
	LizLemon	+	+	+	+	+	789-4363	6X10 <sup>-24</sup>
<b><i>Bacillus</i></b>	BCD7	+	+	+	+	+	10327-15799	0.19
	9g	+	+	+	+	+	3007-8212	8X10 <sup>-161</sup>
<b><i>Enterobacteria</i></b>	Seurat	+	+	+	+	+	25609-31191	1X10 <sup>-170</sup>
<b><i>Burkholderia</i></b>	BcepGomr	+	+	+	+	+	28012-32260	2X10 <sup>-105</sup>
	RHEph04	+	+	+	+	+	34339-38383	2X10 <sup>-89</sup>
<b><i>Rizhobium</i></b>	RHEph05	+	+	+	+	+	32016-36060	2X10 <sup>-89</sup>
	RHEph06	+	+	+	+	+	34832-38876	2X10 <sup>-89</sup>
<b><i>Celullophaga</i></b>	phi38:2	+	+	+	+	+	38309-44048	2.3
	phi3:1	+	+	+	+	+	38293-43894	2.3
	phi47	+	+	+	+	+	38311-44051	2.3
	phi3ST:2	+		+	+	+	38311-44050	2.3
<b><i>Streptococcus</i></b>	Dp-1	+	+	+	+	+	131-4728	1X10 <sup>-21</sup>
	Phi-pp2	+				+	71268-75763	
<b><i>Vibrio</i></b>	VpKK5	+	+	+		+	18693-21943	

Tabla 21. Comparación de la presencia de los genes de biosíntesis de queuosina en diferentes genomas fágicos (Sabri et. al. 2011, Santamaria et. al. 2013, Sepulveda et. al. 2012, Pedulla 2003 et. al. 2003, Lin et. al. 2012, Lee et. al. 2012, Lal et. al. 2015, Kulikov et. al. 2014, Holmfeldt et. al. 2013, Hatfull et. al. 2012). El signo "+" significa la presencia del gen señalado. El valor de E-value marca la similitud entre las secuencias de las proteínas Tgt predichas de los fagos que la presentan contra la Tgt del fago PaMx25 denotando una mayor similitud cuanto más se acerque a cero.

## 7.2 Clonación de *tgt* del fago PaMx55

### 7.2.1 Amplificación del gen *tgt* del fago PaMx55.

Dadas las características del fago PaMx25 (Antecedentes página 14) y al desconocer si entre los fagos de la colección el fago PaMx25 era el único que presentaba el gen *tgt*, se llevaron a cabo ensayos de PCR sobre otros fagos mediante *primers* dirigidos contra la secuencia de *tgt* del fago PaMx25 [Figura 15] encontrándose que el fago PaMx55 amplificó el gen *tgt* [Figura 16]. El amplicon mostrado en el fago PaMx55 migra a la misma distancia que el fago PaMx25. Por lo que, se distingue la presencia del gen *tgt* en el fago PaMx55. Se muestran inespecificidades que sugieren falta de identidad entre las secuencias de los genomas de cada fago.

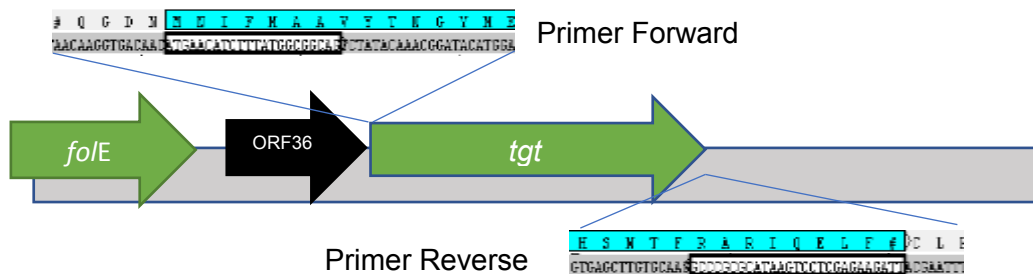


Figura 15, Mapa de la posición de los *primers* para amplificar *tgt* del fago PaMx25. Se muestra la secuencia de los *primers* que coincide con el genoma del fago PaMx25 sin incluir los sitios de restricción correspondientes para la posterior subclonación [Tabla 3]. Las flechas en verde corresponden a los genes codificantes con función encontrada en base a análisis bioinformáticos y la flecha en negro muestra un gen sin función reconocible.



Figura 16. Amplificación del gen *tgt* en los fagos PaMx25 y PaMx55. La abreviación MPM se refiere a marcador de peso molecular.

## 7.2.2 Clonación de *tgt* fágico putativo

Al no estar secuenciado el gen *tgt* putativo del fago virulento PaMx55 se amplificó de DNA fágico por PCR [Figura 16]. Para después clonarlo en el vector de tránsito pJET 1.2 [Figuras 17 y 18], corroborándose la presencia del gen en el vector mediante restricción enzimática [Figura 19]. Al momento de llevar a cabo la selección por PCR se espera obtener un amplicon de 1057pb dado que los *primers* que se utilizaron amplifican fuera del gen, el caso de *primer forward* 61pb y 57pb en el *reverse* [Figura 18]. Al llevar a cabo los análisis de restricción se encontraron a las construcciones C3 y C4 liberan los productos esperados de 939 pb, tras la doble restricción con NcoI y HindIII, además de presentar la liberación de dos fragmentos característicos de la secuencia del gen *tgt* fágico tras la digestión con XhoI por lo que cualquiera de las construcciones era viable para la secuenciación y subclonación en el vector pHERD30T [Figura 19]. Dado que la clonación en pJET1.2 no orienta al inserto, la construcción 3 (C3) posee el sitio de restricción HindIII cerca del sitio HindIII del plásmido pJET y se libera un fragmento de 253pb al restringir con HindIII, en cambio, la construcción 4 lo presenta en el otro extremo y libera un fragmento de 1192pb [Figura 19].

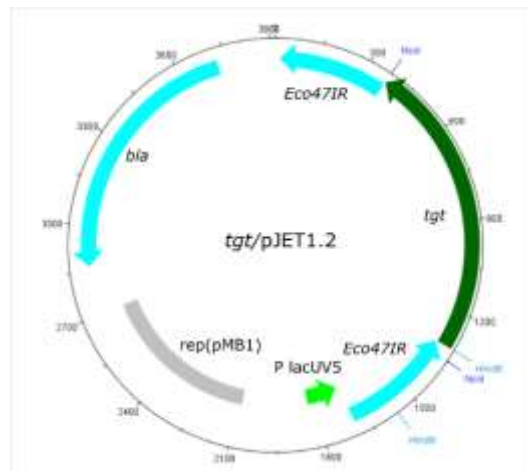


Figura 17. Mapa de la construcción *tgt/pJET1.2*. Los genes se muestran en flechas de colores mientras adyacentemente se muestran los nombres de las secuencias correspondientes. En verde se muestra el gen clonado mientras en azul se muestran los genes *bla*, que da resistencia a ampicilina y *eco417R* que es el gen letal. El promotor *lacUV5* se muestra mediante una flecha verde.

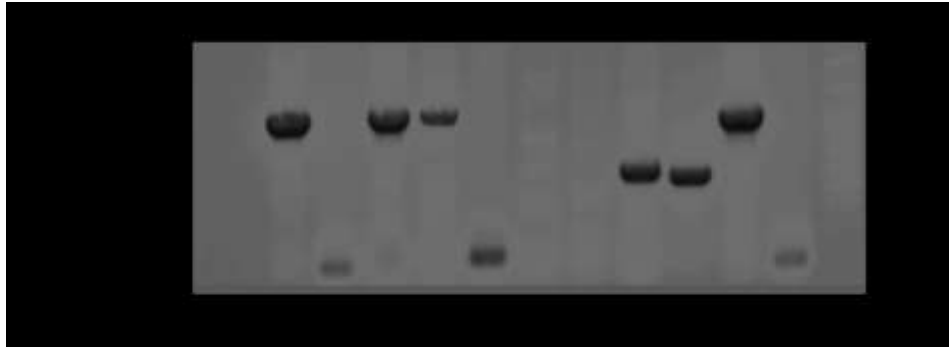


Figura 18. Selección de construcciones *tgt55*/pJET1.2. Las candidatas seleccionadas se muestran con abreviaciones de C1 a C11 correspondiendo al número de construcción.

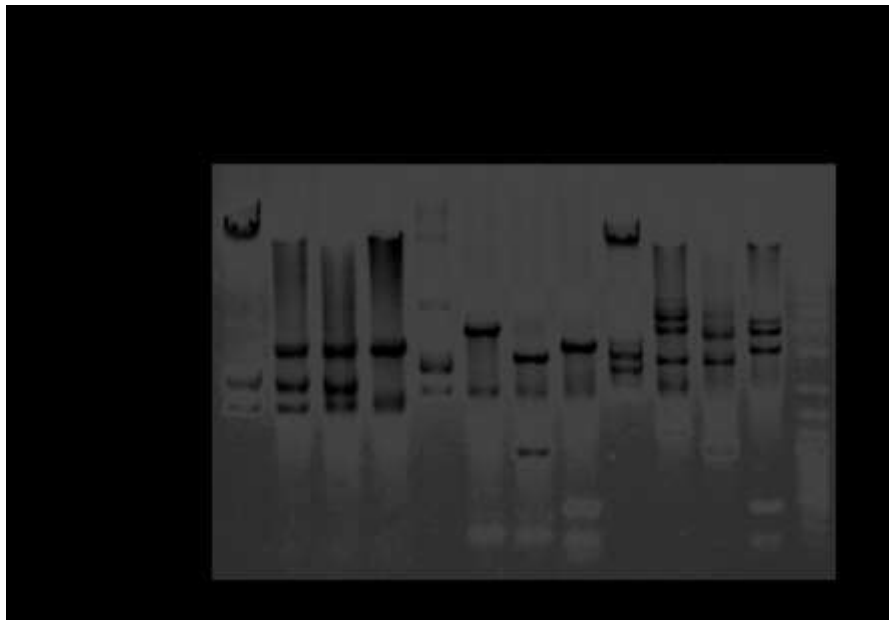


Figura 19. Análisis por restricción de las construcciones *tgt55*-pJET1.2. Se muestran las restricciones de las construcciones 1, 3 y 4.

### 7.2.3 Subclonación de *tgt* de PaMx55 en pHERD30T

Debido a cuestiones de tiempo, características de los análisis de restricción y disponibilidad de equipo de secuenciación. Se procedió directamente a la subclonación de *tgt* de PaMx55. Al subclonar en pHERD30T se seleccionó un grupo de colonias candidatas donde se lograron identificar cinco posibles construcciones por amplificación

del gen *tgt* mediante PCR [Figura 20]. Las construcciones 1, 3, 4, 7 y 8 fueron las más factibles dado que amplificaron un fragmento del tamaño esperado. En que en el caso de la construcción 6 muestra un amplicon del tamaño esperado, pero con un bandeo de menor intensidad que además presenta un par de inespecificidades. Dichas inespecificidades podrían deberse a la presencia de dos construcciones diferentes que podrían deberse a un inapropiado aislamiento de colonia. Posteriormente se analizaron por restricción enzimática [Figura 21]. Las construcciones 1, 3, 4 y 7 se encontró que al tras la doble digestión enzimática con las enzimas *NcoI* y *HindIII* se liberó un fragmento de alrededor de 939 pares de bases que es correspondiente al tamaño esperado [Figura 21].

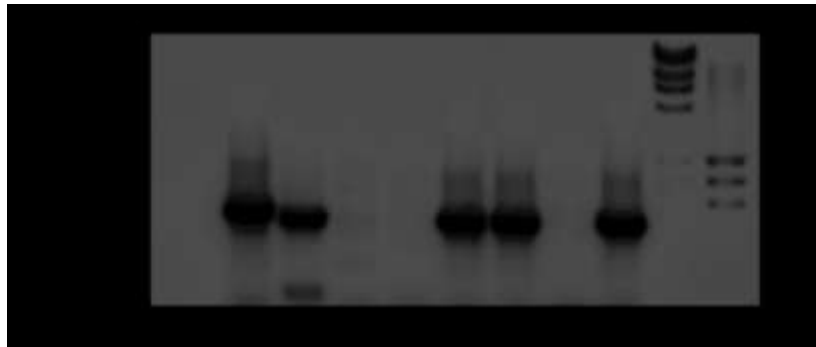


Figura 20. Selección de construcciones *tgt55/pHERD30T* por PCR. Las candidatas seleccionadas se muestran con abreviaciones de C1 a C8 correspondiendo al número de construcción.

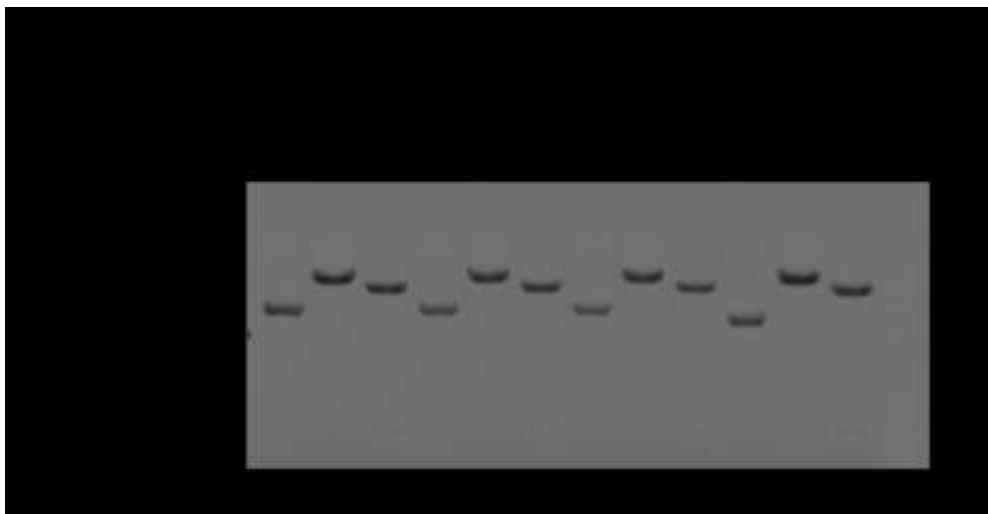


Figura 21. Análisis por restricción de las construcciones *tgt55/pHERD30T*.

### 7.2.3 Secuenciación de *tgt* de PaMx55 en pHERD30T

Se llevó a cabo la secuenciación de *tgt* de PaMx55 sobre la construcción 4 *tgt55/pHERD30T* del tercer grupo analizado. [Figuras 20-21]. Se encontró en el sitio de inicio de la traducción del plásmido pHERD30T una anomalía en la construcción ya que se añade una guanina posterior al sitio de restricción NcoI dado que el *primer forward* se diseñó con respecto a los datos en la tabla 3 por lo que este cambio modifica el marco de lectura y afecta la traducción de la proteína por lo que nombré dicha construcción como *tgt*-(ATGGG)/pHERD30T [Figura 21]. Esta construcción muestra el codón de paro dentro del marco de lectura esperado [Figura 23]. Se mantiene la fidelidad de la secuencia hasta parte del sitio HindIII donde faltaría una timina, aunque se muestra en el electroferograma un doble bandeado de color azul que podría ser debido a las timinas del sitio de restricción pese a que se muestra una banda intermedia de menor tamaño que muestra una citosina [Suppl. Fig. 2].

5'_TCGCTAACCAAACCGG										
TAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAACCAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAA										
AACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTG										
CACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTATTTATCCATAAGATTAGCGGATC										
CTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGG										
GCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA										
	Met	Gly	Glu	His	Leu	Tyr	Gly	Gly	Arg	Leu
CCC	ATG	GGT	GAA	CAT	CTT	TAT	GGC	GGC	CGT	TTA
TACGAACGGCTATATGGAAGGTCAGGCGCGCCACGCCAAGCTGACAGAGCAGC										
AGCAGAACATCTGCAAGAATCTTCCTCACATTC -3'										

Figura. 22. Secuenciación *forward* de la construcción *tgt55/pHERD30T*. Se muestra el sitio de restricción NcoI remarcado en verde [Suppl. Fig. 2]. Se marca en azul el *primer* y en amarillo otro sitio donde podría iniciar la traducción. Se colocan en cuadros tripletes de nucleótidos y los aminoácidos codificados en el sitio de inicio de la traducción.



5'_CACGATGGCACTTCCTATGAGCGTGTC										
GGAGAAGTCCCCCAGCAGGCACGACGCTGGACAGCACGTGACCACACTGACAC										
CGATTGAACAGGACTACGTTCTGCAGATGCTCGAGAAACACGGTTTCACACTTG										
AGCGCCTTTCCACCGTGTATGAATCACGCGCCGCTTACAACCTGTGGGCGTTTCG										
GTGTGATCAACACAATGATCAACGCTGCGCACTCGAACACATTT										
Arg	Ala	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Phe			
CGG	GCG	CGT	ATT	CAG	GAG	CTC	TTC	TAA	GCT	TAT
CTGCTGAAAACCTCGAGCCTCCGGAAGATCTGC – 3'										

Figura 23. Secuenciación *reverse* de la construcción *tgt55/pHERD30T*. Se remarca en azul la posición del primer que coincide en secuencia con el *primer reverse* diseñado en la tabla 3, en rojo el sitio donde se espera que termine la traducción y en gris el sitio de restricción HindIII [Suppl. Fig. 3]. Se colocan en cuadros triplete de nucleótidos y los aminoácidos codificados que se esperan al final de la traducción de la proteína Tgt.

### 7.3 Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de secuencias realizado identificó la similitud entre las secuencias de los genes *tgt* de los fagos PaMx25 y PaMx55 y elucidar si el modelo con el que se realizaron las predicciones, a partir del fago PaMx25, fue procedente para continuar el estudio.

Mediante el alineamiento múltiple de secuencias fue posible identificar la conservación de los residuos aminoacídicos de los sitios catalíticos y de unión a Zinc<sup>2+</sup> entre especies de fagos [Figura 24 y Tabla 22]. Se tomó como modelo comparativo la secuencia aminoacídica de la proteína Tgt de la cepa hospedadora de estos fagos, *Pseudomonas aeruginosa*, [Figura 24], que es homóloga a la presente en *Escherichia coli*.

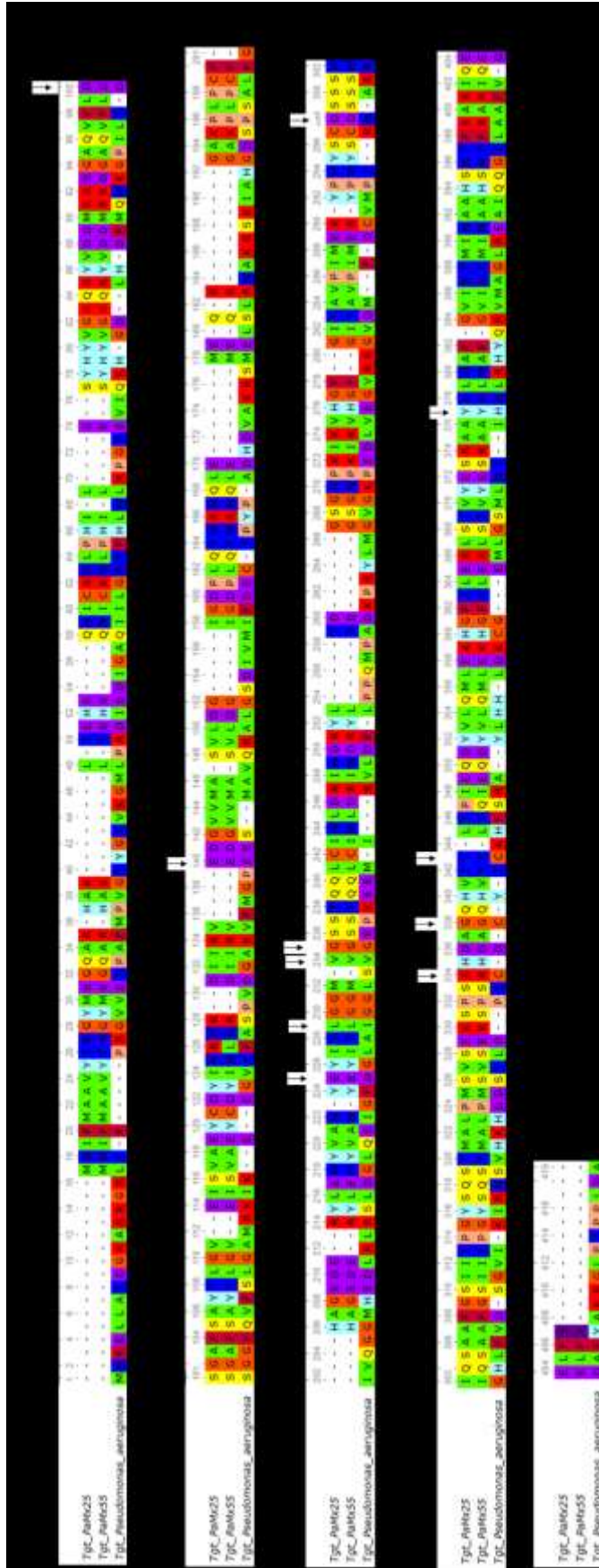
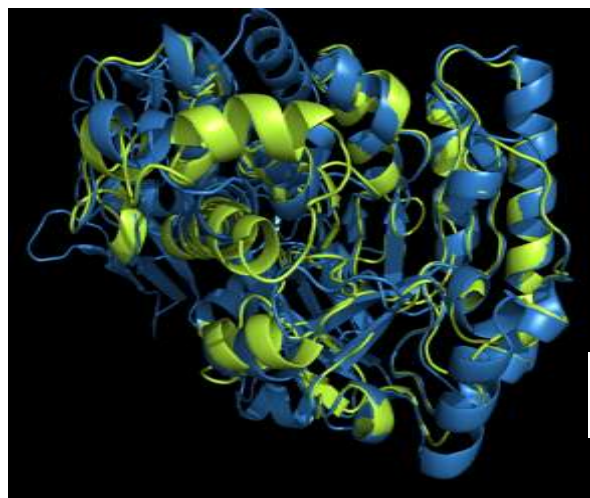


Figura 24. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de Tgt de los fagos de *P. aeruginosa* PaMx25 y PaMx55. En la parte superior se marcan los residuos importantes y posible función.

#### 7.4 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt del fago PaMx55.

Una vez secuenciado el gen *tgt* del fago PaMx55 se logró obtener un posible modelo de la estructura tridimensional de la proteína putativa Tgt del fago mediante el uso del servidor I-TASSER. La calidad del modelo es considerada tomando en cuenta el valor de la similitud entre las estructuras tridimensionales protéicas determinándose a partir del RMSD (media promedio de la distancia entre átomos) donde al encontrarse un valor más cercano a 1 se obtiene que su similitud es mayor.



RMSD. 2.728

Figura 25. Comparación de la estructura cristalina de las proteínas Tgt. Se muestra la proteína Tgt de *Pyrococcus horikoshii* (azul) y el modelo de Tgt de PaMx55 generado por I-TASSER (verde).

Un análisis a detalle comparando el sitio catalítico de la proteína Tgt del organismo *Pyrococcus horikoshii* permitió observar en la estructura obtenida los posibles aminoácidos involucrados en la actividad de la proteína a estudiar, previamente mencionados en el alineamiento múltiple [Figuras 24 y 26]. Dadas las similitudes estructurales de Tgt del fago con respecto a la Tgt arqueobacteriana se propone la posibilidad de que esta tome una conformación dimérica por la presencia de serinas en el sitio de unión a Zinc [Figura 26].

Al considerar las observaciones anteriores se propuso que la proteína era homóloga a la proteína Tgt bacteriana y por ende presentaría la actividad de tRNA guanosin-transglicosilasa.

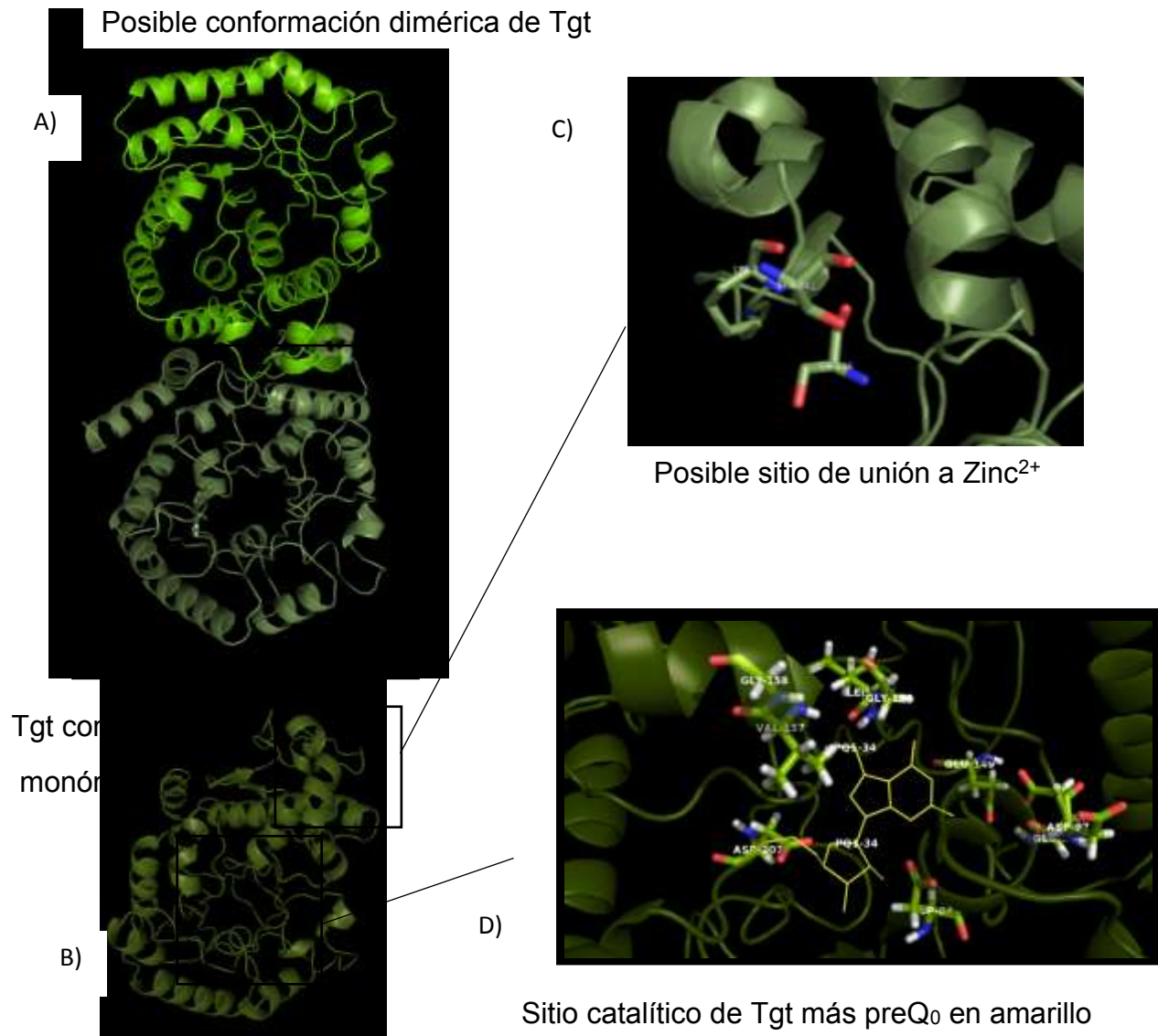


Figura 26. Modelo tridimensional de la proteína Tgt del fago PaMx55. En A) se muestra la configuración de Tgt como dímero. En B) se muestran la estructura como monómero, en C) un acercamiento a los residuos involucrados en: unión a Zinc<sup>2+</sup> (Ser236, Ser241 y Lys242) y en D) el sitio catalítico con interacción con preQ<sub>0</sub> (Asp64, Asp97, Glu149, Leu155, Val157, Gly158 y Asp207)

Tabla 22. Comparación de los aminoácidos del sitio catalítico.		
<b>Tgt <i>Pyrococcus horikoshii</i></b>	<b>Tgt PaMx55</b>	<b>Tgt PaMx25</b>
Ácido aspártico 95	Asp 64	Asp 64
Ácido aspártico 130	Asp 97	Asp 97
Glutamina 190	Glu 149	Glu 149
Glicina 195	Gly 158	Gly 158
Valina 198	Val 157	Val 157
Ácido aspártico 249	Asp 207	Asp 207

## 7.5 Clonación de *tgt* de PaMx25 en pJET 1.2

Debido a que no existe un anticuerpo que reconozca la proteína Tgt fágica y así discernir si la construcción *tgt55/pHERD30T* expresaba la proteína Tgt propia del fago. Se procedió a utilizar una construcción, que se obtuvo accidentalmente, donde se clonó la secuencia codificante para la proteína Tgt del fago PaMx25 en vez de la secuencia del gen *tgt* del fago PaMx55. Esta construcción, presenta una fusión con parte de la secuencia del fragmento alfa de la beta-galactosidasa que facilitará su detección por Western blot con el anticuerpo que reconozca dicho fragmento. El gen *tgt* se clonó en pJET1.2 [Figuras 27 y 28] mediante un amplicon de *tgt* de PaMx55 obtenido de un gel que presentaba como control el amplicon del fago PaMx25 aledaño el cual fue reamplificado por PCR para la clonación en pJET1.2 dadas las inespecificidades que presentaba [Figura 16].

La selección de colonias se llevó primero en grupos de cinco colonias candidatas y al amplificar en un grupo se analizaron individualmente. La selección de la construcción *tgt25-pJET1.2* se llevó a cabo por PCR los *primers* que se incluyen en el kit de reacción CloneJET PCR Cloning kit. Obteniéndose amplicones cercanos a 1222pb. Se seleccionó el grupo IV dadas las características del amplicon que presenta asimilándose al patrón que muestra el bandeo de la amplificación de *tgt* en PaMx55 [Figura 15]. En la selección de construcciones del grupo IV se encontró que en el carril correspondiente a la construcción 3 hay un triple bandeo que podría deberse a una mezcla de colonias en la reacción o a la presencia de diferentes plásmidos en la colonia seleccionada [Figura 27]. Se seleccionaron las candidatas 2 y 4 para llevar a cabo los análisis de restricción enzimática. Dado que la clonación en pJET1.2 no orienta al inserto la restricción con *HindIII* puede presentar bandeos dependientes de la orientación respecto al sitio *HindIII*. Al restringir la construcción 2 (C2) el sitio *HindIII* se encuentra cerca del sitio de restricción propio del plásmido liberando un fragmento de 253pb. En cambio, en la construcción 4(C4) lo presenta en el otro extremo liberando el gen más 253 pares de bases, por lo que, se genera un fragmento de 1192pb. Los productos de la doble restricción con *NcoI* y *HindIII* esperados son de 939pb, por lo que, cualquiera de las construcciones era viable para la secuenciación y subclonación en el vector pHERD30T [Figura 28].

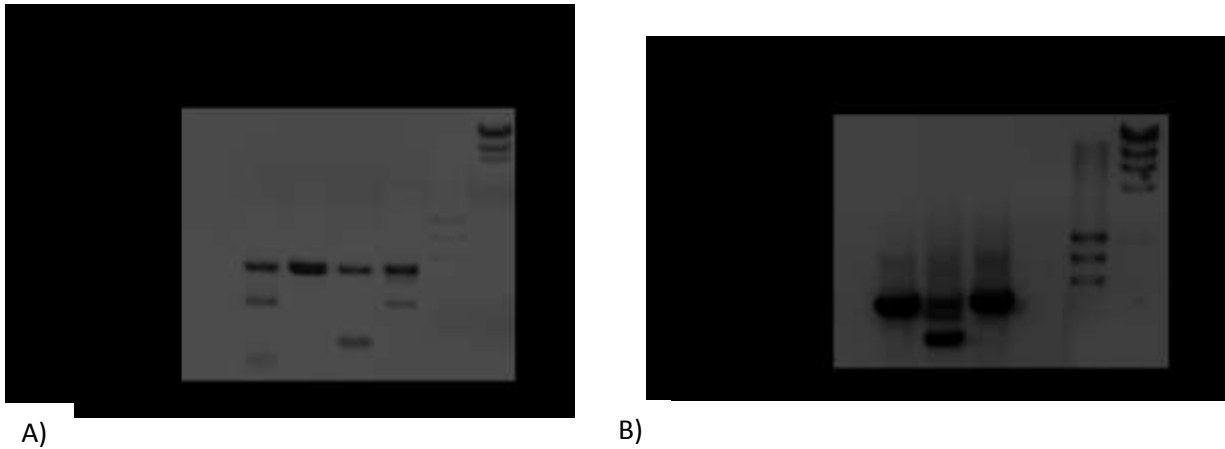


Figura 27. Selección de construcciones *tgt25/pJET1.2*. En A) se muestra la selección por grupos de candidatas y en B) se muestra la selección por construcciones.

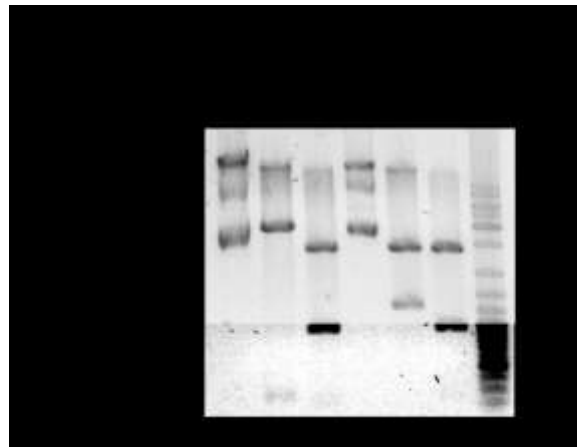


Figura 28. Análisis por restricción de las construcciones *tgt25-pJET1.2*.

### 7.5.1 Secuenciación *tgt25-pJET1.2*

Al llevar a cabo la secuenciación de la construcción *tgt25-pJET1.2* [Figuras 29-30] se tenía supuesto que se había clonado la secuencia de *tgt* de PaMx55 y al encontrarse idéntica a la del gen *tgt* del fago PaMx25 se supuso que ambos fagos presentaron la misma secuencia, aseveración que fue rechazada tras la secuenciación de la construcción *tgt55-pHERD30T* [Figuras 22-24].

5' _ GCGAATTTGTAGGAGACTTCTTGCAAG											
	Met	Val	Asn	Ile	Phe	Met	Ala	Ala	Val	Tyr	
C	CC	ATG	GTG	AAC	ATC	TTT	ATG	GCG	GCA	GTC	TAT
ACAAACGGATACATGGAAGGTCAGGCGCGCCATGCCAAGCTGACAGAGCACGA GCAGAACATCTGCAAGAATCTTCCTCACATTCTCGAGTCGTACCACTACGTCGGA AAGCAGCGTTATGTCGATGATATGCGGCGTGACGGTGCTCAAGTGTTCT - 3'											

Figura 29. Secuenciación *forward* de la construcción *tgt25*-pJET1.2. Se marca en verde el sitio de restricción NcoI que a su vez es el sitio de inicio de la traducción, en azul se marca la secuencia del primer forward que se usó para amplificar el gen *tgt* fagico [Fig. Supp. 3]. En cuadros se muestran tripletes de nucleótidos con los aminoácidos codificados que corresponden al inicio de la traducción.

5' _ CACGATGGCACTTCCTATGAGCGTGTC										
GGAGAAGTCCCCCAGCAGGCACGACGCTGGACAGCACGTGACCACACTGACAC CGATTGAACAGGACTACGTTCTGCAGATGCTCGAGAAACACGGTTTTCACACTTG AGCGCCTTTCCACCGTGTATGAATCACGCGCCGCTTACAACCTGTGGGCGTTTCG GTGTGATCAACACAATGATCAACGCTGCGCACTCGAACACATTT										
Arg	Ala	Arg	Ile	Gln	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Leu
CGG	GCG	CGT	ATT	CAG	GAG	CTC	TTT	GAA	AGC	TTA
TCTGCTGAAAACCTCGAGCCTCCGGAAGATCTGC – 3'										

Figura 30. Secuenciación *reverse* de la construcción *tgt55*/pJET1.2. Se remarca en azul la posición del primer que coincide en secuencia con el primer reverse diseñado en la [Tabla 15]. En cuadros se muestran tripletes de nucleótidos con los aminoácidos codificados correspondientes a extremo carboxilo de Tgt. En rojo se marca el codón de paro fuera del marco de lectura y en gris el sitio de restricción HindIII [Fig. Supp.4].

## 7.6 Subclonación de *tgt* del fago PaMx25 en pHERD30T

Una vez que se analizó la construcción *tgt25*-pJET1.2 por patrones de restricción se subclonó el gen *tgt* presente en dicha construcción en el vector pHERD30T [Figuras 31-32]. La presencia del inserto en las clonas fue verificada por restricción enzimática del

plásmido [Figura 32]. Observándose fragmentos del tamaño esperado correspondientes a las características del vector con el fragmento del gen clonado [Figura 31]. Con los datos de la secuenciación de la construcción *tgt25*-pJET 1.2 el resultado esperado sería una fusión de la proteína Tgt con el fragmento alfa de la beta galactosidasa [Figura 31] que se debe a un desfase del marco de lectura del codón de paro [Figura 30].

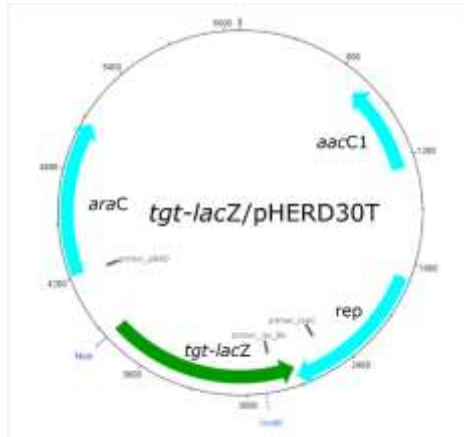


Figura 31. Mapa de la construcción *tgf-lacZ/pHERD30T*. Esta construcción consiste en la subclonación del gen *tgt* presente en la construcción *tgt25*-pJET1.2 en pHERD30T. En el mapa se muestra con flechas la codificación de los genes con sus respectivos nombres y en su dirección de traducción correspondiente. Se muestra la posición de los *primers* utilizados para secuenciar esta construcción mediante barras grises con su correspondiente etiqueta.

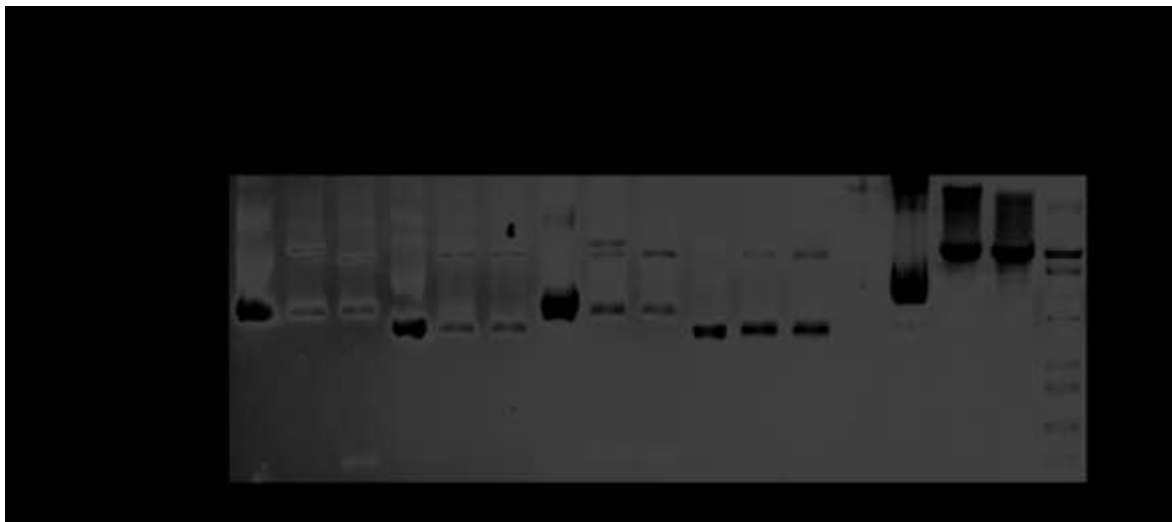


Figura 32. Análisis por restricción de las construcciones *tgf25*-pHERD30T. Los productos de la doble restricción con *NcoI* y *HindIII* esperados son de 939 pares de bases.



### 7.6.1 Secuenciación construcción *tgt-lacZ/pHERD30T*

Se secuenció la construcción 4 *tgt-lacZ/pHERD30T* [Figuras 33-34] la cual se esperaba que formase una proteína de fusión con el fragmento alfa de la beta galactosidasa. A comparación de la construcción *tgt55-pHERD30T* esta no presenta la inserción de una guanina posterior al codón de inicio por lo que el marco de lectura no es modificado y la secuencia clonada debería traducirse en una proteína del tamaño esperado [Figura 32]. Desafortunadamente en esta construcción el codón de paro se sale del marco de lectura por lo que al traducirse se forma una proteína de fusión con el fragmento alfa de la beta galactosidasa correspondiente al resto de nucleótidos dejados en la construcción a partir del sitio de restricción HindIII, por lo tanto, esta construcción la defino como *tgt-lacZ/pHERD30T*.

5'_CATTGCCGTCACCTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGG TAACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAA AACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTG CACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATC CTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGG GCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA										
	Met	Val	Asn	Ile	Phe	Met	Ala	Ala	Val	Tyr
CCC	ATG	GTG	AAC	ATC	TTT	ATG	GCG	GCA	GTC	TAT
ACAAACGGATACATGGAAGGTCAGGCGCGCCATGCCAAGCTGACAGAGCACGA GCAGAACATCTGCAAGAATCTTCTCACATTCTCGAGTCGTACCACTACGTCGGA AAGCAGCGTTATGTGCGATGATATGCGGCGTGACGGTGCTCAAGTGTTTCCT - 3'										

Figura 33. Secuenciación forward de la construcción *tgt-lacZ/pHERD30T*. Se muestra en verde la posición del sitio de restricción NcoI y en azul el *primer* utilizado para amplificar el gen *tgt*. En los cuadros solo se muestran tripletes de nucleótidos con los aminoácidos codificados correspondientes al inicio de la traducción de la proteína Tgt [Fig. Supp. 5].

5'_CACGATGGCACTTCCTATGAGCGTGTCCGGAGAAGTCCCCAGCAGGC ACGACGCTGGACAGCACGTGACCACACTGACACCGATTGAACAGGACTACGTTC TGCAGATGCTCGAGAAACACGGTTTCACACTTGAGCGCCTTTCCACCGTGTATG AATCACGCGCCGCTTACAACCTGTGGGCGTTCGGTGTGATCAACACAATGATCA ACGCTGCGCACTCGAACACATTTCTGGG <b>CGCGTATTCAGGAG</b>										
Leu	Phe	Glu	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
<b>CTC</b>	<b>TTT</b>	<b>GAA</b>	<b>AGC</b>	<b>TTG</b>	GCA	CTG	GCC	GTC	GTT	TTA
CAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCA CATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCC TTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAAA										
Gly	Arg	Pro	Gly	Arg	Gly	Gly	His	Gly	Leu	
GGC	AGG	CCG	GGC	CGT	GGT	GGC	CAC	GGC	CTC	<b>TAG</b>
GCCAGATCCAGCGGCATCTGGGTTAGTCGAGCGCGGGCCGCTTCCCATTCTC – 3'										

Figura 34. Secuenciación reverse de la construcción *tgt-lacZ/pHERD30T*. Se encuentra marcado en gris el sitio de restricción HindIII y en azul la secuencia del *primer* utilizado para amplificar *tgt*, en rojo se marca del codón de paro del fragmento alfa de la beta galactosidasa y el que presentaría Tgt. Se colocan en cuadros tripletes de nucleótidos con los respectivos aminoácidos codificados, correspondientes al sitio donde termina la proteína Tgt y comienza la fusión con el fragmento alfa de la beta galactosidasa. De igual manera, se muestran los últimos aminoácidos de la proteína formada [Fig. Supp.6].

### 7.6.2 Inferencia de la estructura tridimensional de la proteína Tgt-lacZ

La construcción *tgt-lacZ/pHERD30T* fue modelada tridimensionalmente mediante I-Tasser mostrando que la fusión con parte del fragmento alfa de la beta galactosidasa no entra dentro del sitio catalítico por lo que se puede suponer que no afecta su funcionalidad [Figura 35]. La proteína de fusión debería presentar un peso molecular esperado de 42,316Da.

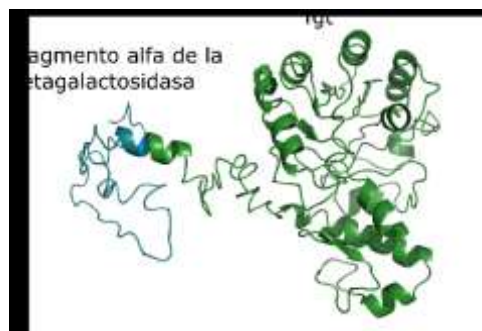
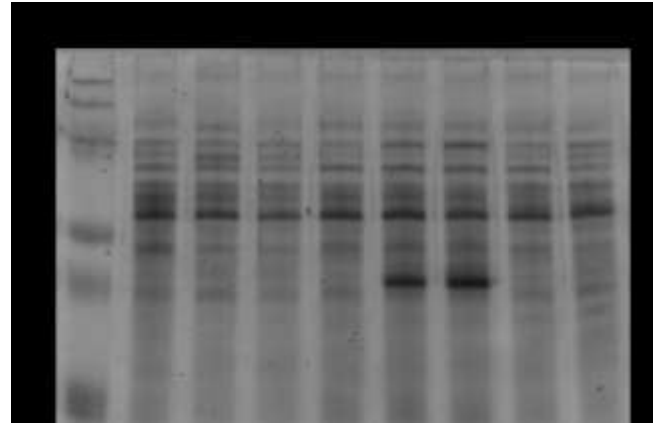
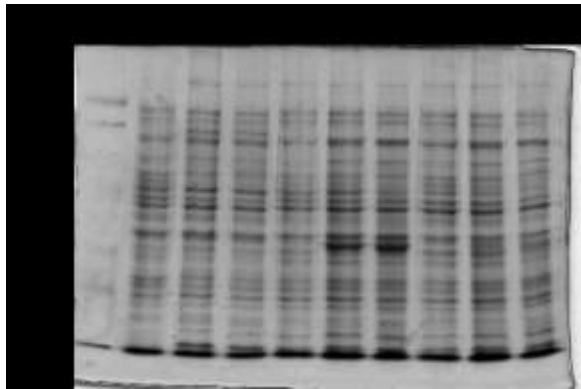


Figura 35. Modelo tridimensional de la proteína de fusión Tgt-LacZ $\alpha$ . El modelo de la proteína Tgt se muestra en color verde mientras en azul se marca el fragmento alfa de la beta galactosidasa.

### 7.7 Análisis de la expresión de la proteína Tgt putativa

Se analizó la expresión de la proteína de interés Tgt-lacZ mediante geles desnaturizantes de SDS y poliacrilamida-urea con extractos totales de proteínas provenientes de cultivos celulares de *Escherichia coli* con y sin inducción de las construcciones por arabinosa a diferentes tiempos de inducción [Figura 36]. Se muestra la banda de inducción en la construcción *tgt-lacZ*/pHERD30T a: una hora y 3 horas en ambos geles. En cambio, en el caso de la construcción *tgt*-(ATGGG)/pHERD30T, en ambos geles, no se muestra una banda de inducción cercana al tamaño esperado de la proteína ya que la proteína Tgt pesa 35,594 Da. Se esperaba que la construcción *tgt*-(ATGGG)/pHERD30T pudiese expresar a la proteína Tgt pese a la presencia de la guanina extra debido a la presencia de otro codón cercano ATG, posterior al que tiene la guanina extra, de donde podría comenzar la traducción correctamente [Figura 22]. Dado que no se induce una banda en la construcción *tgt*-(ATGGG)/pHERD30T se puede suponer que la inducción a la hora y 3 horas en la construcción *tgt-lacZ*/pHERD30T es debida al inserto del gen *tgt* fusionado al fragmento  $\alpha$  de *lacZ* que está generando la proteína de un tamaño visiblemente superior a 37kDa. en el segundo gel. En el primer gel se observa una diferencia en el patrón de corrimiento de la banda inducida con respecto al gel de urea que daría la sospecha de que la proteína no se estaba

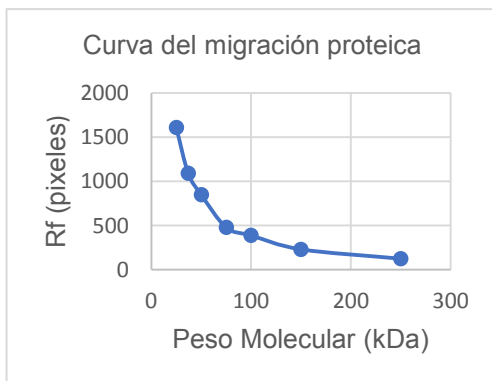
expresando correctamente o que presenta un postproceso que degradaría la proteína, pero bajo las condiciones de mayor desnaturalización en el corrimiento del gel de poliacrilamida SDS-urea 8M se observa un tamaño cercano al esperado [Figura 36]. Al aplicar la fórmula descrita en la linearización del corrimiento proteico sobre el logaritmo de 1004.03 pixeles y aplicarle el antilogaritmo al valor obtenido (3.0017) se obtiene el valor de 40,173 Da que es un valor cercano a los 42,316 Da de la proteína esperada [Figura 37].



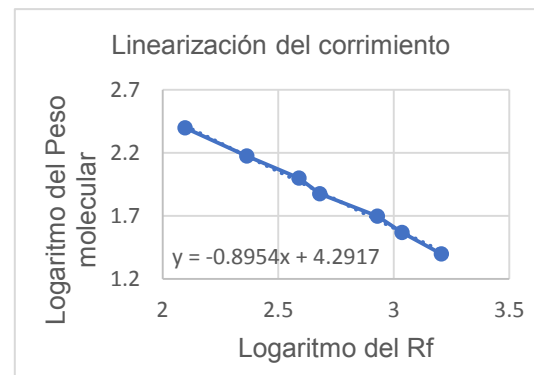
A)

B)

Figura 36. Ensayo de inducción de la expresión de proteína Tgt putativa. El A) se muestra un corrimiento solo condiciones desnaturalizantes con SDS al 10% en B) se muestra el corrimiento en condiciones desnaturalizantes con SDS al 10% más urea 8 molar.



A)



B)

Figura 37. Curva de migración proteica de marcadores de peso molecular. En A) se muestra la gráfica del corrimiento proteico en pixeles contra el peso molecular y en B) se muestra la linearización de la anterior graficando el peso molecular contra el Rf para obtener la ecuación de la recta que facilite la obtención del peso molecular.

## 7.8 Verificación de cepas deficientes del gen *tgt*

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 que presenta una inserción del transposón *IsLacZ/hah-tc* en el gen *tgt* con identificada como PW7450 fue solicitada al Manoil Lab. del Departamento de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington. El transposón presente interrumpe el gen *tgt* y confiere resistencia a tetraciclina. La cepa se cultivó en medio LB con tetraciclina a 60µg/mL y X-gal 40µg/mL. Posteriormente, se extrajo DNA de la cepa para realizar un ensayo de PCR y corroborar la correcta inserción del transposón. Se encontró que la cepa mutada genera un amplicón de 760 pares de bases que confirma la presencia de la inserción esperada en el gen *tgt*. En cambio, en el control con la cepa silvestre, no amplificó ya que no posee el transposon *IsLacZ/hah-tc* [Figuras 38 y 39].

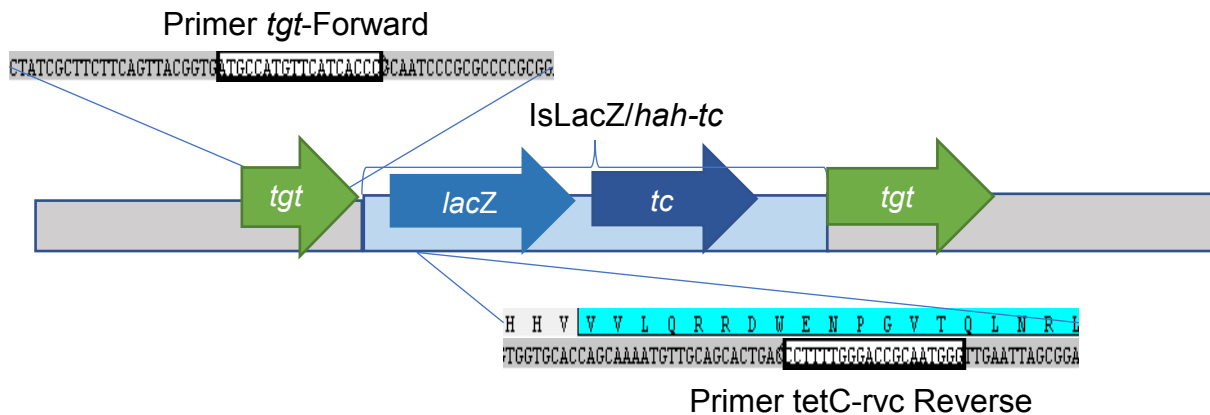


Figura 38. Mapa de la posición de los *primers* para comprobar la posición del transposón *IsLacZ/hah-tc*. La secuencia de los *primers* se muestra en cuadros blancos en dirección 5' - 3'. *lacZ* corresponde a la betagalactosidasa y *tc* al gen que codifica para la proteína que da resistencia a tetraciclina.

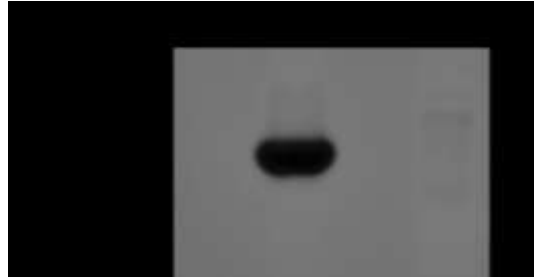


Figura 39. Amplificación por PCR del fragmento del gen *tgt* bacteriano al transposón *IsLacZ*. La muestra amplificada de cada carril se muestra en la parte superior y los números del lado derecho muestran el tamaño de fragmento del marcador de peso molecular.

### 7.8.1 Northern blot de los controles para analizar la función de Tgt

Para probar la predicción de la función de la proteína Tgt se analizaron los patrones de migración de los tRNAs de tirosina, que son queuosinilables, a partir de extractos de tRNAs de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Wt e *IsLacZ*∇*tgt* complementadas y sin complementar con el plásmido vacío pHERD30T [Figura 40] y los de glutamina que son no queuosinilables [Figura 41]. Se complementaron las cepas con el vector vacío pHERD30T para verificar que el plásmido, en el que se clonó *tgt*, no generará modificaciones en los patrones de migración que interfieran en los resultados. Se encontró que la migración de los tRNAs de las cepas complementadas y sin complementar migraban a la misma distancia verificando que el plásmido no interfiere en la modificación de los tRNAs.

En el sondeo de los tRNAs de tirosina se observa un patrón de corrimiento característico donde los tRNAs de las cepas silvestres migran menos que las que presentan el gen *tgt* interrumpido. Además, se observa una diferencia de migración entre los tRNAs que se encuentran acilados con respecto a los deacilados por lo que la diferencia en el patrón de migración no es debido a la acilación de los tRNAs. La diferencia en la migración entre los tRNAs de las bacterias silvestres y las que presentan el gen *tgt* interrumpido se conserva entre los tRNAs acilados y deacilados. Por lo que podemos asegurar que la diferencia en el corrimiento de los tRNAs entre las cepas silvestres y mutantes es debido a la interrupción del gen *tgt*.

Debido a las características de la proteína que codifica el gen *tgt* podemos asumir que la modificación de los tRNAs no se está llevando a cabo, por lo que, el proceso de queuosinilación de los tRNAs está interrumpido y podemos inferir que los tRNAs que migran menos están queuosinilados y los que migran más están no queuosinilados [Figura 40].

Al analizar los tRNAs de glutamina no se encontró el patrón de corrimiento observado en los tRNAs de tirosina. Se observa que los tRNAs de las cepas que presenta el gen *tgt* interrumpido migran al mismo Rf que las cepas silvestres. Se presenta una diferencia en la migración entre los tRNAs acilados con respecto a los deacilados. Pero, se mantiene el mismo patrón de migración entre cepas silvestres y mutantes en *tgt*, por lo que aseguramos que la interrupción del gen *tgt* no afecta la migración de los tRNAs de glutamina [Figura 41]. Dado que el tRNA de glutamina no es queuosinilable y no es afectado por la ausencia de *tgt* podemos inferir que la enzima Tgt es selectiva y tiene preferencia por el tRNA de tirosina sobre los tRNAs de glutamina, confirmando lo ya publicado. Ya que el tRNA de tirosina muestra un anticodon GUN podemos confiar en que lo publicado acerca de la selectividad de Tgt sobre los tRNAs GUN es reproducible en este ensayo.

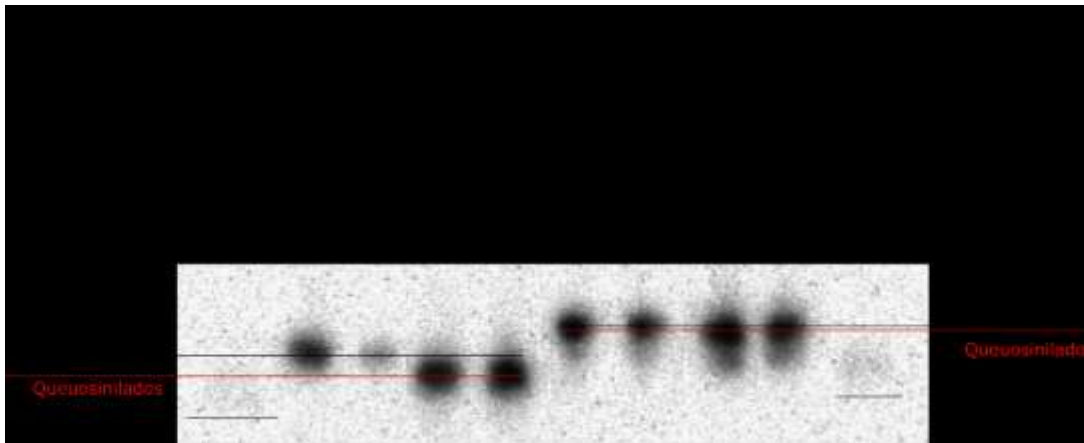


Figura 40. Análisis de la modificación de tRNAs de tirosina. El análisis se llevó a cabo mediante sondeo del tRNA de tirosina por Northern blot. En la parte superior de cada carril se nombran los tRNAs sondeados y se muestran con una línea negra que cruza con los puntos de los tRNAs de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 Wt los tRNAs Queuosinilados y una línea roja para mostrar los no Queuosinilados que cruza con los puntos de los tRNAs de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ LacZ $\Delta$ *tgt*.

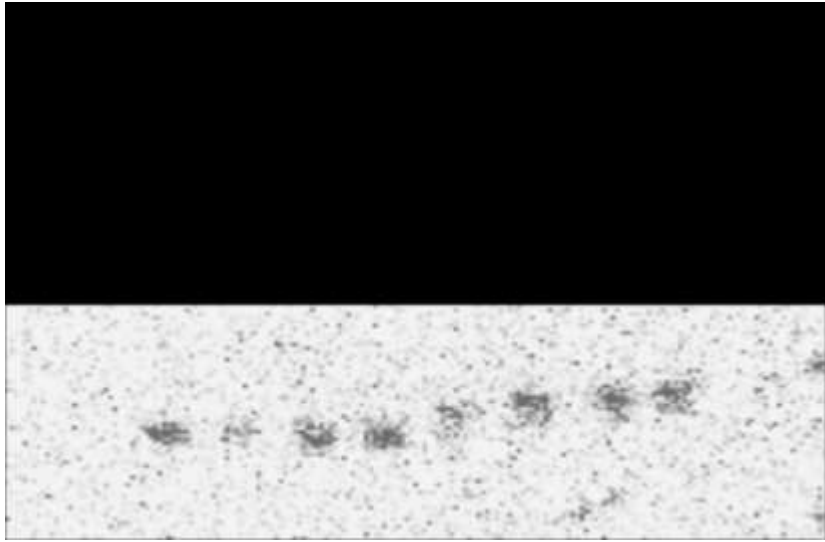


Figura 41. Análisis de tRNAs de glutamina. El análisis se llevó a cabo por Northern blot mediante sondeo de tRNAs de glutamina, que son no queuosinilables. En la parte superior de cada carril se nombra la procedencia de los tRNAs sondeados.



## 8 DISCUSIÓN

Diversos estudios genómicos nos han llevado a encontrar gran diversidad de información biológica novedosa incluyendo genes codificantes para enzimas relacionadas con el metabolismo celular, en una gran cantidad de genomas fágicos. Tal es el caso de la enzima Tgt la cual está presente en todos los órdenes de la vida y se conoce que está involucrada en el intercambio de bases en los tRNAs GUN.

Para desarrollar este trabajo nos basamos en los estudios del 2014 del fago 9g que infecta a *Escherichia coli* (Kulikov, *et al.*, 2014), en el cual, encontraron una secuencia codificante para una proteína putativa Tgt. Dicha proteína es similar a la codificada en un *cluster* de genes en el fago Dp-1 que infecta a *Streptococcus*. Teniendo desconocimiento hasta aquel momento de la naturaleza de la ventaja de presentar el conjunto de genes de la vía biosintética de queuosina, propusieron que estos pudiesen estar involucrados en la modificación del *pool* de tRNAs contenedores de queuosina en las células infectadas, regulando la producción de proteínas estructurales fágicas a nivel de traducción (Kulikov, *et al.*, 2014). Varios autores han reportado genes similares en diversos fagos como los que infectan a *Mycobacterium*: Qyrzula (Hatfull, *et al.*, 2006), Rosebush (Pedulla, 2003), Arbiter, Hedgerow, Ares TA17A, LizLemon (Hatfull, *et al.*, 2012), así como, los fagos que infectan a *Celulophaga*: phi38:2, phi3:1 y phi47 (Holmfeldt, *et al.*, 2013), al igual que, los fagos que infectan a *Ryzzobium*: RHEph04, RHEph05, RHEph06 (Santamaria, *et al.*, 2013). Comparamos la presencia de los genes relacionados con la biosíntesis de queuosina de estos casos [Tabla 21]. Dadas las similitudes que encontramos en el posicionamiento genómico [Tabla 21], los modelos tridimensionales [Figuras 13-14] y la falta de evidencia de una función diferente a la homóloga a Tgt bacteriana se propuso que la proteína putativa Tgt del fago PaMx55 tenía la misma función que la proteína Tgt de la bacteria hospedera.

Dado que el fago PaMx55 aún no está secuenciado, para amplificar el gen *tgt* del fago PaMx55 se utilizaron los *primers* dirigidos contra el gen *tgt* del PaMx25 [Tabla 3], que ya está secuenciado, mostrando varias inespecificidades que dificultaron el proceso de clonación [Figura 16]. Al reamplificar el amplicon de *tgt* de PaMX55 de alrededor de

1000 pares de bases se presentaba un amplicón inespecífico de alrededor de 500 pares de bases. Al obtener una construcción con el fragmento del tamaño deseado y el patrón de restricción adecuado [Figuras 18-19] se encontró una gran similitud con el gen del fago PaMx55, por lo que, probablemente las inespecificidades son debidas a los *primers*, que no son adecuados para amplificar el gen del fago PaMx55.

En la secuenciación de la construcción *tgt*-(ATGGG)/pHERD30T desconocemos como se llegó a agregar una guanina extra posterior al codón de inicio [Figura 22] ya que se usó el mismo *primer forward* en la clonación de *tgt* del fago PaMx25 [Tabla 3] y no se encontró dicha modificación en la construcción *tgt-lacZ*/pHERD30T [Figura 33] en lo único que se varió en el proceso experimental fue el lote de kit de clonación de pJET1.2 y la enzima ligasa utilizada. Aunque puede ser efecto de la reamplificación del gen.

Se analizó el gen *tgt* mediante análisis *in silico* obteniendo modelos tridimensionales y se encontraron dominios conservados entre los genes de los fagos de *Pseudomonas aeruginosa* PaMx25 y PaMx55 [Figuras 13-14 y 25-26], así como el fago 9g que infecta a *Escherichia coli*. Estos dominios correspondieron al sitio catalítico y al sitio de unión a Zinc<sup>2+</sup> que en el caso del fago 9g se mostró un cambio de residuos aminoacídicos de serina por glutamina con respecto a los fagos de *P. aeruginosa*.

Al realizar el ensayo de inducción de la proteína Tgt de la construcción *tgt-lacZ*/pHERD30T se encontró una diferencia en la migración entre las proteínas inducidas y corridas en el gel que solo tenía condiciones desnaturizantes con SDS al 10% y el que contenía urea 8M y SDS al 10% por lo que mayores condiciones desnaturizantes permiten observar un patrón de corrimiento más cercano al esperado, siendo un resultado que se ha visto en otros estudios (Buehl, *et. al.*, 2015).

Al realizar los sondeos de los tRNAs mediante la sonda dirigida contra el tRNA de glutamina no se encontró una diferencia en el patrón de migración entre todas las muestras examinadas [Figura 41] mostrando que la enzima Tgt bacteriana no afectaban dichos tRNAs por lo que se atribuye que para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 la modificación guarda la especificidad reportada en *Escherichia coli* por los tRNAs GUN, tanto en los tRNAs acilados como los deacilados.

Llevando a cabo el sondeo sobre uno de los tRNAs GUN (tRNA de tirosina) se encontró que el patrón de migración entre las cepas *P. aeruginosa* PAO1 Wt y PAO1  $\Delta$ IsLacZ $\nabla$ tgt diferían [Figura 40], comportándose tal como lo reportado en *Escherichia coli* (Gaur, R., y U. Varshney, 2005). Además de presentar un patrón similar tanto entre los tRNAs acilados así como los deacilados, mostrando una diferencia en el patrón de migración entre los tRNAs acilados y deacilados por lo que la diferencia en los patrones de migración no es debida a la acilación de los mismos.

Interesantemente se ha encontrado que el DNA del fago 9g es resistente a la restricción con la enzima HaeIII (GGCC) sugiriendo una alta modificación del DNA fágico (Kulikov 2014). Así mismo, la observación de presencia de resistencia a la restricción enzimática no es exclusiva del fago 9g, sino que también está presente en los fagos de *P. aeruginosa* como los fagos PaMx25 y PaMx55 de la colección (Sepulveda O., 2007). Estos fagos contienen en su secuencia genómica el *cluster* de genes que sugerían la modificación por queuosina y muestra una alta resistencia a la restricción de su DNA por enzimas como EcoRI (GAATTC) y HindIII (AAGCTT), siendo un criterio para secuenciar al fago PaMx25.

Sin embargo, el fago 9g de *Escherichia coli* presentaba bases modificadas en su DNA siendo una característica de los Miovirus con grandes genomas como el phiJL001 que contiene un gen para la proteína T6 Beta-glucosil-HMC-alfa-glucosil transferasa (PDB Acc. No. Q06718) que modifica DNA sin encontrarse un gen similar en el fago 9g o algún otro gen pudiese modificar DNA por lo que consideraron la posibilidad de que este *cluster* de genes estuviese involucrado en la modificación del DNA (Kulikov, *et al.*, 2014).

Posteriormente se descubrió que un *cluster* de genes que contiene parálogos de los genes de la tRNA guanosine transglicosilasa y los involucrados con la síntesis de preQ<sub>0</sub>, de alrededor de veinte mil pares de bases, capaz de modificar DNA (Thiaville, *et al.*, 2016). El descubrimiento fue fundamentado en la detección de 2'-desoxipreQ<sub>0</sub> y 2'-desoxi-7amido-7deazaguanosina en un extracto de DNA de hidrolizados enzimáticos de la bacteria Gram negativa *Salmonella enterica* setoripo Montevideo que comparando con

la mutante de la misma (que no presenta del *cluster* de genes) y una bacteria cercanamente relacionada (*Salmonella enterica* serotipo Typhimurium LT2) manifestaron la ausencia de modificación (Thiaville, *et al.*, 2016). Otro caso donde fue encontrado un organismo que presenta un cluster de genes involucrados con la formación de preQ<sub>0</sub> fue el presente en el fago 9g de *E. coli* que presenta un genoma altamente modificado encontrando la base modificada 2-desoxi-7-formamidino-7-deazaguanina al secuenciar por espectrometría de masas, resultándoles predecible por la presencia de estos genes.

Dado que la capacidad enzimática de Tgt para modificar DNA es dependiente de los sustratos presentes en el medio (Nomura, *et. al*, 2016) existe la posibilidad de que la bacteria pueda regular la cantidad de preQ<sub>0</sub> volviéndolo un sustrato limitante dentro de la misma.

Se ha reportado que el gen que codifica para la enzima que comienza la cadena metabólica para la formación del sustrato preQ<sub>0</sub>, *fo/E*, al ser transcrito a RNA mensajero presenta un *riboswich* que se acopla indiscriminadamente a guanina, preQ<sub>0</sub> y preQ<sub>1</sub> (Kang, 2009) por lo que es posible que la presencia de los genes involucrados con la síntesis de los precursores de queuosina no sea para obtener la misma si no para evitar la reducción de preQ<sub>0</sub> y así continuar con la modificación del DNA.

## 9 CONCLUSIONES

Se encontró que el fago PaMx55 presenta el gen *tgt*.

El gen *tgt* del fago PaMx55 presenta 47 pares de bases de diferencia con respecto al mismo del fago PaMx25.

Se verificó que la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1  $\Delta$ IsLacZ $\nabla$ *tgt* presenta un fenotipo que puede diferenciar la presencia de modificación en su tRNAs de tirosina.

Las diferencias de corrimiento electroforético del tRNA de tirosina de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1  $\Delta$ IsLacZ $\nabla$ *tgt* no se presentan en el tRNA de glutamina.

La proteína Tgt del fago PaMx25 fusionada con un fragmento de la beta galactosidasa fue clonada en el vector pHERD30T.

## 10 PERSPECTIVAS

Analizar la función de la proteína tRNA guanosin-transglicosilasa, del fago PaMx55, para agregar derivados de la deazaguanina en el DNA.

Analizar la función de la proteína tRNA guanosin-transglicosilasa, del fago PaMx55, acerca insertar derivados de la deazaguanina en los tRNAs en ausencia de Tgt bacteria.

Secuenciar el genoma del fago PaMx55 y buscar la inclusión de las modificaciones al DNA presentes, así como la presencia de genes relacionados con modificaciones del mismo.

Deletar el gen *tgt* del fago PaMx55 y analizar los patrones de restricción del genoma del fago.

Analizar si la presencia de la modificación del DNA es dependiente del resto de los genes relacionados con la síntesis de preQ<sub>0</sub>.

Verificar si las modificaciones a los tRNAs GUN afectan la traducción de las proteínas del fago y la bacteria hospedera.

Verificar si las modificaciones al DNA que involucren derivados de la deazaguanina afecten la traducción de las proteínas del fago y la bacteria hospedera.

## 11 ANEXO

### 11.1 Medios de Cultivo

**Medio Luria Bertani (LB):** Bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5% y agar bacteriológico 1.5%

**Medio T $\phi$**  :Triptona 1%, NaCl 0.25%, agar bacteriológico 1%, NaOH 0.002M y MgSO<sub>4</sub> 0.01M

**Medio TMG-SM:** NaCl 1.17%, gelatina 0.1%, Tris HCl 0.01M pH8.0 y MgSO<sub>4</sub> 0.01M ajustando pH a 7.4

**Medio SOC:** Triptona 20g/L, Extracto de levadura 5g/L, NaCl 0.5g/L, MgCl 0.01M/L y se esteriliza a 120°C por 15 minutos.

### 11.2 Buffers

#### Buffer de corrida de gel de tRNAs

0.1M de Acetato de sodio pH 5.0

#### Buffer de carga para tRNAs

8M de Urea, 0.1M de acetato de sodio pH 5.0, 0.05%de XC y BPB

### 11.3 Metodologías

#### Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa*.

Se elaboraron células electrocompetentes de PA14 según el método de Choi et al. 2006. Dejando 6 ml de cultivo líquido de PA14 en medio LB overnight a 37°C y 210 rpm. Centrifugar a 16,770 g durante 1 min y se decantar el sobrenadante. Realizar cuatro lavados de la pastilla con 1 ml sacarosa 300mM y centrifugando a 16,770 g por 1 min. Resuspender la pastilla en 100 $\mu$ l de sacarosa 300mM. Guardar la alícuota a -70°C.

### **Geles de agarosa.**

Los geles de agarosa se prepararon al 1%. Para ello se pesó 1 g de agarosa de bajo punto de fusión de Invitrogen. Se le agregaron 100 ml de buffer TAE 1X (ver ANEXO 1) y se derritió en un horno de microondas. Se dejó enfriar un poco y se vertió en un molde de electroforesis sellado en ambos extremos con cinta adhesiva. Después se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y se distribuyó uniformemente. Se colocaron los peines y se dejó solidificar. Después se retiró la cinta adhesiva, se colocó el molde en una cámara de electroforesis. Se llenó la cámara con buffer TAE 1X hasta cubrir el gel y se retiró el peine. Se cargaron las muestras y se corrió el gel a 80 V durante 1 h.

### **Purificación de bandas de gel de agarosa.**

Se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Se cortó con mucho cuidado la banda del tamaño deseado y se pesó. Por cada 10 mg de gel se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de Membrane Binding Solution. Se mezcló mediante vórtex y se incubó de 55°C a 65°C por 10 minutos, vortexeando cada 2 minutos. Una vez disuelto se incubó 1 minuto a temperatura ambiente. Se colocó una minicolumna SV en un tubo colector y se transfirió el gel derretido. Se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 15700G durante 1 min. Se desechó el filtrado y se hizo un primer lavado con 700  $\mu\text{L}$  de Membrane Washing Solution. Se centrifugó a 15700G durante 1 min y se desechó el filtrado. Después se hizo otro lavado con 500  $\mu\text{L}$  de la misma solución, centrifugando a 15700G durante 5 min y se desechó el filtrado. Se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas (precalentada a 40°C) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Cambiar el tubo de recolección de desecho por un tubo cónico Eppendorf de 1.5mL y centrifugar a 15700G durante 1 min. El DNA purificado se guardó a -20°C.



## Extracción de plásmido

### Producción de lisado aclarado (Cleared Lysate)

Sembrar la bacteria que contiene el plasmido que se desea amplificar en un tubo con 10 ml de medio lb líquido con el antibiótico de selección a 37°C overnight. El cultivo obtenido es transferido a un tubo falcon de 15ml y sometido a centrifugación a 10,732g a 4°C por 15 minutos. Decantar y resuspender el pellet en 250 µL de solución de resuspensión y vaciar en un Eppendorf de 1.5mL. Adicionar 250 µL de solución de lisis e invertir de 8 a 9 veces. Agregar 10 µL de solución de proteasa alcalina e invertir de 8 a 9 veces. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Adicionar 350 µL de solución de neutralización e invertir de 8 a 9 minutos. Centrifugar a máxima velocidad por 10 minutos a temperatura ambiente.

### Unión del plásmido

Insertar la columna spin en el tubo de colección. Decantar el lisado claro en la columna spin. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar el líquido "*flowthrough*" y reinsertar la columna en el tubo de colección.

### Lavados

Adicionar 750 µL de solución de lavado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto y desechar el líquido "*flowthrough*". Adicionar 250 µL de solución de lavado. Centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente.

### Elución

Transferir la columna spin a un tubo cónico nuevo Eppendorf de 1.5mL cuidando de que no lleve solución de lavado. Agregar 100 µL de agua libre de nucleasas a la columna spin. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto a temperatura ambiente. Descartar la columna y guardar el líquido "*flowthrough*" que contiene el ADN a -20°C.

## Gel ácido de Poliacrilamida Urea

El gel ácido de poliacrilamida se preparó siguiendo las condiciones mostradas en la tabla filtrando y degasificando la mezcla, posteriormente, a temperatura ambiente y agregando el TEMED al final.

Gel ácido de Poliacrilamida Urea	
Reactivo	Cantidad
Urea	24g
Stock Acrilamida/Bis-acrilamida (19:1)	12.6mL
3M NaOAc pH5	1.66mL
10% APS	300 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L
Agua	Hasta 50mL

Una vez agregado el TEMED se agregó la mezcla entre los vidrios de 20X20cms. de la cámara de electroforesis vertical de Bethesda Research Laboratories Model V16.

## Stock Acril/Bis 19:1

Un stock de Acrilamida/Bisacrilamida se prepara disolviendo en agua 43.2g de acrilamida más 2.3gr de Bis-acrilamida en un volumen final de 100ml.

Solución de lavado	
Reactivo	Cantidad
Urea	24g
Stock Acrilamida/Bis-acrilamida (19:1)	12.6mL
3M NaOAc pH5	1.66mL
10% APS	300 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L
Agua	Hasta 50mL

### 11.4 Figuras suplementarias

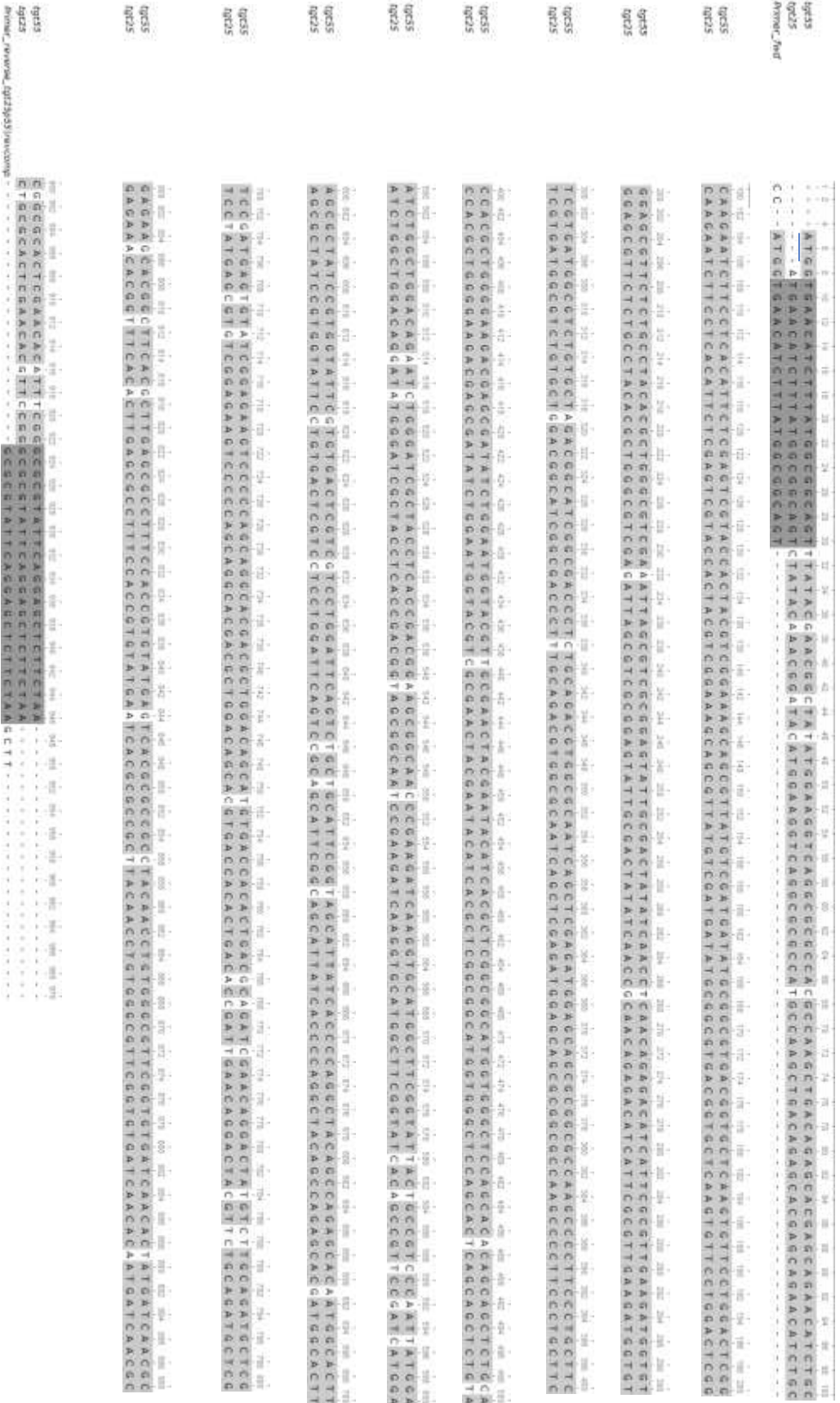


Figura suplementaria 1. Comparación de las secuencias de nucleotídicas del gen *tgt* de los fagos PaMx25 y PaMx55. En verde se marca el codón de inicio y en rojo se marca el codón de paro.

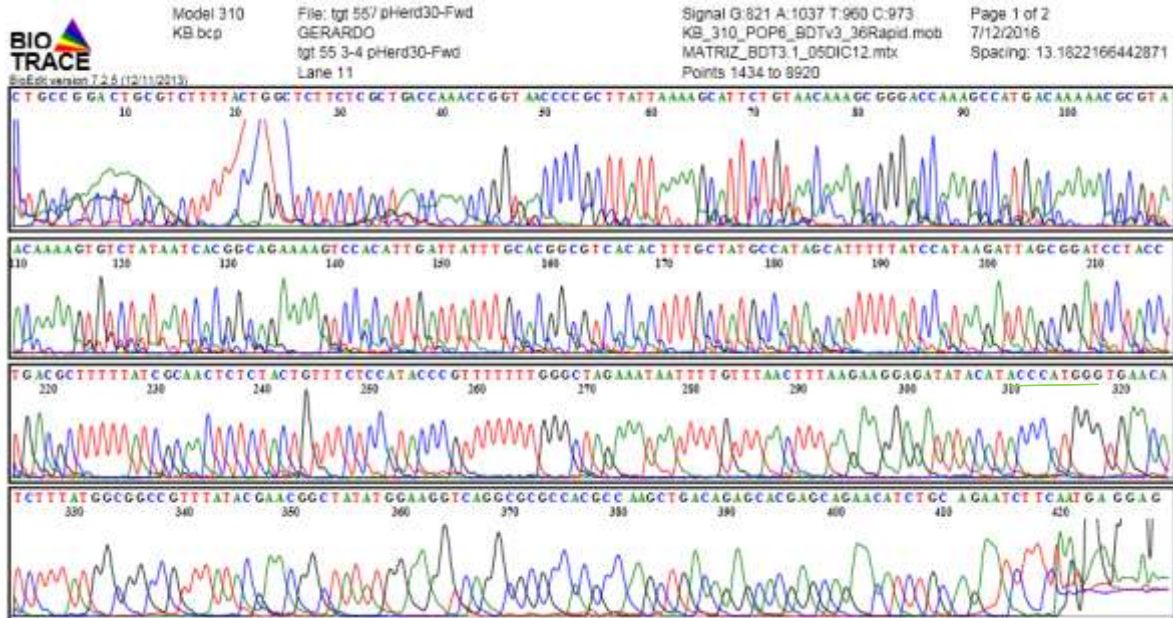


Figura suplementaria 2. Electroferograma de la secuenciación *forward* de la construcción *tgt55/pHERD30T*. Se muestra el sitio de restricción *NcoI* remarcado en verde.



Model 310  
KB.bcp

File: tgt 55 3-4 pHerd30-Rev7-12-16-6-56 AM.ab1  
GERARDO  
tgt 55 3-4 pHerd30-Rev  
Lane 12

Signal G:1417 A:1394 T:1419 C:1683  
KB\_310\_POP6\_BDTV3\_36Rapid.mob 7/12/2016  
MATRIZ\_BDT3.1\_05DIC12.mtx Spacing: 13.1345491409302  
Points 1389 to 8920

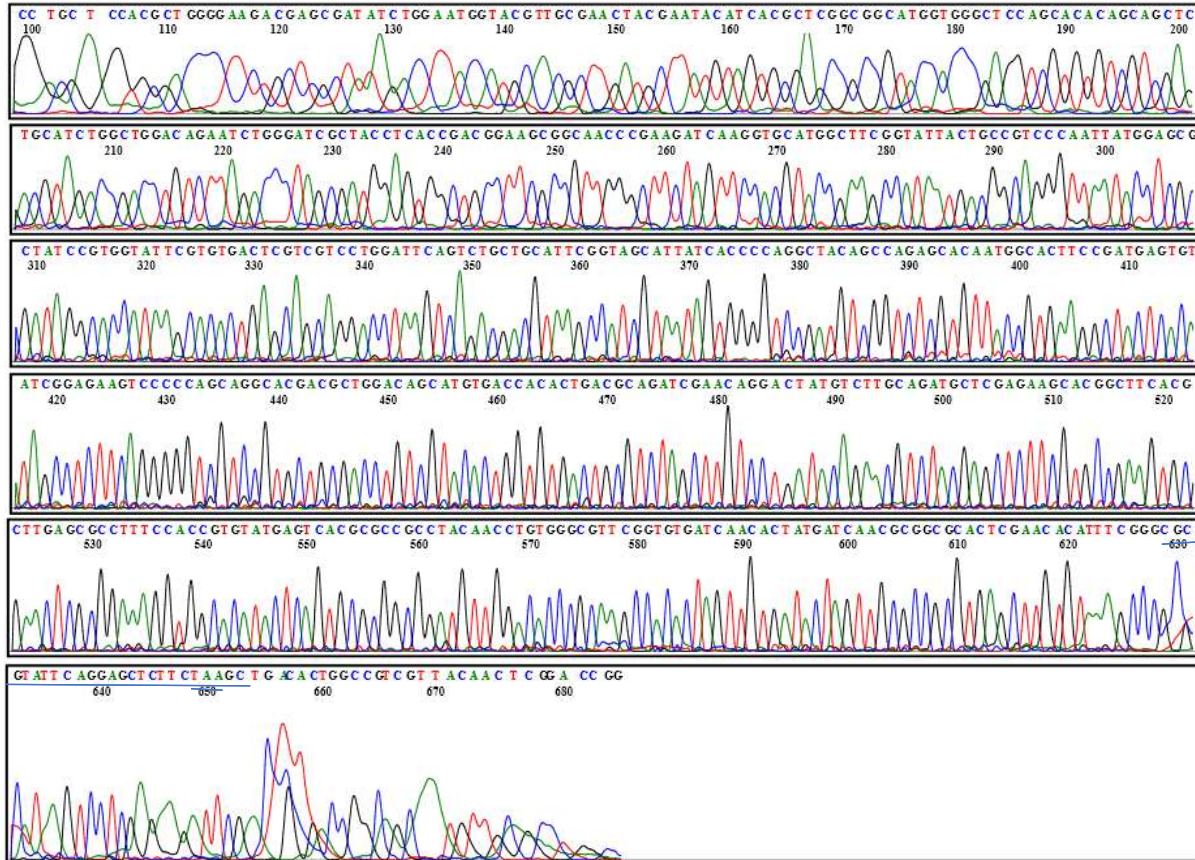


Figura Suplementaria 3. Electroferograma de la secuenciación reverse de la construcción *tgt55/pHERD30T*. La secuencia esta mostrada como reversa complementaria de lo que aparece en las bandas por lo que las letras marcadas en colores se ven de diferente color a las bandas. Se remarca en azul la posición del primer que coincide en secuencia con el primer reverse diseñado en la tabla 3.

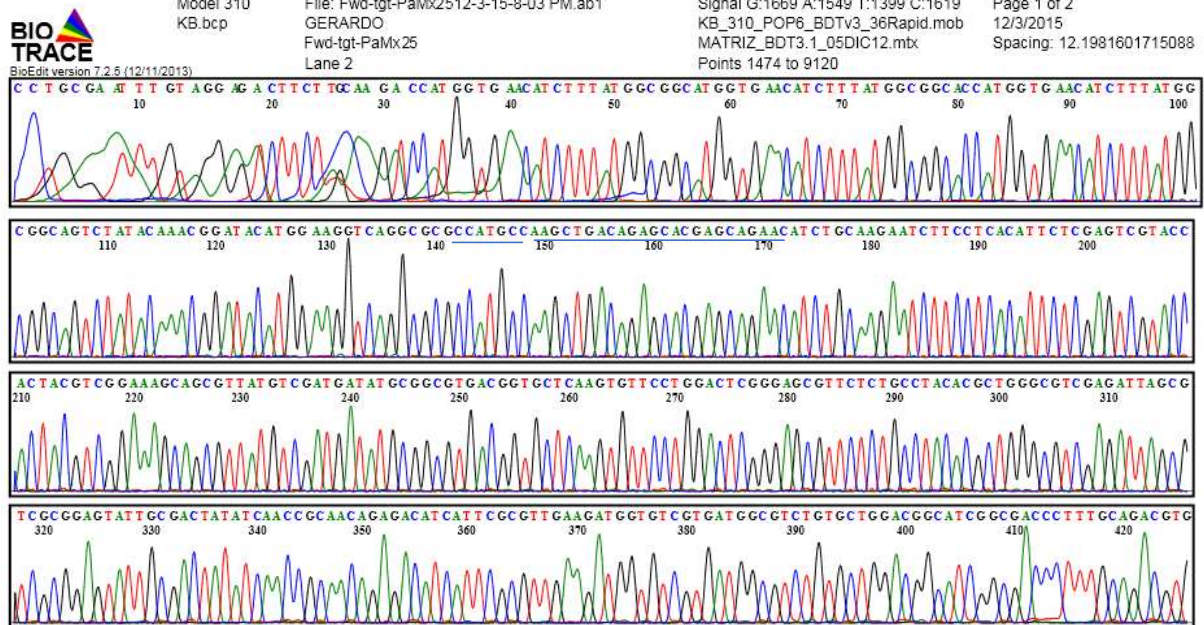


Figura Suplementaria 4. Electroferograma de la secuenciación *forward* de la construcción *tgt25-pJET1.2*. Se marca en verde el sitio de restricción *NcoI* que a su vez es el sitio de inicio de la traducción, en azul se marca la secuencia del primer *forward* que se usó para amplificar el gen *tgt* fagico.

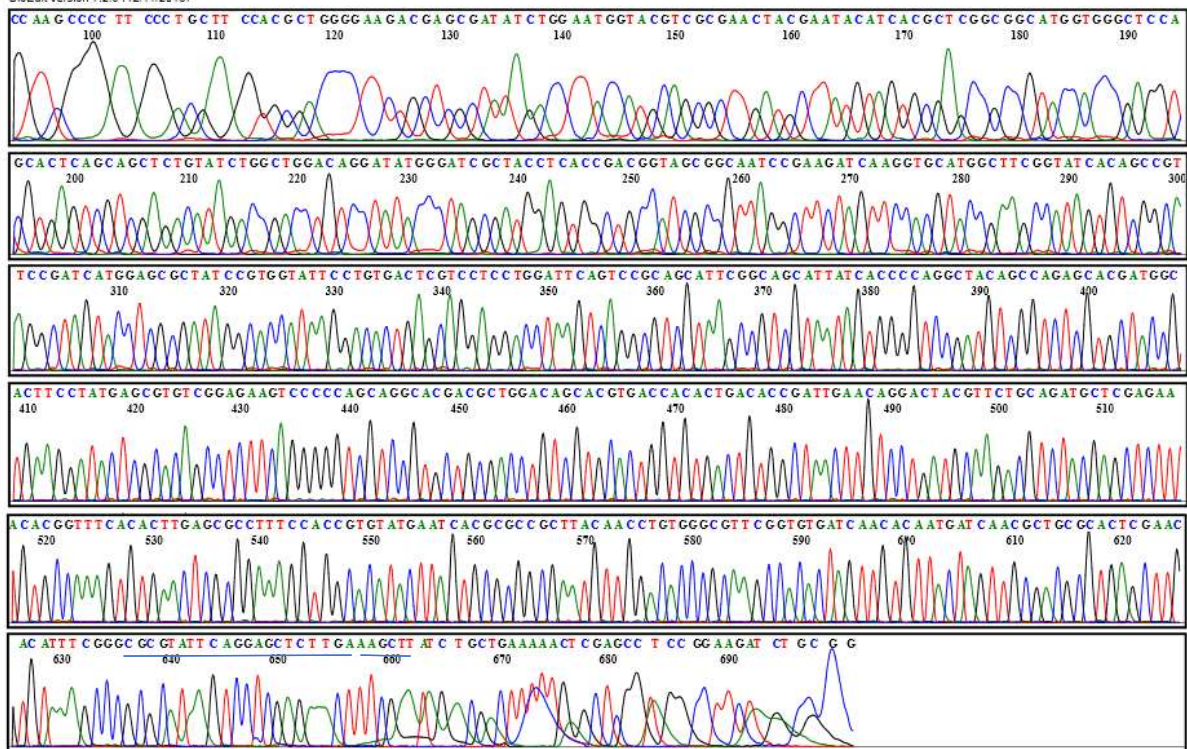


Figura Suplementaria 5. Electroferograma de la secuenciación *reverse* de la construcción *tgt55/pHERD30T*. La secuencia esta mostrada como reversa complementaria con respecto al código de colores que aparece en las bandas por lo que las letras marcadas en colores se ven de diferente color a las bandas. Se remarca en azul la posición del primer que coincide en secuencia con el primer reverse diseñado en la [Tabla 15].

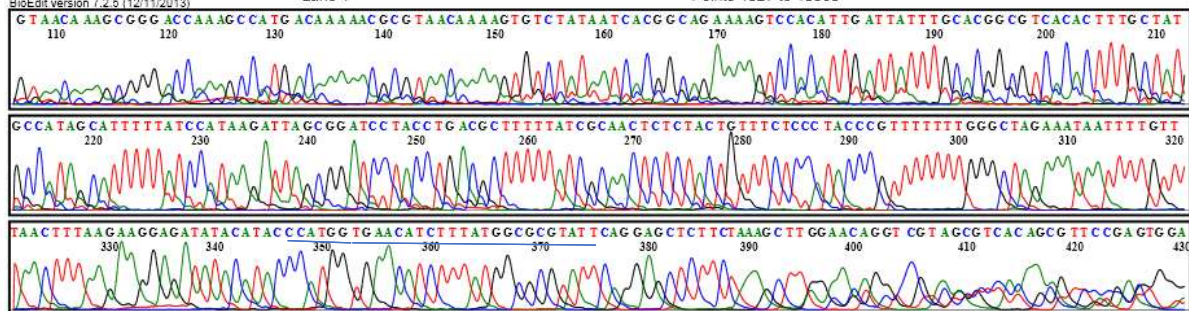


Figura Suplementaria 6. Electroferograma de la secuenciación *reverse* de la construcción *tgt-lacZ/pHERD30T*. Se muestra en verde la posición del sitio de restricción *NcoI* y en azul el *primer* utilizados para amplificar el gen *tgt*

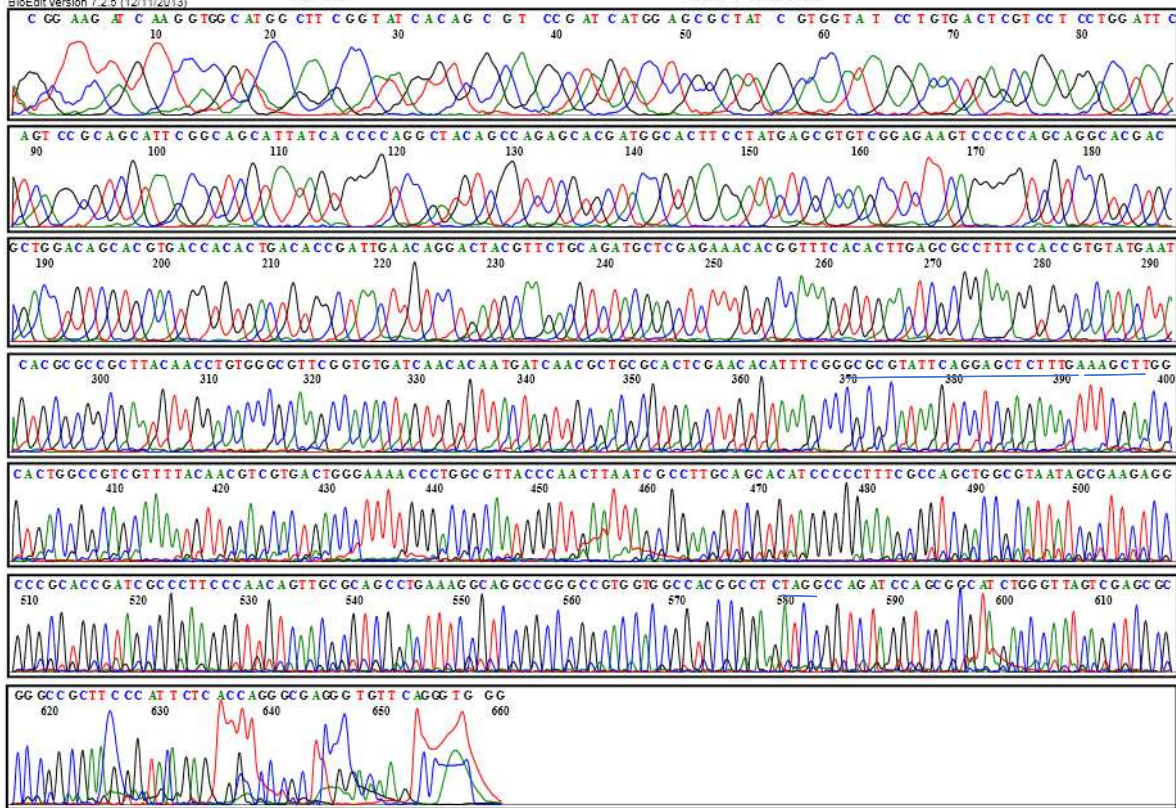


Figura Suplementaria 7. Electroferograma de la secuenciación *reverse* de la construcción *tgt-lacZ/pHERD30T*. Se encuentra marcado en amarillo el sitio de restricción HindII y en azul la secuencia del *primer* utilizado para amplificar *tgt*, en rojo se marca del codón de paro del fragmento alfa de la beta galactosidasa.



## 12 REFERENCIAS

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. and Struhl K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Hoboken N. J.

Beier H., M. Bareizewska and H.D. Sicking, (1984), The molecular basis for the differential translation of TMV RNA in tobacco protoplasts and wheat germ extracts, *EMBO Journal* 3. 1091-1096.

Biela I., Tidten-Luksch N., Immekus F., Glinca S., Xuan T., Nguyen P., Gerber H.-H., Heine A., Klebe G., Reuter K., (2013), Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of Its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor, *PlosOne*.

Bienz M. and Kubli E., (1981) Wild type tRNA<sup>T</sup> reads TMV-RNA stop codon, but Q-base modified tRNA? does not. *Nature* 294, 199-190.

Brüssow, H., Hendrix, R. W. (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108, 13–16  
Dowling D. P., Bruender N. A., Young A. P., Reid M. McCarty, Vahe Bandarian, and Catherine L. Drennan, (2014) Radical SAM enzyme QueE defines a new minimal core fold and metal-dependent mechanism, *Nat Chem Biol*; 10(2): 106–112.

Bryan M. J., Burroughs N. J., Spence E. M., M. R. J. Clokie, N. H. Mann, S. J. Bryan, (2008) Evidence for the Intense Exchange of MazG in Marine Cyanophages by Horizontal Gene Transfer, *PlosOne*, , Volume 3

Buehl C. J., Deng X., Liu M., Hovde S., Xu X., Kuo M. H. (2014) Resolving acetylated and phosphorylated proteins by neutral urea triton-polyacrylamide gel electrophoresis, NUT-PAGE. *Biotech*. 57(2): 72-80. PMID: PMC4242444.

Curnow A.W., Garcia G. A. (1995) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli* Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition, *J. Biol Chem.* 270,17264-67)

Dawn B. Goldsmith, Giuseppe Crosti, Bhakti Dwivedi, Lauren D. McDaniel, Arvind Varsani, Curtis A. Suttle, Markus G. Weinbauer, Ruth-Anne Sandaa, and Mya Breitbart, (2011) Development of *phoH* as a Novel Signature Gene for Assessing Marine Phage Diversity, Applied and environmental microbiology, p. 7730–7739

Frey, B., J. A. McCloskey, W. Kersten, and H. Kersten. (1988) New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 170:2078–2082,.

Gaur, R., y U. Varshney. (2005). Genetic analysis identifies a function for the queC (*ybaX*) gene product at an initial step in the queuosine biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 187:6893–6901.

Garcia GA, Kittendorf JD. (2005). Transglycosylation: a mechanism for RNA modification (and editing?). Bioorg Chem. 33(3):229-51.

Goodenough-Lashua DM, Garcia GA (2003) tRNA-guanine transglycosylase from *E. coli*: a ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis. Bio. Org. Chem. 31: 331–344.

Grädler U, Ficner R, Garcia GA, Stubbs MT, Klebe G, et al. (1999) Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase to elucidate the role of serine 103 for enzymatic activity. FEBS Lett 454: 142–146.

Hancock S. M., Vaughan M. D., Withers S. G. (2006) ,Engineering of glycosidases and glycosyltransferases, Curr. Op. Chem. Biol., Vol. 10, Issue. 5 Pages 509-519

Harada F, Nishimura S., (1972) Possible anticodon sequences of tRNA(his), tRNA(asn), tRNA(asp) from *Escherichia coli* B. Universal presence of nucleoside Q in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acids. *Biochemistry* 11:301-308.

Hargreaves K. R, Andrew M Kropinski, and M. RJ Clokie, (2014) Bacteriophage behavioral ecology, How phages alter their bacterial host's habits, *Bacteriophage*, 4: e29866

Hatfield D., (1989) Chromatographic analysis of the aminoacyl-tRNAs which are required for translation of codons at and around the ribosomal frameshift sites of HIV, HTLV-1, and BLV, *Virology* 173, 736-742.

Hatfull G.F., Pedulla M.L., Jacobs-Sera D., Cichon P.M., Foley A., Ford M.E., Gonda R.M., Houtz J.M., Hryckowian A.J., Kelchner, V.A., Namburi S., Pajcini K.V., Popovich M.G., Schleicher D.T., Simanek B.Z., Smith A.L., Zdanowicz G.M., Kumar V., Peebles C.L., Jacobs W.R. Jr., Lawrence J.G. and Hendrix R.W., (2006) Exploring the mycobacteriophage metaproteome: phage genomics as an educational platform, *PLoS Genet.* 2 (6), E92

Hatfull G.F., the KwaZulu-Natal Research Institute for Tuberculosis and HIV Mycobacterial Genetics Course Students (2012) Complete Genome Sequences of 138 Mycobacteriophages, *J. Virol.* 86 (4), 2382-2384

Holmfeldt K., Solonenko,N., Shah,M., Corrier,K., Riemann,L., VerBerkmoes,N.C. and Sullivan,M.B. (2013) *Twelve previously unknown phage genera are ubiquitous in global oceans*.PNAS, vol 110 no 31, 12798-12803

Ishitani R., O. Nureki, S. Fukai, T. Kijimoto N. Nameki, M. Watanabe, H. Kondo M. Sekine, N. Okada, Nishimura S. and Yokoyama S., (2002), Crystal Structure of Archaeosine tRNA-guanine Transglycosylase, J. Mol. Biol. 318, 665–677

Jacobs MA, 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 MV, Manoil C. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 14339-44.

Kang M., R. Peterson and J. Feigon, (2009), Structural Insights into Riboswitch Control of the Biosynthesis of Queuosine, a Modified Nucleotide Found in the Anticodon of tRNA, Cell Press, DOI 10.1016/j.molcel.2009.02.019

Kinzie, S. D., B. Thern, and D. Iwata-Reuyl. (2000) Mechanistic studies of the tRNA-modifying enzyme QueA: a chemical imperative for the use of AdoMet as a “ribosyl” donor. Org. Lett. 2:1307–1310

Kittendorf J. D., Barcomb L. M., Nonekowsky S. T., Garcia G. A., (2001) tRNA-Guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: Molecular mechanism and role of Aspartate 89, Biochemistry 40(47), pp14123-33

Krylov V., E. Pleteneva, M. Bourkaltseva, O. Shaburova, G. Volckaert, N. Sykilinda, L. Kurochkina, V. Mesyanzhinov, (2003), Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway, Res. Microbiol., 154, pp. 269–275

Kuchino Y., Kasai H., Nihei K., and Nishimura S, (1976), Biosynthesis of the modified nucleoside Q in transfer RNA Nucleic Acids Res. 3, 393–398

Kulikov E. E., Letarov A. V., (2014), Genomic Sequencing and Biological Characteristics of a Novel *Escherichia Coli* Bacteriophage 9g, a Putative Representative of a New Siphoviridae Genus, *Viruses*, 6, 5077-5092

Kung FL., Nonekowsky S., Garcia G. A., (2000) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: recognition of noncognate-cognate chimeric tRNA and discovery of a novel recognition site within the TpsiC arm of tRNA(Phe), RNA, 6;233-44 Cambridge University Press.

Kutter, E. y Sulakvelidze, A. (2005) Bacteriophages: biology and applications. (CRC Press,).

Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, Pelletier J., (2006), Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. J Bacteriol. Feb; 188(3):1184-7.

Lagerkvist U., Lars Rymo, and J. Waldenström (1966) Structure and function of transfer ribonucleic acid J. Biol. Chem., Vol. 241 No. 22 5391-400

Lal,T.M. and Ransangan,J., (2015), Complete Genome Sequence of VpKK5, a Novel *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Siphophage, J. Genome Announc 3

Lanen, S. G. V., Reader J. S., Swairjo M. A., V. de Crécy-Lagard, B. Lee, and D. Iwata-Reuyl. (2005), From cyclohydrolase to oxidoreductase: discovery of nitrile reductase activity in a common fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:4264–4269

Lee, J.-H., Shin, H., Son, B. and Ryu, S., (2012), Complete Genome Sequence of *Bacillus cereus* Bacteriophage BCD7, *J Virol.* Jan; 86(1): 637–638.

Lin Y.R. and Lin C.S., (2012), Genome-wide characterization of vibrio phage phipp2 with unique arrangements of the mob-like genes, *BMC Genomics* 13 (1), 224

Marchetti M., Capela D., R. Poincloux, N. Benmeradi, M.C. Auriac, A. Le Ru, I. Maridonneau-Parini, J. Batut, C. Masson-Boivin, (2013) Queuosine Biosynthesis Is Required for *Sinorhizobium meliloti*-Induced Cytoskeletal Modifications on HeLa Cells and Symbiosis with *Medicago truncatula*, *PLoS One.* 2013; 8(2). Published online February 8

Marshall O. J. (2004) Perl primer: cross-platform graphical primer desing for standard, bisulphite and real-time PCR, *Bioinf.* Vol. 20 pages 2471-2472

McCarty R. M., Somogyi Á., and Bandarian V., (2009) *E. coli* QueD is a 6-carboxy-5, 6, 7, 8-tetrahydropterin synthase, *Biochemistry.* March 24; 48(11): 2301–2303

Meier F., Suter B., Grosjean H., Keith G. and E. Kubli, (1985) *Queuosine modification of the wobble base in tRNA<sup>His</sup> influences 'in vivo' decoding properties*, *EMBO Journal* 4, 823-827.

Miles ZD, McCarty RM, Molnar G, Bandarian V, Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 3;108(18):7368-72.

Nelson D. (2004) Phage taxonomy: we agree to disagree. *J Bacteriol*. 186(21):7029-31.

Noguchi A., Nishimura Y., Hirota Y. and Nishimura S., (1982), Isolation and Characterization of an *Escherichia coli* Mutant Lacking tRNA-Guanine Transglycosylase, *Journal of Biological Chemistry* 257, 6544-6550.

Nomura Y., Ohno S., Nishikawa K., Yokogawa T., (2016), Correlation between the stability of tRNA tertiary structure and the catalytic efficiency of a tRNA-modifying enzyme, archeal tRNA-guanine transglycosylase. *Genes Cells* Jan. 21,(1);41-52.

Nonekowski ST, Kung FL, Garcia GA, (2001), The *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase can recognize and modify DNA, *J Biol Chem*, 2002 Mar 1;277(9):7178-82. Epub, Dec 21.

Okada, N., Noguchi, S., Kasai, H., Shindo-Okada, N., Ohgi, T., Goto, T., and Nishimura, S. (1979), Transfer ribonucleic acid guanine transglycosylase isolated from rat liver, *J. Biol. Chem.* 254, 3067–3073

Pedulla, M.L., Ford, M.E., Houtz, J.M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J.A., Jacobs-Sera, D., Falbo, J., Gross, J., Pannunzio, N.R., Brucker, W., Kumar, V., Kandasamy, J., Keenan, L., Bardarov, S., Kriakov, J., Lawrence, J.G., Jacobs, W.R. Jr., Hendrix, R.W. and Hatfull, G.F., (2003) Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes, *Cell* 113 (2), 171-182

Rana C. Morris, y Mark S. Elliott, (2001), Queosine Modification of tRNA:A case for convergent Evolution , 30/03/2001, Molecular Genetics and Metabolism 74, 147-159

Reader J. S., Metzgar D., Paul Schimmel, and Valérie de Crécy-Lagard, (2004), Identification of Four Genes Necessary for Biosynthesis of the Modified Nucleoside Queosine, J. Biol. Chem, Vol. 279, No. 8, Issue of February 2004, pp. 6280 –6285, 2004

Ritschel T, Atmanene C, Reuter K, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S (2009) An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. J Mol Biol 393: 833–847.

Rebelo J., Auerbach G., Bader G., Bracher A., Nar H., Cornelia Hösl, N. Schramek, J. K. A. Bacher, R. H. and M. Fischer, (2003), Biosynthesis of Pteridines. Reaction Mechanism of GTP Cyclohydrolase I, J. Mol. Biol. 326, 503–516

Reuter, K. & Ficner, R. (1995). Sequence analysis and overexpression of the *Zymomonas mobilis* *tgt* gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. J. Bacteriol. 177, 5284–5288

Romier C, Reuter K, Suck D, Ficner R (1996) Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. EMBO J 15: 2850–2857

Sabri M., R. H. M. Ouellette, J. Liu, M. Dehbi, G. Moeck, E. García, B. Titz, P. Uetz, and S. Moineau, (2011) Genome Annotation and Intraviral Interactome for the *Streptococcus pneumoniae* Virulent Phage Dp-1, J. Bacteriology, p. 551–562, Vol. 193, No. 2

Santamaria R.I., Bustos P., Sepulveda-Robles O., Lozano L., Rodriguez C., Fernandez J.L., Juarez S., Kameyama L., Guarneros G., Davila G. and Gonzalez V., (2013), Narrow Host-Range Bacteriophages that Infect *Rhizobium etli* associate with Distinct Genomic Types Appl. Environ. Microbiol. 80 (2), 446-454



Sepulveda O., Kameyama L. & Guarneros, G., (2007), Tesis “Aislamiento y caracterización de fagos que infectan cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*”

Sepulveda-Robles O., Kameyama L. & Guarneros, G., (2012), High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 78: 4510–4515.

Singhal R.P. and Yakharia V.N., (1983), The role of queuine in the aminoacylation of mammalian aspartate transfer RNAs, *Nucleic Acids Research II*, 4257-4272.

Smith D.W.E. and Hatfield D.L., (1986), Effects of post-translational base modifications on the site-specific function of transfer RNA in eukaryote translation, *Journal of Molecular Biology* 189, 663-671.

Sullivan MB, Lindell D, Lee JA, Thompson LR, Bielawski JP, Chisholm SW., (2006), Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PlosOne PLoS Biol.* Jul; 4(8)

Tanaka Y., N. Nakagawa, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, and R. Masui, (2005), Novel Reaction Mechanism of GTP Cyclohydrolase I. High-Resolution X-Ray Crystallography of *Thermus thermophilus* HB8 Enzyme Complexed with a Transition State Analogue, the 8-Oxoguanine Derivative, *J. Biochem.* 138, 263–275

Thiaville J. J., Stefanie M. Kellner, Y. Yuan, G. Hutinet, Patrick C. Thiaville, W. Jumpathong, S. Mohapatra, C. Brochier-Armanet, A. V. Letarov, R. Hillebrand, Chanchal K. Malik, C. J. Rizzo, Peter C. Dedon, and Valérie de Crécy-Lagard, (2016) Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives, *Biochemistry, Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 15; 113(11): E1452–E1459

Todorov A. K. y Garcia G. A. (2006), The role of aspartate 143 in E. coli tRNA-Guanine Trasglycosylase: Alteration of heterocyclic substrate specificity. *Biochem.* 45(2): 617-625

Vinayak M. and C. Pathak, (2010), Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery, *Bioscience Reports*,

Wolfgang, M. C. (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8484–8489

Xie W., Liu X., Huang RH Chemical trapping and crystal structure analysis of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. (2003) *Nature Struct Biol* 10: 781–788.