



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias con
mención en Microbiología

Cambios en los niveles de tRNA^{Gly} en la adaptación de *Escherichia coli* a
condiciones de estrés oxidativo

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en
Microbiología

POR: Andrea Belén Pincheira Duarte

Profesor Guía: Dr. Assaf Katz Zondek*

Profesor Co-Guía: Dr. Gerardo González Rocha**

*Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina Universidad de Chile

**Depto de Microbiología Facultad de
Cs. Biológicas Universidad de Concepción

Concepción, Chile 2020

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento.





A mi hijo, Vicente.

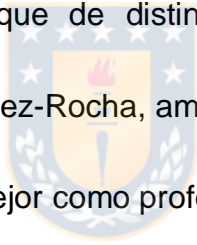
AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por los proyectos Fondecyt Inicio N° 11140222 y de Inserción a la Academia N° 79130044.

Gracias por la oportunidad y confianza al Dr. Assaf Katz y su gran equipo de trabajo, siempre dispuestos a colaborar, enseñar y con una palabra de aliento.

En especial agradecer a mi compañero y amigo Lorenzo Leiva quien fue parte importante de este trabajo.

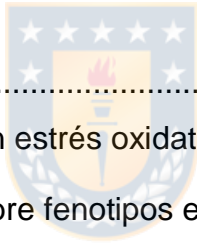
Gracias a todos aquellos que de distintas maneras fueron parte de este proceso, Dr. Gerardo González-Rocha, amigas y familia que me motivaron y me siguen motivando a dar lo mejor como profesional y persona.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Estrés oxidativo en bacterias.....	1
1.2. Estrés oxidativo y RNA.....	5
1.3. Características de los tRNA	6
1.4. El código genético	8
1.5. Hipótesis	10
1.6. Objetivo General	10
1.7. Objetivos Específicos	10
2. METODOLOGÍA	11
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivos	11
2.2. Análisis Molecular	13
2.2.1. Extracción de RNA	13
2.2.2. Determinación de cambios en los niveles totales de tRNA	13
2.2.3. Detección de tRNA mediante Northern Blot	14
2.3. Efectos fenotípicos de la sobreproducción de los isoaceptores de RNA ^{Gly} bajo estrés oxidativo.....	17
2.3.1. Determinación de la relación entre densidad óptica y el número de células de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA ^{Gly}	17

2.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a paraquat en medio M9 de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA ^{Gly}	18
2.3.3. Determinación del efecto de paraquat sobre la fermentación de azúcares de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA ^{Gly}	18
3. RESULTADOS.....	20
3.1. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles totales de tRNA	20
3.2. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de los isoaceptores de tRNA ^{Gly}	22
3.3. Efecto de los niveles de los isoaceptores de tRNA ^{Gly} sobre la respuesta a estrés oxidativo.....	25
4. DISCUSIÓN	29
4.1. Niveles de tRNA ^{Gly} en estrés oxidativo.....	29
4.2. Papel del tRNA ^{Gly} sobre fenotipos estudiados bajo estrés oxidativo.....	31
5. CONCLUSIONES	35
6. PROYECCIONES	36
7. REFERENCIAS	37
8. FIGURAS SUPLEMENTARIAS	41



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes para tRNA ^{Gly} y uso de codones para glicina en el genoma de <i>E. coli</i> K12 MG1655.....	9
Tabla 2. Plásmidos utilizados para el estudio.....	11
Tabla 3. Sondas utilizadas para Northern blot.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El estrés oxidativo no afecta los niveles de tRNA total.....	21
Figura 2. El estrés oxidativo no altera la concentración de los distintos isoaceptores de tRNA ^{Gly}	24
Figura 3. Aumento en los niveles de tRNA ^{Gly} _U disminuye el tamaño celular de <i>E. coli</i> MG1655.....	26
Figura 4. Sobreproducción de tRNA ^{Gly} _U aumentan la sensibilidad de la fermentación de azúcares al estrés oxidativo.....	28

RESUMEN

Las bacterias constan de diversos mecanismos que les permiten adaptar su fisiología para enfrentarse al estrés oxidativo. Los mecanismos mejor descritos a la fecha, corresponden a la regulación de la expresión génica. Sin embargo, es poco lo que se sabe sobre el papel de la traducción y en particular de los tRNA en la adaptación al estrés en bacterias.

Experimentos de aminoacilación de tRNA del laboratorio indicaban que en *Escherichia coli* los tRNA^{Gly} activos disminuyen bajo estrés oxidativo, por lo que en esta tesis se evaluó los cambios de este tRNA en condición de estrés oxidativo y sus consecuencias fenotípicas. Mediante Northern blot se determinó que no hay cambios en los niveles de los isoaceptores de tRNA^{Gly}, indicando que la disminución de la actividad se debe a su modificación. Además, la sobreproducción de cada isoaceptor de tRNA^{Gly} no afecta la concentración mínima inhibitoria (CMI) a paraquat, pero si la fermentación de diferentes fuentes de azúcar. Este cambio es específico para cada isoaceptor de tRNA^{Gly}, observándose un mayor efecto para tRNA^{Gly}_U. Por lo tanto, se propone que el estrés oxidativo conduce a la inactivación del tRNA^{Gly} modulando la respuesta a este estrés. Estos datos permiten demostrar la participación de los tRNA en *E. coli* en la adaptación de su fisiología frente al estrés oxidativo, lo que probablemente permite una colonización más exitosa de nichos con alto contenido de especies oxidantes.

ABSTRACT

In order to confront oxidative stress, bacteria have diverse mechanisms to control their physiology. The best studied mechanisms are involved in the transcriptional regulation while little is known about the role of translation and specially tRNA in the adaptation to stress in bacteria. Experiments from our laboratory have shown that in *Escherichia coli*, active tRNA^{Gly} decrease under oxidative stress. This thesis evaluates changes of tRNA levels in *E. coli* exposed to oxidative stress and its phenotypic consequences. Northern blot analyzes show that isoacceptors levels are not altered indicating that the tRNA activity decrease in consequence of a tRNA modification. In addition, the overproduction of tRNA^{Gly} isoacceptors do not affect the minimal inhibitory concentration (MIC) of paraquat, but rather alter the fermentation of diverse sugar sources. Therefore, we propose that oxidative stress leads to the inactivation of the tRNA^{Gly} modulating the response to this stress. These data allows us to demonstrate the participation of tRNA in the adaptation of the physiology of *E. coli* to oxidative stress and probably increasing it's ability to successfully colonize niches with a higher content of oxidizing species.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Estrés oxidativo en bacterias.

Las reacciones de oxidación y reducción están presentes en el metabolismo de todos los seres vivos. Esto hace que distintas rutas metabólicas dependan del estado redox presente en el interior de la célula (Davies, 1999). Como subproducto de muchas de estas reacciones se pueden generar moléculas dañinas denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS), por ejemplo, las generadas como subproducto de la cadena respiratoria en el metabolismo de bacterias que viven en ambientes aerobios (Quesada-Gómez, 2008). Algunas de las ROS más comunes son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el superóxido (O_2^\cdot). Además de generar daño por reaccionar directamente con los componentes celulares, estas pueden producir más ROS. Este es el caso del OH^\cdot que se genera a partir de H_2O_2 en una reacción catalizada por metales de transición como el hierro (Liu et al., 2012; Quesada-Gómez, 2008). El OH^\cdot es mucho más reactivo que el H_2O_2 , reaccionando rápida e inespecíficamente con blancos celulares cercanos, la denominada reacción de Fenton (Imlay, 2014). Debido a la continua generación de este tipo de moléculas, las células han desarrollado mecanismos que las degradan y/o ayudan a restaurar el daño generado, encontrándose en un continuo balance entre la síntesis y degradación de ROS (Arts, et al., 2015). Este balance puede alterarse producto de diversos factores externos, por lo que se pierde el equilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de la célula para

degradarlas, llevando a una acumulación de ROS, lo que se conoce como estrés oxidativo (Arts et al., 2015; Imlay, 2008). Uno de estos factores externos puede ser la fagocitosis. Durante este proceso se genera una explosión oxidativa donde los microorganismos patógenos dentro de los fagosomas son atacados por un arsenal de agentes oxidantes (Mark et al., 1998; Shen et al., 2000).

Debido a que las bacterias se enfrentan al estrés oxidativo en diversos medios, tanto su supervivencia como su patogenicidad depende de su capacidad para controlar y contrarrestar los efectos del estrés oxidativo. Aún más, durante un proceso infeccioso algunos microorganismos patógenos inducen la generación de un ambiente más oxidante en el hospedero como mecanismo de ocupación de nichos. Al contar con una adaptación al estrés oxidativo mayor que la de otros microorganismos compiten mejor en este tipo de ambientes, colonizando un nicho ecológico que pocos podrían tolerar (Slauch, 2012)

Organismos no patógenos también se ven enfrentados a condiciones que inducen estrés oxidativo, el cual puede ser ocasionado por la exposición a factores físicos y químicos, como la radiación UV y agentes xenobióticos, respectivamente (Katz & Orellana, 2012).

Un agente químico inductor del estrés oxidativo es el dicloruro de 1,1'- dimetil-4,4'- bipyridinio, comercialmente conocido como Paraquat. Este ha sido muy utilizado por su gran capacidad herbicida (Botelho, et al., 2012). Dado que este compuesto invade muchos nichos bacterianos, ha sido utilizado para diversos

estudios de la respuesta a estrés oxidativo en bacterias, este facilita la realización de los experimentos mas que el H_2O_2 por que posee un tiempo de vida mas largo, es un agente redox que se reduce en el interior de la célula y puede volver a oxidarse al interactuar con el oxígeno molecular, manteniendo una concentración de paraquat y O_2^- relativamente constante. La toxicidad del paraquat se da principalmente por dos factores a nivel celular. El primero, es por su rápida reacción con el oxígeno molecular, lo que genera O_2^- . Este puede conducir a la formación de especies reactivas más tóxicas como el H_2O_2 y el OH^- . Lo segundo, es por la reducción del paraquat oxidado por el NADPH (Suntres, 2002). Por lo tanto, el paraquat genera estrés por dos vías, la generación del O_2^- , que es un poderoso oxidante, y la oxidación directa del NADPH, que es necesario para la reducción de las ROS y sus blancos de oxidación.

El estudio del estrés oxidativo es importante ya que se ha relacionado a un sinfín de fenotipos bacterianos producto de la respuesta molecular. Se ha descrito, por ejemplo, que en bacterias hay un cese o reducción del crecimiento en varias condiciones de estrés incluyendo el estrés oxidativo (Imlay, 2014) y que esta detención de la replicación es prolongada, similar a lo observado bajo estrés por inanición de carbono, pero diferente al efecto del estrés por temperatura (Jozefczuk et al., 2010). También se ha observado que el estrés oxidativo induce la formación de biopelículas producto de una reducción de motilidad y aumento en la producción de exopolisacáridos (Gambino &

Cappitelli, 2017). Así mismo algunos miembros de una comunidad bacteriana entran en un estado parcialmente inactivo conocida como "persistencia" (Wu et al., 2012), donde se suprimen varias vías metabólicas, conservando activas aquellas que son parte de la respuesta a estrés (Cohen, et al, 2013; Lewis, 2010).

Bajo una condición de estrés oxidativo se pueden dañar varias macromoléculas, llevando a una muerte celular. Las moléculas dañadas pueden ser proteínas, lípidos, DNA y RNA, por lo que es muy importante para la célula, en este caso las bacterias, contar con mecanismos que puedan eliminar o reparar estas moléculas oxidadas (Imlay, 2008).

En proteínas, los aminoácidos cisteína y metionina que contienen azufre son particularmente vulnerables a la oxidación por ROS. Por otra parte, la exposición a agentes oxidantes puede llevar al desensamblaje de centros metálicos presentes en algunas enzimas. La liberación de iones metálicos como Fe^{+2} o Cu^{+2} puede catalizar la conversión de especies como el O_2^- y H_2O_2 en OH^- , que es mucho más reactivo (Shen et al., 2000).

Para el caso del DNA y RNA, la modificación de la base guanina es la más abundante y estudiada tanto en bacterias como en organismos eucariotas. Se ha descrito que el radical OH^- oxida la guanina a 8-hidroxi guanina (8-OHG) generando lesiones de base, lo que resulta en un apareamiento de bases erróneo con adenina, por lo que la aparición de esta base oxidada afecta a los procesos de transcripción y traducción (Hayakawa, et la., 2001).

En bacterias, se han descrito varios mecanismos enzimáticos de defensa, dentro de las cuales están la superóxido dismutasa (SOD), catalasas y peroxidasas. La enzima SOD, cataliza la dismutación del O_2^- para formar O_2 y H_2O_2 , en cambio las catalasas y las peroxidasas reducen el H_2O_2 (Imlay, 2014). En *E. coli* la regulación de la respuesta a este estrés depende del factor transcripcional OxyR y el factor sigma RpoS, que modulan la respuesta a H_2O_2 ; y los factores transcripcionales SoxRS que modulan la respuesta al O_2^- (Imlay, 2014; Pomposiello & Bruce, 2001). Sin embargo, la transcripción de estos genes de respuesta al estrés tarda aproximadamente 10 minutos en *E. coli* a lo cual debe adicionarse para la traducción de los genes entre 20 y 30 minutos (Davies, 1999; Jozefczuk et al., 2010). Por lo tanto, no se sabe cómo se regula la respuesta más inmediata a la exposición al estrés oxidativo. Estudiando la respuesta a otras condiciones de estrés, algunos autores han observado que los mecanismos de defensa no son regulados exclusivamente a nivel transcripcional. Por ejemplo, cambios en la aminoacilación o modificación de nucleótidos de tRNA controlan en parte la respuesta a condiciones de carencia de nutrientes, cambiando la eficiencia de traducción de genes ricos en codones decodificados por estos tRNA (Katz et al., 2016; Starzyk, 1984).

1.2. Estrés oxidativo y RNA

Estudios de búsquedas masivas a las consecuencias del estrés oxidativo en bacterias muestran cambios en la concentración o estado redox de macromoléculas asociadas a la traducción, entre ellas se encuentran proteínas

ribosomales, factores de elongación de la traducción, distintas aminoacil-tRNA sintetasas (aaRS) y proteínas que modifican los tRNA. Otros estudios han mostrado la oxidación del rRNA, mRNA y del tRNA en general (Katz & Orellana, 2012). Estos resultados hacen suponer que el estrés oxidativo induce importantes cambios en la traducción. Sin embargo, para la mayoría de estos casos no se ha descrito el efecto que estos cambios puedan tener ni a qué nivel se están generado.

La mayoría de las moléculas de RNA presentes en las células participan en la vía de síntesis de proteínas. Mientras que los mRNA proporcionan la información de la secuencia de codones, los rRNA y tRNA están involucrados directamente con la traducción del mensaje genético (Alberts et al., 2006), por lo que saber que pasa a este nivel cuando la bacteria se enfrenta al estrés oxidativo podría ayudar a entender muchas de las repuestas fenotípicas.

1.3. Características de los tRNA

Los tRNA son moléculas que tienen entre 76 a 90 nucleótidos de longitud, formando una estructura secundaria de hoja de trébol y una estructura terciaria en forma de L (Kanai, 2015). Son sintetizados como moléculas precursoras que luego son alteradas por eventos de maduración, que incluyen múltiples pasos como procesamiento, modificación post-transcripcional de nucleótidos y adición de CCA en el extremo 3' (Kirchner & Ignatova, 2014; Phizicky & Hopper, 2010). En la traducción la información contenida en la secuencia del mRNA en forma de codones es reconocida por el anticodón del tRNA y es utilizada para formar

una secuencia aminoacídica. Los codones corresponden a una secuencia de tres nucleótidos (tripleto) en el mRNA, pudiendo ser de las bases nitrogenadas, adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U). El conjunto de estas reglas para poder llegar a la síntesis de una nueva cadena polipeptídica se denomina Código Genético (Taylor & Coates, 1989).

Los tRNA son moléculas ubicuas que constituyen entre el 4-10 % en masa de todos los RNA celulares (Kanai, 2015) y son un componente fundamental de la maquinaria de traducción. La aminoacilación del tRNA es catalizada por 20 aminoacil tRNA sintetasas (aaRS) diferentes que son específicas para los 20 aminoácidos proteínogénicos. Cada una de las 20 aaRS en una célula debe distinguir su propio conjunto de tRNA isoaceptores, de los muchos tRNA no semejantes y catalizar eficazmente la unión covalente del aminoácido correcto en el extremo 3' de sólo estas especies. Para esto existen nucleótidos de identidad que se han descrito en el extremo aceptor, en la región del anticodón y con menos frecuencia en el resto de los brazos del tRNA. Primero el tRNA debe unirse al aminoácido específico (aminoacilación), en una segunda etapa, el ribosoma elige el tRNA correspondiente y con su actividad peptidil transferasa cataliza la formación del enlace peptídico (Pallanc et al., 1995).

El tRNA, además, puede participar de otras funciones celulares, por ejemplo, en la síntesis de compuestos antibacterianos, modificación de lípidos en la membrana, síntesis de péptidoglican, regulación de la degradación de proteínas y como precursores de otros aminoacil-tRNA (Giegé, 2008).

1.4. El código genético

El código genético comprende las 64 combinaciones posibles de tripletes de nucleótidos (codones), 61 codifican para 20 aminoácidos mientras que los otros 3 son codones de parada de la traducción (Alberts et al., 2006).

Algunos aminoácidos están codificados por múltiples codones dentro del código genético. Estos codones se denominan codones sinónimos y aunque tienen diferentes secuencias, codifican el mismo aminoácido. La frecuencia con que diferentes codones sinónimos se utilizan para un aminoácido particular varía mucho entre los diferentes organismos y entre genes de un mismo organismo, fenómeno que se conoce como el sesgo del uso de codón (Fredrick & Ibba, 2010). También hay diferentes genes que codifican para un determinado tRNA. Por ejemplo, en *E. coli* K12 los genes que codifican para el tRNA^{Gly} son seis y presentan tres anticodones que decodifican cuatro codones. Los codones GGU y GGC son utilizados con alta frecuencia mientras que los codones GGG y GGA son utilizados de forma poco frecuente en esta bacteria (tabla 1) (Chan & Lowe, 2009).

Tabla 1: Genes para tRNA^{Gly} y uso de codones para glicina en el genoma de *E. coli* K12 MG1655

Genes de tRNA ^{Gly}	Anticodón	Codones decodificados (frecuencia de uso*)
<i>glyV, glyW, glyX, glyY</i>	GCC	GGC (2.96%) GGU (2.47%)
<i>glyU</i>	CCC	GGG (1.11%)
<i>glyT</i>	UCC	GGA (0.79%) GGG (1.11%)

* Basado en datos disponibles en GtRNAdb (Chan & Lowe, 2009)

Entonces, hay una visión “transcripción céntrica” del estrés oxidativo, pero no se conoce bien el efecto de las oxidaciones en la maquinaria traduccional. Esperando que en bacterias la respuesta al estrés oxidativo sea regulada en parte a nivel traduccional, en este trabajo se estudió a *E. coli* una bacteria modelo, donde se han caracterizado las respuestas fisiológicas y regulaciones de la expresión génica, especialmente a nivel de transcriptoma bajo diferentes condiciones de estrés, incluido el estrés oxidativo.

Datos previos obtenidos por el grupo de investigación (2014), en donde se realizaron experimentos de aminoacilación, indican que en *E. coli* el tRNA^{Gly} activo disminuye entre un 30 y 40 % bajo estrés oxidativo causado por paraquat o H₂O₂. tRNA específicos para otros 9 aminoácidos que fueron probados bajo las mismas condiciones no mostraron cambios estadísticamente significativos (figura S1). Esto indicó un posible papel del tRNA^{Gly} en la modulación de la respuesta a estrés oxidativo. En este contexto, el objetivo principal de este

trabajo fue entender el papel que cumple el tRNA^{Gly} en la maquinaria traduccional en relación a la regulación de la respuesta adaptativa al estrés oxidativo. Se espera responder las siguientes preguntas, ¿Cuál(es) isoceptor(es) de tRNA^{Gly} se ven afectados? ¿Qué efectos tienen los cambios del tRNA^{Gly} sobre la respuesta fisiológica el estrés oxidativo? Para contestar a esto se planteó la siguiente hipótesis y objetivos:

1.5. Hipótesis

Cambios en la concentración de los isoceptores de tRNA^{Gly} modulan la respuesta de *Escherichia coli* K-12 MG1655 a estrés oxidativo.



1.6. Objetivo general

Evaluar los cambios en la concentración de los isoceptores de tRNA^{Gly} en condiciones de estrés oxidativo y sus consecuencias fenotípicas en *Escherichia coli* K-12 MG1655.

1.7. Objetivos específicos

- 1) Determinar el efecto del estrés oxidativo sobre la concentración de los isoceptores de tRNA^{Gly} en *E. coli* K-12 MG1655.
- 2) Analizar el efecto de diferencias de niveles de los isoceptores de tRNA^{Gly} sobre la respuesta al estrés oxidativo en *E. coli* K-12 MG1655.

2. METODOLOGÍA

2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivos

En este trabajo se utilizó la cepa *E. coli* K-12 MG1655 (Freddolino et al., 2012) y variantes genéticas transformadas con los plásmidos incluidos en la tabla 2. Estos plásmidos contienen genes de tRNA bajo el control del promotor TAC, inducible por IPTG.

Tabla 2: Plásmidos utilizados para el estudio.

Nombre	Descripción
pKK 223-3	Plásmido vacío
pKK 223-3-glyU	Plásmido que contiene gen <i>glyU</i>
pKK 223-3-glyV	Plásmido que contiene gen <i>glyV</i>
pKK 223-3-glyT	Plásmido que contiene gen <i>glyT</i>
pKK 223-3-tyrV	Plásmido que contiene gen <i>tyrV</i>

Para los experimentos de cuantificación de los isoaceptores de tRNA^{Gly} las cepas fueron cultivadas en caldo LB (1% Triptona, 0,5% Extracto de Levadura y 0,5% NaCl) a 37°C y 225 rpm hasta la fase exponencial (medida que corresponde a una densidad óptica entre 0,7-0,8 a 600 nm). En este punto un cultivo fue sometido a condición de estrés oxidativo agregando 1 mM de paraquat (Methyl Viologen Sigma # 856177) por 30 minutos y otro se mantuvo bajo las mismas condiciones utilizado como control (sin estrés oxidativo). Para

el caso de los experimentos con estrés inducido por H_2O_2 (Peróxido de Hidrógeno 30 %. Merck # 107209) se utilizó una concentración de 2,5 mM por 20 minutos.

El resto de los experimentos se realizaron en medio M9 (47,7 mM Na_2HPO_4 ; 22,0 mM KH_2PO_4 ; 8,6 mM NaCl; 18,7 mM NH_4Cl ; 2 mM $MgSO_4$; 0,1 mM $CaCl_2$). Para la mayoría de estos experimentos se suplementó el medio con 0,4 % glicerol, 50 $\mu g/ml$ glicina y 50 $\mu g/ml$ de cada aminoácido ramificado (Ile, Leu y Val), llamaremos simplemente M9 al medio que contenga los suplementos mencionados anteriormente. Los medios se suplementaron con estos aminoácidos ramificados ya que se conoce que el estrés oxidativo inactiva la enzima dihidroxi ácido deshidratasa, impidiendo la síntesis de aminoácidos ramificados (Imlay, 2008), lo que podría provocar resultados alterados por estrés de insuficiencia de aminoácidos (que no corresponde al objetivo de este estudio). Para los cultivos de las cepas que contienen plásmidos derivados de pKK 223-3 se adicionó 100 $\mu g/\mu l$ de ampicilina (AMP) y 100 μM de IPTG, para la selección e inducción del plásmido pKK 223-3.

2.2. Análisis Molecular

2.2.1. Extracción de RNA

A partir de 1,5 ml de cultivo en LB o 5 ml de cultivos en M9 se obtuvo un pellet de células bacterianas mediante centrifugación a 12.000 rpm por 3 minutos a 4 °C. Este se resuspendió en 50 µl de buffer de lisis (83 mM Tris HCl pH 6,8; 18 mM EDTA pH 8; 1,7% SDS; 1,6 % 2-mercaptoethanol) y se incubó a 37 °C por 3 minutos. Luego se agregó 1 ml de solución de Trizol, homogenizando con repetidos pipeteos, esto se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego para inducir la separación de la fase acuosa (que contiene el RNA) de la fase orgánica se adicionó 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 10 segundos y se centrifugó a 12.000 rpm por 15 minutos. El RNA se recuperó por precipitación con 500 µl de alcohol isopropílico por 10 minutos y centrifugación 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa y la cantidad mediante A_{260} . Adicionalmente, se evaluó posibles contaminaciones por fenol utilizando la razón A_{260}/A_{280} .

2.2.2. Determinación de cambios en los niveles totales de tRNA

Se purificó RNA a partir de cultivos de *E. coli* K-12 MG1655 en medio M9 (sin suplemento de aminoácidos ramificados) que fueron cultivadas en condiciones control o estresadas con 2,5 mM de H₂O₂ por 20 minutos o con 1 mM de paraquat por 30 minutos. 5 µg de RNA purificado fueron mezclados con 2 volúmenes de buffer de carga 2X (urea 8 M, azul de bromofenol 0,025 %, y

xilen cianol 0,025 %); luego se separaron por electroforesis en un gel al 8 % de acrilamida/bis acrilamida (19:1), 8 M de urea y 0,5X de buffer TBE (Tris-borato 0,045 M y EDTA 0,001 M). Finalmente fueron teñidos con Gel Red para su visualización.

2.2.3. Detección de tRNA mediante Northern Blot

Para realizar el Northern blot se utilizó RNA total extraído desde cultivos de *E. coli* K-12 MG1655 en medio LB con y sin paraquat 1 mM por 30 minutos. Se mezcló 2 µg de RNA con 2 volumen de buffer de carga 2X (urea 8 M, azul de bromofenol 0,025 %, y xilen cianol 0,025 %) y se denaturó a 95 °C por 2 minutos. Esto se cargó en un gel (10 X 7,5 cm) al 10 % de acrilamida/bis acrilamida (19:1), 8 M de urea y 0,5X de buffer TBE, antes de cargar las muestras el gel fue pre corrido a 150 volts por 30 minutos. La electroforesis se realizó en las mismas condiciones, por aproximadamente 90 minutos. El RNA luego se transfirió mediante electrotransferencia desde el gel a una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham Hybond-N+) en buffer TBE 0,5X a 20 volts por 2 horas. Una vez finalizada la transferencia la membrana se incubó con 12.000 Joules de UV para fijar el RNA. Luego se hibridaron las sondas biotiniladas contra un tRNA y el rRNA5S en la membrana. Se utilizaron tres de las sondas que tenían como blanco a los distintos isoaceptores del tRNA^{Gly}, mientras que las otras tenían como blanco el rRNA5S (control interno para la cuantificación posterior), o el tRNA^{Tyr}_V (control de no cambio en la

concentración). Además, se utilizaron 2 sondas no marcadas para mejorar la detección de los tRNA^{Gly_U} y tRNA^{Gly_T} (tabla 3). Las membranas se incubaron en solución de pre hibridación (SSC 6X, SDS 0,1%, reactivo Denhart's 5X y 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado) por 30 minutos a 43 °C y agitación. Se descartó la solución y se agregó solución de hibridación (SSC 6X, SDS 0,1 %, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado) y la cantidad de sonda correspondiente indicada en la tabla 3. Esto se incubó toda la noche a 43° C con agitación.

Tabla 3: Sondas utilizadas para Northern blot

tRNA blanco	Anticodón	Nombre	Secuencia 5'-3' *	Concentración utilizada (nM)
tRNA ^{Gly_U}	CCC	B-SONglyU	B-GAATCGAACCCCTCGTATAGAGCTTGGG	37
tRNA ^{Gly_T}	UCC	B-SONglyT	B-GAATCGAACCCGCATCATCAGCTTGG	37
tRNA ^{Gly_V} , tRNA ^{Gly_X} , tRNA ^{Gly_Y}	GCC	B-SONglyV	B-GACTCGAACTCGGACCCCGACCTTGGC	2,5
tRNA ^{tyr_V}	AUG	B-SONtyrV	B-GATTCGAACCTTCGAAGTCGATGACGGCAGAT	2,5
RNA 5S		B-SONRNA5S	B-TTCTGAGTTCGGCATGGGGTCAGGTGG	0,6
tRNA ^{Gly_U}	CCC	SON_glyU	GCGGGCGAAGGGAATCGAA	12
tRNA ^{Gly_T}	CCC	SON_glyT	GCGGGCAGCGGGAATCGAA	12

*B indica la incorporación de Biotina en la posición señalada.

Al día siguiente se eliminó la solución anterior y se adicionó solución de lavado A (SSC 2X y SDS 0,1 %) a temperatura ambiente por 3 minutos con agitación. Luego se eliminó la solución A y se lavó dos veces con solución de lavado B (SSC 0,1X y SDS 0,1 %) a 43 °C por 15 minutos y con agitación. Se eliminó la solución B y se adicionó solución de bloqueo (ácido maléico 1 M; NaCl 0,15 M a pH 7,5 y caseína 1 % p/v) por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Después se adicionó 1 mg/ml de estreptavidina-HRP (Thermo Fisher # 21126) a esta solución y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y agitación. Luego se lavó la membrana dos veces con solución de lavado (ácido maléico 1 M; NaCl 0,15 M a pH 7,5 y Tween 20 a 0,3 % v/v) por 15 minutos cada vez a temperatura ambiente y en agitación. Se eliminó la solución de lavado y se adicionó solución de detección (Tris-HCL 0,1 M y NaCl 0,1 M a pH 9,5) por 3 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la detección se hizo por quimioluminiscencia. Para esto la estreptavidina-HRP (unida a la biotina de la sonda) se detectó con un sustrato quimioluminiscente (kit Super Signal West pico Chemiluminescent Substrate. Thermo Fisher # 34580) que cubre la membrana, esta se envolvió en papel transparente y se expuso con ella una placa radiográfica por aproximadamente 15 minutos. Luego se sumergió la placa radiográfica en solución reveladora (AGFA G150) por unos minutos hasta ver las bandas. Posteriormente se lavó en agua destilada y finalmente en solución fijadora (AGFA G354).

2.3. Efectos fenotípicos de la sobreproducción de los isoaceptores de tRNA^{Gly} bajo estrés oxidativo.

Para los experimentos mencionados en esta sección las lecturas de absorbancia fueron realizadas en un lector Epoch BioTek.

2.3.1. Determinación de la relación entre la densidad óptica y el número de células de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA^{Gly}.

Se realizó una estimación de DO600 relacionada con unidades formadoras de colonias (UFC) de acuerdo al protocolo de Wiegand et al., 2008. Las cepas que sobreexpresan los isoaceptores de tRNA^{Gly} se cultivaron en medio M9 (suplementado con IPTG y AMP) a 37 °C toda la noche. A este cultivo se midió DO600, luego se hicieron diluciones seriadas de 10⁻² hasta la 10⁻⁷. Se sembraron 100 µl de las diluciones 10⁻⁴ hasta la 10⁻⁷ en placas con agar LB suplementado con 0,2 % de glucosa para la recuperación de células viables. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C y se contó el número de colonias por dilución.

2.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de paraquat en medio M9 de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA^{Gly}.

La CMI sobre las cepas que sobreexpresan los tRNA^{Gly} también fueron determinadas de acuerdo al mismo protocolo anterior (Wiegand et al., 2008). A partir de un cultivo de aproximadamente 16 horas en caldo M9 se preparó una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC/ml. Esta se diluyó 1/100 y luego se tomaron 50 μ l para sembrar en cada pocillo de una microplaca en un volumen final de 100 μ l por pocillo, quedando 5×10^5 UFC/ml por pocillo. Las concentraciones de paraquat que se utilizaron fueron entre 0,4 y 50 μ M. Las microplacas fueron incubadas a 37 °C a 200 rpm por 18 horas. El crecimiento se midió por absorbancia (DO) a 600 nm.

2.3.3. Determinación del efecto de paraquat sobre la fermentación de azúcares de las cepas que sobreproducen los isoaceptores de tRNA^{Gly}.

Para este estudio se utilizaron 3 azúcares: glucosa, lactosa y galactosa. Cultivos de 20 horas en medio M9 glicerol se diluyeron 1:10 en medio fresco, se incubaron hasta alcanzar una DO₆₀₀ entre 0,7–0,8. Muestras de estos cultivos fueron mezcladas con medio fresco para obtener suspensiones de DO₆₀₀ 0,2. Se tomaron 50 μ l de estas suspensiones y fueron colocados en cada pocillo de una microplaca que contenía los 50 μ l de medio de cultivo B (0,2 % del azúcar y

diferentes concentraciones de paraquat de 2 a 350 μM más 100 μM IPTG, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ AMP y 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de rojo fenol como indicador de pH), quedando DO600 final estimada de 0,1 por pocillo. Estos 100 μl finales se cultivaron en placas de 96 pocillos a 37 °C por 12 horas. Trascurrido este tiempo se eliminaron las células mediante centrifugación a 2500 rpm por 7 minutos para poder hacer lectura del sobrenadante, este se traspasó a otra microplaca para medir a una DO560 que permitía detectar el rojo del indicador de pH. El rojo fenol vira a un color amarillo cuando se acidifica el medio.



3. RESULTADOS

3.1. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles totales de tRNA

Como ya se mencionó, antecedentes del laboratorio (2014) muestran una disminución del tRNA^{Gly} activo en *E. coli* K-12 MG1655 bajo estrés oxidativo inducido por paraquat o H₂O₂ (figura S1). Lo primero fue determinar si la disminución era específica para el tRNA^{Gly} o un efecto global sobre el total de tRNA, para esto se analizaron muestras de RNA de *E. coli* cultivada en condiciones control y de estrés oxidativo inducido por paraquat y H₂O₂. En la figura 1 se pueden observar imágenes representativas de las electroforesis realizadas en este experimento, y el gráfico de la cuantificación densitométrica de las bandas correspondiente a los tRNA normalizada por la suma de las bandas de los rRNA 16S y 23S. Como resultado de este análisis, se determinó que en *E. coli* K12 MG1655 no se observa disminución global de tRNA bajo estrés oxidativo. Experimentos realizados en medio M9 y LB mostraron resultados similares (datos no mostrados). Por lo tanto, los resultados indican que no hay variación de los niveles globales de tRNA bajo estrés oxidativo.

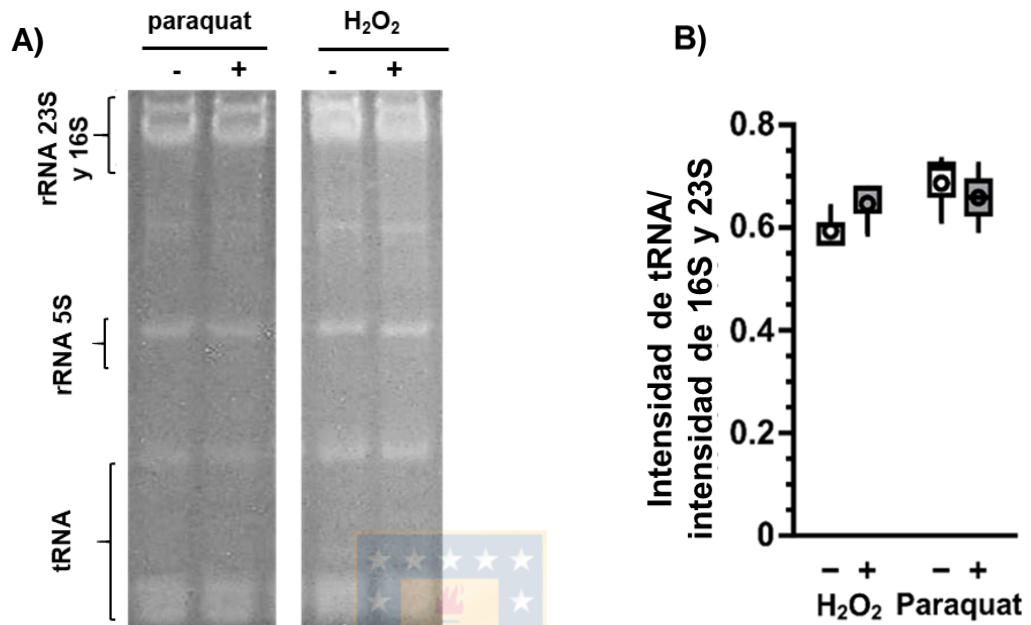


Figura 1: El estrés oxidativo no afecta los niveles de tRNA total.

A) Electroforesis en geles de poliacrilamida de RNA obtenido desde cultivos en medio M9 sin suplemento de aminoácidos. A la izquierda, RNA de muestra control y tratada con 1 mM de paraquat. A la derecha, RNA de muestra control y tratada con 2,5 mM de H₂O₂. B) Razón entre las intensidades de las bandas de RNA de bajo peso molecular (principalmente tRNA) y rRNA 16S y 23S.

Análisis estadístico: t-Test pareado (**P ≤ 0,05).

3.2. Efecto del estrés oxidativo sobre los niveles de los isoaceptores de tRNA^{Gly}

Dado que los antecedentes indicaban que había un efecto similar en los tRNA^{Gly} causado por paraquat y H₂O₂ y que ambos generan una disminución específica del tRNA^{Gly} activo (figura S1), se continuaron los experimentos de estrés oxidativo analizando únicamente el efecto generado por paraquat.

Mediante Northern blot se cuantificó los niveles de los tres isoaceptores de tRNA^{Gly} para determinar si el estrés oxidativo induce una disminución de todos los isoaceptores o de solamente uno(s) en particular. En la figura 2 se observan imágenes representativas de estos Northern blot, así como el resultado del análisis densitométrico de las bandas para cada tRNA^{Gly}. Para que este análisis de la cuantificación fuera estandarizado entre distintas extracciones de RNA se normalizó la intensidad de cada banda de tRNA por la banda del rRNA 5S. Se eligió este último como control ya que su tamaño y concentración celular son similares a la de los tRNA.

Contrario a lo esperado, los resultados indicaron que los niveles de los tres isoaceptores del tRNA^{Gly} se mantienen constante bajo estrés oxidativo respecto al control sin estrés. Además, estos resultados indicaron que no hay fragmentación ni acumulación de transcrito no procesado. Al momento de analizar la figura 2 es importante recordar que cada isoaceptor fue analizado con una sonda de DNA distinta, de manera que las razones tRNA/5S mostradas en la gráfica no son comparables entre los distintos isoaceptores, es decir, la

mayor intensidad de la señal del tRNA^{Gly_v} no indica que necesariamente éste se encuentre en mayor concentración que los otros isoceptores de tRNA^{Gly}.

Debido a que estos resultados indican que no hay cambios en los niveles los tRNA^{Gly} (figura 2), la disminución en los niveles de tRNA^{Gly} aminoacilable (figura S1) solo puede se explicada por una inactivación de algun(os) de los tRNA^{Gly} bajo estrés oxidativo.



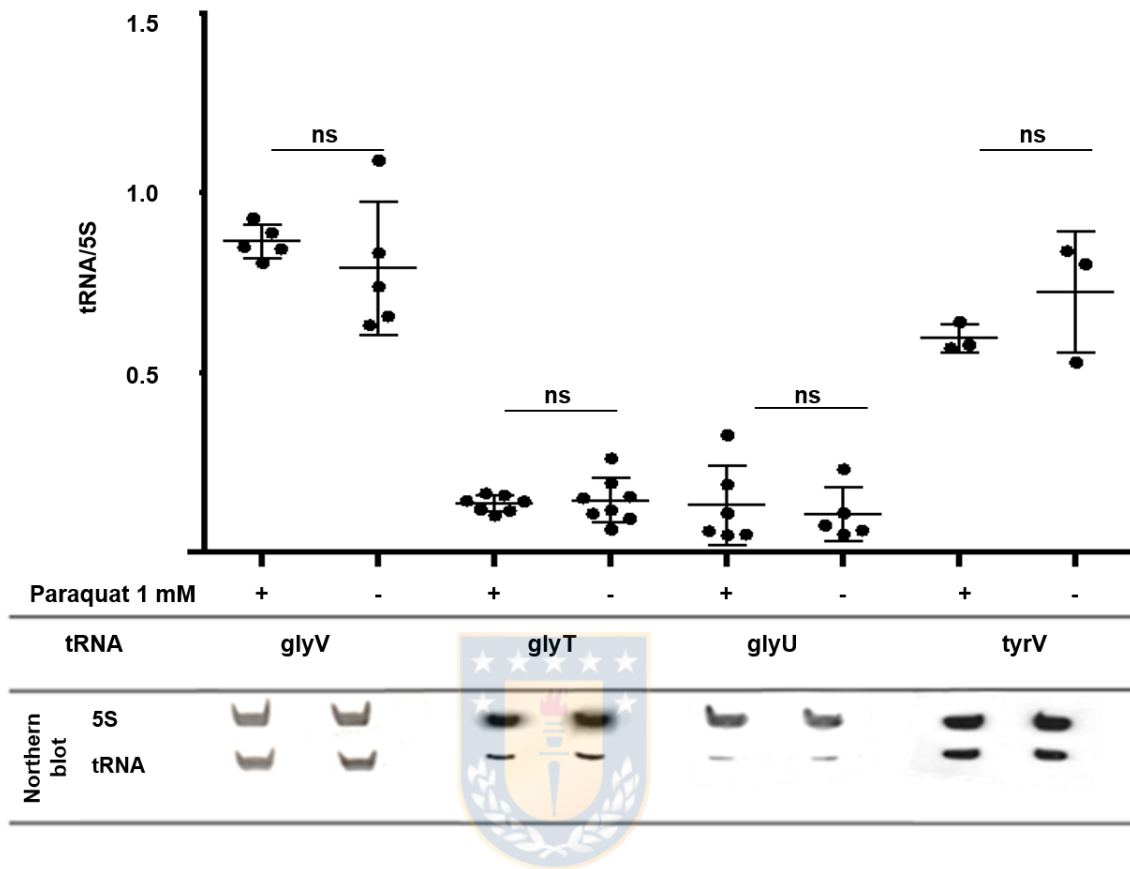


Figura 2: El estrés oxidativo no altera la concentración de los isoaceptores de tRNA^{Gly}. En la parte inferior se muestra imágenes representativas de experimentos de Northern blot realizados con muestras de *E. coli* cultivada en LB en presencia (+) y ausencia (-) de 1 mM paraquat. En la parte superior se muestra la cuantificación por densitometría de estas bandas. Los valores de las bandas de cada tRNA^{Gly} fueron normalizados por el valor correspondiente a la banda del rRNA 5S. Análisis estadístico: Grubbs' test y posterior T-test.

3.3. Efecto de los niveles de los isoaceptores de tRNA^{Gly} sobre la respuesta a estrés oxidativo

Con el fin de determinar si cambios en las concentraciones del tRNA^{Gly} pueden influenciar la respuesta al estrés oxidativo, se investigó el efecto de la sobreproducción de los isoaceptores de tRNA^{Gly} sobre algunos fenotipos asociados al estrés oxidativo. Los fenotipos estudiados fueron concentración mínima inhibitoria (CMI) de paraquat y utilización de diferentes azúcares. Debido a que algunos de los genes para tRNA^{Gly} están en copia única (tabla 2) y son esenciales, se sobreexpresaron y así se pudo prevenir su disminución. Se utilizaron plásmidos con los genes para cada tRNA^{Gly} (plásmidos bajo el control del promotor TAC, inducible por IPTG). En estos experimentos se utilizó como control una cepa con plásmido vacío (pKK 223-3) sin sobreexpresión de genes de tRNA. Además, como punto de comparación se utilizó una cepa que sobreproduce el tRNA^{Tyr_v} como control de no cambio (figura S1).

Antes de observar el efecto sobre el fenotipo bajo estrés oxidativo de estas cepas, se determinó si estas mostraban alguna diferencia morfológica importante al sobreproducir algunos de los tRNA. Esto se hizo debido a que cambios morfológicos alteran la DO de un cultivo y los experimentos posteriores debían realizarse con igual número de células. Como vemos en la figura 3 todas las cepas obtuvieron una relación UFC/DO en el mismo rango de magnitud (10^9), aunque la cepa que sobreproduce el gen *glyU* mostro una razón de aproximadamente el doble del valor de la cepa control (pKK 223-3). A partir de

estos resultados se infiere que el tamaño celular para la cepa que sobreexpresa el tRNA^{Gly}_U está levemente reducido en comparación con la cepa control que no sobreexpresa tRNA.

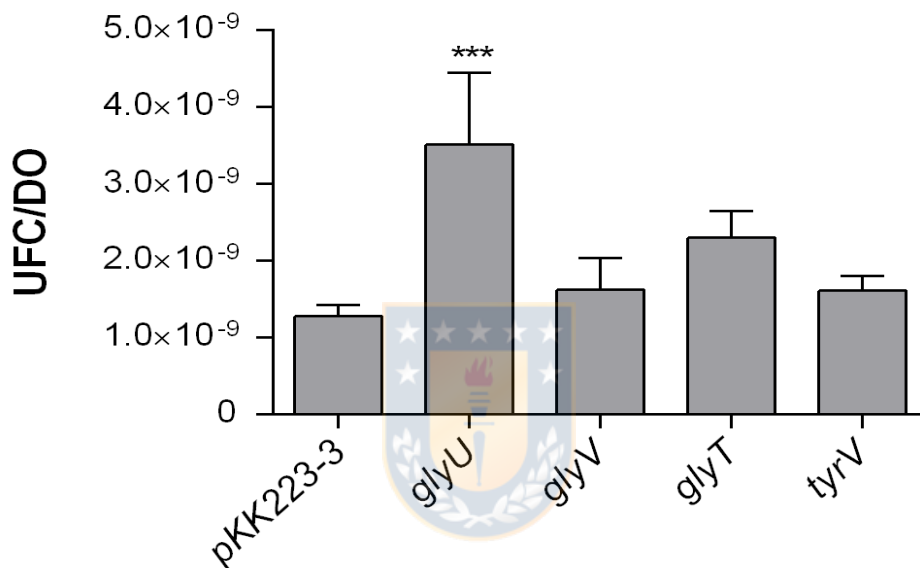


Figura 3: Aumento de los niveles de tRNA^{Gly}_U disminuye el tamaño celular de *E. coli* MG1655. Razón de UFC/DO de las cepas de *E. coli* K-12 MG1655 que sobreproducen los tRNA^{Gly}_U, tRNA^{Gly}_V, tRNA^{Gly}_T, y tRNA^{Tyr}_V en medio M9. Test estadístico: ***p ≤ 0,001 ANOVA una vía con prueba de Dunnett versus control.

Basado en esta equivalencia entre los valores de UFC y DO se estudió los efectos de la sobreproducción de cada isoceptor de tRNA sobre la respuesta al estrés oxidativo. Independiente del gen de tRNA^{Gly} que sea sobreexpresado, paraquat presento una CMI sobre todas las cepas en medio M9 con glicina de 25 μ M. Adicionalmente, se repitieron estos experimentos en medio M9 sin glicina donde se obtuvo la misma CMI, con la diferencia de que esta debía ser analizada a periodos más largos de incubación (por sobre las 24 horas), debido a que la velocidad de crecimiento disminuía fuertemente cuando el medio carecía de glicina.

En contraste a la ausencia de efectos sobre la CMI de paraquat, se observó un fuerte efecto sobre la fermentación de tres tipos de azúcares al sobreproducir los tRNA^{Gly} en condición de estrés oxidativo. En la figura 4 se observa que la sobreproducción de cualquier tRNA^{Gly} afectó la capacidad de fermentar los tres azúcares (glucosa, lactosa y arabinosa), ya que todas las cepas mostraron una mayor sensibilidad al paraquat respecto a la cepa control (pKK 223-3). Sin embargo, la cepa que sobreproduce el tRNA^{Gly_U} (línea roja) mostró una disminución de la fermentación a concentraciones de paraquat mucho menores que las otras cepas, efecto que se observó con los tres azúcares ensayados. Por lo tanto, esta es la cepa cuya fermentación fue más sensible a paraquat.

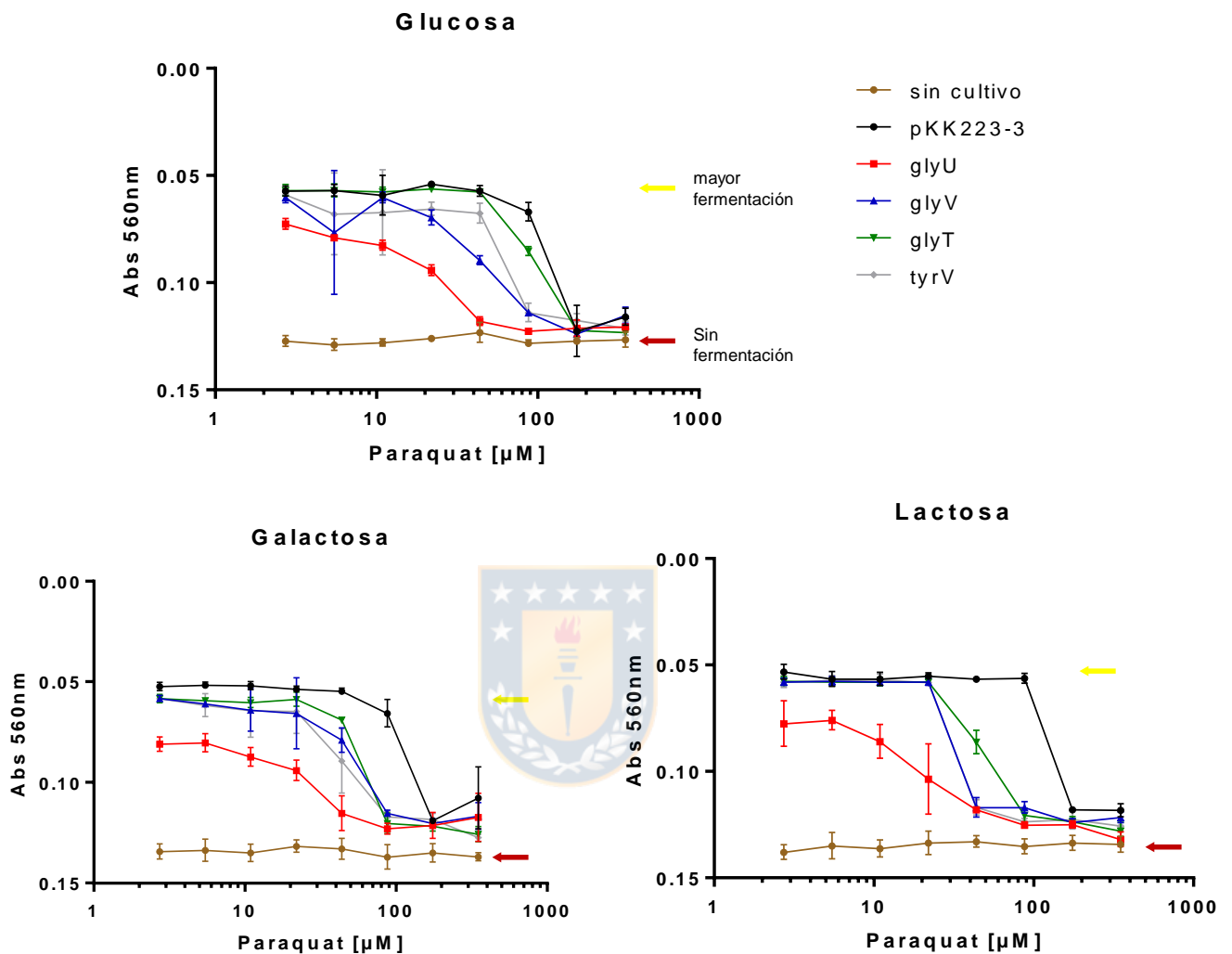


Figura 4: Sobreproducción de $\text{tRNA}^{\text{Gly}}_{\text{U}}$ aumenta la sensibilidad de la fermentación de azúcares al estrés oxidativo. Cepas de *E. coli* que sobreproducen los diferentes tRNA^{Gly} se cultivaron en microplaca con medio M9 suplementado con tres tipos de azúcares. El medio además contenía rojo fenol que permite seguir cambios en el pH mediante cambios en la Abs560. Valores más altos de Abs560 indican pH básico y, por lo tanto, ausencia de fermentación de azúcares, mientras que un medio más amarillo (menor Abs560) indica acidificación por fermentación de azúcar. Test estadístico: $p \leq 0,05$ ANOVA una vía con prueba de Dunnett versus control.

4.DISCUSIÓN

4.1. Niveles de tRNA^{Gly} en estrés oxidativo

Resultados previos del laboratorio indicaban una disminución global del tRNA^{Gly} activo (figura S1) en condiciones de estrés oxidativo. Considerando las distintas características que determinan la funcionalidad de los tRNA, las posibles causas que explicaban esta disminución del tRNA^{Gly} activo son: 1. una fragmentación del tRNA, 2. una disminución de la transcripción y/o procesamiento del transcrito y 3. un cambio en el patrón de modificaciones de los isoaceptores de tRNA^{Gly}. Como no se ven cambios en la concentración ni de especies de menor peso molecular, se puede descartar tanto cambios transcripcionales como los cambios en el procesamiento o estabilidad de los tRNA. Por lo tanto, la explicación más probable para la disminución del tRNA^{Gly} activo sería una inactivación específica de los isoaceptores de tRNA^{Gly} de *E. coli* bajo estrés oxidativo. Lo más probable es que la estructura de los tRNA^{Gly} esté adquiriendo o perdiendo modificaciones químicas, alterando sitios esenciales para el reconocimiento por la aminoacil tRNA sintetasa correspondiente (glicil-tRNA sintetasa, GlyRS) (Pallanck et al., 1995).

Un Northern blot no permite discriminar cambios en el patrón de modificaciones de los tRNA^{Gly}, como las oxidaciones causadas por el estrés oxidativo, salvo que altere la migración electroforética del tRNA o que la modificación ocurra en las secuencias reconocidas por la sonda y altere considerablemente la

temperatura de hibridación. Una alternativa para estudiar cambios en las modificaciones sería una purificación de los tRNA^{Gly} mediante métodos de cromatografía de afinidad, y posterior análisis de los nucleótidos por espectrometría de masa.

Contrario los resultados de esta tesis, un artículo publicado durante el desarrollo de esta reportó una disminución global de todos los tRNA en condiciones similares de estrés (Zhong et al., 2015). Al tratar de reproducir estos experimentos con la cepa de esta tesis, no observamos diferencias para el total de tRNA de *E. coli* (figura 1). Se cree que esta discrepancia pueda deberse a diferencias en las cepas utilizadas, por ejemplo, la cepa que ellos utilizaron fue *E. coli* BL21 (Daegelen et al., 2009), mientras que en esta tesis la *E. coli* MG1655 (Freddolino et al., 2012), las cuales derivan de las cepas *E. coli* B y *E. coli* K-12, respectivamente. Ambas cepas poseen genotipos diferentes debido a su distinto origen, además de mutaciones que se han introducido en cada una de ellas. (Freddolino et al., 2012; Jeong et al., 2015). Entre estas mutaciones, aquellas que afectan proteasas en la cepa BL21 podrían afectar la disponibilidad de aminoácidos durante la respuesta a estrés oxidativo (Daegelen et al., 2009), lo que podría estar afectando la estabilidad del tRNA total que ven aquellos autores (Svenningsen et al, 2017).

4.2. Papel del tRNA^{Gly} sobre fenotipos estudiados bajo estrés oxidativo

Para evaluar el papel de los tRNA^{Gly} sobre la respuesta fenotípica al estrés oxidativo se sobreexpresaron los genes de cada isoceptor de este tRNA^{Gly}. A pesar de que el experimento ideal hubiese sido reducir la concentración de cada isoceptor de tRNA^{Gly} y estudiar los fenotipos asociados simulando el estado se observó bajo estrés oxidativo, esta aproximación genética era difícil. Estos experimentos implican realizar mutantes de delección de algunos de los genes de tRNA y así disminuir la cantidad de transcrito disponible (tabla 1). Al sobreproducir cada isoceptor en *E. coli* se evita la disminución de tRNA^{Gly} bajo estrés oxidativo, produciendo el efecto contrario a lo que ocurría en una condición de estrés oxidativo en la cepa silvestre. Sin embargo, al analizar los resultados, es importante considerar que al aumentar los niveles de tRNA^{Gly} total también es posible que aumente la concentración de tRNA inactivo (o modificado) el que podría ser responsable de alguno de los fenotipos observados.

Dado que no se observaron diferencias al determinar la CMI de paraquat sobre cepas que sobreexpresan los isoceptores de tRNA^{Gly}, se puede inferir que cambios en la concentración de tRNA^{Gly} no están teniendo un papel fundamental en la respuesta para tolerar el estrés oxidativo. Sin embargo, en algunos fenotipos relacionados con el metabolismo de la bacteria sí se observa diferencias al sobreexpresar algunos de los tRNA^{Gly}. Por ejemplo, la fermentación de azúcares se altera drásticamente al sobreexpresar el tRNA^{Gly}_U.

Resultados similares fueron obtenidos en el laboratorio, donde la sobreexpresión de otros tRNA^{Gly} afecta fenotipos como la motilidad bacteriana y el rendimiento de las curvas de cultivo (figura S3). Se observó que la cepa con sobreproducción de tRNA^{Gly_V} es menos sensible que el resto a la pérdida de motilidad producida por el estrés oxidativo, y aquella que sobreexpresa el tRNA^{Gly_T} reduce el rendimiento de la curva de cultivo. Todos estos resultados permiten proponer que cada tRNA^{Gly} tiene un efecto específico bajo estrés oxidativo.

Entonces, los resultados de este trabajo en conjunto con los datos del laboratorio muestran una condición celular donde bajo estrés oxidativo hay menos tRNA^{Gly} aminoacilable como consecuencia de la formación de tRNA^{Gly} inactivo. Esto se correlaciona con otros de este mismo grupo de investigación donde se ha observado que la bacteria está generando un aumento de un segundo mensajero diadenosina tetrafosfato (Ap4A), indistintamente del isoceptor de tRNA^{Gly} que esté siendo sobreproducido. Este dinucleótido es producto de una reacción secundaria catalizada por la aminoacil-tRNA sintetasa. Estas activan el aminoácido para formar pirofosfato y aminoacil-adenilato. Luego, el aminoácido se transfiere del AMP (adenosín monofosfato) a la adenina terminal del tRNA. En ciertas condiciones la enzima puede catalizar una reacción alternativa y el AMP ahora sería transferido a otro nucleótido resultando en la liberación del aminoácido y un dinucleótido, que generalmente es Ap4A. (Despotović et al., 2017; Ismail et al., 2003). Al igual que estos

resultados, varios autores han observado un incremento del Ap4A frente a diversos tipos de estrés (Farr et al., Nishimura et al., 1997; Monds et al., 2010). Como la sobreproducción de los isoaceptores de tRNA^{Gly} inducen la producción de Ap4A bajo estrés oxidativo, es posible que al menos parte de los fenotipos que se observan derivarán del aumento de la síntesis de Ap4A bajo estrés oxidativo inducido por un aumento del tRNA^{Gly} modificado. Pero como se mencionó, la sobreproducción de cualquiera de los tRNA^{Gly} muestra un aumento similar de los niveles de Ap4A bajo estrés oxidativo. Por consiguiente, se esperaba ver el mismo efecto de los tRNA^{Gly} sobre la fermentación de azúcares y otros fenotipos. Sin embargo, como ya se mostró en este trabajo y en conjunto a los datos suplementarios se concluye que la respuesta es específica para cada isoceptor y no dependiente del Ap4A. Lo que sí podría estar influyendo en las respuestas fenotípicas observadas, es una regulación de la velocidad de traducción de los codones para glicina como se muestra en antecedentes del laboratorio. Por ello se cree que los fenotipos no son producto del aumento del Ap4A, sino que probablemente, son consecuencia de cambios en la eficiencia de traducción de los codones que decodifican. Como cada isoceptor de tRNA^{Gly} decodifica un conjunto diferente de codones, esto podría potencialmente explicar las diferencias en los fenotipos producidos por un exceso de producción de cada uno de ellos.

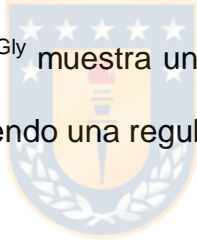
Asumiendo que el efecto observado al sobreproducir los tRNA^{Gly} sea contrario a lo que ocurre en la cepa silvestre bajo estrés oxidativo, ya que en dicha

condición disminuye el tRNA^{Gly} activo, se propone que la bacteria está utilizando este tRNA como vía de señalización para adaptar su metabolismo, movilidad y capacidad replicativa, lo cual sería beneficioso para la bacteria, ya que el dejar de crecer y estar inmóviles podría promover la formación de biopelícula donde quedan protegidas del estrés oxidativo (Gambino & Cappitelli, 2017). Sin embargo, es difícil determinar si estos cambios son consecuencia directa del aumento de dichos tRNA o consecuencia de la disminución en el grado de aminoacilación de otros tRNA^{Gly} al sobreproducir uno de ellos que compiten por la misma glicil-tRNA sintetasa. De todos modos, estos resultados muestran la importancia de los tRNA^{Gly} en modular la respuesta al estrés oxidativo.



5. CONCLUSIONES

- Los niveles de cada isoceptor de tRNA^{Gly} no son afectados por el estrés oxidativo, lo que indica que cambios de niveles de tRNA^{Gly} activo, previamente observados sea por modificaciones químicas producto de este estrés, las cuales impiden que este sea aminoacilado.
- El tRNA^{Gly} no afecta la CMI de paraquat en *E. coli*.
- La sobreproducción de los tres isoceptores de tRNA^{Gly} aumentan la sensibilidad de la fermentación de azúcares al estrés oxidativo. Sin embargo, el efecto es mucho mayor para el tRNA^{Gly_U}.
- Cada isoceptor de tRNA^{Gly} muestra un efecto específico sobre la respuesta al estrés oxidativo, sugiriendo una regulación a nivel traduccional.



6. PROYECCIONES

Una de las proyecciones más inmediata para continuar con este trabajo es determinar qué modificación química es responsable de la inactivación de los tRNA^{Gly}. Para esto se propone efectuar una purificación de los tRNA^{Gly} para posteriormente realizar un análisis de los nucleótidos modificados a través de espectrometría de masa. Esto permitiría plantear los posibles mecanismos que expliquen dichas modificaciones, y entender por qué únicamente se observan cambios significativos en los niveles de tRNA^{Gly} activo y no en otros tRNA.

En este trabajo se observaron diferencias en la fermentación de azúcares bajo estrés oxidativo a distintos niveles de tRNA^{Gly}. Sin embargo, se desconoce qué otras rutas bioquímicas pueden estar siendo afectadas frente a los cambios en los niveles de los tRNA. Es por eso por lo que resultaría interesante realizar un análisis global de cambios en el metabolismo. Una alternativa es construir una batería con condiciones de cultivo no analizadas, para poder generar una vista más acabada. Otra alternativa es efectuar un análisis global de metabolitos mediante espectrometría de masa y, de esta manera, observar los cambios en la concentración de sustratos en distintas vías.

Finalmente, sería interesante incluir en el análisis nuevos fenotipos asociados a estrés, como formación de biopelículas y células persistoras, así como también ver si esta regulación de los tRNA^{Gly} está presente en otras cepas de *E. coli* de interés clínico y su papel en la respuesta a otros tipos de estrés.

7. REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Walter, P. (2006). *Introducción a la Biología Celular* (2a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Arts, I. S., Gennaris, A., & Collet, J. (2015). Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Letters*, 589(14), 1559–1568.
- Botelho, R., Froes, F., & Santos, J. (2012). Toxicity of herbicides on *Escherichia coli* growth. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1), 141–146.
- Chan, P. P., & Lowe, T. M. (2009). GtRNAdb : a database of transfer RNA genes detected in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 37, 93–97.
- Cohen, N. R., Lobritz, M. A., & Collins, J. J. (2013). Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe*, 13(6), 632–642.
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B , and the Derivation of B Strains REL606 and BL21 (DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643.
- Davies, K. J. A. (1999). The Broad Spectrum of Responses to Oxidants in Proliferating Cells : A New Paradigm for Oxidative Stress. *Life*, 48, 41–47.
- Despotović, D., Brandis, A., Savidor, A., Levin, Y., Fumagalli, L., & Tawfik, D. S. (2017). Diadenosine tetraphosphate (Ap4A) – an *E. coli* alarmone or a damage metabolite? *The FEBS Journal*, 284, 2194–2215.
- Farr, S. B., Arnosti, D. N., Chamberlin, M. J., & Amest, B. N. (1989). An apaH mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Genetics*, 86, 5010–5014.
- Freddolino, P. L., Amini, S., & Tavazoie, S. (2012). Newly Identified Genetic Variations in Common *Escherichia coli* MG1655 Stock Cultures. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 303–306.

- Fredrick, K., & Ibba, M. (2010). How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell*, 141(2), 227–229.
- Gambino, M., & Cappitelli, F. (2017). Mini-review : Biofilm responses to oxidative stress Mini-review : Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32(2), 167–178.
- Giegé, R. (2008). Toward a more complete view of tRNA biology. *Nature structural & molecular biology*, 15(10), 1007–1014.
- Hayakawa, H., Kuwano, M., & Sekiguchi, M. (2001). Specific Binding of 8-Oxoguanine-Containing RNA to Polynucleotide. *Biochemistry*, 40, 9977–9982.
- Imlay, J. A. (2008). Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 755–776
- Imlay, J. A. (2014). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress : lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 443–454.
- Ismail, T. M., Hart, C. A., & Mclennan, A. G. (2003). Regulation of Dinucleoside Polyphosphate Pools by the YgdP and ApaH Hydrolases Is Essential for the Ability of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to Invade Cultured Mammalian Cells. *Biological Chemistry*, 278(35), 32602–32607.
- Jeong, H., Kim, J., & Lee, J. (2015). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* Strain BL21. *Genome Announcements*, 3(2), 2015.
- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-inostroza, A., Steinhauser, D., Willmitzer, L. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 6(364), 1–16.
- Kanai, A. (2015). Disrupted tRNA Genes and tRNA Fragments: A Perspective on tRNA Gene Evolution, *Life*, 5, 321–331.

- Katz, A., Elgamal, S., Rajkovic, A., & Ibba, M. (2016). Micro Review Non-canonical roles of tRNAs and tRNA mimics in bacterial cell biology. *Molecular Microbiology*, 101(4), 545–558.
- Katz, A., & Orellana, O. (2012). Protein Synthesis and the Stress Response. *Cell-Free Protein Synthesis*. InTech, 111–134.
- Kirchner, S., & Ignatova, Z. (2014). Emerging roles of tRNA in adaptive translation , signalling dynamics and disease. *Nature Publishing Group*, 16(2), 98–112.
- Lewis, K. (2010). Persister Cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357–72.
- Liu, M., Gong, X., Alluri, R. K., Wu, J., Sablo, T., & Li, Z. (2012). Characterization of RNA damage under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biological Chemistry*, 393(3), 123–132.
- Mark B. Hampton, Anthony J. Kettle, & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. *The Journal of The American Society of Hematology*, 92(9), 3007–3017.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Wagner, J. C., Schwartzman, J. A., Lu, W., Rabinowitz, J. D., & Toole, G. A. O. (2010). Di-Adenosine Tetraphosphate (Ap4A) Metabolism Impacts Biofilm Formation by *Pseudomonas fluorescens* via Modulation of c-di-GMP-Dependent Pathways. *Bacteriology*, 192(12), 3011–3023.
- Nishimura, A., Moriya, S., Ukai, H., Nagai, K., Wachi, M., & Yamada, Y. (1997). Diadenosine 5'5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A) controls the timing of cell division in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*, 2, 401–413.
- Pallanck, L., Pak, M., & Schulman, M. (1995). tRNA Discrimination in Aminoacylation. *ASM Press*, 18, 371–394.
- Phizicky, E. M., & Hopper, A. K. (2010). tRNA biology charges to the front, *Genes & Development* 24, 1832–1860.
- Pomposiello Pablo, & Bruce, D. (2001). Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Cell Press*, 19(3), 109–114.

- Quesada-Gómez, C. (2008). Daño y respuesta al estrés oxidativo en bacterias del género *Bacteroides*: resistencia a los antimicrobianos y mecanismos de virulencia. *Biomédica*, 19(3), 162–168.
- Shen, Z., Wu, W., & Hnazen, S. L. (2000). Activated Leukocytes Oxidatively Damage DNA, RNA, and the Nucleotide Pool through Halide-Dependent Formation of Hydroxyl Radical. *Biochemistry*, 39, 5474–5482.
- Slauch, J. M. (2012). How does the oxidative burst macrophages kill? Still an open question. *Molecular Microbiology*, 80(3), 580–583.
- Starzyk, R. (1984). tRNA base modifications and gene regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 9, 334–335.
- Suntres, Z. E. (2002). Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology*, 180, 65–77.
- Svenningsen SL, Kongstad M, Stenum TS, Muñoz-Gómez AJ, S. M. (2017). Transfer RNA is highly unstable during early amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 45(2), 793–804.
- Taylor, F., & Coates, D. (1989). The code within the codons. *Biosystems*, 22(3), 177–187.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175.
- Wu, Y., Vulic, M., Keren, I., & Lewis, K. (2012). Role of Oxidative Stress in Persister Tolerance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4922–4926.
- Zhong, J., Xiao, C., Gu, W., Du, G., Sun, X., He, Q. Y., & Zhang, G. (2015). Transfer RNAs Mediate the Rapid Adaptation of *Escherichia coli* to Oxidative Stress. *PLoS Genetics*, 11(6), 1–24.

8. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

En esta sección se adjuntan resultados obtenidos por otros integrantes del mismo grupo de investigación del laboratorio.

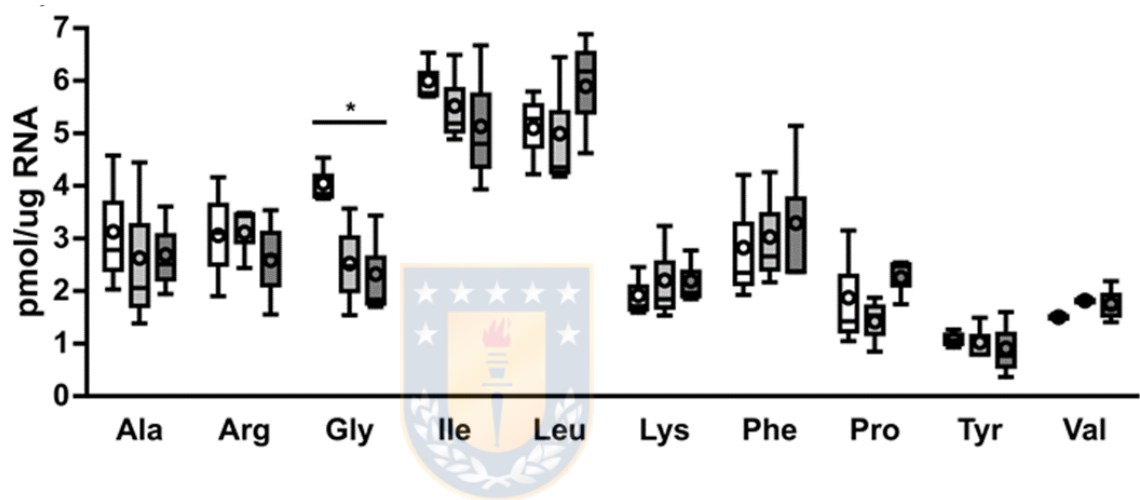


Figura suplementaria 1 (S1). tRNA^{Gly} activo disminuye en condición de estrés oxidativo.

Efecto del estrés oxidativo en los niveles de tRNA activo específica para diez aminoácidos diferentes, medida por el plato de la reacción de aminoacilación. El tRNA total se purificó a partir de células de *E. coli* cultivadas en condición control (LB, barras blancas) o condiciones de estrés oxidativo (LB mas paraquat 1 mM, barras de color gris claro o H₂O₂ 2,5 mM, barras de color gris oscuro). Los isoaceptores de tRNA específicos se cuantificaron a partir del plato de la reacción de aminoacilación usando un extracto de S100 y los correspondientes aminoácidos radiactivos.

* $p \leq 0,01$ ANOVA una vía con prueba de Dunnett versus Control posterior para cada aminoácido.

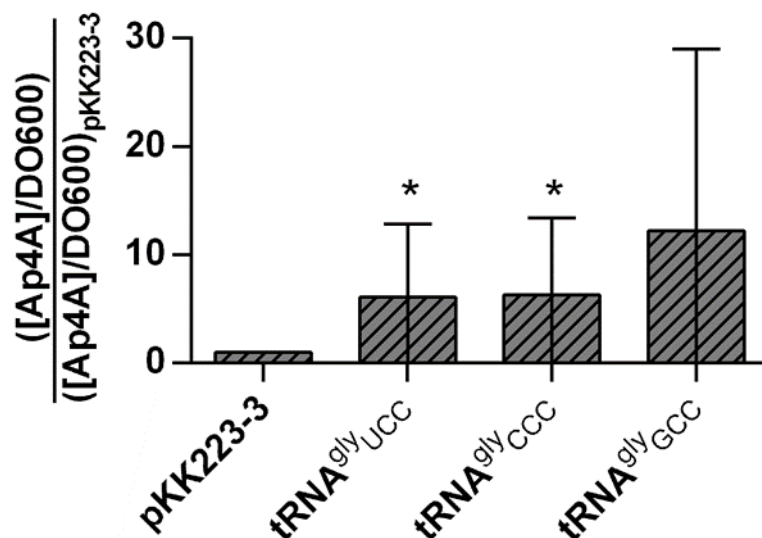


Figura suplementaria 2 (S2). Sobreexpresión de tRNA^{Gly} altera los niveles *in vivo* de Ap4A en *E. coli* en condiciones de estrés oxidativo.

Las cepas se cultivaron en medios bajos en fosfato suplementados con aminoácidos ramificados, glicina y AMP. A una DO600 ~ 0,7. Se añadió paraquat (700 μ M) al cultivo restante. Se tomaron muestras antes y una hora después de la adición de paraquat. El Ap4A solo fue detectable en las muestras estresadas. Los datos se expresan como concentración nanomolar de Ap4A normalizado por la DO600 del cultivo. Los valores se normalizaron dividiendo por el valor obtenido para las cepas de control que llevan el plásmido sin tRNA. * $p \leq 0.05$, test Wilcoxon signed-rank, valor hipotético= 1.0.

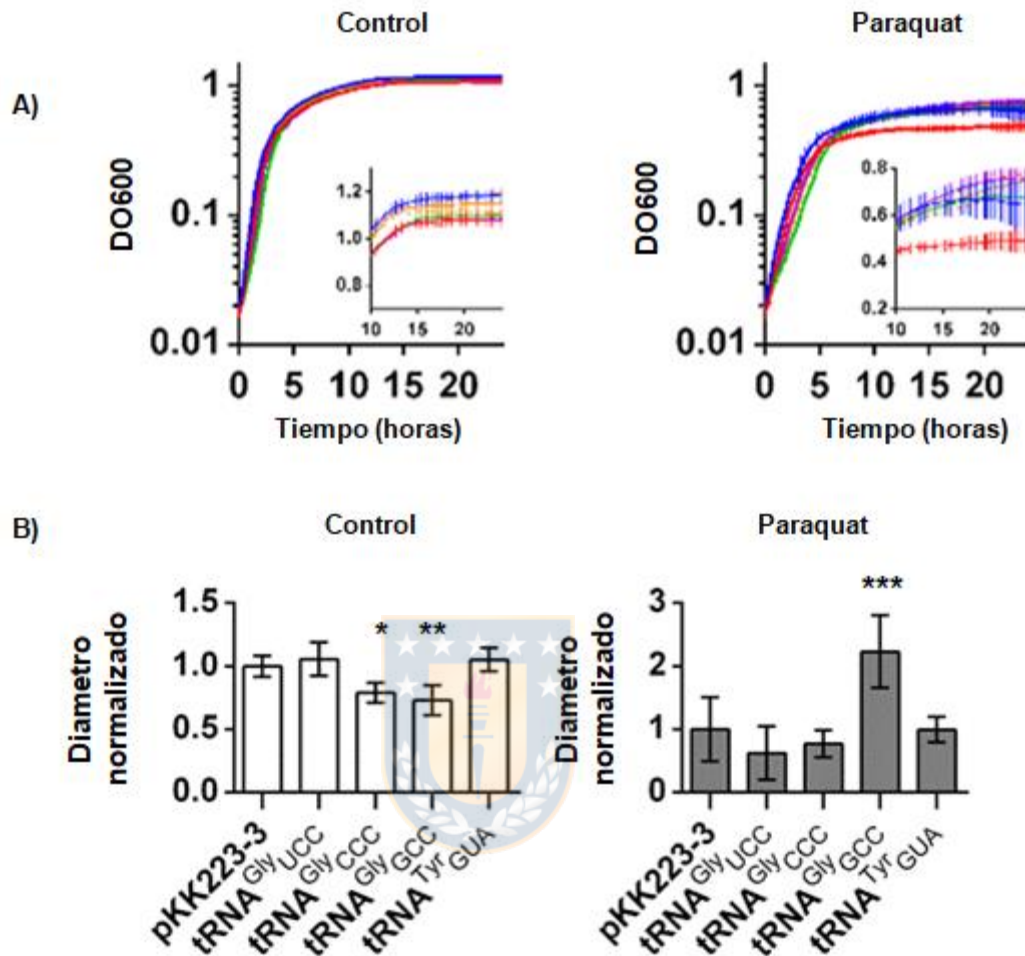


Figura suplementaria 3 (S3). Sobreproducción de tRNA^{Gly} altera la respuesta de *E. coli* al estrés oxidativo. A) Efectos sobre las curvas de crecimiento. En la izquierda cultivos en medios control LB, y a la derecha el cultivo estresado (1 mM de paraquat). El gráfico inserto muestra los mismos datos en escala lineal para puntos de tiempo superiores a 10 horas. tRNA^{Gly}_{CCC}: verde, tRNA^{Gly}_{GCC}: púrpura, tRNA^{Gly}_{UCC}: rojo, tRNA^{Tyr}_{GUA}: naranja, plásmido pKK223-3 vacío: azul. B) Efecto sobre la movilidad. Apartir de cultivos de crecimiento exponencial se inocularon placas de LB que contenían 0,3 % de agar. En la izquierda la condición control que fueron cultivadas durante 8 hrs. y a la derecha la condición estresada (500 μ M de paraquat) cultivada por 24 hrs. Los datos en gráfico representan el diámetro de las colonias normalizadas dividiendo por el diámetro promedio de las células control. **** $p \leq 0.0001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, one way ANOVA con Dunnett versus cepa control (plásmido vacío en la condición correspondiente).