

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Caracterización parcial de una lipoproteína del colifago
mEp021 involucrada en la exclusión a la superinfección”**

Tesis que Presenta

I.B.T. Carlos Eduardo Martínez Soto

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

En la especialidad de

Genética Y Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, en el laboratorio número 5 bajo la dirección del Doctor (PhD) Luis Yoshio Kameyama Kawabe. Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría: número de registro curriculum vitae único 777666.

Agradezco enormemente al CONACYT y al CINVESTAV-IPN por financiar y apoyarme durante mis estudios de Posgrado en esta institución.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco a mis padres José Luis Y María Guadalupe por su apoyo y amor incondicional, por motivarme todos los días y darme los recursos y armas necesarias para concluir con mi formación profesional, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano mayor Luis por apoyarme todos los días, decirme que nada es imposible y siempre estar al pendiente de mí, sé que siempre puedo contar contigo. A mi hermano Andrés por motivarme y apoyarme en todo, sé que siempre puedo confiar en ti Kovu, ¡I love You! A mi hermano Javier por siempre sacarme una sonrisa en cualquier momento, apoyarme y confiar en mí, gracias hermano.

A mi novia Sonia, por estar siempre a mi lado, darme su amor y apoyarme en todas mis metas y sueños, te amo con todo mi corazón.

A todos mis compañeros de laboratorio Lupita, Elisa, Roxana, Honorio, Noé y Esmeralda, muchas gracias por todo su apoyo, consejos y por aguantarme todos los días con mis ocurrencias, mi estancia en el laboratorio no hubiese sido lo mismo sin ustedes, ¡gracias!

De manera muy especial a la Dra. Eva Martínez, muchísimas gracias por todos tus consejos, tu apoyo y tus regaños... ¡Este proyecto no hubiese sido lo mismo sin todo tu apoyo!

Agradezco a todo el personal administrativo y técnico del CINVESTAV, gracias a Arturo Rojas, Gabriela Mora, M en C. Rosa María García Pérez, Guadalupe Aguilar, gracias por toda su ayuda durante mi estancia.

Gracias en especial a mis asesores Dr. G. Guarneros, Dr. J. Hernández y Dra. R. Bermúdez, gracias por todos sus consejos y apoyo, sin duda su mentoría me ha convertido en una mejor persona tanto profesional como académicamente.

Agradezco enormemente al Dr. Luis Kameyama, gracias por todo el apoyo que me brindó durante mi trabajo de tesis y durante los cursos de maestría, gracias por ser una persona sencilla y amable. Gracias por recibirme en el laboratorio y por instruirme todos los días durante mi trabajo, lo admiro mucho, es una gran persona.

Por último, a todos mis compañeros del departamento de Genética y Biología Molecular, gracias a Mauricio, Alex González, Juan de Dios, Mateo, Fer, Sergio, Evelyn, Alex Ramírez, Ariana, Chano, ¡los quiero amigos!

CONTENIDO	
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA	3
RESUMEN	10
SUMMARY.....	11
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bacteriófagos.....	1
1.2 Clasificación de bacteriófagos	1
1.3 Ciclo replicativo de los bacteriófagos	2
1.4 Conversión lisogénica.....	3
1.5 Mecanismos de resistencia a la infección por bacteriófagos	4
1.5.1 Mecanismo de proteínas de exclusión	5
1.5.1.1 Evitando la adsorción del fago	5
1.5.1.2 Mecanismo de bloqueo de la inyección de DNA fágico.	7
1.5.1.3 Mecanismo de infección abortiva.....	8
1.6 Exclusión a la superinfección	9
1.7 Lipoproteínas de exclusión en bacteriófagos	10
1.8 Lipoproteínas de membrana.....	11
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 Bacteriófago mEp021	13
2.2 Lipoproteína Cor del bacteriófago mEp167	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. HIPÓTESIS.....	18
5. OBJETIVO.....	19
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS	21
7.1 Bacterias, bacteriófagos, y plásmidos	21
7.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	23
7.3 Propagación del fago mEp021 y λ	23
7.4 Obtención de lisados de mEp021 y λ	23
7.5 Titulación de los fagos mEp021 y λ	24
7.6 Extracción de DNA del fago mEp021 mediante DEAE-celulosa.....	24
7.7 Caracterización enzimática del genoma de mEp021.....	25

7.8 Análisis <i>in silico</i> de la posible lipoproteína de exclusión de mEp021 (ORF81)	26
7.9 Amplificación del gen que codifica para la posible proteína de exclusión (ORF81)	26
7.10 Purificación del fragmento correspondiente al ORF81	28
7.11 Clonación del ORF81 en el vector de transición pJET1.2/Blunt	28
7.12 Selección de candidatas con inserto de interés	29
7.13 Clonación del ORF81 en el vector de expresión pKQV4	30
7.14 Preparación de bacterias quimiocompetentes	31
7.15 Trasformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico	31
7.16 Extracción del DNA plasmídico	31
7.17 Secuenciación de DNA	32
7.18 Ensayo de infección/exclusión	33
7.19 Curva de crecimiento de W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con diferentes concentraciones de inductor	34
7.20 Ensayo de infección/exclusión en cepas JW3996 (<i>lamB</i> ⁻) y C600 (<i>fhuA</i> ⁻)	34
7.21 Ensayo de adsorción	35
7.22 Expresión e inmunodetección de la proteína codificada por el ORF81	35
7.22.1 Expresión de ORF81 en W3110	35
7.22.2 Preparación del gel de proteínas	36
7.22.3 Tinción de plata	37
7.22.4 Western Blot	37
7.23 Fraccionamiento de la bacteria	38
8. RESULTADOS	39
8.1 Análisis <i>in silico</i> del ORF81	39
8.1.1 Análisis de BLASTp de Lpp ^{mEp021}	40
8.1.2 Búsqueda de dominios conservados	40
8.1.3 Búsqueda de secuencias “Lipobox” y comparación con proteínas de exclusión	41
8.1.4 Búsqueda de promotores y terminadores cercanos al ORF81	42
8.1.5 Predicción de estructura tridimensional por I-TASSER	43
8.2 Propagación y caracterización de mEp021	44
8.3 Clonación del ORF81 en vector de transición y expresión	45

8.3.1 Amplificación del ORF81 mediante PCR	45
8.3.2 Clonación del ORF81 en vector de transición pJET1.2/blunt.....	46
8.3.3 Clonación en el vector de expresión pKQV4.....	48
8.4 Ensayo de infección/exclusión en W3110/pORF81	50
8.5 Inducción de pORF81 y su efecto sobre la viabilidad celular	52
8.6 Ensayo de infección/exclusión en cepas JW3996 (λ MB ⁻) y C600 (λ fhuA ⁻)...	53
8.7 Ensayo de infección en mutantes para proteínas de membrana (<i>Keio collection</i>)	55
8.8 Ensayo de adsorción en W3110/pORF81	58
8.8 Ensayo de infección/exclusión de W3110 (mEp021) y W3110/pORF81 con los bacteriófagos del grupo de inmunidad I.	61
8.8 Amplificación del ORF81 en los fagos del grupo de inmunidad I.....	62
8.9 Ensayo de infección/exclusión de W3110/pRep ⁰²¹	63
8.10 Construcción de pORF81 más 6xHis tag en C-terminal	66
8.11 Expresión de Lpp ^{mEp021} en la cepa W3110	69
8.12 Localización de Lpp ^{mEp021} mediante fraccionamiento celular y Western Blot	72
9. DISCUSIÓN	74
10.CONCLUSIONES	82
11. PERSPECTIVAS	83
12. REFERENCIAS	84
13. APÉNDICES	88
14. ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos replicativos desarrollados por los bacteriófagos.	3
Figura 2. Resistencia bacteriana en función a las etapas de infección del fago.	5
Figura 3. Mecanismos para que evitan la adsorción del fago.....	7
Figura 5. Modelo de infección abortiva del sistema Rex.	9
Figura 6. Exclusión a la superinfección en bacterias.....	10
Figura 7. Ruta de maduración y exporte de lipoproteínas en Gram negativas.	12
Figura 8. Microscopía electrónica del bacteriófago mEp021	14
Figura 9. Proteínas estructurales de mEp021.	14
Figura 10. Fenotipo hemolítico de <i>E. coli</i> MC4100 (hlyE+) con el profago mEp021.....	15
Figura 11. Diluciones de un lisado de bacteriófagos.	24
Figura 12. Localización genómica de la posible proteína de exclusión (ORF81) de mEp021.	26
Figura 13. Localización del ORF81 en el genoma de mEp021.	39
Figura 14. Búsqueda de dominios utilizando el servidor InterPro.....	41
Figura 15. Localización de la secuencia “lipobox” en Lpp ^{mEp021}	42
Figura 16. Alineamiento con lipoproteínas caracterizadas en otros bacteriófagos.....	42
Figura 17. Localización de los promotores y terminador adyacente al ORF81.....	43
Figura 18. Predicción de estructura tridimensional de Lpp ^{mEp021} por I-TASSER.....	44
Figura 19. Título viral del fago mEp021 y λ en la cepa <i>E. coli</i> W3110.....	44
Figura 20. Integridad y patrón de restricción del DNA de mEp021.....	45
Figura 21. Características y amplificación del ORF81.....	46
Figura 22. Caracterización de candidatas pJET/ORF81.	47
Figura 23. Alineamiento de la secuenciación de las candidatas “C.2” y “C.3” para pJET/ORF81	48
Figura 24. Restricción de candidatas pKQV4/ORF81.	49
Figura 25. Alineamiento de la secuenciación de las candidatas “4D” y la secuencia <i>in silico</i> para pKQV4/ORF81.	49

Figura 26. Ensayo de infección/exclusión sin inductor (0mM IPTG) en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021J ^{Δ1kb} , λ y mEp167. N=3.	50
Figura 27. Ensayo de infección/exclusión con 0.1mM de IPTG en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021J ^{Δ1kb} , λ y mEp167.	51
Figura 28. Ensayo de infección/exclusión con 0.25mM de IPTG en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021J ^{Δ1kb} , λ y mEp167. N=3.	52
Figura 29. Viabilidad de la cepa W3110 en presencia del pORF81.	53
Figura 30. Ensayo de infección/exclusión en C600/pORF81.	54
Figura 30.1 Ensayo de infección en la cepa W3110 y JW0146 (fhuA ⁻).	54
Figura 31. Ensayo de infección/exclusión en JW3996 (λ ^B)/pORF81. ...	55
Figura 32. Ensayo de adsorción de mEp021 en W3110/pORF81. N=3.	59
Figura 33. Gráfica de los tiempos de mayor adsorción para el fago mEp021 y λ.	60
Figura 34. Ensayo de infección/exclusión de los fagos del grupo de inmunidad I en las bacterias W3110, W3110 (mEp021) y W3110/pORF81.	61
Figura 34.1. Ensayo de infección/exclusión de los fagos del grupo de inmunidad I en las bacterias W3110, W3110 (mEp021) y W3110/pORF81.	62
Figura 35. PCR para amplificar el ORF81 en los fagos del grupo de inmunidad I.	63
Figura 36. Ensayo de infección/exclusión de los bacteriófagos del grupo de inmunidad I en la bacteria W3110/pRep ^{mEp021}	64
Figura 36.1. Ensayo de infección/exclusión de los bacteriófagos del grupo de inmunidad I en la bacteria W3110/pRep ^{mEp021}	64
Figura 37. PCR del gen del represor de mEp021 en los fagos del grupo de inmunidad I.	65
Figura 38. PCR del ORF81+6xHis. Se utilizaron los oligos Fw-ORF81 y Rv-ORF81 ^{6xHis}	66
Figura 39. Selección de candidatas con construcción pORF81 ^{6xHis}	67
Figura 40. Alineamiento de la secuenciación de las candidatas “C.H”, “C.G” y la secuencia <i>in silico</i> para pKQV4/ORF816xHis.	68
Figura 41. Ensayo de infección/exclusión en la bacteria W3110/pORF81 ^{6xHis} y W3110/pORF81 ^{6xHis} W71C.	69

Figura 42. Gel de proteínas de la inducción de W3110/pORF81 ^{6xHis}	70
Figura 43. Western blot de expression de LppmEp021 en W3110.	71
Figura 43.1. Western blot de expression de Lpp ^{mEp021} en W3110.....	72
Figura 44. Western Blot del fraccionamiento celular de W3110/pORF81 ^{6xHis}	73

RESUMEN

Una nueva familia de fagos no lambdoides (mEp) fue descrita y clasificada en un grupo de inmunidad único (Grupo de inmunidad I). Ninguno de los fagos pertenecientes a este grupo de inmunidad fue capaz de crecer en una bacteria lisógena *Escherichia coli* W3110 que albergaba el profago mEp021, presumiblemente debido al represor. Sin embargo, a partir de la secuencia genómica del colifago mEp021, se identificó un marco de lectura abierto (ORF81) que codifica para un polipéptido de 72 aminoácidos (Lpp^{mEp021}) que proponemos es responsable de la exclusión a la superinfección (Sie). Además, el BLASTp de proteínas mostró que Lpp^{mEp021} posee una secuencia consenso lipobox y comparte aproximadamente 15% de identidad con otras proteínas relacionadas a la Sie de los fagos HK022, phi80, N15, mEp167, Sh6 y T5. La secuencia de aminoácidos de Lpp^{mEp021} presentó un péptido señal característica de proteínas de excreción o proteínas transmembranales. Por otra parte, se localizaron *in silico* dos posibles promotores río arriba del ORF81, así como un posible terminador río debajo de este gen. La expresión del ORF81 clonado en el vector de expresión pKQV4 fue suficiente para excluir la infección de mEp021 en una cepa W3110. De manera interesante la sobreexpresión del ORF81 mostró una reducción en la Sie de mEp021 en la cepa W3110. Además, la Sie fue inhibida en cepas mutantes que expresaban el ORF81 donde los genes *lamB*, *malF* y *malG* se encontraban deletados (Keio collection), indicando que la proteína de membrana externa LamB y las proteínas de membrana interna MalF y MalG son necesarias para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}. La adsorción de mEp021 fue inhibida por Lpp^{mEp021}, indicando una posible interferencia en el reconocimiento del receptor primario y la adsorción normal a la célula. De manera interesante ninguno de los 13 diferentes bacteriófagos probados del grupo de inmunidad I fue excluido por Lpp^{mEp021} sugiriendo que requieren de un receptor primario diferente al de mEp021 (OmpA). Además, se identificó que el residuo Triptófano 71 es indispensable para la Sie mediada por Lpp^{mEp021} debido a que una mutación puntal en este codón (W71C) provoca la pérdida total de la función de exclusión de la proteína. Lpp^{mEp021} fue localizado en la membrana interna y externa de la bacteria mediante Western Blot, sugiriendo que la Sie mediada por el Lpp^{mEp021} se está llevando a cabo a nivel de ambas membranas, donde interactúa con proteínas membranales como LamB, MalF y MalG, inhibiendo así la adsorción de mEp021 y su infección.

SUMMARY

A new family of nonlambdoid phages (mEp) was classified into a unique immunity group (Immunity group I). None of the phages belonging to this immunity group were able to grow in a lysogenic *Escherichia coli* W3110 harboring the prophage mEp021, presumably due to its repressor. However, from mEp021 genome sequence, we identified an open reading frame (ORF81) which encodes for a 72 amino acid polypeptide (Lpp^{mEp021}), which we propose is responsible of superinfection exclusion (Sie). In addition, a protein BLASTp showed that Lpp^{mEp021} has a lipobox consensus sequence and shares around 15% identity with other Sie related proteins of phages HK022, phi80, N15, mEp167, Sh6 and T5. The amino acid sequence of Lpp^{mEp021} presented a signal peptide characteristic of excretion and transmembrane proteins. On the other hand, we localized *in silico* two possible promoters upstream of ORF81, and one possible terminator downstream of this gene. The expression of the cloned ORF81 into pKQV4 expression vector was able to exclude mEp021 in a *E. coli* strain W3110. Interestingly overexpression of ORF81 showed reduced Sie for mEp021 in a strain W3110. Sie for mEp021 was inhibited in ORF81 expressing mutant strains where, *lamB*, *malF* and *malG* genes were knocked out (Keio collection), indicating that the OM protein LamB and the IM proteins MalF and MalG are necessary for the exclusion mediated by Lpp^{mEp021}. Adsorption of mEp021 was shown to be inhibited by Lpp^{mEp021}, indicating a possible interference of the primary receptor recognition and the normal adsorption to the cell. Interestingly, none of the 13 different bacteriophages tested from immunity group I were excluded by Lpp^{mEp021} suggesting that they require a different receptor than that of mEp021 (OmpA). We also identified that the residue Tryptophan 71 is indispensable for Sie mediated by Lpp^{mEp021} as a point mutation in this codon (W71C) abolished the exclusion function of this protein. Lpp^{mEp021} was localized in the inner and outer membrane of the bacteria by Western Blot, suggesting that Sie mediated by Lpp^{mEp021} is being carried out at a complete membranes level, where it interacts with membrane proteins such as LamB, MalF and MalG, inhibiting mEp021 adsorption and therefor its infection.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacteriófagos

Bacteriófagos, también conocidos como “fagos”, son virus que únicamente infectan bacterias. Con un estimado de 10^{31} partículas en la biosfera, los fagos superan en número a las bacterias, por lo menos 10 veces, es por esto que no es de sorprender su influencia en la evolución de la mayoría de las especies bacterianas, en algunos casos de formas inesperadas [1]. Los bacteriófagos fueron descubiertos en 1915 por el patólogo británico, Frederick Twort, y redescubiertos en 1917 por el microbiólogo franco-canadiense Félix d’Hérelle [2]. Desde entonces, los fagos han sido de interés para los científicos como una herramienta para entender los aspectos fundamentales de la biología molecular, uno de ellos es la evolución bacteriana por la transferencia horizontal de genes a través de fagos [3].

1.2 Clasificación de bacteriófagos

Los bacteriófagos están compuestos principalmente de proteínas que encapsidan genomas que pueden ser de DNA o ARN de cadena doble o sencilla y pueden tener estructuras relativamente simples o muy elaboradas. Es por esto que se clasifican en distintas familias según el tipo de ácidos nucleicos que presentan, la presencia y/o forma y composición de la cápside y cauda. Actualmente la ICTV (por sus siglas en inglés “International Committee on Taxonomy of Viruses”) clasifica a los bacteriófagos en las siguientes familias: *Caudovirales* (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*), *Mficroviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae*, *Cytoviridae*, *Inoviridae*, *Plasmaviridae*. En la [Tabla 1](#) se presentan las características principales de cada una de las 9 familias de bacteriófagos [4].



Tabla 1. Familia de Fagos modificada de [Ackermann, 2007](#) [4].

Forma	Orden o familia	Ácido nucleico, tamaño	Miembro	No. Reportados
	Caudovirales	dsDNA(L), sin envoltura		
	Myoviridae	Cola contractil	T4	1312
	Siphoviridae	Cola larga, no contractil	λ	3262
	Podoviridae	Cola corta	Φ 174	771
	Microviridae	ssDNA(C), 27 nm, 12 capsomeros	f X174	38
	Corticoviridae	dsDNA(C), capsid compleja, lípidos, 60 nm	FM2	37
	Tectiviridae	dsDNA (L), vesícula interna de lípidos, pseudo cola, 60 nm	FD1	19
	Leviviridae	ssRNA (L), 23 nm, parecido a poliovirus	MS2	38
	Oystoviridae	dsRNA (L), segmentado, envoltura lipídica, 70-80 nm	f 6	3
	Inoviridae	ssDNA (C), filamentos o bastones, 85-1950 x 7 nm	fd	66
	Plasmaviridae	dsDNA, envoltura lipídica, sin capsid, 80 nm	MM2	5

1.3 Ciclo replicativo de los bacteriófagos

Al momento se conocen dos ciclos replicativos posibles que pueden presentar los bacteriófagos una vez que han infectado su célula huésped, estos son el ciclo lítico y el ciclo lisogénico [3]. La decisión entre la vía lisogénica o lítica se realiza poco después de efectuada la infección y es crucial para la eficaz propagación del fago. La decisión está estrictamente regulada a nivel genético (los niveles de la proteína CII del fago λ , decide entre las dos vías; a mayor concentración de CII es favorecida la vía lisogénica), y el control de la expresión de ciertos genes asegura la permanencia de un estado [5].

El ciclo lítico se caracteriza por la adsorción del fago y posteriormente una unión irreversible a un receptor específico de la membrana externa bacteriana. Posteriormente, la inyección del DNA del fago al citoplasma de la bacteria, donde es replicado, transcrito y traducido con ayuda de las maquinarias bacterianas. Las proteínas fágicas son sintetizadas por separado y ensambladas en cápsides (cabezas) y colas o caudas (en el caso de fagos con cola) para posteriormente empacar el genoma viral en las cápsides, unir la cauda, y finalmente formar viriones maduros. Al final del ciclo lítico, las proteínas formadoras de un poro único ocasiona la lisis de la célula y la liberación de cientos de nuevas partículas infecciosas al



ambiente que serán capaces de infectar a las bacterias cercanas y empezar nuevamente el ciclo [1].

En contraste, los fagos temperados son capaces de llevar a cabo un ciclo lisogénico, en el cual, el DNA fágico se integra al genoma bacteriano, o pueden mantenerse en forma episomal dentro de la célula huésped (pseudolisogenia). Este ciclo puede ser estable por miles de generaciones y además puede alterar el fenotipo de la bacteria expresando genes que no son expresados en el curso usual de infección, a este proceso se le conoce como conversión lisogénica [1, 2].

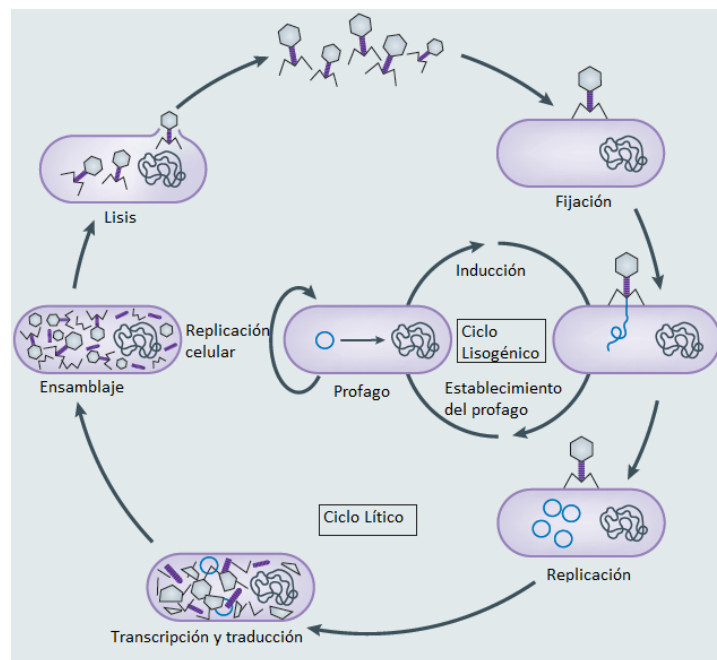


Figura 1. Ciclos replicativos desarrollados por los bacteriófagos. Imagen modificada de [Salmond, 2015](#) [2]

1.4 Conversión lisogénica

La conversión lisogénica resultante de la integración de profagos puede tener un gran impacto en la célula huésped debido a la expresión de genes denominados “morons” que codifican para un gran número de proteínas que le confieren beneficios como: producción de toxinas, proteínas efectoras, proteínas regulatorias, factores de resistencia al suero, exonucleasas y proteasas, superantígenos, productos que pueden alterar las capacidad del biofilm bacteriano, péptidos que



pueden inducir o silenciar genes del huésped, autoinmunidad contra la infección del mismo fago o fagos relacionados, etc [1, 6].

Algunos genes de fagos son conocidos por incrementar la supervivencia de la bacteria lisógena. El represor del fago y péptidos relacionados a la exclusión de la superinfección confieren ventajas selectivas contra la infección de fagos. Algunas de estas proteínas son la proteína Cor del profago $\Phi 80$, que inactivan el receptor de superficie FhuA, resultando en la incapacidad de $\Phi 80$ de infectar nuevamente al huésped [7-9]. Otros fagos que requieren de este receptor (por ejemplo, T1, T5, HK022, mEp167 y N15) son incapaces de infectar a bacterias que expresen la proteína Cor. Otras proteínas expresadas por genes “morons”, como SieA en el fago P22 de *Salmonella*, Sp y Imm en el fago T4 de *E. coli* [10] y Sie₂₀₀₉ en el fago Tuc2009 de *Lactococcus lactis*, previenen la entrada de DNA de fagos después de la unión inicial al receptor en membrana externa. Todos estos factores protegen a la bacteria lisógena y son de importancia para su sobrevivencia (de la bacteria) por lo tanto, son objeto de estudio en los últimos años [9].

1.5 Mecanismos de resistencia a la infección por bacteriófagos

Los mecanismos de resistencia a fagos, también llamados “resistencia bacteriana a la infección”, sirven para limitar el rango de huéspedes. Aunque principalmente se le conoce como bloqueo de la “adsorción” del fago, existe un gran número de mecanismos que interfieren en la infección y se encuentran codificados en bacterias, profagos y posiblemente también en plásmidos. Colectivamente, estos mecanismos se han descrito como parte del “Resistoma a bacteriófagos” y han sido estudiados, especialmente en las bacterias ácido lácticas. Los fagos, por su parte también emplean numerosas técnicas para contrarrestar la resistencia de las bacterias, y de este modo ampliar su rango de infección [11].

Los mecanismos bacterianos de resistencia son usualmente diferenciados en: bloqueo de la adsorción, bloqueo de la inyección del genoma del fago, modificación y restricción (sistema R-M), infección abortiva y sistemas CRISPR. Todos estos mecanismos de resistencia son empleados por las bacterias, así como también



pueden ser adquiridos por medio de profagos, plásmidos o genes tomados del medio ambiente [11].

En la Figura 2 se muestra la resistencia bacteriana a la infección que puede darse en distintas etapas de la infección del fago, impidiendo así la infección y proliferación de los mismos.

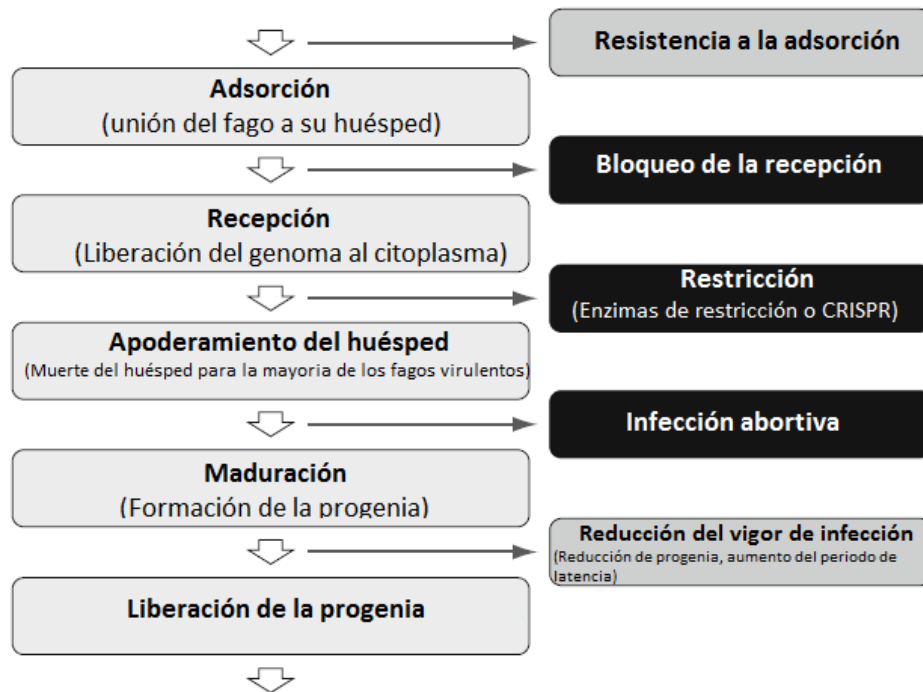


Figura 2. Resistencia bacteriana en función a las etapas de infección del fago. Modificada de [Hyman y Abedon, 2010](#) [11].

1.5.1 Mecanismo de proteínas de exclusión

De acuerdo con Labrie et al. se han reportado por lo menos tres distintos niveles de exclusión de bacteriófagos: 1) Bloqueo de la adsorción, 2) Bloqueo de la inyección del DNA, o 3) Una infección abortiva [12].

1.5.1.1 Evitando la adsorción del fago

La adsorción de los fagos a receptores presentes en el hospedero es el primer paso en la infección y quizá uno de los eventos más interactivos en esta, debido a que el



fago debe reconocer componentes específicos de su huésped. Las bacterias han desarrollado barreras que previenen la adsorción del fago. Estos mecanismos de bloqueo de adsorción se pueden dividir en tres categorías: bloqueo de los receptores del fago, producción de matriz extracelular y la producción de inhibidores competitivos (Figura 3) [12].

- Bloqueo de los receptores del fago. Para limitar la propagación del fago la bacteria puede adaptar la estructura de sus receptores de la membrana o su conformación tridimensional. El bacteriófago T5 y el bacteriófago mEp167 usan como receptor a la proteína de membrana externa FhuA y producen las lipoproteína Llp y Cor respectivamente, que bloquean a FhuA, previniendo futuras infecciones por bacteriófagos dependientes de FhuA. Llp también protege a los nuevos viriones T5 de la inactivación por la unión a receptores libres presentes en los residuos de las bacterias lisadas. Por otro lado, la proteína TraT codificada por el plásmido F modifica la conformación de la proteína de membrana externa OmpA que funciona como receptor para fagos T-like [12].
- Producción de matriz extracelular. Las bacterias pueden producir polímeros extracelulares para promover su supervivencia protegiendo a la bacteria de ambientes adversos y en algunos casos aportando una barrera física entre los bacteriófagos y sus receptores. Las bacterias *Pseudomonas* spp. producen un exopolisacárido llamado alginato el cual incrementa la resistencia a bacteriófagos, sin embargo, el fago F116 que infecta a *Pseudomonas* spp., produce una enzima alginato liasa que facilita su dispersión en la matriz de alginato y reduce la viscosidad de esta, permitiendo su infección [12].
- Producción de inhibidores competitivos: Algunas moléculas que están presentes naturalmente en el ambiente de la bacteria pueden unirse específicamente a los receptores del fago. FhuA, un transportador de hierro en *E. coli* también es una entrada para algunos fagos como T1, T5, mEp167 y Φ 80. La microcina J25 también utiliza FhuA como receptor y puede competir con los bacteriófagos en su unión a este receptor [12].

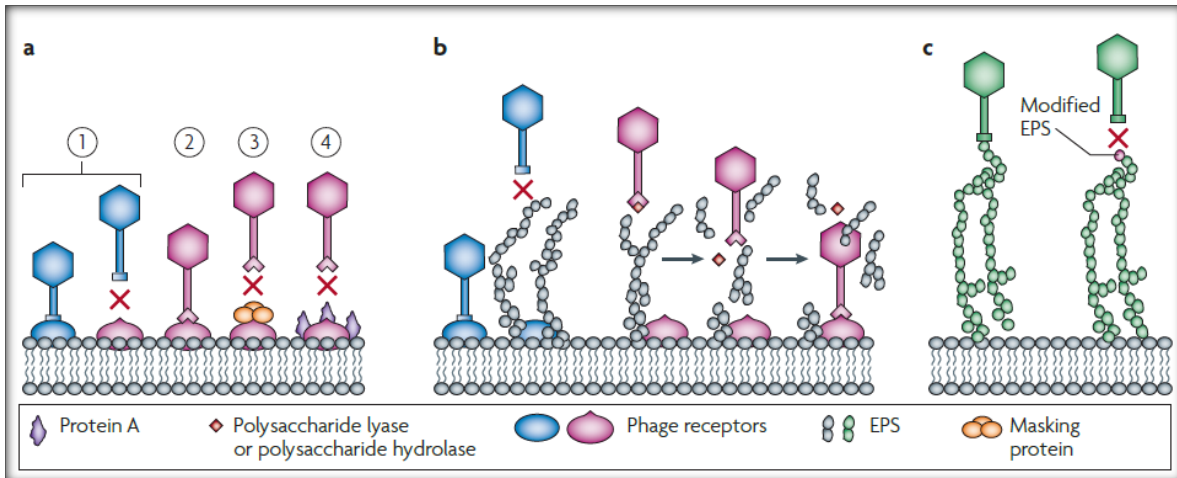


Figura 3. Mecanismos para que evitan la adsorción del fago. a) Bloqueo de los receptores del fago. b) Producción de matriz extracelular. c) Producción de inhibidores competitivos. Modificada de Labrie et al., 2010 [12].

1.5.1.2 Mecanismo de bloqueo de la inyección de DNA fágico.

Las proteínas de exclusión a la superinfección (Sie) bloquean la entrada del DNA fágico a la célula hospedera y por ende confieren inmunidad contra fagos específicos. Estas proteínas se han encontrado ancladas o asociadas a componentes membranales. Los genes que codifican estas proteínas son encontrados comúnmente en profagos, sugiriendo en muchos casos que los sistemas Sie son importantes en la interacción fago-fago [12].

Uno de los sistemas Sie mejor caracterizados es el del bacteriófago T4, el cual codifica para dos proteínas codificados en los genes *imm* y *sp*. Este sistema causa una inhibición rápida de la inyección del DNA a la célula huésped, previniendo la infección de otros fagos T-like. *Imm* tiene dos dominios transmembranales no convencionales y se predice que se localiza en la membrana del huésped, además *Imm* debe de estar asociada con otra proteína de membrana para lograr una exclusión completa. La proteína de membrana *Sp* inhibe la actividad de la lisozima de T4, por lo tanto, previene la degradación del peptidoglicano y la subsecuente entrada del DNA del fago (Figura 4) [12].

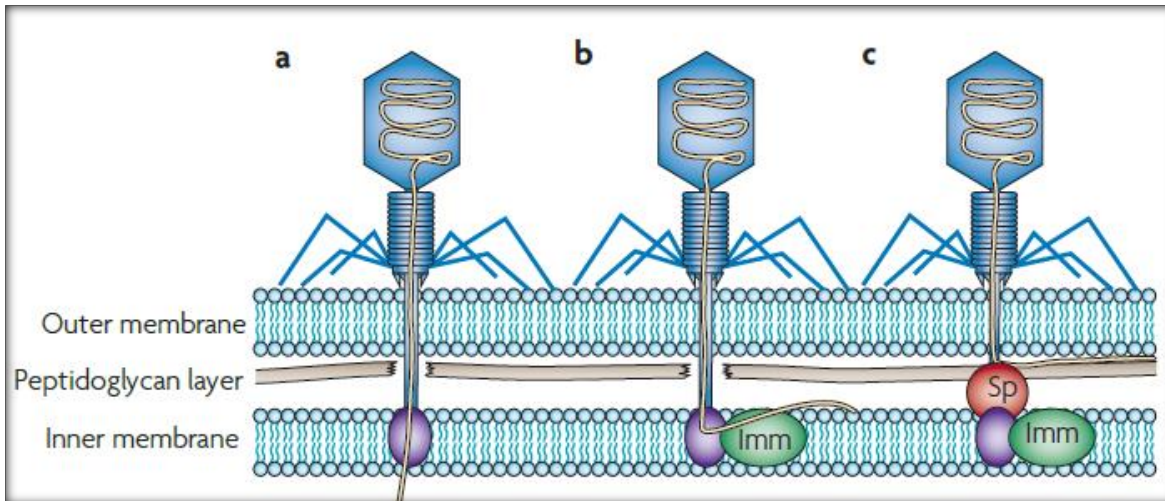


Figura 4. Sistema de exclusión del bacteriófago T4. a) Infección normal de fago T4. b) La proteína Imm previene la inyección del DNA del fago al citoplasma de la bacteria huésped. c) La proteína Sp inhibe la actividad de la lisozima de T4, previniendo la degradación del peptidoglicano de la pared celular. Modificada de [Labrie et al., 2010](#) [12].

1.5.1.3 Mecanismo de infección abortiva.

Algunas bacterias poseen un amplio rango de proteínas heterólogas que provocan una infección abortiva. Estos sistemas de infección abortiva (Abi) también llevan a una atenuación de la célula infectada. El sistema de infección abortiva Rex puede encontrarse en cepas *E. coli* lisógenas de λ . Cuando la infección por un fago ocurre, se produce un complejo proteína-DNA ya sea por recombinación o replicación, este complejo activa RexA. RexB es un canal de iones que al ser activado por el complejo RexA-DNA reduce el potencial de membrana, lo cual lleva a una caída en los niveles de ATP en la célula, esto ocasiona una disminución en la síntesis de macromoléculas y por lo tanto de la replicación celular (Figura 5) [12].

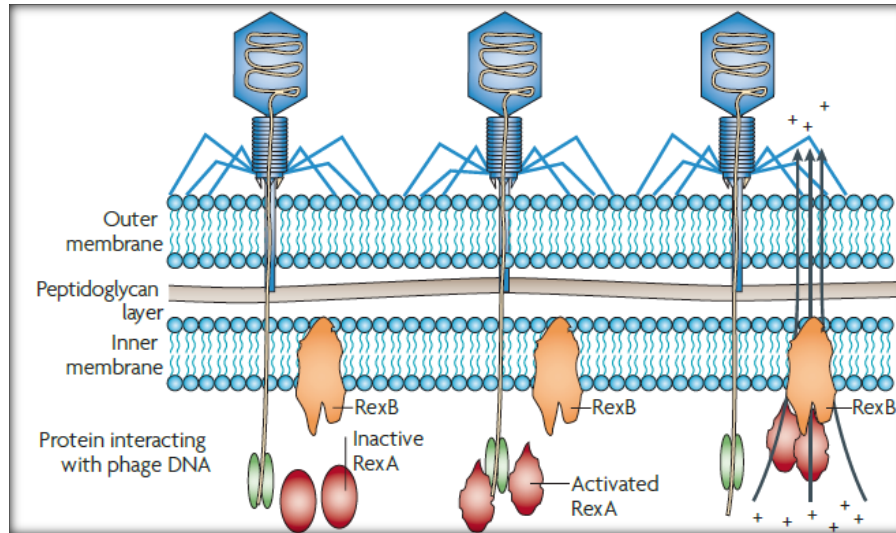


Figura 5. Modelo de infección abortiva del sistema Rex. a) La inyección de DNA a la bacteria causa la formación de un complejo DNA-proteína ya sea por recombinación o replicación de este. b) RexA es activado por el complejo DNA-proteína. c) Dos moléculas activadas de RexA activan el canal de iones RexB, lo que ocasiona una pérdida en el potencial de membrana, esta pérdida disminuye los niveles de ATP en la célula y por lo tanto su replicación. Modificada de [Labrie et al., 2010 \[12\]](#).

1.6 Exclusión a la superinfección

Una obvia ventaja selectiva para el huésped lisogénico es la inmunidad (relacionada al represor del fago) y los genes del profago relacionados con la exclusión a la superinfección, los cuales protegen a la bacteria lisógena contra la infección de otros fagos. Estos genes también proveen una ventaja directa al profago debido a que excluyen el DNA de fagos infecciosos y evitan que este compita con el DNA del profago [12].

La exclusión a la superinfección es un fenómeno en donde la preexistencia de una infección viral previene una infección secundaria del mismo virus u otro muy cercano a este. Este fenómeno poco entendido podría reflejar un estado antiviral en la célula infectada. Como se mencionó anteriormente algunos virus codifican proteínas que logran la exclusión a la superinfección. Estas proteínas virales pueden interferir con la liberación de DNA al citoplasma del huésped o modificar el receptor de entrada. Pueden incluso actuar como inhibidores de las enzimas virales encargadas de la degradación del peptidoglicano previniendo así la entrada del DNA del bacteriófago [12, 13].

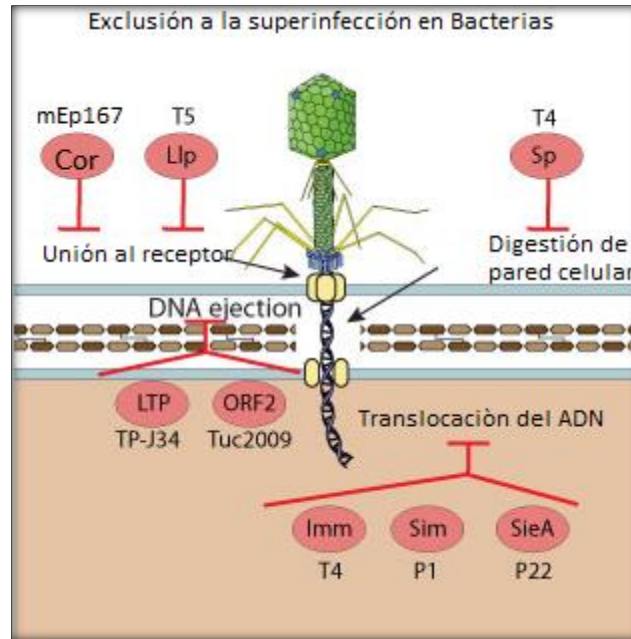


Figura 6. Exclusión a la superinfección en bacterias (Imagen modificada de Expasy, Bioinformatics Resource Portal)

1.7 Lipoproteínas de exclusión en bacteriófagos

Dentro de las proteínas de exclusión reportadas en bacteriófagos, algunas de estas se han caracterizado como lipoproteínas, es decir son proteínas que poseen una modificación lipídica en su porción N-terminal que les permite anclarse a la membrana del hospedero. Algunas de estas proteínas son: Cor del colifago mEp167 de, la cual se caracterizó como una lipoproteína de membrana externa que inactiva el transportador de ferricromo FhuA; evitando así la infección de bacteriófagos FhuA dependientes [14, 15], Ltp del bacteriófago TP-J34 de *Streptococcus thermophilus*, la cual evita la infección del fago TP-J34 impidiendo la inyección del DNA a la célula hospedera [16], Llp del bacteriófago T5 de *Escherichia coli*, que inactiva a su receptor FhuA y protege a los nuevos viriones T5 de la inactivación por la unión a receptores libres presentes en los restos de las bacterias lisadas [17].



1.8 Lipoproteínas de membrana

En bacterias Gram negativas como *E. coli*, las proteínas de membrana externa denominadas lipoproteínas portan en su porción amino terminal modificaciones que consisten en una gliceril cisteína (ácido S-[2,3-propanodiol]-3-tioamino propiónico) el cual está ligado a dos residuos de ácidos grasos por dos uniones del tipo éster, y en el caso de las principales lipoproteínas de la membrana externa solo se encuentra en adición un residuo de ácido graso unido por una unión amida. Estas proteínas son sintetizadas a partir de precursores que portan una secuencia señal hidrofóbica en el extremo terminal y son translocadas a través de la membrana interna por el sistema Sec [18], contiene además, una secuencia señal en su (SS por sus siglas en inglés) [L/V/I][A/S/T/V/I][G/A/S]C la cual también se conoce como “lipobox”. En *E. coli* las lipoproteínas son translocadas a través de la membrana interna por el translocon Sec, aunque en otros organismos existen lipoproteínas dependientes del translocon Tat [19, 20].

La maduración y el procesamiento de las lipoproteínas toma lugar en el lado periplasmático de la membrana interna (Figura 7). El primer paso es la adición de diacilglicerol al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína conservada por una enzima llamada Lgt (por sus siglas en inglés “phosphatidylglycerol/prolipoprotein diacylglyceryl transferase”). Esta modificación es un pre-requisito para realizar el corte en la SS por una lipoproteína proteasa (LspA o peptidasa señal II) y asegura que la apolipoproteína permanezca anclada en la membrana interna después del corte en la Cisteína de la SS. La lipoproteína proteasa (LspA) genera una apolipoproteína diacilada con un nuevo N-terminal gracias a la cisteína conservada de la lipobox referida como +1. Finalmente, el grupo amino de la cisteína es N-acilado por la enzima Lnt (por sus siglas en inglés phospholipid/apolipoprotein transacylase) generando una lipoproteína madura triacilada. Los genes codificantes para las tres enzimas son esenciales en *E. coli* y altamente conservados en las bacterias Gram-negativas [20].

Finalmente, las lipoproteínas maduras son exportadas a la membrana externa de la bacteria mediante la ruta Lol (Figura 7), siempre y cuando estas lipoproteínas no



cuenten con la señal llamada “señal de evitación de Lol”. Esta señal en *E. coli* es conocida por la regla +2 y es determinada por la identidad del aminoácido que se encuentra después de la cisteína conservada (+1). De acuerdo con esta regla, un ácido aspártico en la posición +2 ocasiona una retención de la lipoproteína en la membrana interna; y eso funciona como una señal selección para diferenciar lipoproteína de membrana interna y membrana externa [18].

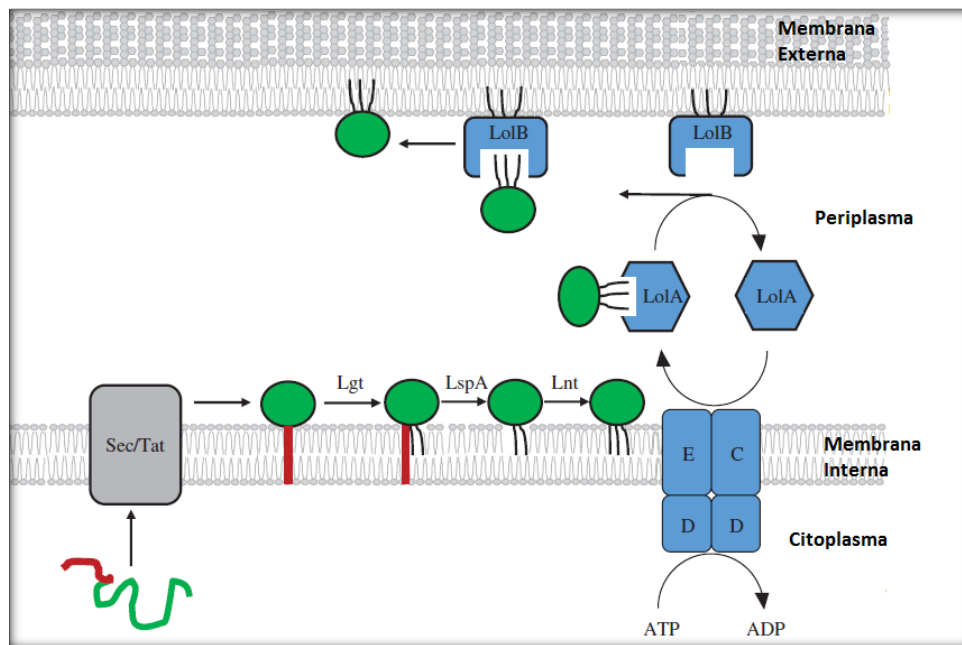


Figura 7. Ruta de maduración y exporte de lipoproteínas en Gram negativas. La lipoproteína (verde) es sintetizada en el citoplasma con una secuencia señal de aminoácidos hidrofóbicos en N-terminal la cual la hace blanco para su translocación a través de la membrana interna por el translocon Sec o Tat. La lipoproteína permanece anclada en la membrana interna por su secuencia SS y Lgt añade diacilglicerol al residuo conservado de Cisteína. LspA corta la secuencia SS y Lnt añade otra cadena de acilos al glicerol unido a la Cisteína recién formado. La lipoproteína es reconocida por el complejo en LolCDE en membrana interna que cataliza la extracción de la lipoproteína de la membrana interna utilizando ATP. La lipoproteína es liberada al periplasma en complejo con la chaperona LolA. LolA entrega la lipoproteína al receptor de membrana externa LolB el cual la inserta a la cara interna de la membrana externa. El LolA libre regresa al complejo LolCDE y es reciclado. Imagen modificada de [Kanovalova y Silhavy, 2015](#) [20]



2. ANTECEDENTES

2.1 Bacteriófago mEp021

El colifago mEp021 fue aislado de muestras de materia fecal por Kameyama y cols en 1999. Se clasificó como “no lambdoide” y forma parte de un grupo de inmunidad único (I) que está conformado por 48 miembros. Presenta características como no puede desarrollarse adecuadamente a 32°C, el profago no puede ser inducido por luz UV y requiere de algunos factores Nus del huésped para su desarrollo [21].

Su genoma no puede ser cortado por enzimas como: *BglI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacII*, *SalI*, *SphI* y *XhoI*, se pensaba que no se encontraban estos sitios de restricción en su genoma. Sin embargo, la secuenciación del genoma completo de mEp021 (54,655 pb), se identificaron sitios de restricción para *EcoRI*, *KpnI*, *PstI*, lo que sugiere que estos sitios deben ser modificados durante el desarrollo del fago [22]. De acuerdo a su morfología se le ubica en el orden de los Caudovirales y en la familia Siphoviridae, ya que es un fago no envuelto, con cola larga no contráctil y flexible y posee un genoma de DNA lineal de doble cadena (Tabla 1).

Las partículas virales de mEp021 muestran una cola de aproximadamente 150 nm y una cápside icosaédrica de 60 nm de diámetro aproximadamente (Figura 8). Por análisis electroforético de las proteínas estructurales de mEp021 (Figura 9) se pueden distinguir en gel dos de ellas que parecen ser las proteínas mayoritarias de la cápside del virión (peso molecular ~40kDa y ~16kDa).

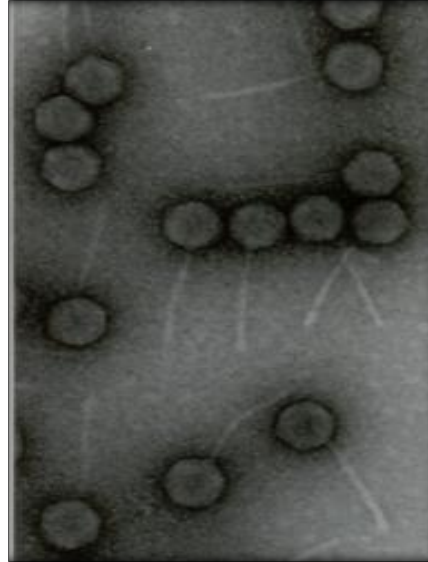
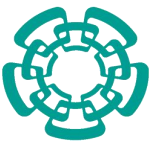


Figura 8. Microscopía electrónica del bacteriófago mEp021 (tinción con acetato de uranilo)

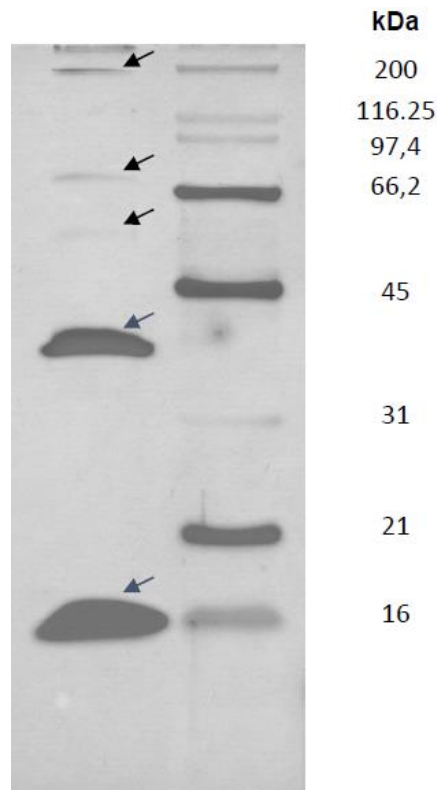


Figura 9. Proteínas estructurales de mEp021. Electroforesis de proteínas estructurales de mEp021 en gel Tricina-SDS teñido con plata (Martínez-Peñañiel, E y Sepúlveda, O. datos no publicados).



La característica relevante de este nuevo grupo es que alrededor del 10% de sus miembros inducen un fenotipo hemolítico. En el genoma del representante de este grupo (mEp021), se identificó un marco de lectura abierto responsable de inducir este fenotipo. Este marco presentó 4 probables codones de inicio en fase y la expresión del ORF 4.3, reprodujo el fenotipo en una cepa nativa con el gen *hlyE*⁺, pero no en la cepa mutante en *hlyE*⁻ (Figura 10) [23]. ([Martínez-Peñafiel et al, 2012](#))

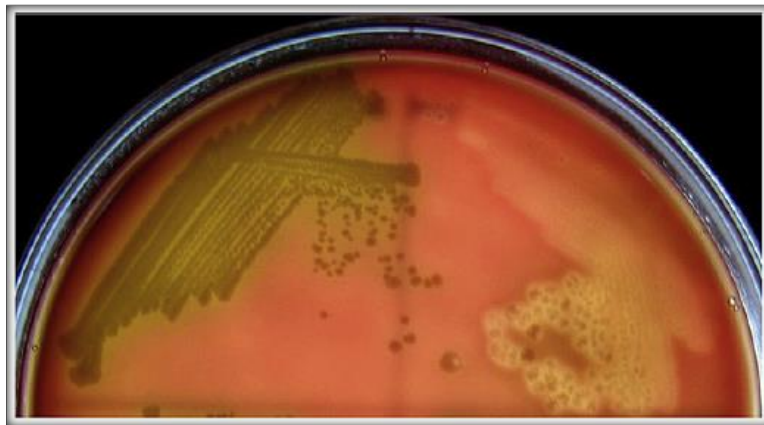


Figura 10. Fenotipo hemolítico de *E. coli* MC4100 (*hlyE*⁺) con el profago mEp021. A la izquierda, la cepa CFP201 (*hlyE*⁻) con el profago mEp021 donde no se evidencia hemólisis. A la derecha, la cepa lisógena MC4100 (*hlyE*⁺), que contiene el profago mEp021, y muestra el fenotipo hemolítico. Imagen modificada de [Martínez-Peñafiel et al, 2012](#) [23].

2.2 Lipoproteína Cor del bacteriófago mEp167

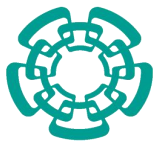
Dentro de la colección de fagos aislados de heces, se encontró que los fagos mEp213, mEp237, mEp410 son incapaces de crecer en lisógenas de mEp167, esto debido a un mecanismo de exclusión del bacteriófago. Dentro del genoma de mEp167 se encontró un fragmento de DNA que contiene un marco de lectura abierto (ORF) codificante para un polipéptido de 77 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de este ORF presenta un porcentaje de identidad muy alto con las proteínas Cor de los fagos HK022, phi80 y N15. Se encontró que la expresión de este ORF (Cor) en *E. coli* es responsable de inhibir la infección de bacteriófagos FhuA dependientes, así como de inhibir el transporte de ferricromo, muy posiblemente inactivando FhuA [14, 21].



Recientemente en el trabajo realizado por la M. en C. Emma Arguijo se encontró que Cor es una lipoproteína que contiene una secuencia señal “lipobox” con la secuencia de aminoácidos LVGCA. Esta lipoproteína Cor se localiza en la membrana externa de la bacteria e interactúa con las proteínas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpW, LamB, OmpF y Slp [15].

Anteriormente se hipotetizaba que Cor interactuaba directamente con el transportador de ferricromo FhuA causando un impedimento estérico y evitando así el transporte a través de este; sin embargo, estos resultados podrían indicar que Cor, al interactuar con las proteínas de membrana externa provoca un cambio conformacional del receptor FhuA evitando así el flujo de ferricromo a través de este y evitando el reconocimiento de este receptor por los fagos FhuA dependientes [14, 15].

El estudio de los genes responsables del fenotipo de exclusión a la superinfección (por sus siglas en inglés Sie) ha sido de gran interés en los últimos años y el mecanismo por el cual se produce dicha exclusión es incierto, además de ser específico para cada tipo de bacteriófago que la contenga. Este proyecto está dirigido al estudio de una lipoproteína putativa del colifago mEp021; debido a que anteriormente se ha descrito que algunas lipoproteínas como Cor en mEp167 y Φ 80; Ilp en T5 que son responsables del fenotipo de exclusión a la superinfección. Por lo tanto, resulta interesante conocer si la lipoproteína de mEp021 fuese la responsable de conferir el fenotipo de exclusión a la superinfección en este fago.



3. JUSTIFICACIÓN

Tomando en consideración que la mayoría de las lipoproteínas de bacteriófagos reportadas y caracterizadas en bacteriófagos brindan un fenotipo de exclusión a la superinfección en el hospedero, resulta importante estudiar si la lipoproteína codificada por el ORF81 en el genoma del bacteriófago mEp021 tiene dicha función, ya que posee algunas características similares con las ya reportadas a nivel de secuencia de aminoácidos, dominios transmembranales, localización en el genoma y presenta una lipobox que podría permitir su procesamiento y transporte hacia la membrana del hospedero.



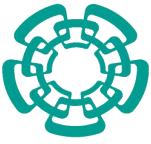
4. HIPÓTESIS

La expresión episomal del ORF81 en *Escherichia coli* excluye la infección de mEp021 mediante la inhibición de su unión a la proteína OmpA



5. OBJETIVO

Caracterizar la expresión del ORF81 en *Escherichia coli*, así como su posible participación en la exclusión de la infección de mEp021.



6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análisis in silico del ORF81 del fago mEp021.
2. Clonar el ORF81 de mEp021 en el vector de expresión pKQV4.
3. Comparar el fenotipo de exclusión entre la lisógena W3110 (mEp021) y la bacteria que expresa de manera episomal el ORF81.
4. Determinar si la posible lipoproteína confiere la exclusión a la superinfección evitando la unión del fago a su receptor de membrana externa.
5. Verificar fenotipo de exclusión a la superinfección de la lisógena W3110 (mEp021) y la bacteria que expresa de manera episomal el ORF81.
6. Determinar la localización de la posible lipoproteína y su interacción con proteínas de *E. coli*.



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Bacterias, bacteriófagos, y plásmidos

Las bacterias, bacteriófagos y plásmidos utilizados en este estudio se encuentran enlistados en la Tabla 1. La cepa *Escherichia coli* W3110 [24] fue utilizada para la propagación de los bacteriófagos y los ensayos de adsorción, mientras que las cepa W3110 y las cepas de la colección Keio derivadas de BW25113 [25] fueron utilizadas para los ensayos de exclusión. La cepa DH5 α [26] fue utilizada para la transformación y aislamiento de plásmidos, la cepa BL21 [26] fue utilizada para el ensayo de proteína de fusión fluorescente. Los bacteriófagos utilizados en este estudio son derivados de mEp y pertenecen al grupo de inmunidad I de la colección de nuestro laboratorio y están descritos en Kameyama et al [21]. El bacteriófago λ (Campbell, 1961) y mEp167 [21] fueron utilizados como control de infección.

Tabla 1. Plásmidos, cepas y bacteriófagos utilizados en este estudio

Cepas, bacteriófagos y plásmidos	Genotipo o marcador relevante	Fuente o referencia
Cepas		
W3110	F ⁻ λ^- rph ⁻	[24]
BW25113	F ⁻ λ^- Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>) rph-1 Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568 <i>hsdR</i> 514	[25]
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR</i> 17(<i>rK⁻mK⁺</i>), λ^-	[26]
W3110 <i>ompA⁻</i>	F ⁻ λ^- <i>rph</i> Δ <i>ompA::kan</i>	Este estudio
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_{BM}⁻_B) gal dcm</i> (DE3)	[26]
C600	<i>leuB6 thi-1 lacY1 supE44 thr-1 rfbD1 thuA21</i>	[32]



JW0940	BW25113 $\Delta ompA::kan$	[33]
JW3996	BW25113 $\Delta lamB::kan$	[33]
JW1248	BW25113 $\Delta ompW::kan$	[33]
JW2205	BW25113 $\Delta ompC::kan$	[33]
JW3995	BW25113 $\Delta malK::kan$	[33]
JW0912	BW25113 $\Delta ompF::kan$	[33]
JW3993	BW25113 $\Delta malF::kan$	[33]
JW3992	BW25113 $\Delta malG::kan$	[33]

Bacteriófagos

λ	<i>imm</i> _{λ}	[34]
mEp167	<i>imm</i> _{VI}	[21]
mEp021	<i>imm</i> _I	[21]
mEp009	<i>imm</i> _I	[21]
mEp010	<i>imm</i> _I	[21]
mEp013	<i>imm</i> _I	[21]
mEp044	<i>imm</i> _I	[21]
mEp137	<i>imm</i> _I	[21]
mEp279	<i>imm</i> _I	[21]
mEp321	<i>imm</i> _I	[21]
mEp345	<i>imm</i> _I	[21]
mEp515	<i>imm</i> _I	[21]
mEp532	<i>imm</i> _I	[21]
mEp554	<i>imm</i> _I	[21]
mEp555	<i>imm</i> _I	[21]
mEp413	<i>imm</i> _I	[21]

Plásmidos



pJET1.2/Blunt	2.9 kb, vector de transición, Amp ^R	ThermoFisher
pKQV4	5.7 kb, bajo número de copias, operador lac, Amp ^R	[35]
pORF81	5.9 kb, pKQV4 con ORF81 _{mEp021}	Este estudio
pORF81^{6xHis}	5.9 kb, pORF81 con 6x Histidine tag at C-terminal	Este estudio
pORF81^{6xHis}W71C	5.9 kb, mutación que cambia W71C en pORF81 ^{6xHis}	Este estudio

7.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a Silhavy et al [27] y se encuentran listados en la sección de apéndices. En general las bacterias se crecieron en medio LB (Apéndice 1) utilizando el antibiótico de interés e incubadas a 37°C con una agitación de 200 rpm.

7.3 Propagación del fago mEp021 y λ

300 μ L de un cultivo O/N de la cepa W3110 se mezclaron con 3.0 mL de medio T Φ suave (Apéndice 1) previamente derretido, esta mezcla se vertió sobre una caja T Φ hasta dejar solidificar por completo. A partir de un stock de los fagos mEp021 y λ se realizaron diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) en medio TMG (Apéndice 1) y se gotearon 5 μ L de cada dilución sobre el tapiz de bacteriano, las gotas se dejaron secar y se incubó a 37°C durante aproximadamente 18 h de acuerdo con lo descrito en Silhavy et al [27].

7.4 Obtención de lisados de mEp021 y λ .

Para la obtención del lisado de los bacteriófagos, se extrajeron tres placas de mEp021 y λ provenientes de un tapiz de W3110, utilizando una pipeta pasteur, estas placas se mezclaron con 300 μ L de un cultivo O/N de W3110 en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se le adicionó 60 μ L de una solución MgCl₂ 0.4M/CaCl₂ 0.1



M para favorecer la adsorción de los fagos. Se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 30 mL de medio LB. Posteriormente se incubó a 37°C con una agitación de 200 rpm durante 5-6 horas o hasta observar lisis celular. Finalmente, se agregaron 5 mL de cloroformo al cultivo y se agitó en vortex por 1 minuto para liberar todos los bacteriófagos que se encontraban dentro de las bacterias, se centrifugó a 6,000 rpm (3,904 x g) utilizando la centrifuga Hettich® Mikro 22R. El sobrenadante fue recuperado en tubo falcón de 50 mL y refrigerado a 4°C para su posterior titulación.

7.5 Titulación de los fagos mEp021 y λ

La titulación de los fagos se realizó según lo descrito por Silhavy et al [27]. Se realizaron diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) (Figura 11) en buffer TMG partiendo de los lisados de mEp021 y λ . 5 μ L de cada dilución de gotearon en un tapiz de W3110, las gotas se dejaron secar y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se calculó el título del fago utilizando la siguiente formula:

$$\text{Unidades Formadoras de Placa (UFP)} = \frac{\text{No. de placas por gota} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de gota (mL)}}$$

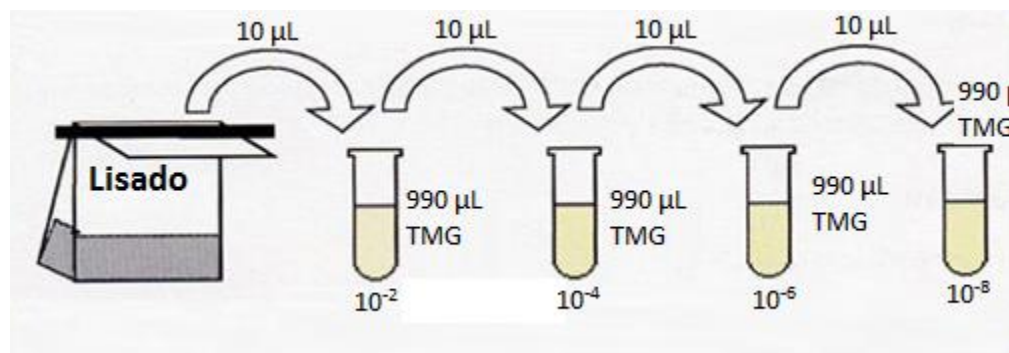
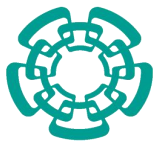


Figura 11. Diluciones de un lisado de bacteriófagos.

7.6 Extracción de DNA del fago mEp021 mediante DEAE-celulosa

El protocolo de extracción de DNA fágico se realizó según Silhavy et al [27]. Se tomó 1 mL de un lisado de 1×10^{11} de mEp021 el cuál se mezcló con 600 µL de DEAE-celulosa (Apéndice 3). La mezcla se agitó por inversión 15 veces posteriormente se separó la DEAE-celulosa por centrifugación a 12,000 x g por 15



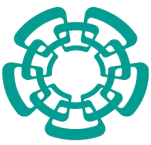
minutos a 4°C. Se repitió nuevamente este procedimiento para eliminar la celulosa restante y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril. A 800 µL del sobrenadante recuperado se le adicionaron 100 µL de NaCl 5M y 540 µL de isopropanol, posteriormente la mezcla se incubó durante 20 min a -20°C. La mezcla se centrifugó a 12000 x g por 5 minutos para posteriormente descartar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 200 µL de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). Se adicionaron 200 µL de fenol y se mezcló brevemente en vortex, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa, en la cual se encuentra al DNA del fago. La muestra se precipitó adicionando 15 µL de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol al 95%. Se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró y se dejó secar la pastilla hasta evaporar completamente el etanol restante. Finalmente, se resuspendió en 50 µL de TE y se almacenó a -20°C.

7.7 Caracterización enzimática del genoma de mEp021

Para la caracterización del genoma de mEp021 se tomaron 5 µL (~1 µg) de DNA del fago y se incubó durante toda la noche a 37°C con 10 U de la enzima *NdeI* (New England Biolabs). Los volúmenes utilizados para la reacción fueron los siguientes:

Reacción	Volumen (µL)
DNA fágico (1µg)	5
Enzima <i>NdeI</i> (10 U)	1
Buffer 4 (10X)	2
H ₂ O inyectable	12
Volumen total	20

La reacción total se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, la corrida se realizó a 80V durante 1:15 horas, posteriormente se analizaron las bandas y se compararon con el patrón de restricción predicho *in silico* mediante la plataforma de Neb Cutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2>)



7.8 Análisis *in silico* de la posible lipoproteína de exclusión de mEp021 (ORF81)

A partir de la secuencia del genoma de mEp021 se tomó el posible gen que codifica para una lipoproteína de exclusión anotado como ORF81 (Figura 12). Se realizó una búsqueda de genes y proteínas homólogas, así como de dominios importantes en la secuencia de aminoácidos utilizando los servidores de BLASTn, BLASTp e InterPro, respectivamente. Además de esto realizó la búsqueda de posibles promotores y terminadores adyacentes al ORF81 utilizando las plataformas de Softberry y ARNold. Por último, se modeló la estructura tridimensional de la proteína de interés mediante el servidor de I-TASSER.

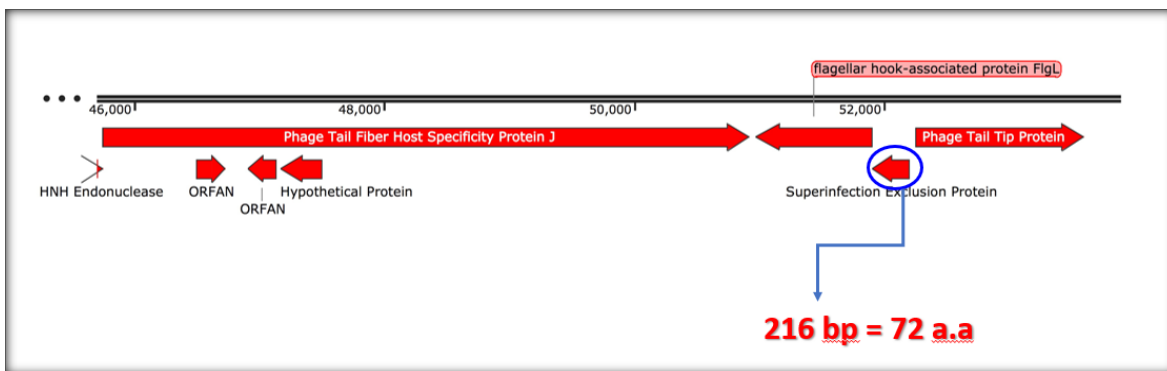


Figura 12. Localización genómica de la posible proteína de exclusión (ORF81) de mEp021.

7.9 Amplificación del gen que codifica para la posible proteína de exclusión (ORF81)

Se diseñaron los oligos que amplifican el ORF81 con los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* (5') Y *HindIII* (3') (Tabla 2), además se adicionaron nucleótidos en el oligo Rv (antisentido) que codifican para un tag de 6 histidinas en el C-terminal de la proteína. Además, se adicionó una base degenerada para codificar ya sea un codón Stop (TAA) o un codón que codifica para una Lisina (AAA).



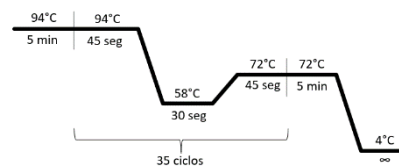
Tabla 2. Lista de oligos utilizados en este estudio

Oligo	Secuencia
Fw-ORF81	5'-CGCGGCGG [•] AATTCATGAAAATGGTAACAATTATCGCTG-3'
Rv-ORF81	5'-TCA [•] AGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTCCACTACCTTWTGACCACTCCTTACTTC-3'
Rv-ORF81 ^{6xHis}	5'-TCA [•] AGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTCCACTACCTTTGTACCACTCCTTACTTC-3'
Rv-ORF81 ^{mCherry}	5'-TCCACTACCTTTGTACCACTCCTTACTTCC-3'
Fw-mCherry	5'-AGTGGTACAAAGGTAGTGAATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'
Rv-mCherry	5'-CGGA [•] AGCTTCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

Nota: Sitio EcoRI **G[•] AATTC** y sitio HindIII **A[•] AGCTT** (el símbolo [•] indica el sitio de corte)

La reacción y las condiciones de PCR para la obtención del fragmento esperado (270 pb) fueron las siguientes:

Reacción de PCR	Volumen (µL)
H ₂ O	9.8
Buffer Taq 10X (ThermoFisher)	2
dNTP's 10 µM (ThermoFisher)	1
Oligo Fw	2
Oligo Rv	2
Dream Taq polimerasa (ThermoFisher)	0.2
DNA (mEp021)	3
Volumen total	20



La reacción se llevó a cabo utilizando el termociclador BioRAD T100.



7.10 Purificación del fragmento correspondiente al ORF81

La reacción de PCR se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, la banda de 270 pb correspondiente al ORF81 se cortó y purificó mediante el kit “Gel Extraction Kit Columns (OMEGA bio-tek)” siguiendo las especificaciones del fabricante. La banda se disolvió en 1:1 de Binding Buffer (XP2) incubando durante 7 minutos a 60°C. La mezcla se transfirió a una columna HiBind® DNA mini Column y se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto para después descartar el filtrado. A la misma columna se adicionaron 300 µL de Binding Buffer (XP2) y se centrifugó a 13,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente para descartar el filtrado. Se añadió 700 µL de buffer de lavado SPW (diluido en 100% etanol), se centrifugó a máxima velocidad y se descartó el filtrado. Para eliminar los restos de etanol se centrifugó la columna vacía a máxima velocidad por 2 minutos a temperatura ambiente. Por último, se adicionaron 50 µL de H₂O inyectable a la columna, se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto y se recuperó el filtrado. El filtrado se almacenó a -20°C

7.11 Clonación del ORF81 en el vector de transición pJET1.2/Blunt

El amplicón correspondiente al ORF81 se clonó el vector de transición pJET1.2/Blunt (ThermoFisher) siguiendo las especificaciones indicadas en el Kit CloneJET PCR Cloning. Con la finalidad de remover los extremos 3'-dA generados por la Dream Taq polimerasa en la reacción de PCR, el amplicón se digirió con la enzima “Blunting” en la siguiente reacción:

Reacción	Volumen (µL)
Buffer 2X	5
Producto de PCR (Purificado)	0.5
H ₂ O	3
Enzima Blunting	0.5
Volumen Total	9



La reacción se incubó por 5 minutos a 70°C e inmediatamente se colocó en hielo. Posteriormente se agregaron los reactivos para la ligación:

Reacción de ligación	Volumen (μL)
pJET1.2/Blunt (50 ng/ μL)	0.5
T4 Ligasa	0.5
Volumen Final	10

La reacción de ligación se incubó por 5 minutos a 22°C. Posteriormente, se transformaron 5 μL de la reacción de ligación en bacterias DH5 α quimiocompetentes.

7.12 Selección de candidatas con inserto de interés

Se tomaron de 1 a 5 colonias transformadas con la ligación de interés para extraer plásmido con la técnica de Miniprep. El plásmido extraído de las candidatas fue caracterizado por restricción con la enzima *HindIII* (New England Biolabs) con la siguiente reacción:

Reacción	Volumen (μL)
Buffer 2	2
Plásmido (~1 μg)	10
H ₂ O	7
<i>HindIII</i>	1
Volumen Total	20

La reacción de restricción se incubó a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron aquellos plásmidos que liberaron el fragmento de interés (270 pb) para su posterior secuenciación.



7.13 Clonación del ORF81 en el vector de expresión pKQV4

Se realizó una doble digestión del vector de expresión pKQV4 y la construcción pJET1.2_ORF81 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* a 37°C por 3 horas. La reacción se muestra a continuación:

Reacción	Volumen (μL)
Buffer 2	2
pKQV4 (~1 μg)	10
H ₂ O	6
<i>HindIII</i>	1
<i>EcoRI</i>	1
Volumen Total	20

El fragmento liberado de 270 pb de la construcción pJET1.2_ORF81 y la linealización de pKQV4 se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente el volumen restante de las reacciones se cargó un gel de agarosa al 0.8% para su purificación. El fragmento purificado se ligó en el vector pKQV4 de la siguiente manera:

Reacción	Volumen (μL)
pKQV4 (~150 ng)	2
Inserto (~50 μg)	15
H ₂ O	0
Buffer T4 Ligasa (10X)	2
T4 Ligasa (80 U)	1
Volumen Total	20

Como control, se realizó una ligación del vector cortado sin inserto. La reacción de ligación se incubó a 22°C durante toda la noche. Posteriormente, las mezclas de ligación se transformaron en DH5 α quimiocompetentes.



7.14 Preparación de bacterias quimiocompetentes

Las bacterias quimiocompetentes fueron preparadas según el método de Cohen et al, 1972, con ligeras modificaciones. A partir de cultivos de toda la noche de la cepa a transformar se inocularon 100 mL de LB para obtener una dilución de 1/50, el inóculo se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.4. Posteriormente las células fueron recuperadas por centrifugación a 3,904 x g por 10 minutos a 4°C y resuspendidas en 10 mL de 100 mM CaCl₂ frío (4°C), la suspensión se incubó a 4°C por 20 minutos. A continuación, las células se centrifugaron a 3,904 x g por 10 minutos a 4°C y se resuspendieron en 1 mL de 100 mM CaCl₂ frío con 40% de glicerol (4°C). Las bacterias competentes obtenidas de este se alicuotaron y almacenaron a -70°C.

7.15 Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico

La *E. coli* DH5α preparada previamente con CaCl₂ se usó para transformar las reacciones de ligación. 50 µL de bacteria se transfirieron a un tubo estéril de 1.5 mL. Se les agregó aproximadamente 10 µL de la muestra de ligación y se agitaron suavemente. Se dejaron incubar durante 30 min en hielo para posteriormente dar un choque térmico a 42°C durante 40 segundos y de inmediato poner en hielo por 2 minutos. A cada tubo se le adicionó 1 mL de medio LB o SOC y se incubó a 37°C durante 1 hora. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto y se resuspendieron en 100 µL del sobrenadante restante. Finalmente, las bacterias se espatularon sobre cajas de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Los plásmidos de las colonias candidatas se caracterizaron por restricción como se mencionó anteriormente, para su posterior secuenciación.

7.16 Extracción del DNA plasmídico

Se tomaron 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL), se inoculó una colonia de bacteria y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Al siguiente día se empastilló el cultivo el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL mediante centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto. La extracción se llevó a cabo mediante el protocolo de miniprep según Wistanley y Rapley [28]. La pastilla se resuspendió en 100 µL de solución 1 (Apéndice 2). Después se adicionaron 200 µL



de solución 2 (Apéndice 2) y se mezcló por inversión aproximadamente 5 veces. Se agregaron 150 μL de solución 3 (Apéndice 2) a 4°C, se agitó por vortex y se dejó reposar durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 mL. Se adicionó 1 volumen (500 μL) de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico, se mezcló con vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 12,000 x g por 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 mL. Posteriormente, se hizo un lavado con cloroformo, se adicionó 1 volumen (500 μL) de cloroformo, la mezcla se mezcló durante 10 segundos con vortex y se centrifugó a 12,000 x g para recuperar el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo estéril de 1.5 mL. Se agregaron 2 volúmenes (1 mL) de Etanol absoluto grado biología molecular a temperatura ambiente, la mezcla se agitó en vortex por 10 segundos y se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1 mL de 70% Etanol a -20°C, la mezcla se agitó por vortex hasta despegar la pastilla, se centrifugó a 12,000 x g durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar al mechero hasta eliminar por completo los restos de etanol presentes en esta. La pastilla seca se resuspendió en 50 μL de TE 0.1X y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

7.17 Secuenciación de DNA

De las candidatas seleccionadas (por la librería del fragmento de interés) se extrajo el DNA plásmidico y se secuenciaron utilizando el kit BigDye® Terminator Kit protocol (Applied Biosystems), la reacción se realizó de la siguiente manera:

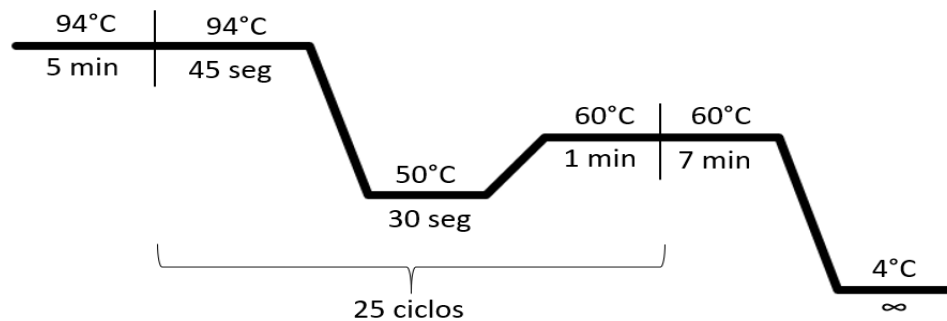
Reacción	Volumen (μL)
H ₂ O	2
Buffer 5X	4
Primer Fw o Rv	1 (10 pmoles)
Plásmido	2
Mix 3.1	1 (500 ng)
Volumen Total	10



Los oligos utilizados para la secuenciación fueron los siguientes:

Oligos	Secuencia 5' – 3'
pJET1.2 Forward Sequencing Primer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 Reverse Sequencing Primer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
Fw-ORF81	CGCGGCGGAATTCATGAAAATGGTAACAATTATCGCTG
Rv-ORF81	TCAAGCTTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTCCACTACCTTWG TACCACTCCTTACTTC

Las condiciones para la reacción de secuenciación fueron las siguientes:



7.18 Ensayo de infección/exclusión

El ensayo de infección/exclusión fue realizado de acuerdo a lo descrito por Kameyama et al. [21]. A partir de cultivos overnight de *E. coli* W3110 con diferentes combinaciones de los plásmidos pKQV4, pORF81, pORF81^{6xHis} o pORF81^{6xHis}W71C, se tomaron 300 μ L y se adicionaron cantidades necesarias de IPTG para obtener concentraciones finales de 0 mM, 0.1 mM y 0.25 mM. Las bacterias se mezclaron con 3.0 mL de T Φ suave (Apéndice 1). Posteriormente, la mezcla se esparció en cajas de T Φ (Apéndice 1) suplementadas con el antibiótico adecuado hasta dejar solidificar totalmente. Se hicieron diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) de los mEp021, mEp021 (J Δ^{1kb}) (Caraballo, 2017, datos no publicados) y como control de infección λ y mEp167 (Tabla 1) y 5 μ L de cada dilución fueron goteados en el tapiz de bacteria. Las gotas se dejaron secar completamente y las cajas se incubaron a 37°C por toda



la noche. Las placas se cuantificaron al siguiente día y reportadas como UFC/mL con la siguiente formula:

$$\text{Unidades Formadoras de Placa (UFP)} = \frac{\text{No. de placas por gota} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de gota (mL)}}$$

7.19 Curva de crecimiento de W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con diferentes concentraciones de inductor

A partir de cultivos overnight de las cepas W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 se hicieron diluciones 1:100 para cada cepa evaluada y para cada concentración de inductor utilizada (0 mM, 0.1 mM y 0.25 mM). Las diluciones se incubaron a 37°C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀= 0.1. Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada se agregaron las concentraciones indicadas de inductor IPTG, se tomaron muestras por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 horas para medir densidad óptica. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las cepas y para cada concentración de IPTG.

7.20 Ensayo de infección/exclusión en cepas JW3996 (λ B⁻) y C600 (fhuA⁻)

Se inocularon 5 mL de medio LB con bacterias frescas de las cepas JW3996 y C600. Tomando estos cultivos se hicieron bacterias competentes de cada una de las cepas para ser transformadas con la construcción pORF81 como se describe en el apartado 7.15. Las cepas transformadas se plaquearon en cajas con Ampicilina (100 µg/mL) y Kanamicina (50 µg/mL). Posteriormente se hicieron tapices de bacterias frescas como se indica en el apartado 7.5. Los tapices de bacteria fresca se infectaron con los fagos mEp021, mEp021 (J^{Δ1kb}) (Caraballo, 2017, datos no publicados) y como control de infección λ y mEp167. Las placas se cuantificaron al siguiente día y reportadas como UFC/mL con la siguiente formula:

$$\text{Unidades Formadoras de Placa (UFP)} = \frac{\text{No. de palcas por gota} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen de gota (mL)}}$$



7.21 Ensayo de adsorción

El ensayo de adsorción se realizó según Garvey et al [29]. A partir de cultivos overnight de W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 se hicieron diluciones hasta ajustar los cultivos a una OD₆₀₀ de 0.1 y se incubaron a 37°C con agitación de 200 rpm. Una vez que los cultivos llegaron a una DO₆₀₀ de 0.6 se tomaron 500 µL y se centrifugaron a 6,000 rpm (3,904 x g) en la centrifuga Hettich® Mikro 22R. El pellet de bacterias se resuspendió en 100 µL de medio LB y 20 µL de MgCl₂/ CaCl₂ 0.4M. La suspensión de células (100 µL de medio LB y 20 µL de MgCl₂/ CaCl₂ 0.4M como control) se mezcló con 5 µL de un lisado de fago con un título de 2 x 10⁶ UFP/mL de mEp021 o λ como control, dando una multiplicidad de infección (MOI por sus siglas en inglés “Multiplicity of Infection”) de 0.1. La mezcla fue incubada a 37°C con agitación constante. Se tomaron 10 µL de muestra en los tiempos 0, 15, 30, 45, 60, y 75 minutos. La muestra se centrifugó a 6,000 rpm (3,904 x g) en la centrifuga Hettich® Mikro 22R durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se hicieron diluciones seriadas del sobrenadante (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³) y se gotearon de acuerdo a lo reportado por Silhavy et al [21] y lo descrito en el apartado 7.18. Al siguiente día las placas se cuantificaron y se reportaron como fago no adsorbido.

7.22 Expresión e inmunodetección de la proteína codificada por el ORF81

7.22.1 Expresión de ORF81 en W3110

De un cultivo overnight de las cepas W3110/pKQV4 y W3110/pORF81^{6xHis}, se hicieron diluciones 1/100 en un volumen de 10 mL de LB con ampicilina (100 µg/mL), cuando se alcanzó una DO₆₀₀ de 0.3 se hizo una inducción con 0.1mM IPTG y se tomaron muestras por 0, 1, y 2 horas. De cada intervalo de tiempo se tomó 1mL, el cual se ajustó a la DO inicial para posteriormente centrifugar a 18,900 x g por 1 minuto, la pastilla se resuspendió en 100 µL de buffer de carga y 100 µL de agua destilada estéril, cada muestra se colocó en ebullición por 5 minutos, después se colocó en hielo por 5 minutos y finalmente se centrifugó a 21,900 x g por 15 minutos, el sobrenadante se corrió en un gel de bis-acrilamida al 16%.



7.22.2 Preparación del gel de proteínas

Se preparó un gel de Tris-Tricina al 15%. El gel separador con una concentración del 15% de acrilamida y el gel separador 4.2%. Los volúmenes utilizados para cada gel se muestran en la siguiente tabla:

Gel separador 15%	Volumen
Acrilamida (Apéndice 4)	1.5 mL
Buffer del gel (Apéndice 4)	1 mL
H ₂ O	0.314 mL
Glicerol	0.168 mL
Persulfato de amonio 1% (Apéndice 4)	15 µL
TEMED	1.5 µL
Volumen Total	3 mL

Gel concentrador 4.2%	Volumen
Acrilamida (Apéndice 4)	0.280 mL
Buffer del gel (Apéndice 4)	0.655 mL
H ₂ O	0.560 mL
Glicerol	0.500 mL
Persulfato de amonio 1% (Apéndice 4)	10 µL
TEMED	1 µL
Volumen Total	3 mL

Los geles se dejaron polimerizar, posteriormente se cargaron 20 µL de cada muestra y 5 µL del marcador (Precision Plus Protein Dual Xtra standard Bio-Rad). Los geles se corrieron por 4 horas a 80 volts.



7.22.3 Tinción de plata

La tinción del gel se realizó de acuerdo al protocolo Silver Stain Plus de BioRad. Después de correr el gel, éste se colocó en un recipiente de vidrio con 100 mL de la solución fijadora (Apéndice 5) y se agitó lentamente por 1 hora, la solución se desechó, el gel fue lavado con agua Milli-Q por 10 minutos 3 veces. Posteriormente se colocaron 15 mL de la solución teñidora (Apéndice 5), hasta que se observó la aparición de las bandas de proteínas, la tinción se detuvo con una solución de ácido acético al 5% (Apéndice 5).

7.22.4 Western Blot

El gel de SDS-PAGE se transfirió a membrana de nitrocelulosa, utilizando la técnica de transferencia en cámara húmeda que se corrió a 60 volts por 1 hora.

Una vez transferido el gel a la membrana este se colocó en solución de bloqueo (PBS, 7% leche y 0.2% Tween) y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante durante 2 horas. Posteriormente la solución de bloqueo se retiró y se agregó una nueva solución de PBS, Tween 0.2% y 2% leche con una dilución de 1:3000 del anticuerpo primario (6xHis) (GeneTex), la membrana se incubó a 4°C con agitación constante durante toda la noche.

Al día siguiente se retiró la solución de anticuerpo primario y se hicieron 3 lavados con solución de PBS-Tween 0.2%. Se retiró la solución de lavado y se agregó la solución del anticuerpo secundario (anti-ratón) con una dilución 1:3000, PBS, 0.2% Tween y 2% leche Svelty. La membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, la membrana se lavó tres veces con solución PBS, 0.2% Tween.

La membrana se reveló utilizando el kit SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate #34095 de ThermoFisher.



7.23 Fraccionamiento de la bacteria

Las fracciones de membrana y citoplasma fueron obtenidas en base al protocolo descrito por Aono et al, con algunas modificaciones [31]. A partir de cultivos overnight de W3110 conteniendo los plásmidos pKQV4 ó pORF81^{6xHis}, se hicieron diluciones 1/200 en 1 litro de medio LB y se incubaron a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. Los cultivos se indujeron con 0.1mM de IPTG por 1 hora y se recuperaron las bacterias por centrifugación a 8,000 rpm (9,793 x g) por 10 minutos a 4°C utilizando la centrifuga Beckman® Avanti J25 y el rotor JA-14. La pastilla de bacterias se resuspendió en 125 mL de buffer NTI-10G (20 mM Tris base, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0.04% Azida de Sodio, 10% Glicerol) con 12 mg de lisozima y 1 pastilla disuelta de Benzonasa® (coctel de inhibidores de proteasas y nucleasas). La suspensión se incubó en hielo por 1 hora y posteriormente se sonicó a 12 micrones de amplitud con 5 pulsaciones de 30 segundos cada una, dejando reposar 2 minutos entre cada una. El lisado se clarificó por centrifugación a 10,000 (10,393 x g) por 15 minutos a 4°C en el rotor JA-20. El sobrenadante resultante se ultracentrifugó a 27,000 rpm (100,000 x g) por 1:10 hrs a 4°C utilizando la centrifuga Beckman® XL90-ultracentrifuge en el rotor SW40Ti. Se recuperó el sobrenadante, el cual contiene la fracción citoplasmática y se almacenó a -70°C. La pastilla se lavó 3 veces con el buffer NTI-10G, después se resuspendió en 5 mL del mismo buffer con 0.5% de Sarkosyl (Sodium lauroyl sarcosinate) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 32,000 rpm (124,103 x g) por 2 horas a 4°C utilizando la centrifuga Beckman® XL90-ultracentrifuge en el rotor SW50.1Ti. Se recuperó el sobrenadante, el cual corresponde a la fracción de membrana interna y se almacenó a -70°C. La pastilla, que corresponde a la membrana externa se lavó tres veces con el buffer NTI-10G y se resuspendió en 600 µL de buffer NTI-10G y 119 µL de n-Dodecyl β-D-maltoside 100mM. La muestra se almacenó a -70°C.



8. RESULTADOS

8.1 Análisis *in silico* del ORF81.

El genoma del colifago mEp021 tiene anotados 92 ORFs, 34 (36.95%) de ellos tienen homología con genes que ya presentan una función asignada, los 58 (63.04%) restantes corresponden a ORFans que poseen cierta homología con genes hipotéticos o no poseen ninguna homología con los genes registrados en bases de datos.

El ORF81, que se mencionará en adelante con el término Lpp^{mEp021} para referirse al péptido codificado por este gen; se encuentra en el bloque de genes que codifican para las proteínas que forman el virión, específicamente la cola y la cabeza del fago. Este ORF tiene 216 pb que codifican para un péptido de 72 aminoácidos.

Se encuentra flanqueado por 2 genes importantes para la estructura del virión, río arriba del ORF81 se encuentra un gen que codifica para la proteína “flagellar hook-associated protein FlgL” y se encuentra codificado en la cadena (+) del genoma y río abajo se encuentra el gen que codifica para una proteína estructural, la “Phage Tail Tip Protein” (Figura 13).

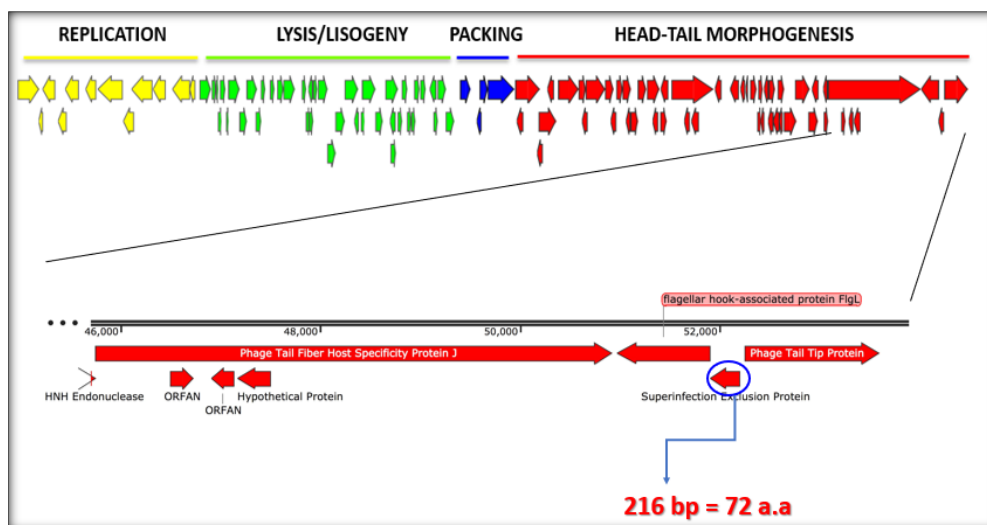


Figura 13. Localización del ORF81 en el genoma de mEp021. En la parte superior se muestra el genoma de mEp021 (5,655 pb), así como cada uno de los bloques según su función. Replicación (amarillo), Lisis/lisogénia (verde), empaquetamiento (azul) y morfogénesis (rojo). En la parte inferior se muestra la localización exacta del ORF81.



8.1.1 Análisis de BLASTp de Lpp^{mEp021}

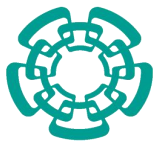
La secuencia nucleotídica del ORF81 no presenta ninguna similitud con genes reportados en base de datos, pero de acuerdo con el análisis de BLASTp, Lpp^{mEp021} presenta 96% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con una proteína hipotética de *Escherichia coli*, 49% con la posible lipoproteína del fago Rtp de *Escherichia coli* y con la lipoproteína del fago SH6 de *Shigella* y 46% con la proteína hipotética del fago HK5778 de *Escherichia coli* (Tabla 2).

Tabla 2. Homólogos de Lpp^{mEp021} a nivel de secuencia de aminoácidos

Blastp Lpp ^{mEp021}	Query	E-value	Identidad
Proteína hipotética de <i>Escherichia coli</i>	100%	6e-44	96%
Posible lipoproteína del fago Rtp de <i>Escherichia coli</i>	98%	3e-15	49%
Lipoproteína del fago SH6 de <i>Shigella</i>	98%	2e-13	49%
Proteína hipotética del fago HK5778 de <i>Escherichia coli</i>	97%	3e-11	46%

8.1.2 Búsqueda de dominios conservados.

De acuerdo al servidor InterPro (Figura 14) la secuencia de aminoácidos de Lpp^{mEp021} se identifica como una lipoproteína de procariontes, siendo esta la principal de sus características, además, presenta un péptido señal en sus residuos 1-16 el cual es característico de proteínas de secreción o proteínas transmembranales, dicha péptido señal cuenta con sus tres características principales: un dominio N del residuo 1-3 en el que presenta aminoácidos de carga positiva, un dominio H del residuo 4-12 en el que presenta aminoácidos hidrofóbicos y un dominio C del residuo 13-16 en donde se encuentra un sitio de corte para una peptidasa. Por último, un dominio denominado como “no citoplasmático” del residuo 17-72. La presencia de dichos dominios podría favorecer la translocación de la Lpp^{mEp021} hacia el periplasma donde podría ser procesada e interactuar con otras proteínas y tener su función de exclusión.



Detailed signature matches



Figura 14. Búsqueda de dominios utilizando el servidor InterPro. Los rectángulos rojos representan los dominios presentes en la proteína, en el lado derecho se muestran los en los que se encuentra presente dicho dominio.

8.1.3 Búsqueda de secuencias “Lipobox” y comparación con proteínas de exclusión

Según el análisis de BLASTp, Lpp^{mEp021} da “match” con lipoproteínas presentes en *Escherichia coli*, fagos de *E. coli* y de *Salmonella*. Por lo tanto, se decidió hacer una búsqueda de la secuencia “lipobox” la cual es característica de las lipoproteínas en bacterias Gram negativas, la secuencia lipobox consta de los siguientes aminoácidos [L/V/I][A/S/T/V/I][G/A/S]C.

Lpp^{mEp021} posee una “lipobox” en su secuencia de aminoácidos (LVGCA) (Figura 15), la cual va del residuo 13 al residuo 17, esta secuencia posee el residuo de Cisteína conservada necesaria para el procesamiento de las lipoproteínas, este residuo se encuentra en la posición +1 de la “lipobox” y en la posición 16 del péptido. En la posición +2 de la “lipobox” se encuentra un residuo de Alanina, el cual, según la regla de las lipoproteínas le permite exportarse a la membrana externa de la bacteria.

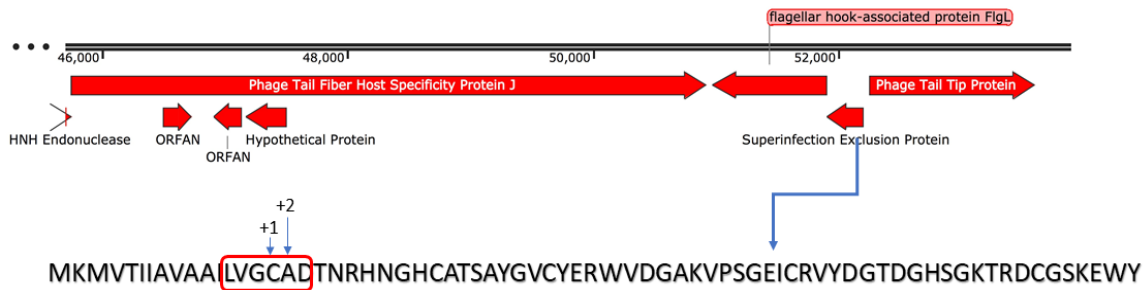


Figura 15. Localización de la secuencia “lipobox” en Lpp^{mEp021}. En el recuadro rojo se muestra la secuencia lipobox la cual va del residuo 13 al residuo 17, en la posición +1 hay un residuo de Cisteína y en la posición +2 un residuo de Alanina.

Se realizó un alineamiento con las lipoproteínas que se han reportado en bacteriófagos, específicamente lipoproteínas de exclusión, para esto se tomaron las lipoproteínas de los fagos de *Escherichia coli*. mEp167, HK022, Phi80, N15, T5 y el fago de *Shigella* Sh6. Interesantemente todas estas proteínas poseen una “lipobox” que se encuentra aproximadamente entre los residuos 15 al 19 que concuerda con la de la Lpp^{mEp021}, además de una región río arriba de la “lipobox” de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 16).

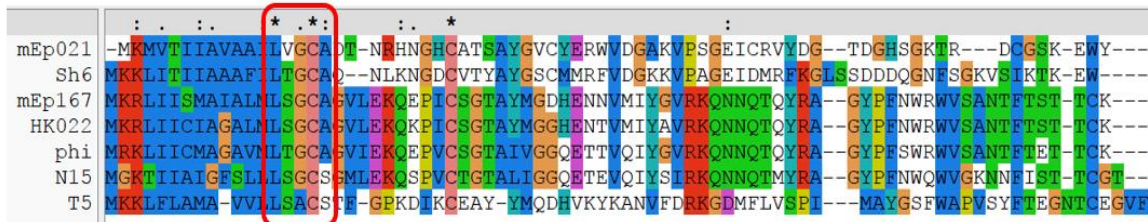


Figura 16. Alineamiento con lipoproteínas caracterizadas en otros bacteriófagos. En recuadro rojo se muestra la secuencia “lipobox” de cada una de las proteínas.

8.1.4 Búsqueda de promotores y terminadores cercanos al ORF81

Según el servidor de Softberry existen dos promotores río arriba del ORF81, el “Promoter 1” se encuentra entre la región 52,959 y 52,984 del genoma del fago y consta de 26 pb, con los sitios -10 (TTTTATGCT) y -35 (TTGTGA), y el “Promoter 2” se encuentra dentro del gen “Phage Tail Tip Protein” entre la región 53,352 y



53,380 del genoma del fago y consta de 29 pb, con los sitios -10 (TGGAAAAAT) y -35 (GTGCAT) (Figura 17).

Además de los promotores, el servidor ARNold indica la presencia de un terminador río abajo del ORF81, el terminador se encuentra dentro del ORF que codifica para la proteína “J” y se encuentra dentro de la región 49,705 y 49,743 dentro del genoma del fago (Figura 17).

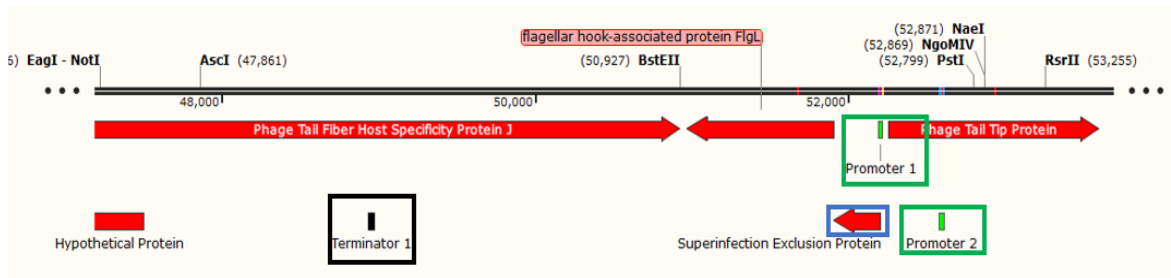


Figura 17. Localización de los promotores y terminador adyacente al ORF81. En el recuadro azul se señala el ORF81, en recuadro verde los dos promotores predichos por el servidor Softberry y en recuadro negro el terminador predicho por el servidor ARNold.

8.1.5 Predicción de estructura tridimensional por I-TASSER

Tomando en cuenta que Lpp^{mEp021} es una posible lipoproteína, se predijo la estructura tridimensional de la proteína procesada (apolipoproteína) y la proteína sin procesar (prelipoproteína). En la estructura tridimensional de la prelipoproteína (C-score: -2.61) se muestra una hélice en el extremo N-terminal de la proteína, que corresponde a los aminoácidos hidrofóbicos presentes en la secuencia, en el C-terminal se observa una cadena lineal de aminoácidos sin estructura definida (Figura 18). En la estructura tridimensional de la apolipoproteína (C-score: -1.54) se observa la pérdida de la hélice hidrofóbica en su extremo N-terminal debido al procesamiento normal de las lipoproteínas, además que se observa de manera más clara la presencia de láminas β en la región media del péptido (Figura 18). Sin embargo, la estructura no muestra la adición de los tres grupos acilos en la cisteína como se presume que está pasando en el caso de que Lpp^{mEp021} sea una lipoproteína.

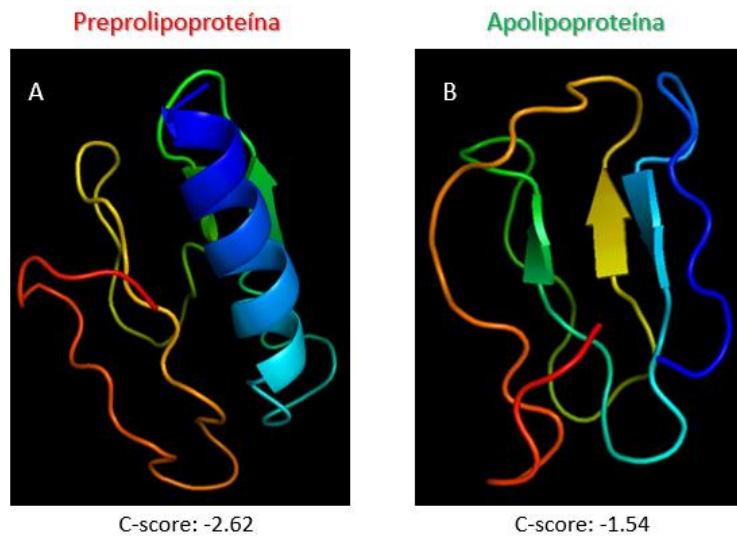


Figura 18. Predicción de estructura tridimensional de Lpp^{mEp021} por I-TASSER. A) Preprolipoproteína (C-score: -2.62). B) Apolipoproteína (C-score: -1.54).

8.2 Propagación y caracterización de mEp021

El bacteriófago mEp021 y λ (como control) se propagaron en la cepa W3110, se obtuvo un título de 1.15×10^{11} UFP/mL para mEp021 y 1×10^{10} UFP/mL para λ . Además, se comprobó el fenotipo de paca turbia característica del fago mEp021 y λ como se observa en la Figura 19.

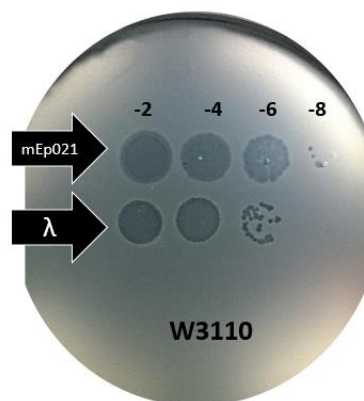


Figura 19. Título viral del fago mEp021 y λ en la cepa *E. coli* W3110



El genoma del fago mEp021 se comprobó mediante el patrón de restricción al ser digerido con la enzima *NdeI*. La restricción del genoma y su integridad se verificó mediante electroforesis como se observa en la Figura 20. El patrón de restricción se comparó con el predicho *in silico*. En la Figura 20 se observa que el patrón de restricción de mEp021 coincide con la predicha *in silico* y coincide, por lo que el fago corresponde a mEp021 y se puede utilizar para los ensayos posteriores.

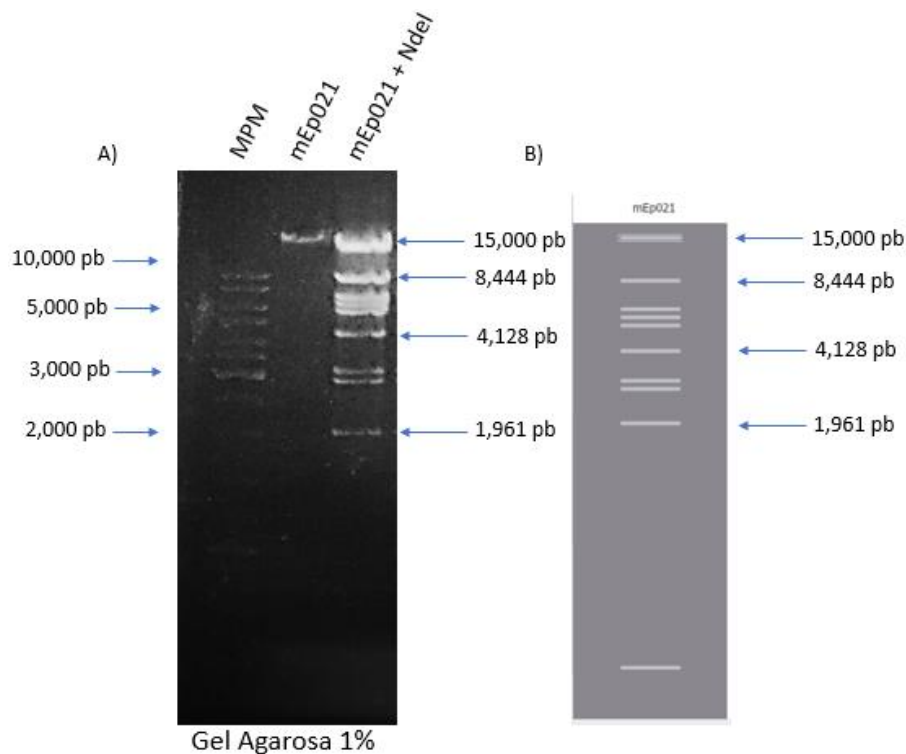
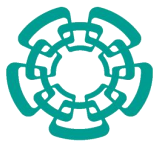


Figura 20. Integridad y patrón de restricción del DNA de mEp021. A) Electroforesis en gel del patrón de restricción de mEp021. B) Patrón de restricción *in silico* del genoma de mEp021.

8.3 Clonación del ORF81 en vector de transición y expresión

8.3.1 Amplificación del ORF81 mediante PCR

Por medio de PCR se amplificó el ORF81 y por electroforesis se observa una banda correspondiente al amplicon esperado de 270 pb, el fragmento contiene los sitios de restricción 5' *EcoRI* y 3' *NdeI* (Figura 21). Además el oligo "reverse" (Rv-ORF81) contiene la secuencia que codifica para un Tag de 6 Histidinas, así como un



nucleótido degenerado (W) que puede ser aleatoriamente una Adenina o una Timina, sí el oligo tiene una Adenina en su secuencia este codifica para un codón de Glicina el cual permite que la traducción continúe y se traduzca el Tag de Histidinas en el C-terminal del péptido, sí el oligo tiene una Timina en su secuencia este codifica para un codón de STOP y se genera una proteína sin Tag de Histidinas.

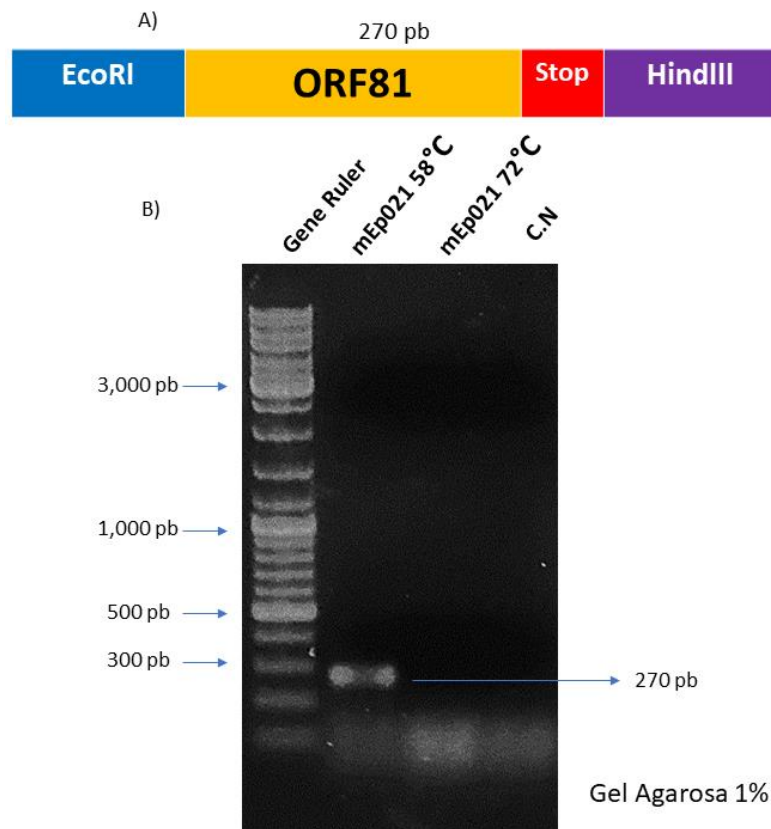


Figura 21. Características y amplificación del ORF81. A) características predichas del amplicon correspondiente al ORF81. B) Electroforesis en gel de agarosa 1%. Gene Ruler = marcador de peso molecular 10 kb, C.N = control negativo.

8.3.2 Clonación del ORF81 en vector de transición pJET1.2/blunt

El fragmento correspondiente al ORF81 se clonó el vector de transición pJET1.2/blunt y posteriormente se transformó en cepas quimiocompetentes DH5 α . Se obtuvieron 50 candidatas de la transformación, de las cuales se tomaron 5 de estas para realizar la extracción de plásmido y caracterización de este por restricción con la enzima *HindIII*. El fragmento puede clonarse en dos direcciones distintas: 1) en dirección a los genes del vector pJET1.2/blunt; que debe de liberar



un fragmento de 520 pb con la digestión por *HindIII*. 2) en dirección contraria a los genes del vector pJET1.2/blunt; que debe liberar un fragmento de 260 pb con la digestión por *HindIII*.

La restricción se analizó por electroforesis en un gel agarosa al 1%. Se seleccionaron las candidatas “C.2” y “C.3” que liberan un fragmento de aproximadamente 300 pb, lo que significa que el fragmento se insertó en sentido contrario a los genes del vector (Figura 22).

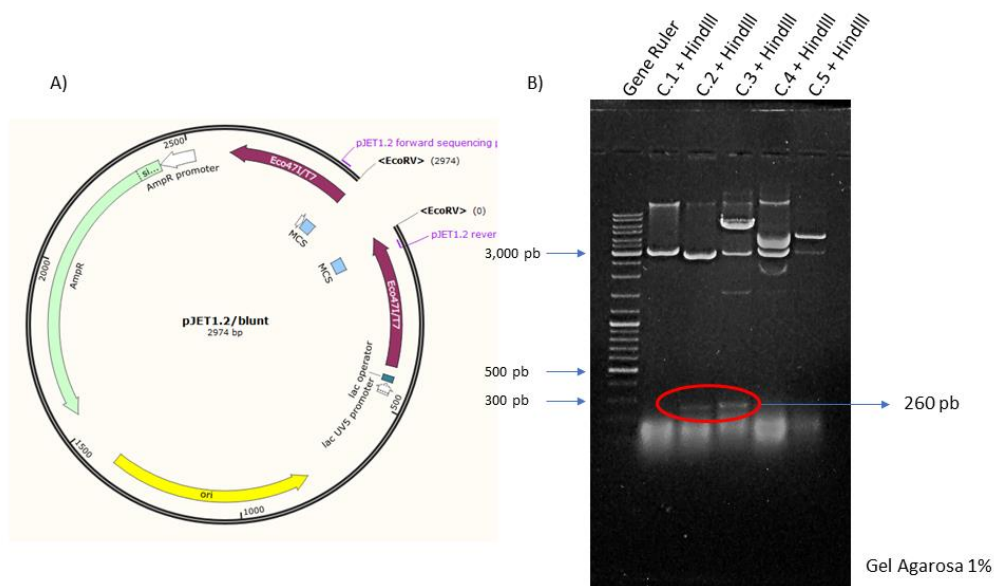


Figura 22. Caracterización de candidatas pJET/ORF81. A) Mapa del vector pJET1.2/blunt. B) Electroforesis de restricción de las candidatas, con la enzima *HindIII*.

Ambos plásmidos de las candidatas “C.2” y “C.3” se secuenciaron. La secuencia de “C.2” no presenta ninguna mutación y contiene los sitios de restricción para *EcoRI* en 3’ y *HindIII* en 5’, además la secuencia tiene una Timina (T) en la posición del nucleótido degenerado, lo que significa que la secuencia codifica el péptido sin Tag de Histidinas en el C-terminal (Figura 23). La secuencia de “C.3” se descartó debido a que en la secuencia se observa un “gap” que no da certeza de que la secuencia sea correcta.

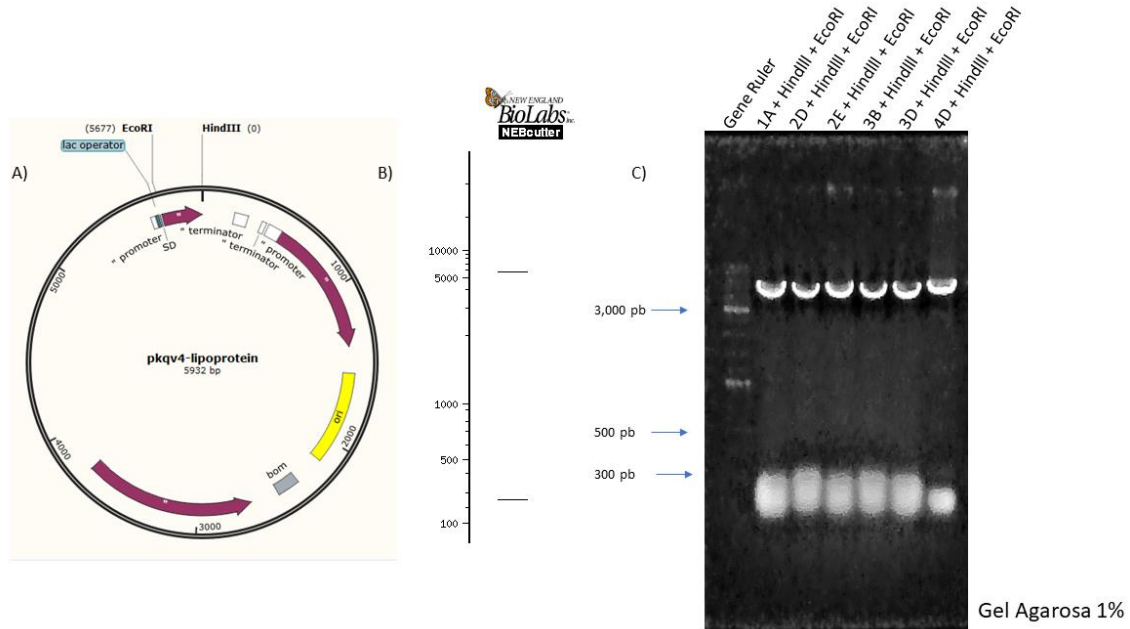


Figura 24. Restricción de candidatas pKQV4/ORF81. A) Mapa *in silico* de la pKQV4/ORF81, se indican los sitios de corte para *EcoRI* y *HindIII*. B) Predicción de restricción de pKQV4/ORF81 *in silico*. C) Gel de electroforesis de restricción de candidatas, con enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

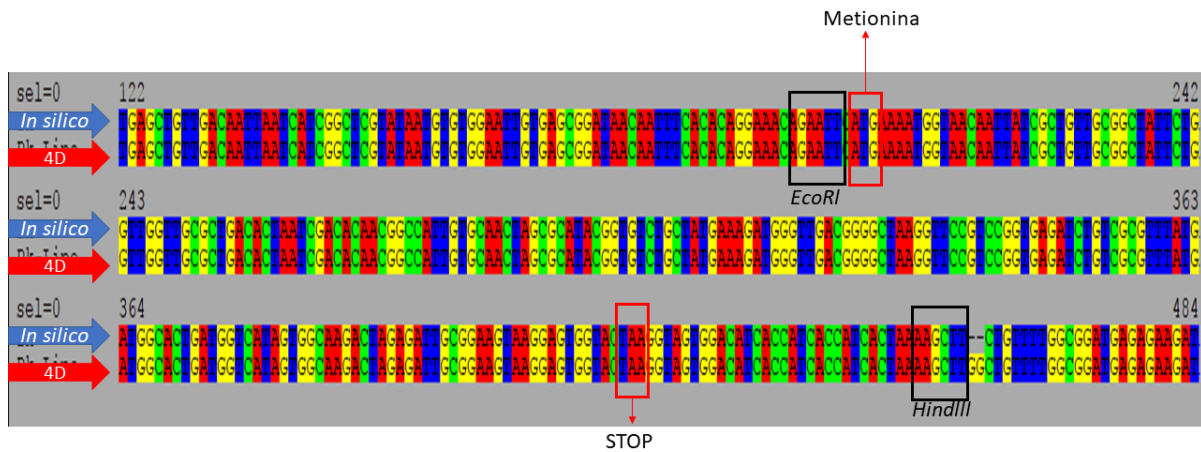


Figura 25. Alineamiento de la secuenciación de las candidatas "4D" y la secuencia *in silico* para pKQV4/ORF81. Línea 1) Secuencia esperada *in silico*, 2) secuencia "4D". En la imagen se señalan los sitios de restricción para *EcoRI* y *HindIII*, el codón de inicio (ATG) y el codón de Stop (TAA).



8.4 Ensayo de infección/exclusión en W3110/pORF81

La construcción mencionada anteriormente (pORF81) se transformó en cepas de *E. coli* W3110 quimiocompetentes, posteriormente se realizaron tapices de esta bacteria con distintas concentraciones de IPTG (0mM, 0.1mM, 0.25mM), utilizando la bacteria W3110 y W3110/pKQV4 (vector vacío) como controles de infección. Los tapices se infectaron con los mEp021, mEp021 ($J^{\Delta 1kb}$) (Caraballo, 2017, datos no publicados) y como control de infección λ y mEp167 (Figura 26).

En la Figura 26 se muestran las cepas mencionadas anteriormente sin inductor (0mM IPTG), o sea, utilizando solamente la fuga transcripcional del promotor para la expresión del gen. Como se observa, los fagos mEp021, mEp021 $J^{\Delta 1kb}$, λ y mEp167 pueden infectar de manera normal a las cepas control (W3310 y W3310/pKQV4) observando un título de aproximadamente 1×10^{11} UFC/mL para cada uno de ellos. Sin embargo, en la cepa problema W3110/pORF81 los fagos mEp021, mEp021 $J^{\Delta 1kb}$ no pueden formar placas lisis, indicando que estos fagos no pueden infectar de manera exitosa a esta cepa debido a la expresión de Lpp⁰²¹ (producto de ORF81), como control de infección los fagos λ y mEp167 pueden infectar de manera normal a esta cepa. Este resultado indica que la expresión del ORF81 por la fuga transcripcional es suficiente para excluir totalmente al fago mEp021 y mEp021 $J^{\Delta 1kb}$.

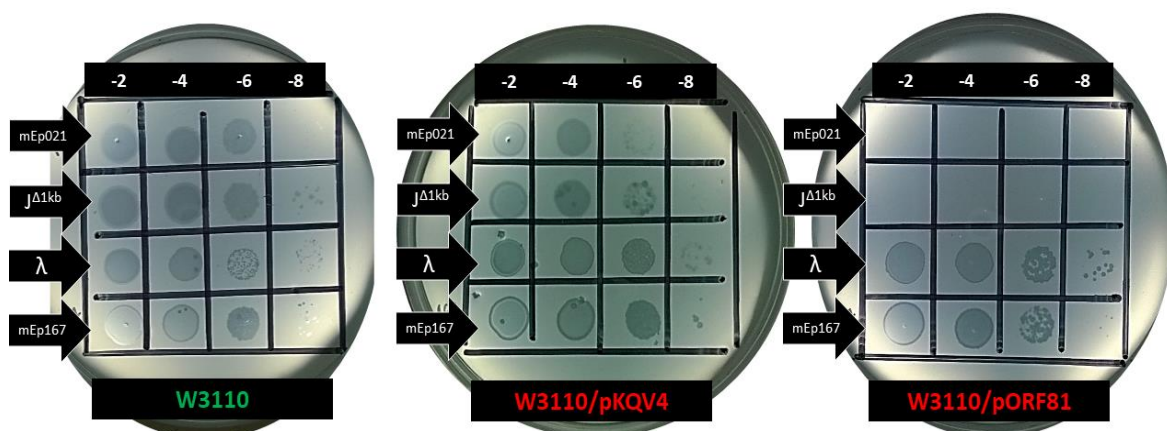


Figura 26. Ensayo de infección/exclusión sin inductor (0mM IPTG) en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021 $J^{\Delta 1kb}$, λ y mEp167. N=3.



En la Figura 27 se muestran las cepas antes mencionadas con una concentración de 0.1mM de IPTG (inductor de pKQV4), las cepas fueron infectadas con los fagos mEp021, mEp021J Δ 1kb, λ y mEp167. Utilizando 0.1mM de IPTG se observa un fenotipo muy similar que con 0mM de IPTG, es decir los fagos mEp021 y mEp021J Δ 1kb no pueden infectar de manera exitosa a la bacteria W3110/pORF81. La expresión del ORF81 con 0.1mM de inductor es capaz de excluir por completo al fago mEp021 y mEp021J Δ 1kb. Sin embargo, el tapiz de bacteria W3110/pORF81 crece de una manera irregular con dicha concentración de inductor, este fenotipo no se observa en los controles W3110 y W3110/pKQV4, lo que sugiere que el crecimiento irregular de la bacteria se debe a la inducción del ORF81 (Figura 27).

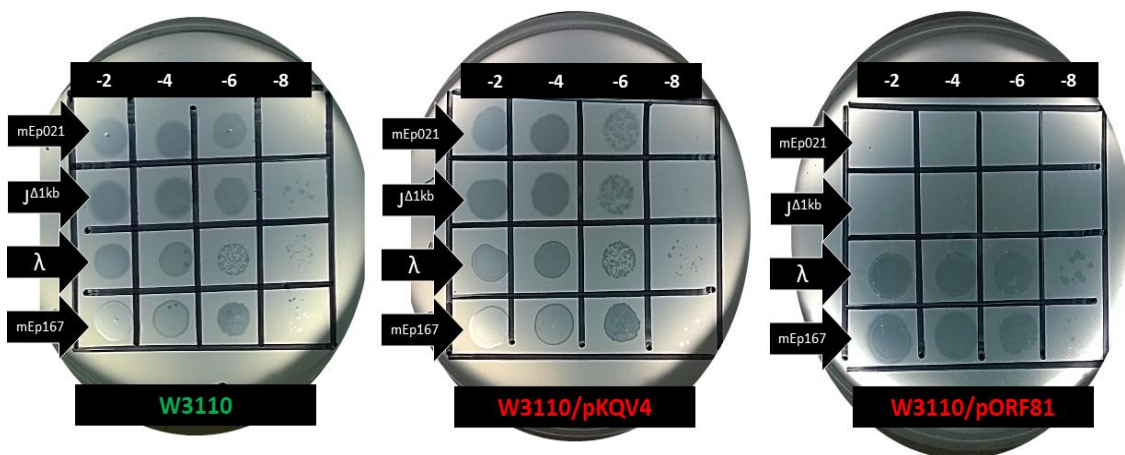


Figura 27. Ensayo de infección/exclusión con 0.1mM de IPTG en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021J Δ 1kb, λ y mEp167. N=3.

Utilizando una concentración de 0.25mM IPTG (Figura 28) el tapiz de la bacteria W3110/pORF81 se observa muy tenue y con un crecimiento pobre, fenotipo que no se observa en los controles W3110 y W3110/pKQV4, indicando que el fenotipo se debe a una posible toxicidad debido a la sobre expresión el ORF81. Interesantemente, usando 0.25mM del inductor se observa la formación de placas en mEp021 y mEp021J Δ 1kb en las diluciones -2 y -4 lo cual difiere a los resultados observados anteriormente, en este caso al expresarse más el ORF81 produce un fenotipo inverso y permite la infección de mEp021 y mEp021J Δ 1kb (Figura 28).

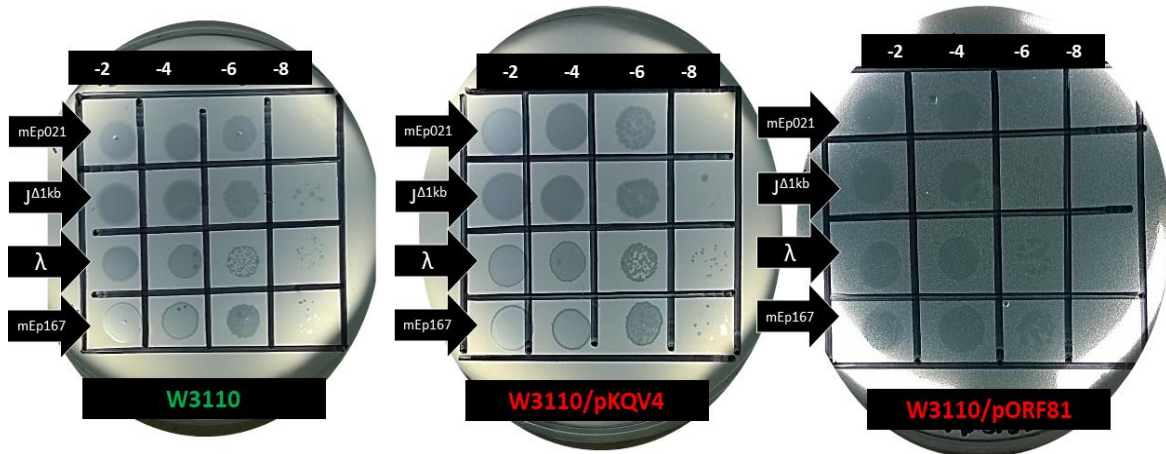


Figura 28. Ensayo de infección/exclusión con 0.25mM de IPTG en W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 con los fagos mEp021, mEp021J^{Δ1kb}, λ y mEp167. N=3.

8.5 Inducción de pORF81 y su efecto sobre la viabilidad celular

Debido a que en el ensayo de infección/exclusión se observó que la inducción de pORF81 con concentraciones de 0.1 y 0.25mM de IPTG afecta el crecimiento normal de la bacteria W3110/pORF81, se decidió hacer una curva de crecimiento utilizando las mismas concentraciones de inductor. El crecimiento se monitoreo por 8 horas midiendo la densidad óptica (OD_{600nm}) cada hora, se utilizaron las cepas W3110 y W3110/pKQV4 como controles de crecimiento (Figura 29).

La bacteria W3110/pORF81 sin inductor presenta un crecimiento normal con respecto a los controles (W3110 y W3110/pKQV4), lo cual indica que la expresión del ORF81 con la fuga transcripcional del vector no causa ninguna toxicidad en la bacteria (Figura 29). Sin embargo, a concentraciones 0.1mM y 0.25 mM de inductor la bacteria W3110/pORF81 detiene su crecimiento dentro de las primeras 4 horas con respecto a los controles, pasadas las dos horas la bacteria empieza a crecer de manera normal, esto indica que el aumento de la expresión del ORF81 es tóxica para la bacteria y que después de las 4 horas posiblemente la bacteria este degradándola, entre otras posibilidades y por lo tanto se retoma el crecimiento normal de esta (Figura 29).

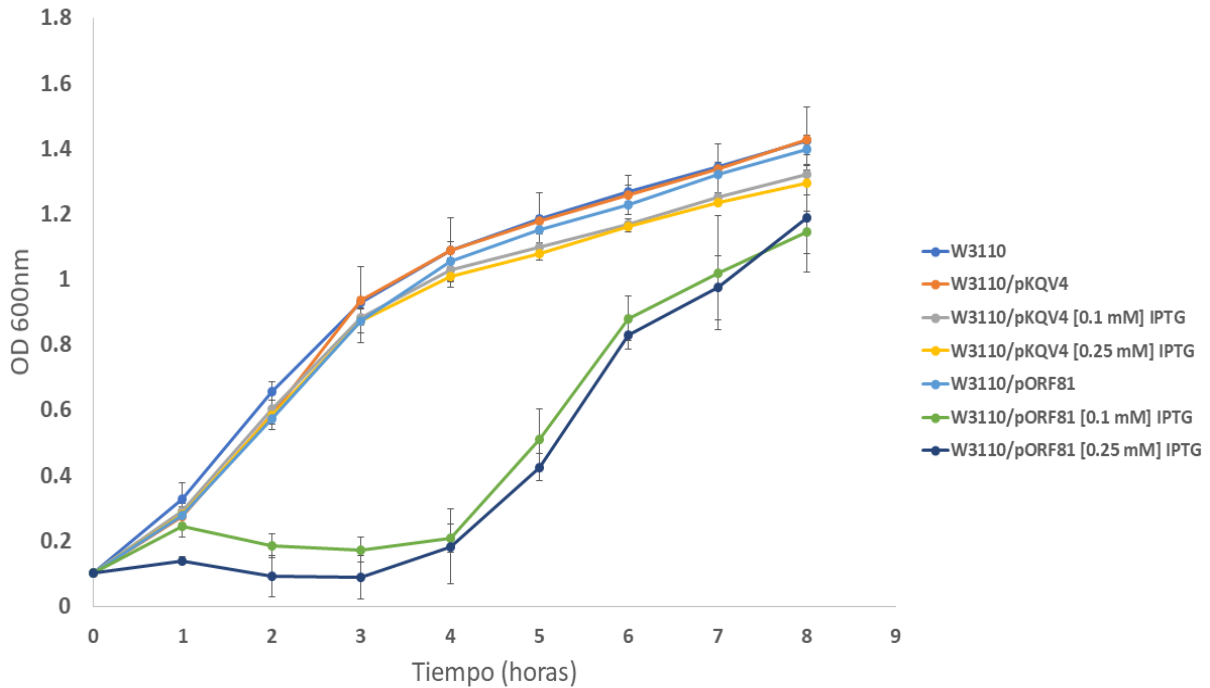


Figura 29. Viabilidad de la cepa W3110 en presencia del pORF81. Se describe el crecimiento de las cepas W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pORF81 sin inductor e inducidas con IPTG 0.1mM y 0.25mM. N=3.

8.6 Ensayo de infección/exclusión en cepas JW3996 (lamB^-) y C600 (fhuA^-)

Con la finalidad de descartar que la infección de mEp021 que se observa al sobre expresar el ORF81 se debe a una “saturación del spot”, es decir que la bacteria no puede crecer en el spot donde se goteó previamente el fago o a que la toxicidad que provoca $\text{Lpp}^{\text{mEp021}}$ permitiera que el fago permeara dentro de la bacteria, se decidió sobre expresar el ORF81 en las cepas JW3996 (lamB^-) y C600 (fhuA^-) que carecen de los receptores necesarios para λ y mEp167 respectivamente. De tal manera que sí al sobre expresar el ORF81 en estas cepas provoca el mismo fenotipo para sus respectivos fagos, entonces se debe a alguno de los fenómenos previamente mencionados.

La sobre expresión del ORF81 en la cepa C600 muestra el mismo fenotipo que en W3110, es decir si se observa infección de mEp021. Sin embargo, incluso que el tapiz muestra la misma falta de crecimiento no se observa infección de mEp167, lo que indica indirectamente que la infección de mEp021 al sobre expresar el ORF81 no se debe a una saturación del spot o permeabilidad de la bacteria (Figura 30).

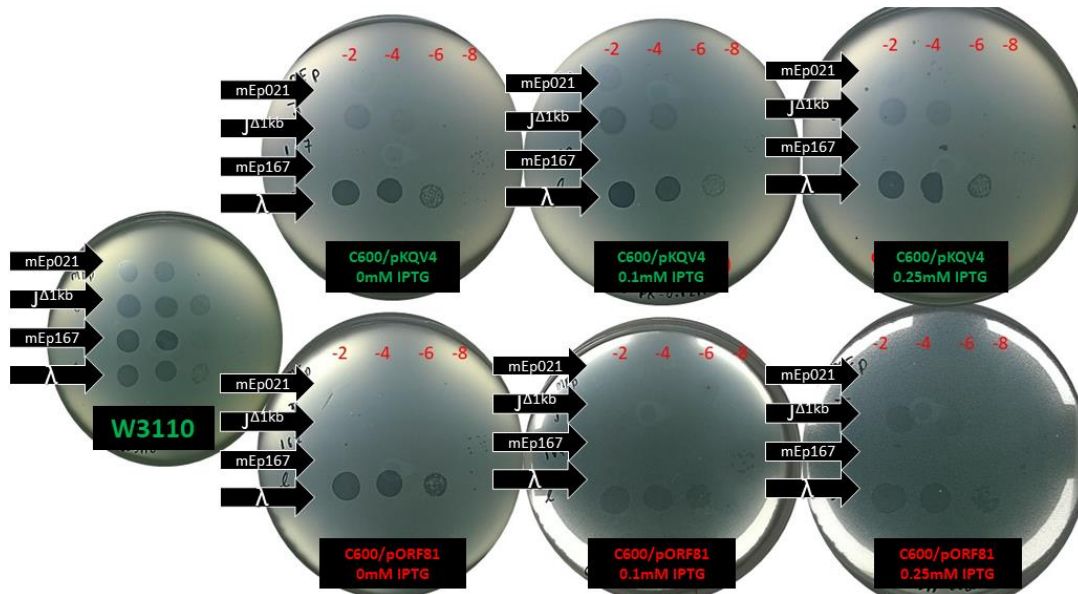


Figura 30. Ensayo de infección/exclusión en C600/pORF81. Infección de C600/pORF81 con distintas concentraciones de IPTG, C600/pKQV4 y W3110 como control de infección. N=3.

La infección de mEp021 en la cepa C600 disminuye dos logaritmos, comparando con la cepa silvestre W3110. Con la finalidad de descartar que esta disminución se debe a la ausencia de *fhuA* en la cepa C600, se realizó un ensayo de infección en la cepa JW0146 (*fhuA*⁻). En la Figura 30.1 se observa que mEp021 puede infectar de manera normal a una cepa que carece de *fhuA*, por lo que la disminución del título viral en C600 podría deberse a las mutaciones adicionales que muestra esta cepa.

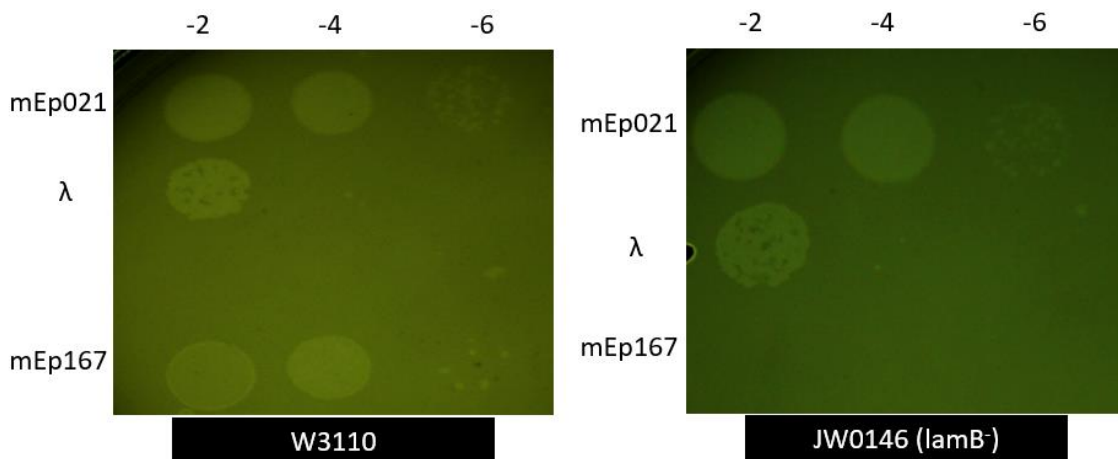


Figura 30.1 Ensayo de infección en la cepa W3110 y JW0146 (*fhuA*⁻). Infección con mEp021, λ y mEp167 como control negativo de infección.



Interesantemente la expresión del ORF81 en la cepa JW3996 (lamB^-) permite la infección de mEp021 y mEp021 $\Delta 1\text{kb}$, es decir $\text{Lpp}^{\text{mEp021}}$ pierde su capacidad de excluir a mEp021 en la ausencia de la proteína LamB (Figura 31). Este resultado sugiere que $\text{Lpp}^{\text{mEp021}}$ requiere de la interacción con LamB para poder excluir a mEp021.

Además, la sobre expresión del ORF81 en la cepa JW3996 (lamB^-) no permite la infección de λ , lo que reafirma lo demostrado anteriormente que la infección de mEp021 debida a la sobre expresión del ORF81 no se debe a una saturación del spot o permeabilidad de la bacteria.

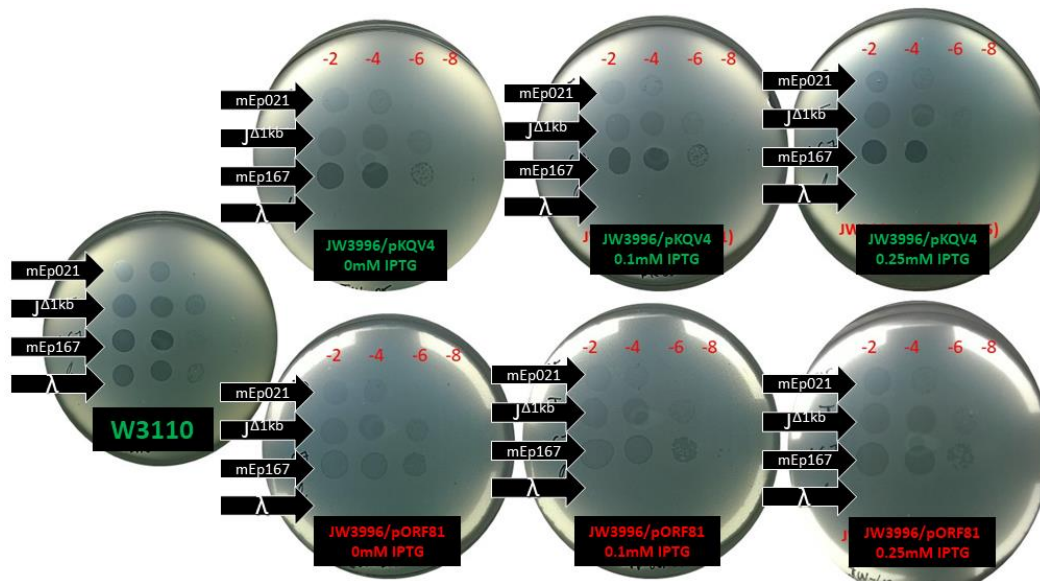


Figura 31. Ensayo de infección/exclusión en JW3996 (lamB^-)pORF81. Infección de JW3996/pORF81 con distintas concentraciones de IPTG, C600/pKQV4 y W3110 como control de infección. N=3.

8.7 Ensayo de infección en mutantes para proteínas de membrana (*Keio collection*)

Debido al resultado descrito anteriormente en el que se observa que la $\text{Lpp}^{\text{mEp021}}$ requiere de la proteína LamB para evitar la infección por mEp021, se decidió probar si la ausencia de otras proteínas de membrana también podría afectar la capacidad de exclusión de $\text{Lpp}^{\text{mEp021}}$, por lo que se utilizaron las cepas JW3996 (lamB^-), C600 (fhuA^-), JW1248 (ompW^-), JW2203 (ompC^-), JW3995 (malK^-), JW0912 (ompF^-), JW3993 (malF^-), y JW3992 (malG^-).



Las cepas se infectaron con los fagos mEp021, mEp021J^{Δ1kb}, λ y mEp167, como se muestra en la Tabla 3 todas las cepas pueden ser infectadas de manera normal por todos los fagos, con excepción de las cepas JW3996 (lamB⁻) y C600 (fhuA⁻) que no pueden ser infectadas por los fagos λ y mEp167, respectivamente, debido a que carecen de sus receptores de membrana externa (LamB y FhuA).

Las cepas mencionadas anteriormente fueron transformadas con la construcción pORF81 y fueron infectadas por los mEp021, mEp021J^{Δ1kb}, λ y mEp167, esto con la finalidad de identificar si alguno de estos elementos de la membrana es necesario para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}.

Como se muestra en la Tabla 4 las cepas transformadas con pORF81 son capaces de excluir a mEp021 y mEp021J^{Δ1kb} con excepción de las cepas JW3996 (lamB⁻), JW3992 (malG⁻) y JW3993 (malF⁻); como se había mencionado anteriormente la proteína de membrana externa LamB es necesaria para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}, pero este resultado demuestra que las proteínas de membrana interna MalG y MalF también son necesarias para la exclusión mediada por esta proteína. Estos resultados demuestran que la exclusión mediada por Lpp^{mEp021} requiere de proteínas de membrana externa y membrana interna.



Tabla 3. Infección por fagos en cepas con deleciones en proteínas de membrana

Cepas	Gpo Inmunidad: Receptor principal:	Bacteriófagos			
		mEp021	mEp021J ^{A1kb}	λ	mEp167
		I	I	λ	VI
W3110	OmpA	+	+	+	+
BW25113	OmpA	+	+	+	+
C600 (fhuA ⁻)	OmpA	+/-	+/-	+	-
JW3996 (lamB ⁻)	OmpA	+	+	-	+
JW1248 (ompW ⁻)	OmpA	+	+	+	+
JW2203 (ompC ⁻)	OmpA	+	+	+	+
JW3995 (malK ⁻)	OmpA	+	+	+	+
JW0912 (ompF ⁻)	OmpA	+	+	+	+
JW3993 (malF ⁻)	OmpA	+	+	+	+
JW3992 (malG ⁻)	OmpA	+	+	+	+

(+) Infección del fago

(-) Sin infección del fago N=2



Tabla 4. LamB y MalG son necesarias para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}

Cepas	Gpo Inmunidad: Receptor principal:	Bacteriófagos			
		mEp021	mEp021J ^{A1kb}	λ	mEp167
		I	I	λ	VI
W3110		+	+	+	+
BW25113		+	+	+	+
W3110/pORF81		-	-	+	+
C600 (fhuA ⁻)/pORF81		-	-	+	-
JW3996 (lamB ⁻)/pORF81		+	+	-	+
JW1248 (ompW ⁻)/pORF81		-	-	+	+
JW2203 (ompC ⁻)/pORF81		-	-	+	+
JW3995 (malK ⁻)/pORF81		-	-	+	+
JW0912 (ompF ⁻)/pORF81		-	-	+	+
JW3993 (malF ⁻)/pORF81		+	+	+	+
JW3992 (malG ⁻)/pORF81		+	+	+	+

(+) Infección del fago

(-) Sin infección del fago N=2

8.8 Ensayo de adsorción en W3110/pORF81

La infección de los bacteriófagos se divide en varios pasos, el primer paso es la adsorción que se da cuando el bacteriófago reconoce a su receptor primario en la membrana del huésped y se une de manera reversible a este, posteriormente se une al receptor principal (o secundario) en forma irreversible. Debido a que se hipotetiza que Lpp^{mEp021} es una proteína de membrana externa y su actividad de exclusión podría darse mediante el bloqueo de la adsorción, se realizó un ensayo de adsorción con la cepa W3110/pORF81 y W3110 como control de adsorción.

Sin embargo, en la cepa W3110 y W3110/pKQV4 el fago mEp021 se adsorbe en 45 minutos, perdiendo aproximadamente 80% de sus partículas virales en este tiempo,



a los 60 minutos de observa la primera liberación de fago lo que indica que a ese tiempo el fago está lisando la bacteria y liberando partículas virales al medio. Esto significa que en estas bacterias el fago está reconociendo de manera normal a su receptor de membrana externa y uniéndose de manera irreversible a éste lo que se refleja como perdida de partículas virales en el medio (Figura 32).

En la cepa W3110/pORF81 no se observa perdida de partículas virales en el tiempo, incluso a los 60 minutos se observa la misma cantidad de fagos en el medio que al tiempo 0, comparando con el control. Esto indica que Lpp^{mEp021} impide el reconocimiento normal del receptor del fago en la membrana del huésped, por lo tanto, no hay infección, replicación, ni lisis de la bacteria (Figura 32).

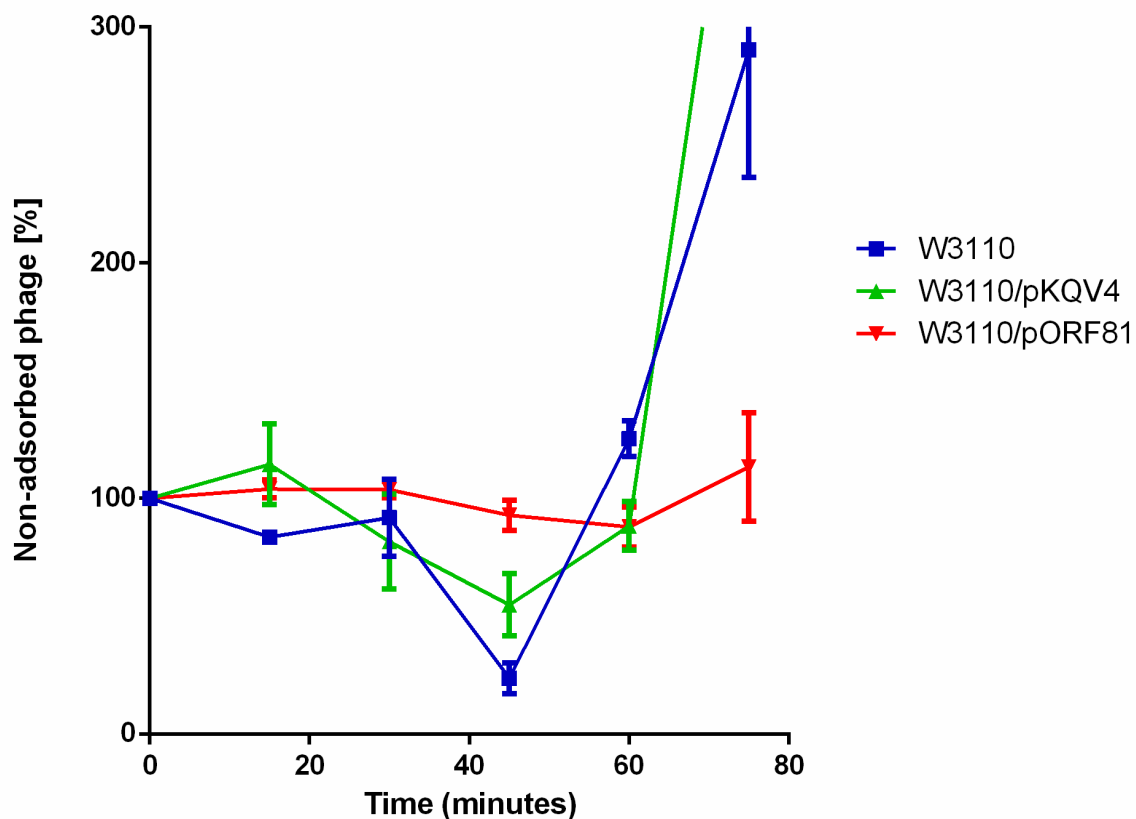


Figura 32. Ensayo de adsorción de mEp021 en W3110/pORF81. N=3.

Además, se realizó el mismo ensayo de adsorción tomando como control el bacteriófago λ en una cepa W3110 (como control positivo) y una cepa JW3996 (λ B⁻) como control negativo de adsorción. En la siguiente gráfica se muestran los



tiempos de máxima adsorción: 45 minutos para el fago mEp021 y 15 minutos para el fago λ (Figura 33).

Se puede observar que el fago λ se adsorbe de la manera reportada en la cepa W3110, perdiendo aproximadamente 85% de sus partículas virales libres en 15 minutos, ésta pérdida no se observa en la cepa JW3996 debido a la ausencia de su respectivo receptor (LamB), lo que demuestra que la metodología del ensayo de adsorción es funcional.

Además, según los análisis estadísticos (one-way ANOVA) existe una diferencia significativa en la adsorción de mEp021 en W3110/pORF81 con respecto a los controles W3110 y W3110/pKQV4 (Figura 33).

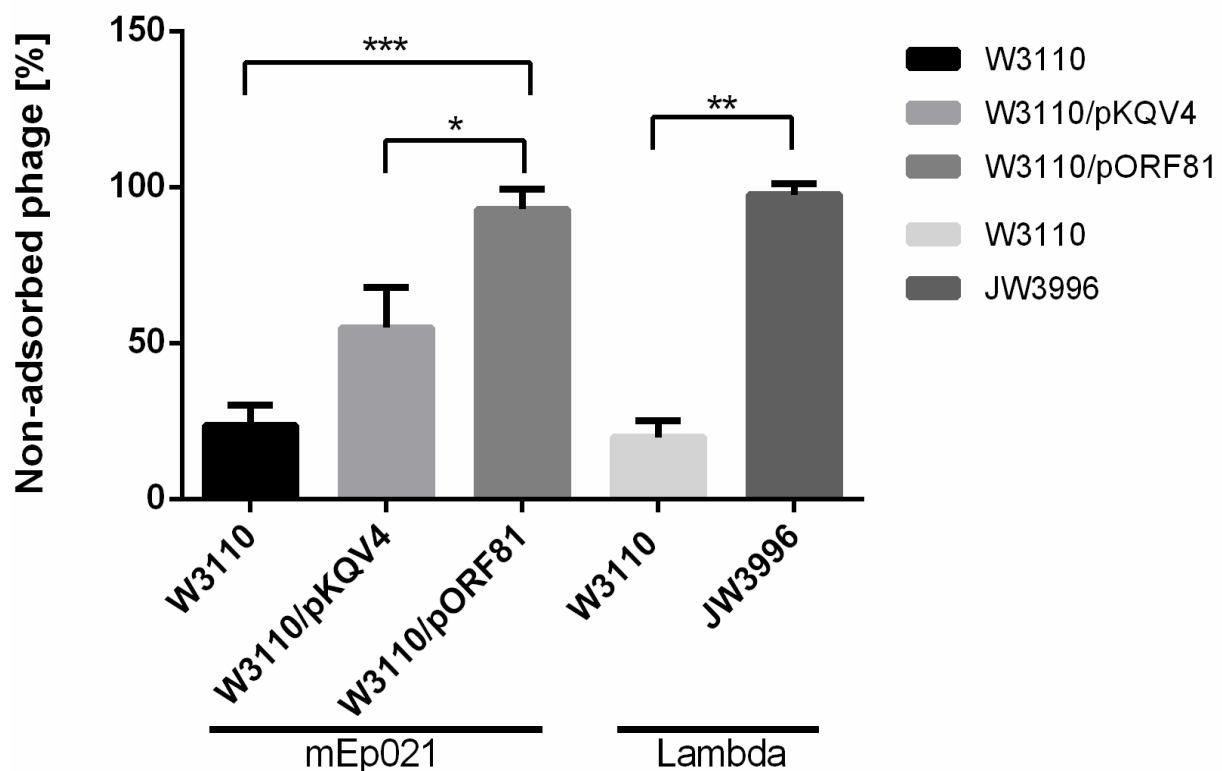


Figura 33. Gráfica de los tiempos de mayor adsorción para el fago mEp021 y λ . 45 minutos para mEp021 y 15 minutos para λ . ***P= 0.0002, **P= 0.0033, *P= 0.0107. N=3.

Estos resultados indican la posibilidad de que Lpp^{mEp021} esté actuando a nivel de la membrana de la bacteria, impidiendo así que mEp021 reconozca a su respectivo receptor principal de membrana externa.



8.8 Ensayo de infección/exclusión de W3110 (mEp021) y W3110/pORF81 con los bacteriófagos del grupo de inmunidad I.

Con la finalidad de probar si el fenotipo de exclusión por Lpp^{mEp021} es exclusivo para mEp021, se retó la bacteria W3110/pORF81 contra 13 bacteriófagos (Tabla 1) del grupo de inmunidad I (mEp021 pertenece a este grupo), utilizando a W3110 (mEp021) como control negativo de infección (Figura 34 y 34.1).

Como se esperaba todos los bacteriófagos probados pueden infectar a la bacteria W3110 (WT) y son excluidos por la cepa lisógena W3110 (mEp021).

Interesantemente la bacteria W3110/pORF81 no puede excluir a ninguno de estos bacteriófagos (Figura 34 y 34.1) y se observa que todos los fagos presentan el mismo título viral que en la bacteria silvestre W3110.

Es interesante mencionar que algunos de las bacteriófagos del grupo de inmunidad I como mEp044, mEp137, mEp321, mEp532, mEp555 y mEp413 muestran un fenotipo de doble placa (placa clara y placa turbia) al igual que mEp021.

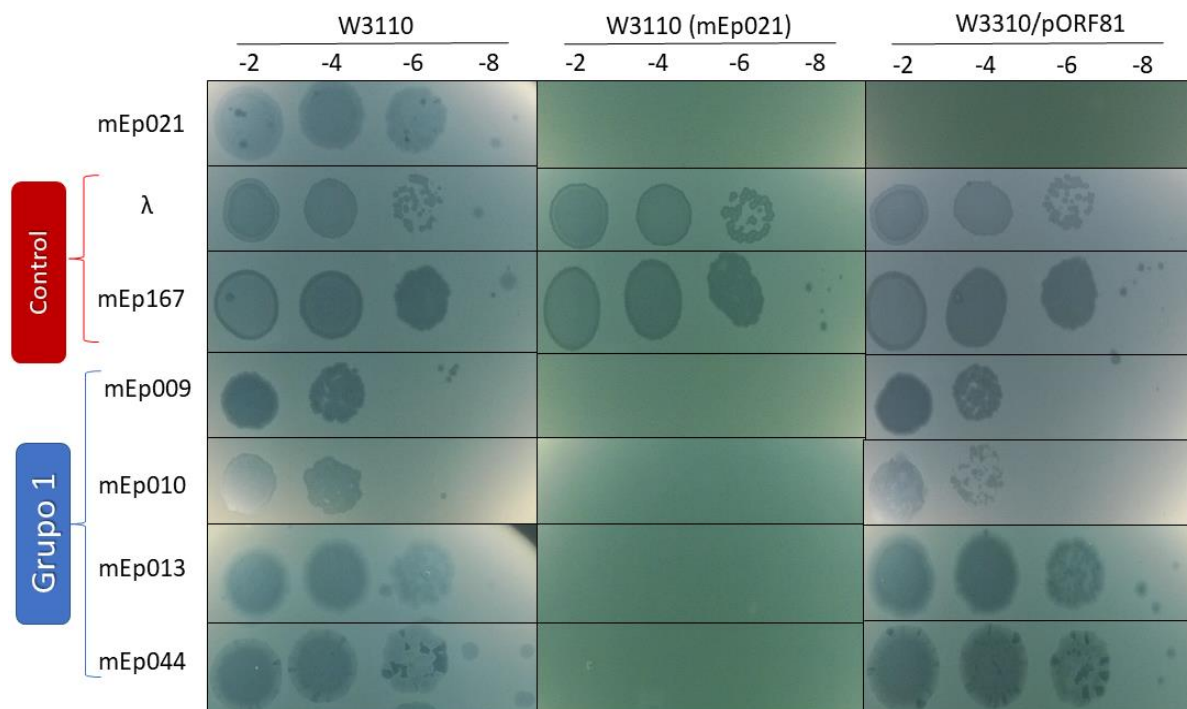


Figura 34. Ensayo de infección/exclusión de los fagos del grupo de inmunidad I en las bacterias W3110, W3110 (mEp021) y W3110/pORF81. Bacteriófago λ y mEp167 utilizados como control positivo de infección. N=3.

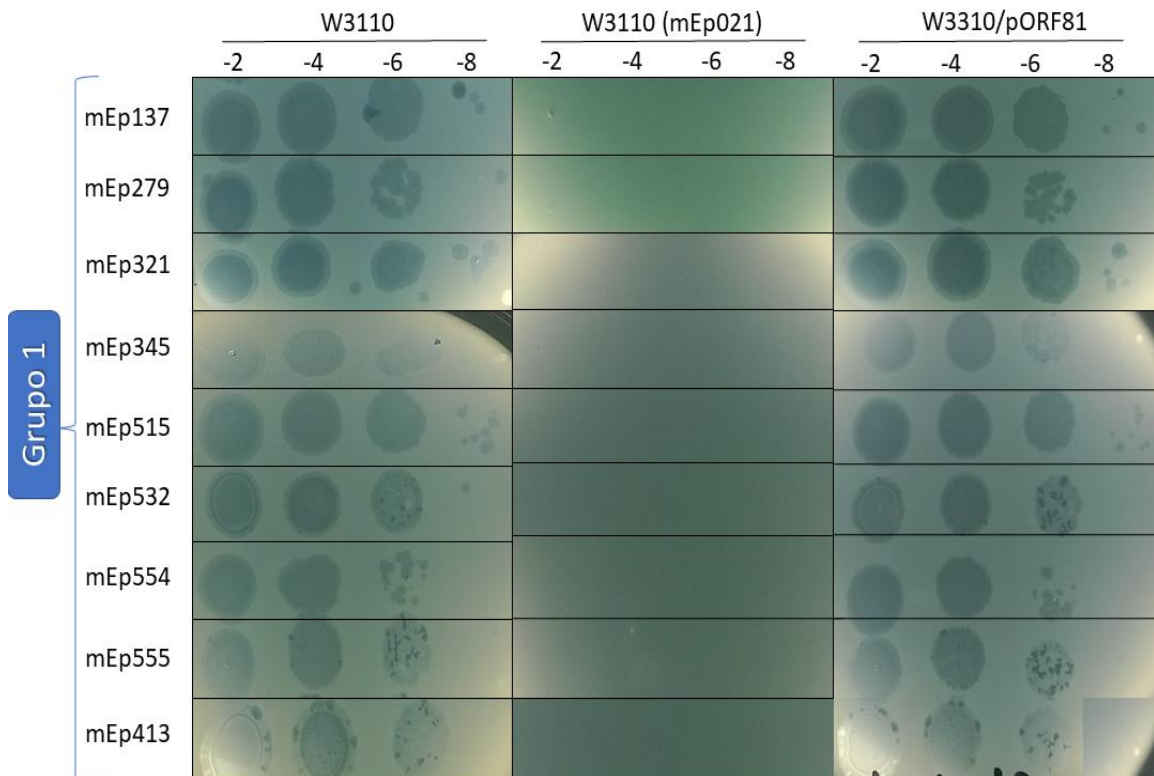
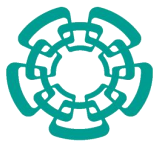


Figura 34.1. Ensayo de infección/exclusión de los fagos del grupo de inmunidad I en las bacterias W3110, W3110 (mEp021) y W3110/pORF81. Bacteriófago λ y mEp167 utilizados como control positivo de infección. N=3.

8.8 Amplificación del ORF81 en los fagos del grupo de inmunidad I

Debido a que ninguno de los fagos del grupo de inmunidad I fue excluido por Lpp^{mEp021} , se decidió amplificar el ORF81 de estos fagos para identificar la presencia de éste mismo gen o un gen similar en su genoma.

En la Figura 35 se muestra la amplificación del ORF81 en los fagos del grupo de inmunidad I; se puede observar que utilizando los oligos diseñados para el ORF81 de mEp021 (Fw-ORF81 y Rv-ORF81) no hay amplificación de ningún gen en los bacteriofagos del grupo de inmunidad I, solo se observa un amplicon de 270 pb en mEp021 que corresponde al ORF81.

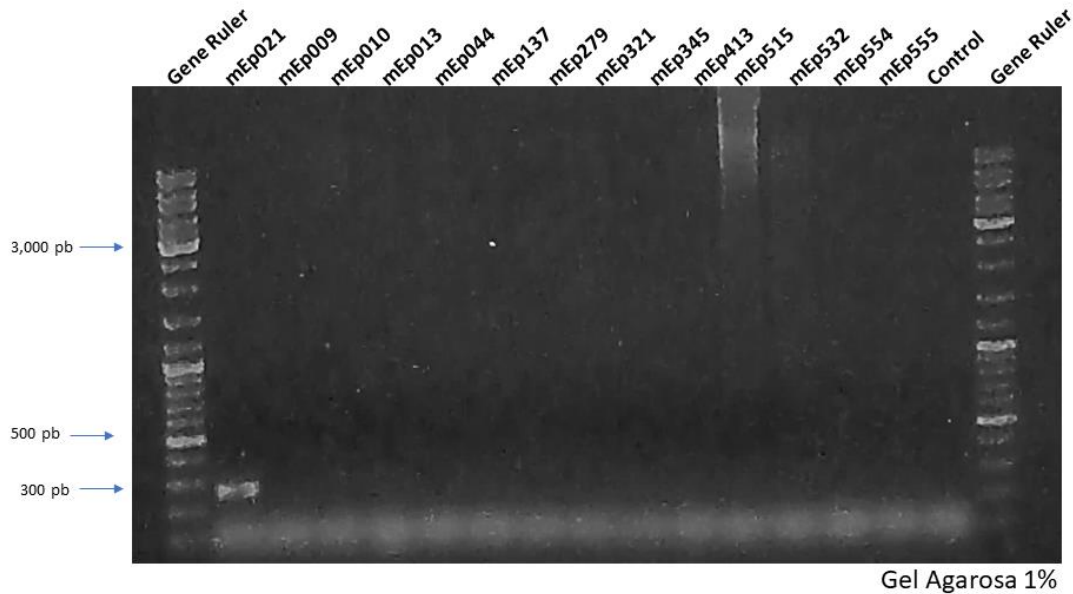


Figura 35. PCR para amplificar el ORF81 en los fagos del grupo de inmunidad I. Los oligos utilizados fueron Fw-ORF81 y Rv-ORF81.

8.9 Ensayo de infección/exclusión de W3110/pRep⁰²¹

Los resultados anteriores muestran que la cepa lisógena W3110 (mEp021) es capaz de excluir a todos los fagos probados del grupo de inmunidad I, sin embargo, la bacteria transformada con el ORF81 solo puede excluir a mEp021. Por lo tanto, para probar que la inhibición del crecimiento de los 13 fagos en la lisógena W3110 (mEp021) es mediada por el represor, se retaron los 13 fagos del grupo de inmunidad I contra la bacteria transformada con el represor de mEp021 (W3110/pRep⁰²¹) (Caraballo, 2017. Datos no publicados) (Figura 36 y 36.1).

Como se muestra en las Figuras 36 y 36.1 ninguno de los 13 fagos del grupo de inmunidad I es capaz de infectar a la cepa W3110/pRep^{mEp021} comparado con la cepa control W3110, es decir que solo la presencia del Represor de mEp021 en la cepa silvestre W3110 es capaz de excluir a todos estos fagos.

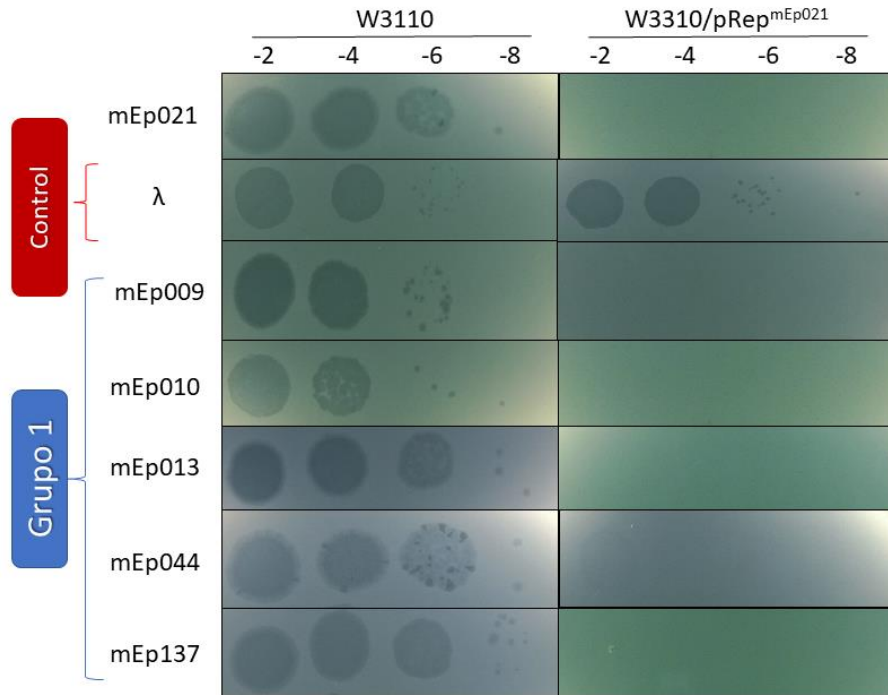


Figura 36. Ensayo de infección/exclusión de los bacteriófagos del grupo de inmunidad I en la bacteria W3110/pRep^{mEp021}. Bacteriófago λ utilizado como control positivo de infección. N=3.

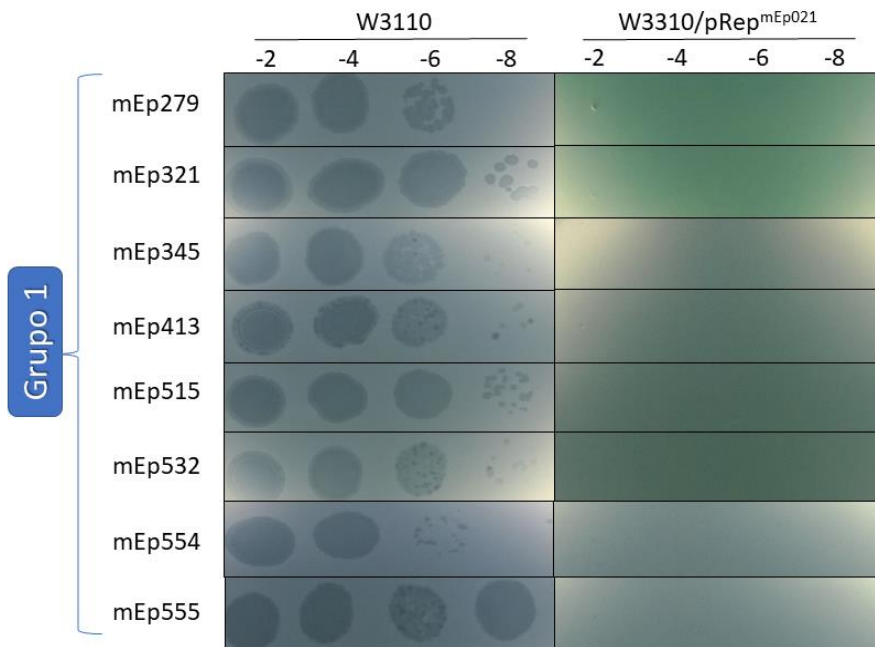


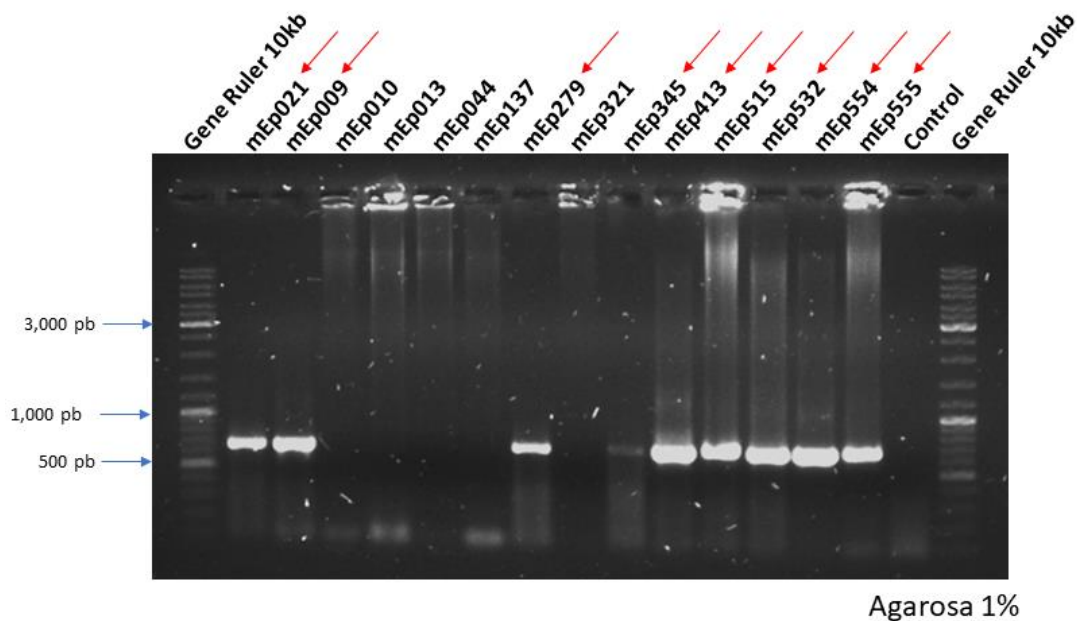
Figura 36.1. Ensayo de infección/exclusión de los bacteriófagos del grupo de inmunidad I en la bacteria W3110/pRep^{mEp021}. Bacteriófago λ utilizado como control positivo de infección. N=3.



Además, en el sayo de infección se realizó una amplificación del gen del represor en los 13 fagos del grupo de inmunidad I con la finalidad de identificar cuáles de estos fagos tienen un represor igual o diferente al de mEp021.

Como se muestra en la Figura 37. Los bacteriófagos mEp009, mEp279, mEp345, mEp413, mEp515, mEp532, mEp554, mEp55 (Carriles 2, 3, 8, 10, 11, 12, 13, 14, y 15) muestran un amplicón de aproximadamente 650 pb que según el control de mEp021 concuerda con la longitud del amplicón del represor, indicando que estos fagos tienen un represor similar al del mEp021 (Figura 37).

Interesantemente los fagos mEp010, mEp013, mEp044, mEp137 y mEp320 (carriles 4, 5, 6, 7 y 9) no muestran ningún amplicón, esto sugiere que estos fagos tienen un represor morfológicamente distinto al de mEp021, pero no así fenotípicamente ya que si pueden ser excluidos por éste (Figura 37).



Agarosa 1%

Figura 37. PCR del gen del represor de mEp021 en los fagos del grupo de inmunidad I. Los oligos utilizados fueron los diseñados por Caraballo, 2017 (Fw-Rp, Rv-Rp). Las flechas rojas indican los fagos que dan un amplicón de aproximadamente 650 pb correspondiente al represor de mEp021.



8.10 Construcción de pORF81 más 6xHis tag en C-terminal

Se diseñó una construcción de pORF81 más 3 codones que codifican para un linker Glicina-Serina-Glicina y 6 codones de Histidinas en el C-terminal para poder identificar la expresión y localización de Lpp^{mEp021} mediante inmunodetección en fase sólida.

Se utilizaron los oligos Fw-ORF81 y Rv-ORF81^{6xHis} (Tabla 1) para amplificar el ORF81 más el linker y el tag de histidinas (Figura 38). En la Figura 38 se muestra la electroforesis del PCR donde se observa el amplicón esperado de 270 pb. Este fragmento fue purificado y clonado en el vector de expresión pKQV4.

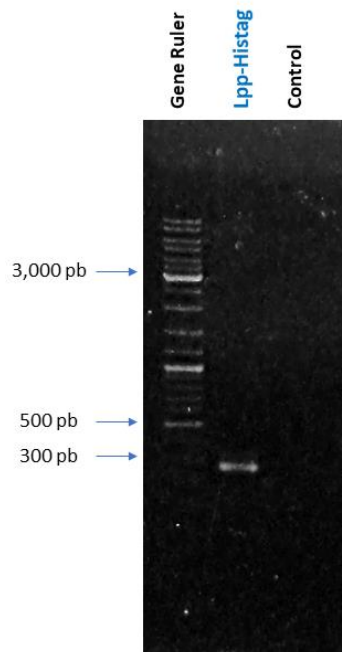


Figura 38. PCR del ORF81+6xHis. Se utilizaron los oligos Fw-ORF81 y Rv-ORF81^{6xHis}.

La construcción se transformó en bacterias DH5 α quimiocompetentes y se obtuvieron 30 candidatas, posteriormente se tomaron tres candidatas y se comprobaron mediante “colony PCR” (Figura 39). Se seleccionaron las candidatas “C.G” y “C.H” para hacer extracción de plásmido y posteriormente su secuenciación.

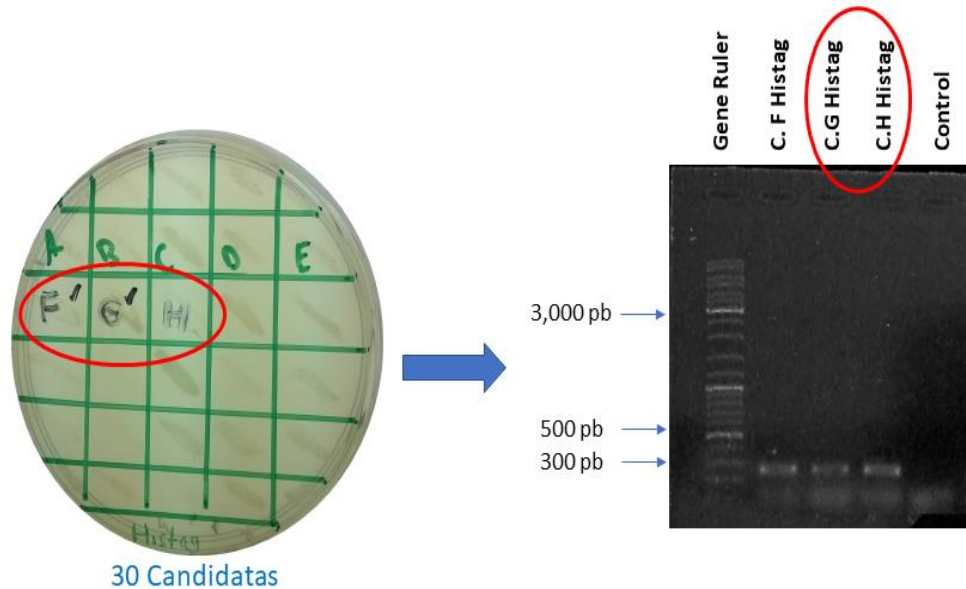


Figura 39. Selección de candidatas con construcción pORF81^{6xHis}. Del lado izquierdo de muestran las 30 candidatas obtenidas. Del lado derecho resultado del “colony PCR” para las colonias “C.F”, “C.G” y “C.H”. En rojo se muestran las candidatas seleccionadas para secuenciación.

Como se muestra en la Figura 40 la secuencia de la candidata “C.H” está íntegra y no tiene ninguna mutación, comparando con la predicción *in silico*. La secuencia de “C.H” presenta el codón de inicio (ATG), los 6 codones de histinas y un codón de stop al final (TAA). Esta construcción será referida en adelante como pORF81^{6xHis}.

La candidata “C.G” tiene dos mutaciones en su secuencia. La primera mutación (5' > 3') presenta un cambio de una G por una T lo que ocasiona un cambio en el codón de un GGT (Tryptófano) por un GTT (Cisteína). La segunda mutación origina un cambio de una A por una G, sin embargo, esta mutación es silenciosa y no cambia el codón en esa posición (Figura 40). Esta construcción será referida en adelante como pORF81^{6xHis}W71C.

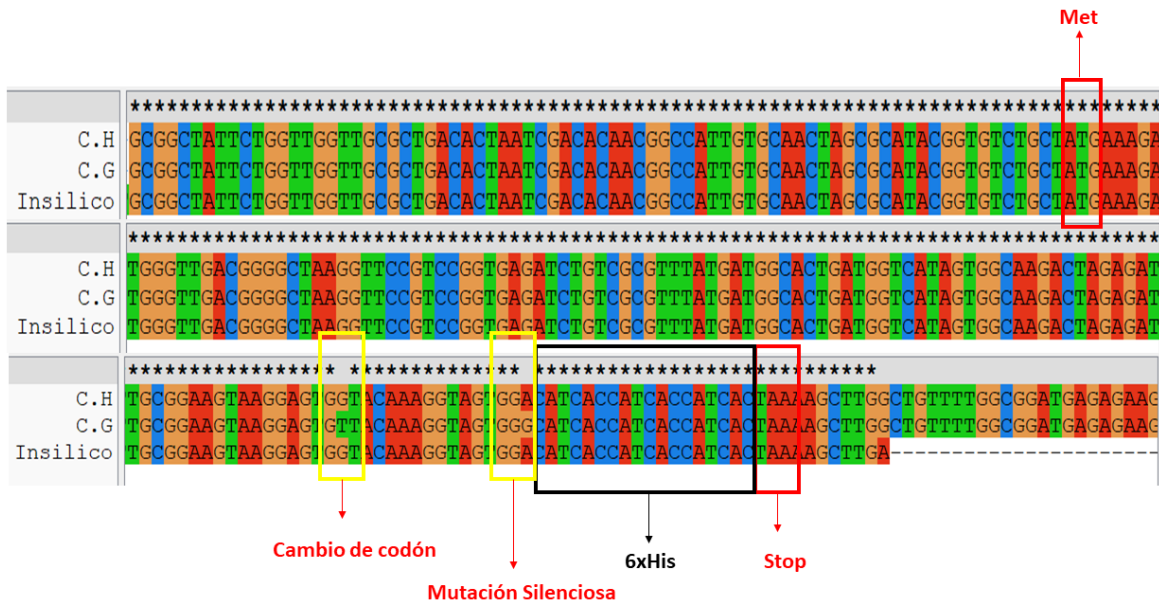
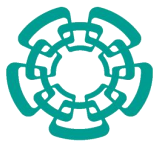


Figura 40. Alineamiento de la secuenciación de las candidatas “C.H”, “C.G” y la secuencia *in silico* para pKQV4/ORF816xHis. Línea 1) secuencia “C.H”, 2) secuencia “C.G”, 3) secuencia *in silico*. En la imagen se señala el codón de inicio (ATG), la mutación que ocasiona un cambio en el codón, la mutación silenciosa, los codones del tag de 6 histidinas y el codón de Stop.

Debido a las mutaciones encontradas en la construcción pORF81^{6xHis}W71C se decidió probar su capacidad de exclusión infectándola con el fago mEp021.

La bacteria W3110/pORF81^{6xHis} la cual tiene la construcción con la secuencia WT del ORF81 tiene la capacidad de excluir al fago mEp021, además cuando se induce con 0.25mM IPTG presenta el mismo fenotipo que W3110/pORF81 es decir se observa toxicidad en la bacteria y se ven spots de lisis para mEp021 en las diluciones -2 y -4 (Figura 41)

La bacteria W3110/pORF81^{6xHis}W71C la cual presenta un cambio de codón en la secuencia del ORF81 pierde la capacidad de excluir al fago mEp021, además que al inducirse con 0.25mM no presenta un fenotipo de toxicidad a comparación de la bacteria que tiene la secuencia correcta del ORF81 (Figura 41). Esto indica que el aminoácido Triptófano en la posición 71 del péptido es indispensable para la exclusión de mEp021.

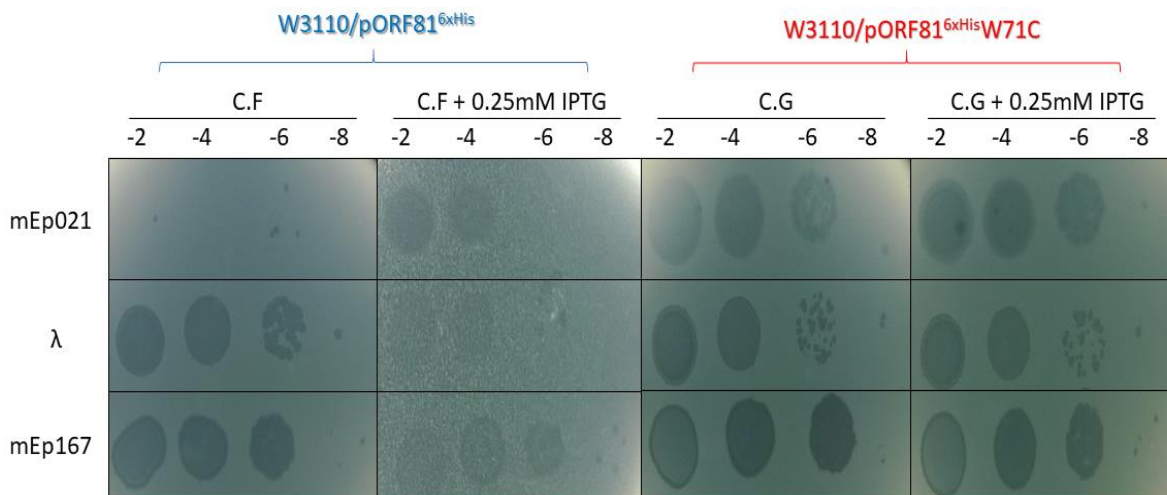


Figura 41. Ensayo de infección/exclusión en la bacteria W3110/pORF81^{6xHis} y W3110/pORF81^{6xHis}W71C. Bacteriófagos λ y mEp167 utilizados como control positivo de infección.

La construcción W3110/pORF81^{6xHis} se utilizará para los ensayos de expresión y localización celular.

8.11 Expresión de Lpp^{mEp021} en la cepa W3110

A partir de cultivos overnight de W3110/pORF81^{6xHis} y W3110/pKQV4 se hicieron diluciones 1/10, los cultivos se incubaron hasta alcanzar una OD₆₀₀= 0.3 y se hizo la inducción con 0.1mM IPTG. Las células se recuperaron por centrifugación en los tiempos 0, 1 y 2 horas, se trataron con el buffer de carga y se cargaron en un gel de Tris-tricina acrilamida al 15% y se tiñó utilizando la técnica de “silver stain”.

En los resultados no se observa una diferencia entre la bacteria control con la bacteria W3110/pORF81^{6xHis}, tampoco se observa la banda esperada de 8.94 kDa que corresponde a Lpp^{mEp021} con el tag de 6 histidinas. Esto posiblemente se deba a que la técnica no es tan sensible o a que la banda esperada de 8.94 kDa se empalma con otra proteína de la bacteria y no permite su visualización (Figura 42).

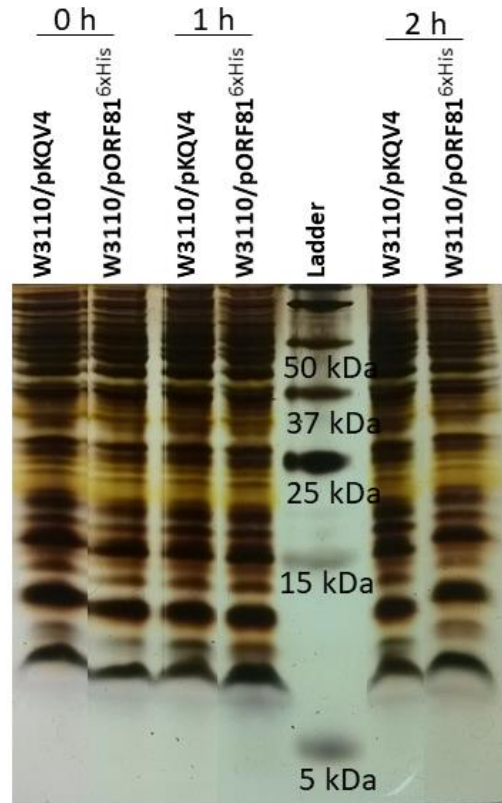
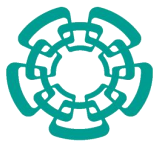


Figura 42. Gel de proteínas de la inducción de W3110/pORF81^{6xHis}. La inducción se dio con 0.1mM IPTG durante los tiempos que se indican arriba de cada carril (0, 1 y 2 h)

El gel de proteínas se transfirió a un gel de nitrocelulosa para detectar la proteína mediante anticuerpos anti-histidinas. La placa de revelado se expuso a la membrana durante 5 y 30 segundos (Figura 43 y 43.1)

Utilizando solamente la fuga transcripcional del vector a 0 h de inducción, no se puede detectar ninguna banda correspondiente a Lpp^{mEp021} (carril 2), a 1 hora de inducción con 0.1mM IPTG se puede observar una banda de aproximadamente 9 kDa (carril 4) que corresponde el peso esperado de Lpp^{mEp021}, después de 2 horas de inducción no se detecta la banda correspondiente a Lpp^{mEp021} (carril 6). El control W3110/pKQV4 no revela ninguna inespecificidad del anticuerpo, ni tampoco se observa la banda de 9 kDa observada en W3110/pORF81^{6xHis} (Figura 43).

Estos resultados sugieren que el tiempo de inducción adecuado es de 1 hora utilizando 0.1mM de IPTG, debido a que es el tiempo en el que se observa la banda correspondiente a la proteína (Figura 43, carril 4)), también que posiblemente la



proteína está siendo degradada o excretada por la bacteria después de 2 horas de inducción y es por eso que no se observa la misma banda que se observa a 1 hora de inducción (Figura 43, carril 6).

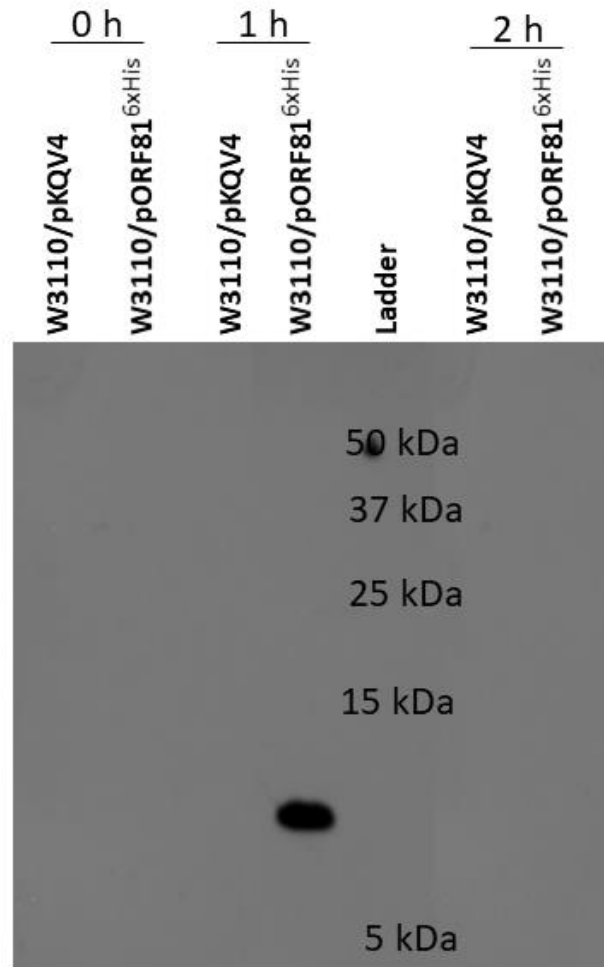


Figura 43. Western blot de expresión de LppmEp021 en W3110. 1:3000 del anticuerpo primario (6xHis) (GeneTex), 1:3000 del anticuerpo secundario (anti-ratón). Tiempo de exposición 5 segundos.

Con un tiempo de exposición de 30 segundos se pueden observar bandas 30, 35 y 50 kDa, las cuales podrían significar interacciones de Lpp^{mEp021} (Figura 43.1). Estos resultados indican que Lpp^{mEp021} está interaccionando con distintas proteínas de la bacteria y que estas proteínas podrían ser importantes para el proceso de exclusión por Lpp^{mEp021}.

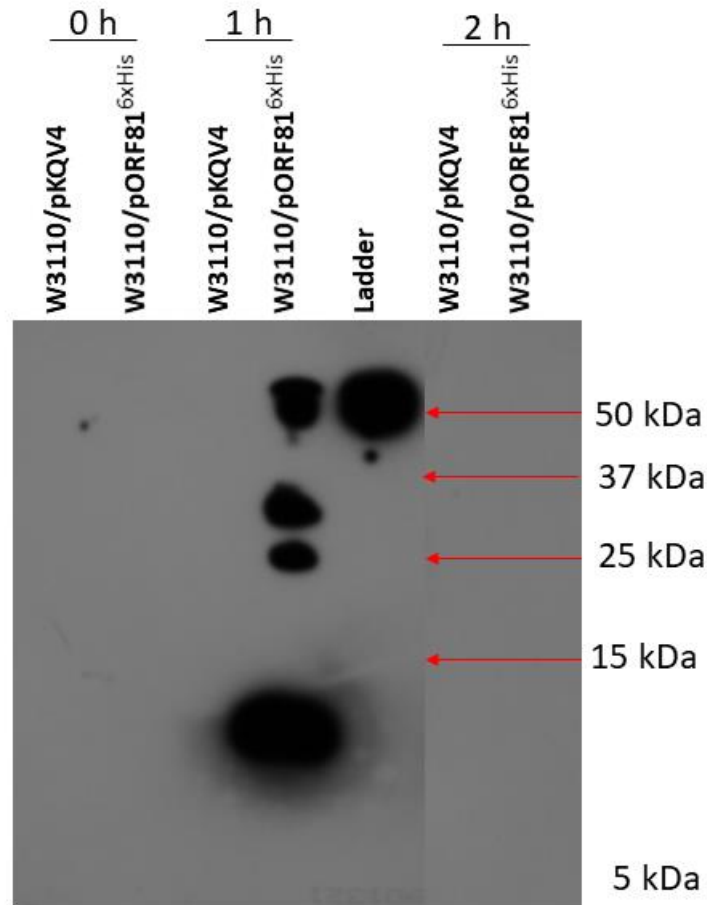


Figura 43.1. Western blot de expresión de Lpp^{mEp021} en W3110. 1:3000 del anticuerpo primario (6xHis) (GeneTex), 1:3000 del anticuerpo secundario (anti-ratón). Tiempo de exposición 30 segundos.

8.12 Localización de Lpp^{mEp021} mediante fraccionamiento celular y Western Blot

Una de las hipótesis es que Lpp^{mEp021} es una lipoproteína que está actuando a nivel membrana externa en la bacteria, por lo tanto, debe de localizarse en este compartimiento. Para comprobar que Lpp^{mEp021} se ubica en la membrana externa de la bacteria se realizó un fraccionamiento celular de acuerdo a Aono et al [30]. La bacteria se dividió en tres fracciones: 1) citoplasma, 2) membrana interna, 3) membrana externa. Cada fracción se corrió en un gel de proteínas de gradiente 6M urea según Schagger [31], posteriormente se transfirió a una membrana y se detectó mediante anticuerpos anti-Histidinas.



La proteína Lpp^{mEp021} se localizó principalmente en la fracción de la membrana externa, en la que se observa una banda de aproximadamente 9 kDa que corresponde al peso esperado de esta proteína (Figura 44, carril 7), además se puede observar un ligero punto de aproximadamente 9.5 kDa en la fracción de membrana interna (Figura 44, carril 4), posiblemente el punto de 9.5 kDa sea la Lpp^{mEp021} sin haber sido procesada (prelipoproteína).

A pesar de que el gel contiene 6M de urea, se siguen observando algunas bandas inespecíficas (observadas anteriormente en Figura 43.1, carril 5) que podrían corresponder a interacciones muy fuertes de Lpp^{mEp021} con proteínas de la bacteria.

Estos resultados demuestran que Lpp^{mEp021} es una proteína que se ubica en la membrana externa de la bacteria y que además está interaccionando con proteínas de la membrana externa de la bacteria.

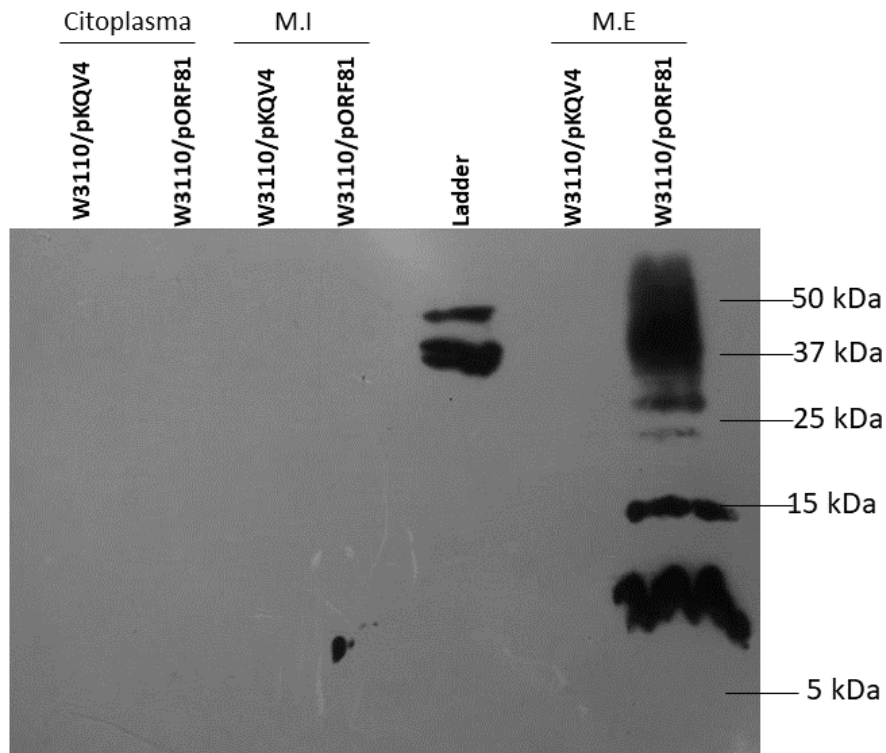


Figura 44. Western Blot del fraccionamiento celular de W3110/pORF81^{6xHis}. 1:3000 del anticuerpo primario (6xHis) (GeneTex), 1:3000 del anticuerpo secundario (anti-ratón). Tiempo de exposición 3 segundos. M.I: membrana interna, M.E: membrana externa.



9. DISCUSIÓN

Al realizar una búsqueda bioinformática de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el ORF81 (Lpp^{mEp021}), se observó que ésta presenta similitud en su mayoría con proteínas hipotéticas de *Escherichia coli* (96%), así como lipoproteínas hipotéticas de algunos bacteriófagos de esta misma cepa, como el fago Rtp (49%) y HK578 (46%); sin embargo, ninguna de estas proteínas han sido caracterizadas [36, 37]. Interesantemente, también presenta identidad con varias posibles lipoproteínas de fagos como el SH6 de *Shigella spp.* [38]. Esto último sugiere la posible transferencia horizontal de este gen entre fagos de distintas especies ya que como se ha considerado, la transferencia horizontal de genes juega un papel dominante en la organización y arquitectura de los genomas fágicos, además, como *Escherichia coli* y *Shigella* están estrechamente relacionados entre sí y genéticamente constituyen una misma especie, esto podría indicar un punto en la divergencia evolutiva de estas dos cepas bacterianas [39, 40].

De acuerdo al servidor InterPro, la secuencia de aminoácidos de Lpp^{mEp021} fue identificada como una lipoproteína de procariontes, siendo esta la principal de sus características, además, presentó un péptido señal en sus residuos 1-16 el cual es característico de proteínas de secreción o proteínas transmembranales. En bacterias Gram-negativas la translocación de proteínas es a través de la membrana citoplasmática hacia el periplasma o espacio extracelular, y es típicamente mediado por la interacción del péptido señal (presente en el N-terminal de las proteínas) con la maquinaria de secreción de la bacteria. La proteína Lpp^{mEp021} presentó este péptido señal con todas sus características, un dominio N del residuo 1-3 en el que presenta aminoácidos de carga positiva, un dominio H del residuo 4-12 en el que presenta aminoácidos hidrofóbicos y un dominio C del residuo 13-16 en donde se encuentra un sitio de corte para una peptidasa, de manera interesante este sitio de corte se encuentra localizado dentro de la secuencia “lipobox”, y debería ser procesado por la enzima LspA, la cual interviene en el procesamiento de las lipoproteínas. Por lo tanto, el péptido señal presente en el N-terminal de Lpp^{mEp021} podría favorecer su transporte a la membrana y posteriormente ser translocada al



periplasma por medio del translocón heterotrimérico Sec YEG para su posterior procesamiento como lipoproteína [41, 42, 43]. Además, se identificó un dominio “no citoplasmático” de los residuos 17-72 el cual podría quedar libre en el periplasma para interactuar con distintas proteínas y propiciar la exclusión de mEp021.

Además de la presencia de un péptido señal, Lpp^{mEp021} presenta una firma de aminoácidos conocida como “lipobox” ([L/V/I][A/S/T/V/I][G/A/S]C), característica de las lipoproteínas de bacterias Gram-negativas que consiste de los aminoácidos “LVGCA” la cual va del residuo 13 al 17 [42]. Dentro de esta secuencia se encuentra un residuo de cisteína (C) en la posición +1 de la “lipobox” y en la posición 16 del péptido, el cual es esencial para la tri acilación de las lipoproteínas y para su posterior translocación a la membrana externa [42, 44]. En la posición +2 de la “lipobox” se encuentra un residuo de alanina (A), el cual, según la regla de las lipoproteínas en bacterias Gram-negativo le permite exportarse a la membrana externa de la bacteria por medio del complejo LolCDE y la chaperona LolA [42]. El alineamiento con lipoproteínas de exclusión de los bacteriófagos Sh6, mEp167, HK022, Φ80, N15 y T5 muestra que todas estas proteínas poseen una “lipobox” que se encuentra aproximadamente entre los residuos 15 al 19 que concuerda con la de la Lpp^{mEp021}, además de una región río arriba de la “lipobox” de aminoácidos hidrofóbicos, lo cual indicó la posibilidad de que Lpp^{mEp021} sea una lipoproteína de exclusión como las reportadas anteriormente [38, 45, 14, 17].

El análisis *in silico* también reveló la presencia de dos posibles promotores que se encuentran río abajo del ORF81: el “Promotor 1” se encuentra entre la región 52,959 y 52,984 del genoma del fago y consta de 26 pb, con los sitios -10 (TTTTATGCT) y -35 (TTGTGA), y el “Promotor 2” se encuentra dentro del marco anotado como “Phage Tail Tip Protein”, entre la región 53,352 y 53,380 del genoma del fago y consta de 29 pb, con los sitios -10 (TGGAAAAT) y -35 (GTGCAT). El análisis también reveló la presencia de un terminador río abajo del ORF81, éste se encuentra dentro del ORF que codifica para el marco anotado como “Phage protein J” y se encuentra dentro de la región 49,705 y 49,743 dentro del genoma del fago. Estos resultados indican la posibilidad de que el ORF81 se transcriba de manera



independiente a los genes morfogénicos del mismo bloque y que por esto se podría clasificar como un gen “moron” o gen accesorio en el genoma de mEp021 que como se ha reportado estos genes tienen la capacidad de brindarles ventajas adaptativas al huésped, una de ellas la inmunidad o exclusión a la superinfección [9, 46].

La bacteria W3110/pORF81 mostró resistencia a la infección por mEp021 y mEp021J^{Δ1kb}, y fue sensible a la infección por λ y mEp167. Esto indica que la expresión del ORF81 es suficiente para evitar la infección de mEp021 y mEp021J^{Δ1kb}. Debido a que el gen codificado por el ORF81 posee sus propios promotores y terminadores (por el momento hipotético) en el genoma, y a que su expresión es capaz de excluir la infección de mEp021, es posible de que se trate de un mecanismo de “conversión lisogénica” en el cual le confiere un fenotipo de “exclusión a la superinfección”, por fagos muy relacionados a mEp021 o fagos que requieran del mismo receptor que OmpA [1, 6].

La sobreexpresión del ORF81 utilizando 0.25mM IPTG en la bacteria W3110/pORF81 mostró sensibilidad a la infección por mEp021 y mEp021J^{Δ1kb}, sin embargo, este resultado es inconcluso ya que se desconoce si este efecto se produce por la toxicidad de la proteína en la bacteria o por un efecto inverso debido a la excesiva expresión del ORF81, dicho se efecto no se observó utilizando 0.1mM IPTG o solamente la fuga transcripcional del vector (sin inductor). Sin embargo, los halos de lisis debido a la toxicidad se descartaron debido a que en las cepas JW3996 y C600 resistentes a la infección por los fagos λ y mEp167, respectivamente, la sobreexpresión del ORF81 no causa ningún halo de lisis por estos fagos, pero si se observaron halos de lisis por mEp021 por lo que este fenómeno de lisis debido a la sobreexpresión del ORF81 puede deberse a un fenómeno intrínseco o exclusivo del fago mEp021.

Además, como se demostró, la sobreexpresión del ORF81 afecta la viabilidad celular de W3110 en la que se observa que el desarrollo celular se detiene dentro de las primeras 3 horas de inducción (0.1mM y 0.25mM) y se reactiva después de este tiempo, alcanzando la misma densidad óptica que el control W3110 a las 8 horas de inducción. Este efecto pudiera deberse a que la proteína está siendo



excretada de la bacteria por medio de los mecanismos de excreción tipo II o V, estos mecanismos de excreción dependen del translocón Sec o Tat y podrían estar involucrados en la recuperación de la viabilidad celular a las 8 horas de inducción y a la sensibilidad por la infección de mEp021 y mEp021J^{Δ1kb} al excretar fuera de la bacteria la proteína Lpp^{mEp021}, además de que existe la posibilidad de que la proteína se esté degradando por distintas proteasas de la bacteria **[47]**.

Las cepas JW3996 (lamB⁻), JW3993 (malF⁻) y JW3992 (malG⁻) transformadas con pORF81 fueron sensibles a la infección por mEp021 y mEp021J^{Δ1kb}. Esto indica que las proteínas LamB, MalF y MalG son necesarias para exclusión mediada por Lpp^{mEp021}. La proteína LamB es una porina que se localiza en la membrana externa y está involucrada en el transporte de maltosa y maltodextrinas, y actúa como receptor para varios bacteriófagos incluyendo lambda. También se reportó como una proteína (LamB) necesaria para la exclusión mediada por Cor en fagos FhuA dependientes junto con otras proteínas de membrana externa como OmpA, OmpC, OmpW y FhuE **[48, 15]**. El hecho de que Lpp^{mEp021} requiere de LamB sugiere que su mecanismo de exclusión pudiera ser similar al de Cor, es decir se exporta a la membrana externa de la bacteria donde interactúa con otras porinas como LamB y posiblemente otras para excluir la infección de mEp021; sin embargo, las cepas JW1248 (ompW⁻), JW2203 (ompC⁻) y JW0912 (ompF⁻) transformadas con pORF81 fueron resistentes a la infección por mEp021 lo que significa que estas porinas no son necesarias para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}, por lo tanto el mecanismo de exclusión mediado por Lpp^{mEp021} es diferente al de Cor. En cuanto a las interacciones de las proteínas de membrana externa (OMP's), Kleanthoues et al. reportó interacciones promiscuas entre las OMPs en las que se generan microdominos o islas de cientos o hasta miles de estas proteínas, por lo que la inserción de alguna proteína como Lpp^{mEp021} en estas islas de OMPs podría cambiar drásticamente su conformación y así evitar el reconocimiento adecuado de mEp021 por su receptor OmpA **[49]**.

Por otra parte, también se observó que las cepas JW3993 (malF⁻) y JW3992 (malG⁻) transformadas con pORF81 fueron sensibles a la infección por mEp021, lo cual



sugiere que MalF y MalG son necesarias para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}. Las proteínas MalF y MalG se encuentran en la membrana interna de la bacteria y pertenecen a un complejo transportador de maltosa y maltodextrinas compuesto de cuatro proteínas: MalE, MalF, MalG y MalK (complejo MalEFGK₂) [50, 51]. Como se mencionó anteriormente LamB también participa en el transporte de maltosa y maltodextrinas, y es necesaria para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}, lo cual sugiere que hay una interacción entre LamB y el complejo MalEFGK₂, dicha interacción solamente se ha reportado en predicciones *in silico* (Anexo 1) pero nunca de manera experimental. Hunken et al. [52] reportaron que mutaciones en los “loops” EAA (loops en los dominios transmembranales) de MalG y MalF ocasionan una pérdida total del transporte de maltodextrinas y formación del complejo MalEFGK₂ lo que significa que la interacción de MalG y MalF es necesaria la formación de este complejo. Al no estar presente alguna de estas proteínas en las cepas JW3993 (malF⁻) o JW3992 (malG⁻) se impide la formación correcta del complejo MalEFGK₂, lo cual podría ocasionar un cambio en la interacción de Lpp^{mEp021} con LamB lo que se refleja como una pérdida en la capacidad de exclusión. La cepa JW3995 (malK⁻) transformada con pORF81 es resistente a la infección por mEp021. MalK es una proteína de unión a ATP que se encuentra en el citoplasma, aunque esta proteína es necesaria para el correcto transporte de maltodextrina y maltosa no es necesaria para la formación del complejo MalEFGK₂, por lo que la ausencia de esta no afecta la estructura del complejo ni la interacción de Lpp^{mEp021} con LamB [51].

Los ensayos de adsorción mostraron que la expresión del ORF81 en la cepa W3110, es capaz de impedir la adsorción correcta del fago mEp021. En W3110/pORF81 no se observa pérdida de partículas virales a lo largo del tiempo, ya que aún a los 60 minutos se observa el mismo título viral que en el tiempo 0. Este tipo de comportamiento se ha descrito anteriormente en algunos bacteriófagos como T5, el cual expresa la proteína Llp que inactiva a su propio receptor inmediatamente después de infectar a la bacteria, lo que impide que los fagos puedan inactivarse aún en presencia de receptores disponibles presentes en los restos celulares [52]. Asimismo se ha reportado que la proteína TraT codificada en



el plásmido F puede modificar la conformación de la proteína de membrana externa OmpA, la cual es el receptor de algunos fagos tipo T y también de mEp021. Esta información genera la posibilidad de que la Lpp^{mEp021} se transloque a la membrana externa de la bacteria donde puede interaccionar con otras proteínas como LamB y por lo tanto modificar la conformación de OmpA, evitando así que mEp021 pueda reconocerlo de manera correcta y por lo tanto infectar a la bacteria **[17, 12]**.

De manera interesante, los ensayos de infección/exclusión de los fagos del grupo de inmunidad I en la bacteria W3110/pORF81 revelaron que Lpp^{mEp021} no es capaz de excluir a ninguno de ellos, lo que sugiere que estos bacteriófagos no utilizan una lipoproteína similar para su exclusión o que requieren de un receptor distinto al de mEp021 (OmpA). Esto último se corroboró utilizando una cepa transductante W3110 (*ompA*⁻) la cual fue sensible a la infección por todos los fagos del grupo de inmunidad I con excepción de mEp021 (Anexo 2). Estos resultados sugieren fuertemente que Lpp^{mEp021} excluye exclusivamente a fagos dependientes de OmpA, sin embargo, se requieren hacer ensayos de infección/exclusión utilizando fagos OmpA dependientes que no pertenezcan a la colección mEp. Por otra parte, también se observó que ninguno de los fagos del grupo de inmunidad I dio un amplicón para el ORF81, lo que sugiere que ninguno de estos fagos posee un gen similar al ORF81, esto encaja con la hipótesis de que el ORF81 es un gen “moron” o gen accesorio que se encuentra solamente en mEp021 y difiere de los otros fagos de su mismo grupo, además de que cabe la posibilidad de que este gen haya sido adquirido mediante una transferencia horizontal de genes **[9, 46]**.

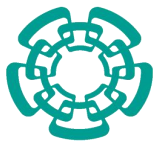
Los resultados del ensayo de infección/exclusión en la cepa W3110/pRep⁰²¹ demostraron que todos los fagos del grupo de inmunidad I son excluidos por el represor de mEp021, lo cual descarta la posibilidad de que mEp021 posea un sistema de exclusión adicional al del represor y al de Lpp^{mEp021} . Interesantemente, el PCR dirigido al represor de mEp021, los fagos mEp009, mEp279, mEp345, mEp413, mEp515, mEp532, mEp554, mEp55 muestran un amplicón de aproximadamente 650 pb que según el control de mEp021 concuerda con la longitud del amplicón del represor, indicando que estos fagos tienen un represor



similar al del mEp021, sin embargo, los fagos mEp010, mEp013, mEp044, mEp137 y mEp320 no muestran ningún amplicón, esto sugiere que estos fagos tienen un represor estructuralmente distinto. Esto demuestra que a pesar de que los fagos del grupo I poseen diferencias en el represor, estos son capaces de reconocer a la misma región operadora dentro del genoma y por lo tanto inhibir la expresión sus genes.

La bacteria (W3110) que porta al plásmido pORF81^{6xHis}W71C, presenta un cambio en la posición 71 del ORF81 (Triptófano por una Cisteína) la cual no permite la exclusión de mEp021, además que al inducirse con 0.25mM no presenta la toxicidad, a comparación de la bacteria que tiene la secuencia correcta del ORF81. El cambio de este aminoácido genera un cambio en la estructura tridimensional de Lpp^{mEp021}, según las predicciones por I-TASSER (Anexo 3), dicho cambio en la estructura podría estar implicado en la interacción con otras proteínas en la membrana lo que podría afectar su capacidad de excluir, además de esto se ha reportado la importancia de los aminoácidos del C-terminal en varias lipoproteínas de bacterias Gram-negativas como por ejemplo la lipoproteína asociada a peptidoglicano (Pal) necesaria para mantener la integridad de la membrana externa, la cual posee 61 aminoácidos conservados en su C-terminal necesarios para la interacción con proteínas Tol (TolA, TolQ y TolR) [53]. Esto indica que el aminoácido Triptófano en la posición 71 del péptido es indispensable para la correcta interacción de Lpp^{mEp021} con proteínas de membrana y por lo tanto para la exclusión.

En el ensayo de expresión de Lpp^{mEp021}, se pudo detectar por Western Blot, después de una hora de inducción con 0.1mM IPTG, pero después de dos horas de inducción la banda correspondiente de aproximadamente 9 kDa ya no pudo ser detectada, indicando que esto podría relacionarse con lo observado en la curva de crecimiento, en la que aproximadamente a las 3 horas después de la inducción la bacteria recupera su crecimiento normal. Es posible que Lpp^{mEp021} esté siendo excretada de la bacteria mediante algún mecanismo de secreción, en el cual la proteína es transportada al periplasma por medio del translocón Sec o Tat (procesamiento normal de las lipoproteínas) y posteriormente excretada mediante una porina de



membrana externa, lo cual podría relacionarse con la recuperación de la viabilidad celular a las 8 horas de inducción y a la sensibilidad por la infección de mEp021 y mEp021J^{Δ1kb} al excretar fuera de la bacteria la proteína Lpp^{mEp021} [47]. Al sobreexponer la placa durante 30 segundos, se observaron bandas inespecíficas de aproximadamente 30, 35 y 50 kDa, las cuales podrían significar interacciones de Lpp^{mEp021}, cabe mencionar que estas bandas ya se habían observado anteriormente por Arguijo-Hernandez et al. [15], en donde placas sobreexpuestas en un Western Blot dirigido a Cor mostraban bandas de un peso mayor, las cuales posiblemente corresponden a interacciones fuertes entre Cor y proteínas de membrana externa.

Por último, el fraccionamiento celular demostró que Lpp^{mEp021} se encuentra principalmente en la fracción correspondiente a la membrana externa de la bacteria, en la que se observa una banda de aproximadamente 9 kDa que corresponde a Lpp^{mEp021} posterior a su procesamiento (corte proteolítico en el que se pierden 15 aminoácidos). Además, se observó un ligero punto de aproximadamente 9.5 kDa en la fracción correspondiente a la membrana interna, posiblemente el punto de 9.5 kDa sea la Lpp^{mEp021} sin haber sido procesada (preprolipoproteína). Esto comprueba la hipótesis de que Lpp^{mEp021} es una proteína que se encuentra en la membrana externa de la bacteria.



10.CONCLUSIONES

- ❖ Los posibles promotores y terminadores adyacentes al ORF81 indican una posible expresión independiente.
- ❖ La expresión del ORF81 en una cepa W3110 es capaz de evitar la infección de mEp021.
- ❖ La exclusión mediada por Lpp^{mEp021} evita la adsorción de mEp021 a su receptor en membrana externa.
- ❖ Lpp^{mEp021} no es capaz de excluir a ninguno de los fagos probados del grupo de inmunidad I.
- ❖ El residuo de Triptófano en la posición 71 es indispensable para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}.
- ❖ Las proteínas de membrana externa LamB y de membrana interna MalG y MalF son necesarias para la exclusión mediada por Lpp^{mEp021}.
- ❖ Lpp^{mEp021} se localiza en la fracción que corresponde a la membrana externa de la bacteria.
- ❖ El represor de mEp021 (Rp^{mEp021}) es suficiente para evitar la infección de los 13 bacteriofagos probados del grupo de inmunidad I, por lo que se descarta la posibilidad de que exista otro sistema de exclusión en mEp021.



11. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensayos de “pull-down” con Lpp^{mEp021} para identificar interacción con proteínas de la bacteria (Características de la construcción en Anexo 4).
- ❖ Hacer ensayos de localización de la proteína para comprobar su posible secreción de la bacteria.
- ❖ Comprobar la expresión del ORF81 en la bacteria lisógena W3110 (mEp021)
- ❖ Realizar mutagénesis dirigida a los aminoácidos de la “lipobox” de Lpp^{mEp021} y comprobar su capacidad de exclusión.

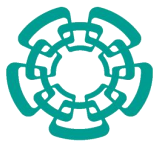


12. REFERENCIAS

1. Fortier, L. and Sekulovic, O. (2013). Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens. *Virulence*, 4(5), pp.354-365.
2. Salmond, G. and Fineran, P. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), pp.777-786.
3. Clokie, M., Millard, A., Letarov, A. and Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), pp.31-45.
4. Ackermann, H.-W. (2007) 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 152, 277–243
5. Wegrzyn, G., and Wegrzyn, A. (2015) Genetic switches during bacteriophage lambda development. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79, 1-48.
6. Brussow, H., Canchaya, C. and Hardt, W. (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp.560-602
7. Harkness, R. (1991). The biology of colicin M. *FEMS Microbiology Letters*, 88(1), pp.27-41.
8. Hernández-Sánchez, J, et al. (2008). Analysis of some phenotypic traits of feces-borne temperate lambdoid bacteriophages from different immunity groups: a high incidence of cor+, FhuA-dependent phages. *Archives of Virology*, 153(7), pp.1271-1280.
9. Cumby, N., Edwards, A., Davidson, A. and Maxwell, K. (2012). The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *Journal of Bacteriology*, 194(18), pp.5012-5019.
10. Lu, M. and Henning, U. (1994). Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in Microbiology*, 2(4), pp.137-139.
11. Hyman, P., Abedon, S. (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology* 70, 217-247
12. Labrie, S., Samson, J. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), pp.317-327.
13. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A. and Brussow, H. (2003). Prophage Genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(2), pp.238-276.
14. Uc-Mass, A., Loeza, E., de la Garza, M., Guarneros, G., Hernández-Sánchez, J. and Kameyama, L. (2004). An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology*, 329(2), pp.425-433.
15. Arguijo-Hernandez, E., Hernandez-Sanchez, J., Briones-Peña, S., Oviedo, N., Mendoza-Hernandez, G., Guarneros, G., Kameyama, L. (2018). Cor interacts with outer membrane proteins to exclude FhuA-dependent phages. *Archives of Virology*. (Accepted).
16. Sun, X., Göhler, A., Heller, K. and Neve, H. (2006). The ltp gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection



- exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology*, 350(1), pp.146-157.
17. Dunn, G, Duckworth, D. (1977). Inactivation of Receptors for Bacteriophage T5 During Infection of *Escherichia coli* B. *Journal of Virology*, 24(1), pp. 419-421.
 18. Yamaguchi, K., Yu, F. and Inouye, M. (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell*, 53(3), pp.423-432.
 19. Hayashi, S. and Wu, H. (1990). Lipoproteins in bacteria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 22(3), pp.451-471.
 20. Konovalova, A. and Silhavy, T. (2015). Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), p.20150030.
 21. Kameyama, L., Fernandez, L., Calderon, J., Ortiz-Rojas, A. and Patterson, T. (1999). Characterization of Wild Lambdoid Bacteriophages: Detection of a Wide Distribution of Phage Immunity Groups and Identification of a Nus-Dependent, Nonlambdoid Phage Group. *Virology*, 263(1), pp.100-111.
 22. Kameyama, L., Fernández, L., Bermúdez, R., García-Mena, J., Ishida, C., Guarneros G. (2001). Properties of a new coliphage group from human intestinal flora, in: *Recent Research Developments in Virology-II* (P. S. G. Ed.). Transworld Research Network, India, 2001, pp. 297e303.
 23. Martínez-Peñafiel, E., Fernández-Ramírez, F., Ishida, C., Reyes-Cortés, R., Sepúlveda-Robles, O., Guarneros-Peña, G., Bermúdez-Cruz, R. and Kameyama, L. (2012). Overexpression of lpe protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death. *Biochimie*, 94(6), pp.1262-1273.
 24. Jensen, K. (1993). The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology*, 175(11), pp.3401-3407.
 25. Wood, W. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *Journal of Molecular Biology*, 16(1), pp.118-133.
 26. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557-580.
 27. Silhavy, T., Berman, M. and Enquist, L. (2005). *Experiments with gene fusions*. Michigan: ProQuest.
 28. Craig Winstanley and Ralph Rapley, *Extraction and Purification of Plasmid DNA*, *The Nucleic Acid Protocols Handbook* (2000), Pages 327-331
 29. Hill, C., Garvey, P. and Fitzgerald, G. (1996). Bacteriophage-host interactions and resistance mechanisms, analysis of the conjugative bacteriophage resistance plasmid pNP40. *Le Lait*, 76(1-2), pp.67-79.
 30. Aono R, Tsukagoshi N, Yamamoto M (1998). Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 180:938-944
 31. Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), pp.16-22.



32. Appleyard RK (1954). Segregation of New Lysogenic Types during Growth of Doubly Lysogenic Strain Derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* 39:440-452.
33. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K., Tomita, M., Wanner, B. and Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2.
34. Campbell, A. (1961). Sensitive mutants of bacteriophage λ . *Virology*, 14(1), pp.22-32.
35. Strauch, M., Perego, M., Burbulys, D. and Hoch, J. (1989). The transition state transcription regulator *AbrB* of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Molecular Microbiology*, 3(9), pp.1203-1209.
36. Refardt, D., Gencoglu, M., Kunzli-Gontarczyk, M., Bruggmann, R. and Kropinski, A.M. The genome of several lambdoid coliphages. Unpublished.
37. Wietzorrek, A., Schwarz, H., Herrmann, C. and Braun, V. (2006). The Genome of the Novel Phage Rtp, with a Rosette-Like Tail Tip, Is Homologous to the Genome of Phage T1. *Journal of Bacteriology*, 188(4), pp.1419-1436.
38. Hamdi, S., Rousseau, G., Labrie, S., Tremblay, D., Kourda, R., Ben Slama, K. and Moineau, S. (2017). Characterization of two polyvalent phages infecting *Enterobacteriaceae*. *Scientific Reports*, 7, p.40349.
39. Chattaway, M., Schaefer, U., Tewolde, R., Dallman, T. and Jenkins, C. (2016). Identification of *Escherichia coli* and *Shigella* Species from Whole-Genome Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), pp.616-623.
40. Hatfull, G. and Hendrix, R. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current Opinion in Virology*, 1(4), pp.298-303.
41. Ivankov, D., Payne, S., Galperin, M., Bonissone, S., Pevzner, P. and Frishman, D. (2013). How many signal peptides are there in bacteria?. *Environmental Microbiology*, 15(4), pp.983-990.
42. Konovalova, A. and Silhavy, T. (2015). Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), p.20150030.
43. Narita, S., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2004). Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, 182(1), pp.1-6.
44. Fukuda, A., Matsuyama, S., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H. and Tokuda, H. (2002). Aminoacylation of the N-terminal Cysteine Is Essential for Lol-dependent Release of Lipoproteins from Membranes but Does Not Depend on Lipoprotein Sorting Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.43512-43518.
45. Hung, S. and Gottesman, M. (1997). The Nun protein of bacteriophage HK022 inhibits translocation of *Escherichia coli* RNA polymerase without abolishing its catalytic activities. *Genes & Development*, 11(20), pp.2670-2678.
46. Hargreaves, K., Kropinski, A. and Clokie, M. (2014). Bacteriophage behavioral ecology. *Bacteriophage*, 4(3), p.e29866.



47. Green, E. and Mecsas, J. (n.d.). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition, pp.215-239.
48. Clément, J. and Hofnung, M. (1981). Gene sequence of the λ receptor, an outer membrane protein of *E. coli* K12. *Cell*, 27(3), pp.507-514.
49. Kleanthous, C., Rassam, P. and Baumann, C. (2015). Protein–protein interactions and the spatiotemporal dynamics of bacterial outer membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 35, pp.109-115.
50. Davidson, AL., Nikaido, H. (1991). Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 14, pp. 46-51
51. Dippel, R. and Boos, W. (2005). The Maltodextrin System of *Escherichia coli*: Metabolism and Transport. *Journal of Bacteriology*, 187(24), pp.8322-8331.
52. Hunke, S., Mourez, M., Jéhanno, M., Dassa, E. and Schneider, E. (2000). ATP Modulates Subunit-Subunit Interactions in an ATP-binding Cassette Transporter (MalFGK2) Determined by Site-directed Chemical Cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), pp.15526-15534.
53. Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. and Lloubes, R. (2002). Pal Lipoprotein of *Escherichia coli* Plays a Major Role in Outer Membrane Integrity. *Journal of Bacteriology*, 184(3), pp.754-759.



13. APÉNDICES

Apéndice 1

Soluciones para bacterias y fagos

1. Medio Luria-Bertani (LB)

Para 1 L:	
Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Para Medio Agar, adicionar a lo anterior 15 g de Bacto-agar

2. Medio TΦ suave

Para 1 L:	
Triptona	10 g
Agar	10 g
NaOH	Concentración final 2M
MgSO ₄ 1M	10 mL

3. Buffer TMG (para diluciones de fagos)

Para 1 L:	
Tris base	1.21 g
MgSO ₄	1.20 g
Gelatina	0.10 g
Ajustar a pH 7.4 con HCl, esterilizar en autoclave	



Apéndice 2

Soluciones para extracción de plásmido con técnica de miniPREP

1. Solución I

50 mM glucosa	
25 mM Tris-Cl (pH 8.0)	
10 mM EDTA (pH 8.0)	
Esterilizar en autoclave. Guardar a 4°C	

2. Solución II

0.2 N NaOH
1% SDS

3. Solución III

5M Acetato de potasio	60 mL
Ácido acético glacial	11.5 mL
H ₂ O	28.5 mL
Volumen final	100 mL

Apéndice 3

DEAE-celulosa.

Pesar 100 g resina DEAE-celulosa. Agregar 400 mL de HCl 0.05N. Neutralizar con una solución de NaOH concentrado hasta obtener un pH de 6.8, manteniendo la muestra en agitación. Dejar precipitar la resina y decantar el sobrenadante. Hacer lavados con medio LB (pH 6.8) al menos tres o hasta que el pH se idéntico al del medio. Resuspender la resina hasta obtener aproximadamente 75% de resina y 25% de medio LB. Dividir suspensión en tubos falcón estériles de 50 mL. Agregar 0.1% de azida de sodio para evitar contaminaciones.



Apéndice 4

Soluciones para preparación de Geles Tris-tricina 15%

1. Acrilamida 30% T, 2.7% bis

Pesar 292 g de Acrilamida y 8 g de Bis-acrilamida. Disolver y aforar a 1 L. Guardar a 4°C.

2. SDS 10%

Disolver 50 g de SDS y aforar a 500 mL con H₂O destilada.

3. Buffer del gel (Tris 3M, SDS 0.3%, pH 8.45)

Pesar 36.42 g de Trisma base. Disolver y ajustar pH con HCl. Agregar 3 mL de solución 2. Aforar a 100 mL con H₂O destilada.

4. Persulfato de amonio 10%

Disolver 0.05 g de persulfato de amonio en 500 µL de H₂O. Guardar a -20°C.

5. Buffer de tratamiento 2X. (Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8; SDS 4%; Glicerol 20%; 2-mercaptoetanol 10%)

Agregar 2.5 mL de solución 3, 4 mL de solución 4, 2 mL de glicerol y 1 mL de 2-mercaptoetanol. Mezclar y aforar a 10 mL con H₂O destilada. Disolver una pizca de azul de bromofenol.

6. Buffer cátodo (-) (Tris 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1%, pH 8.25)

Pesar 12.14 g de Trisma base y 17.91 de Tricina. Disolver y ajustar pH con HCl. Agregar 10 mL de solución 2. Aforar a 1000 mL con H₂O destilada.

7. Buffer ánodo (+) (Tris 0.2M, pH 8.9)

Pesar 24.28 g de Trisma base. Disolver y ajustar pH con HCl. Aforar a 1 L con H₂O destilada.



Apéndice 5

Soluciones para Tinción de geles con plata

Se utilizó el kit de Silver Stain Plus™ Kit #1610449 de Bio Rad

1. Solución Fijadora

Para 100 mL	
Metanol	50 mL
H ₂ O	30 mL
Ácido acético	10 mL
Fijador (Bio Rad Kit)	10 mL

2. Solución aceleradora

Disolver 0.25 g del reactivo acelerador en 5 mL de H₂O destilada

3. Solución Teñidora

Para 15 mL	
H ₂ O	7 mL
Solución Silver (Bio Rad Kit)	1 mL
Solución Reductora (Bio Rad Kit)	1 mL
Desarrollador de imagen (Bio Rad Kit)	1 mL
Solución aceleradora (Sol. 2)	5 mL

4. Solución para detener reacción

Para 50 mL	
H ₂ O	47.5 mL
Ácido acético	2.5 mL



Apéndice 6

Soluciones para Western Blot

1. Buffer de Tris-Glicina (Tris 0.25M, pH 8.3; Glicina 1.92M)

Pesar 30 g de Trisma base y 150 g de Glicina. Disolver y aforar a 1 L con H₂O destilada. Solución 10X

2. SDS 10%

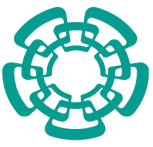
Disolver 50 g de SDS y aforar a 500 mL con H₂O destilada.

3. Buffer del Tanque (Tris 0.025M, pH 8.3; Glicina 0.192M; SDS 0.1%)

Para 1000 mL	
Solución 1	100 mL
Solución 2	10 mL
H ₂ O	890 mL

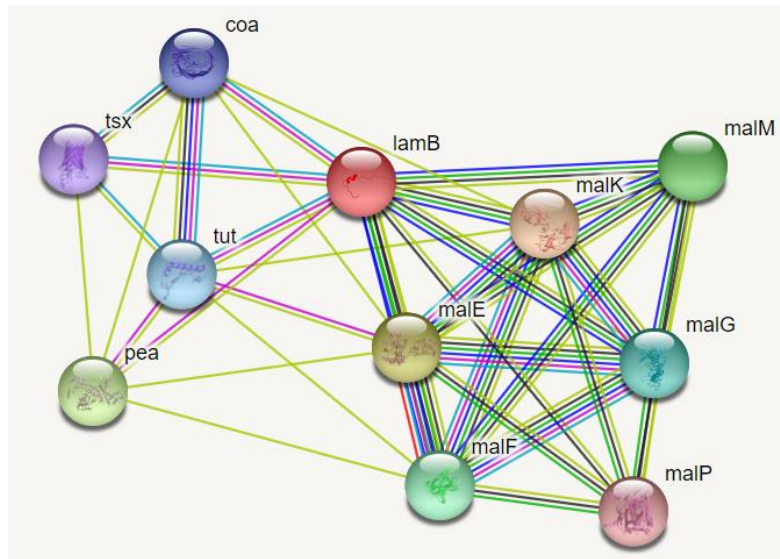
4. Buffer de transferencia

Para 1000 mL	
Solución 3	800 mL
Metanol	200 mL



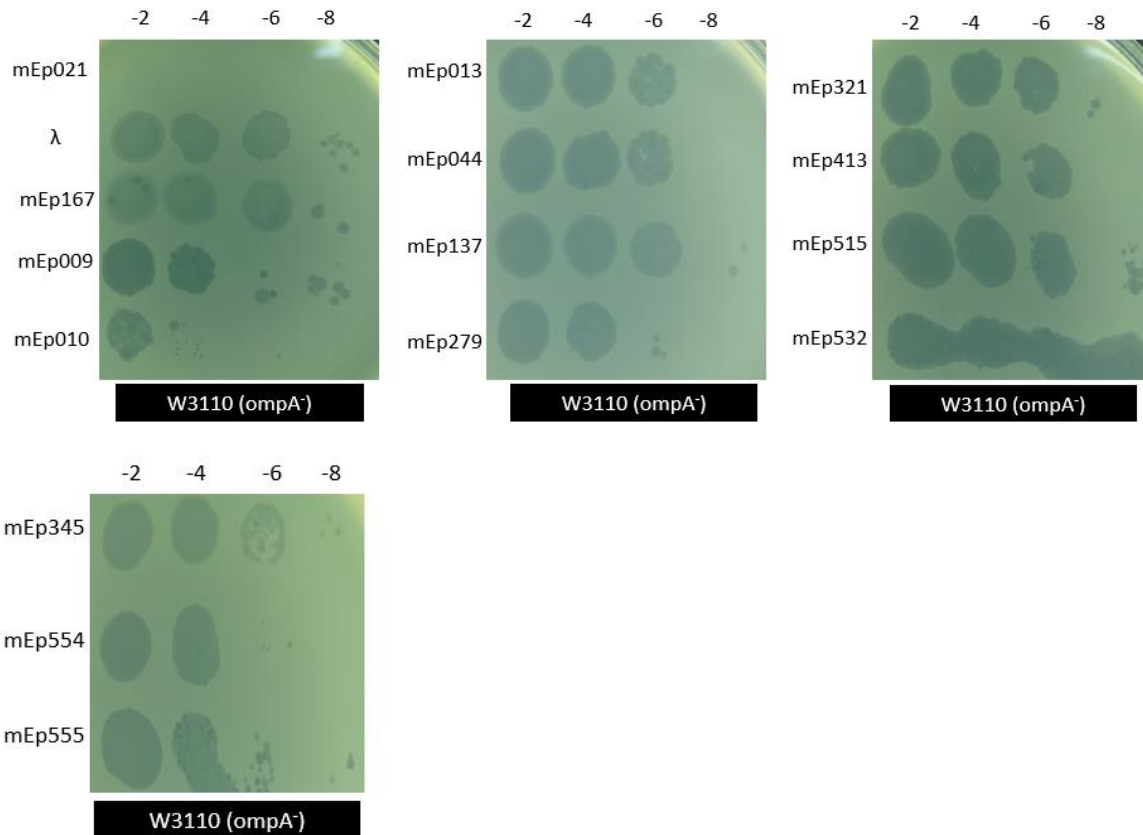
14. ANEXOS

Anexo 1. Predicción *in silico* utilizando el servidor de STRING de la interacción entre LamB y el complejo MalEFGK₂.

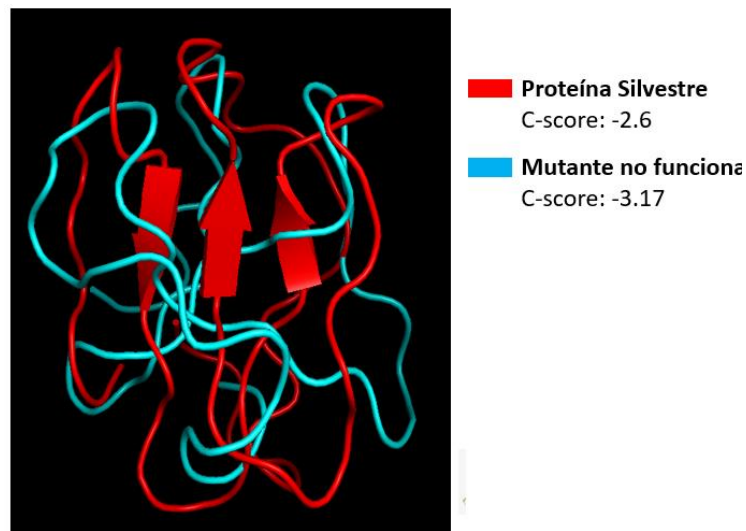




Anexo 2. Ensayo de infección con fagos del grupo de inmunidad I en la cepa transductante W3110 (*ompA*⁻). N=2.



Anexo 3. Comparación de estructura tridimensional entre Lppm^{Ep021} WT y Lppm^{Ep021} W71C.

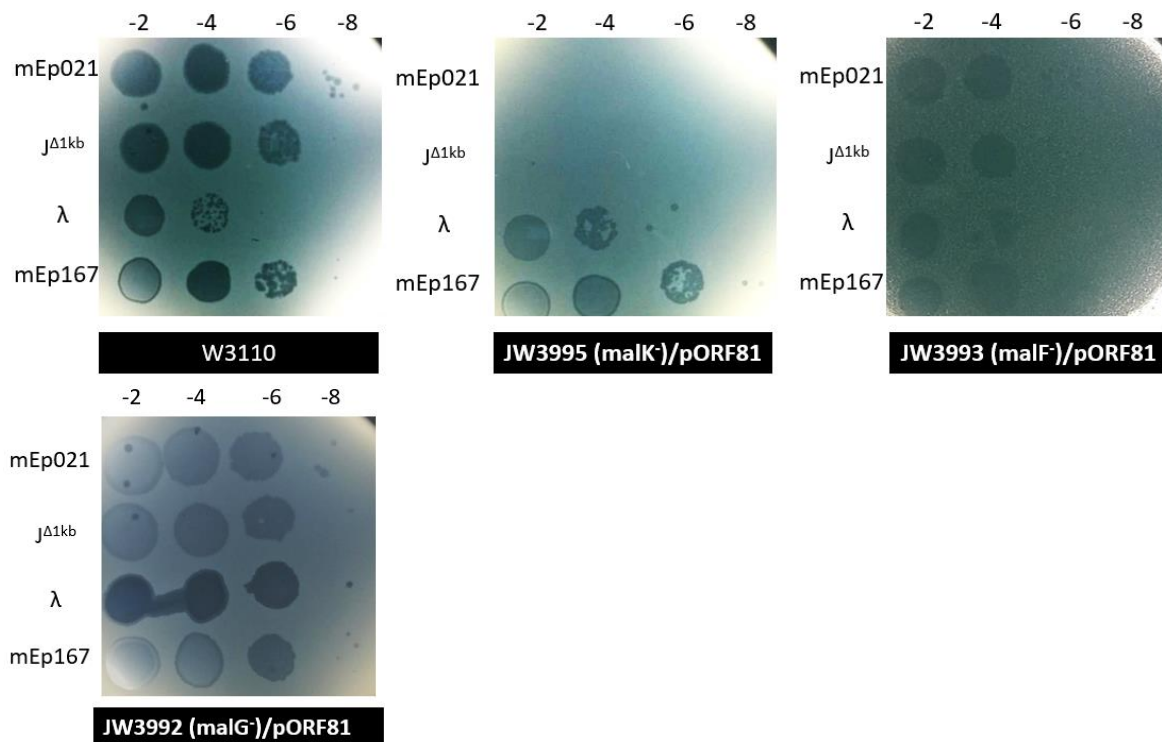




Anexo 4. Características de la construcción para “Pulld-Down”, el Tag de Histidinas se agregó en el extremo N-terminal, y se eliminaron los aminoácidos presentes en la “lipobox”, de tal manera que se mimetiza el procesamiento de las lipoproteínas. La construcción se encuentra en el vector pKQV4 clonado con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

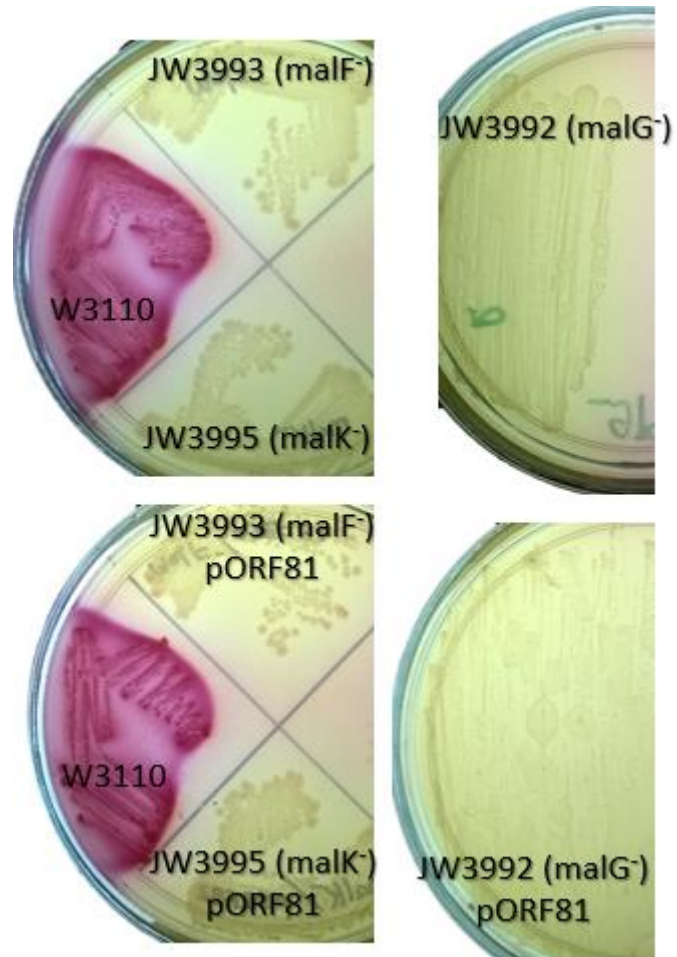
EcoRI **M** **6xHis** **G-S-G** **CA**DTNRHNGHCATSAYGVCIYERWVDGAKVPSGEICRVYDGTGDGHSGKTRDCGSKEWY **Stop** **HindIII**

Anexo 5. Ensayo de infección en cepas JW3995 (*malK*⁻), JW3993 (*malF*⁻) y JW3992 (*malG*⁻) “Keio Collection” transformadas con pORF81. N=2.



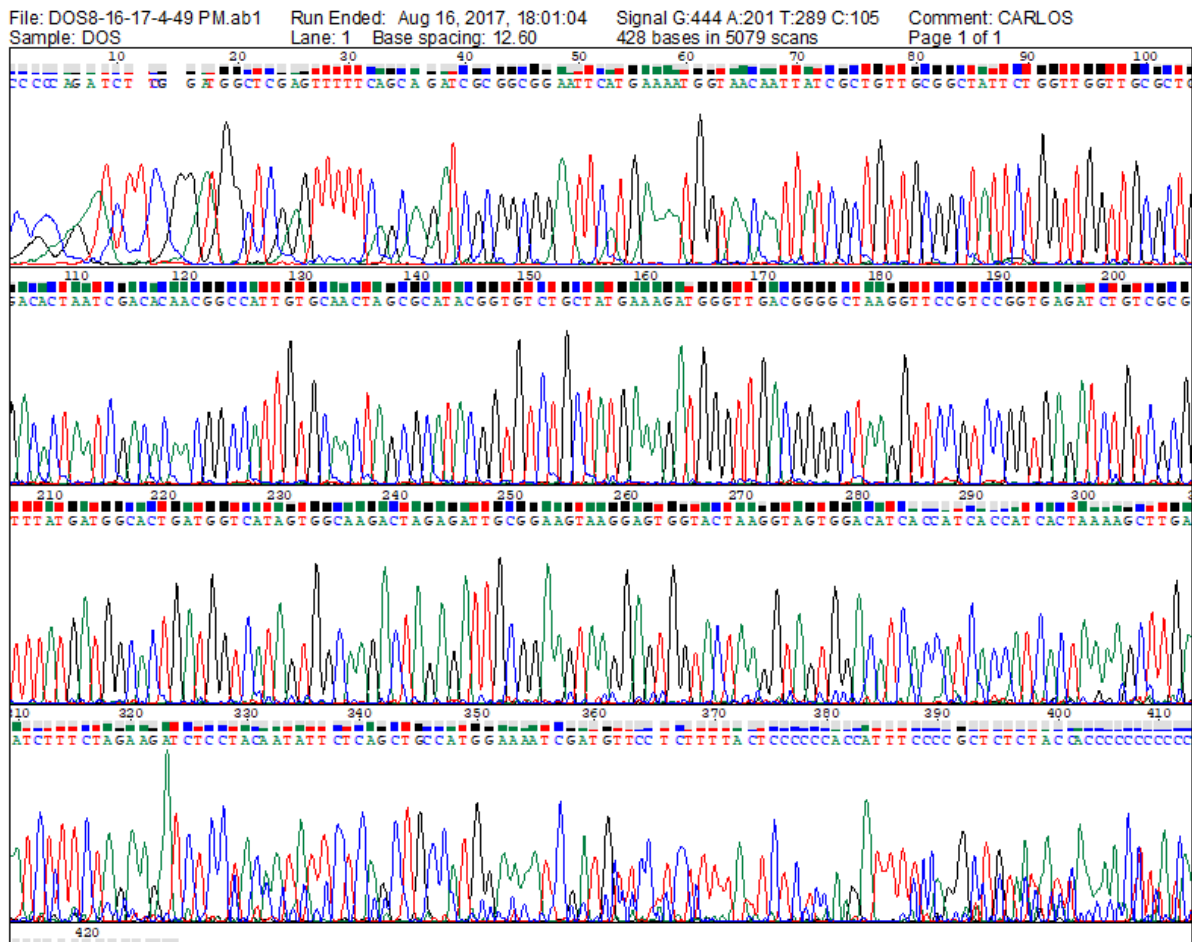


Anexo 6. Comprobación de las cepas JW3995 ($malK^-$), JW3993 ($malF^-$) y JW3992 ($malG^-$) en medio MacConkey Maltosa. Maltosa (+): Colonias rosas, Maltosa (-): Colonias amarillas.



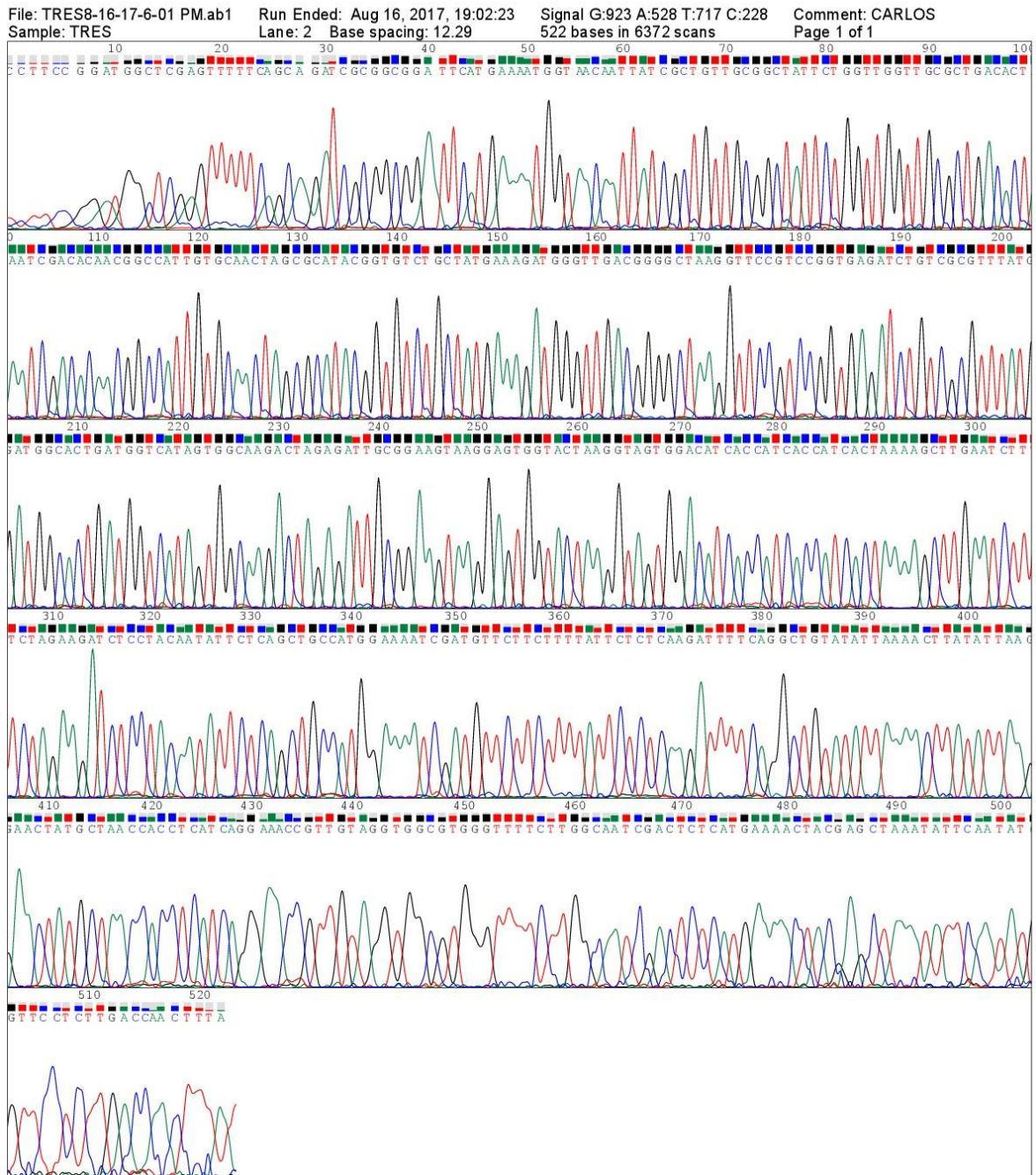


Anexo 7. Electroferograma de la construcción pJET1.2/blunt_ORF81 (Fw). Candidata 2.



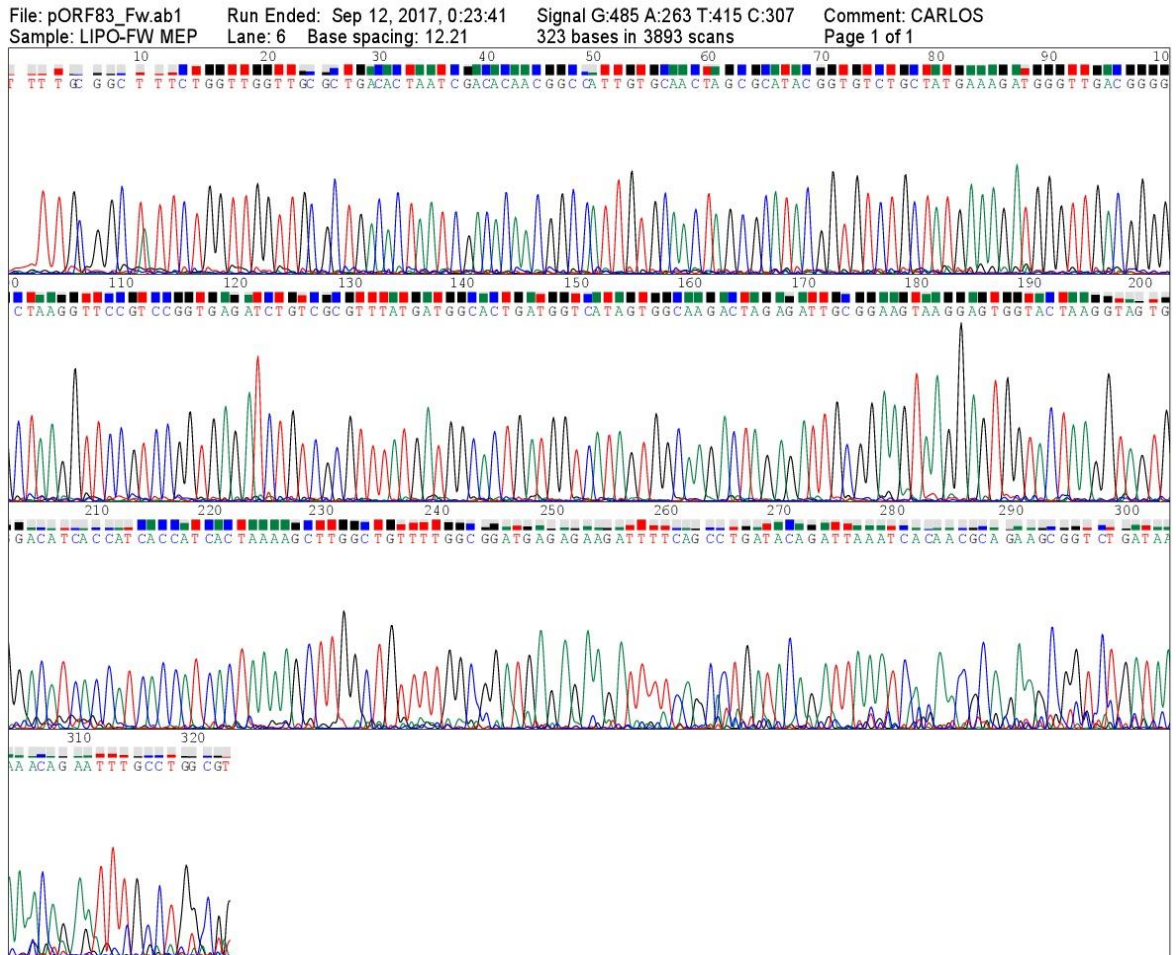


Anexo 8. Electroferograma de la construcción pJET1.2/blunt_ORF81 (Fw). Candidata 3.



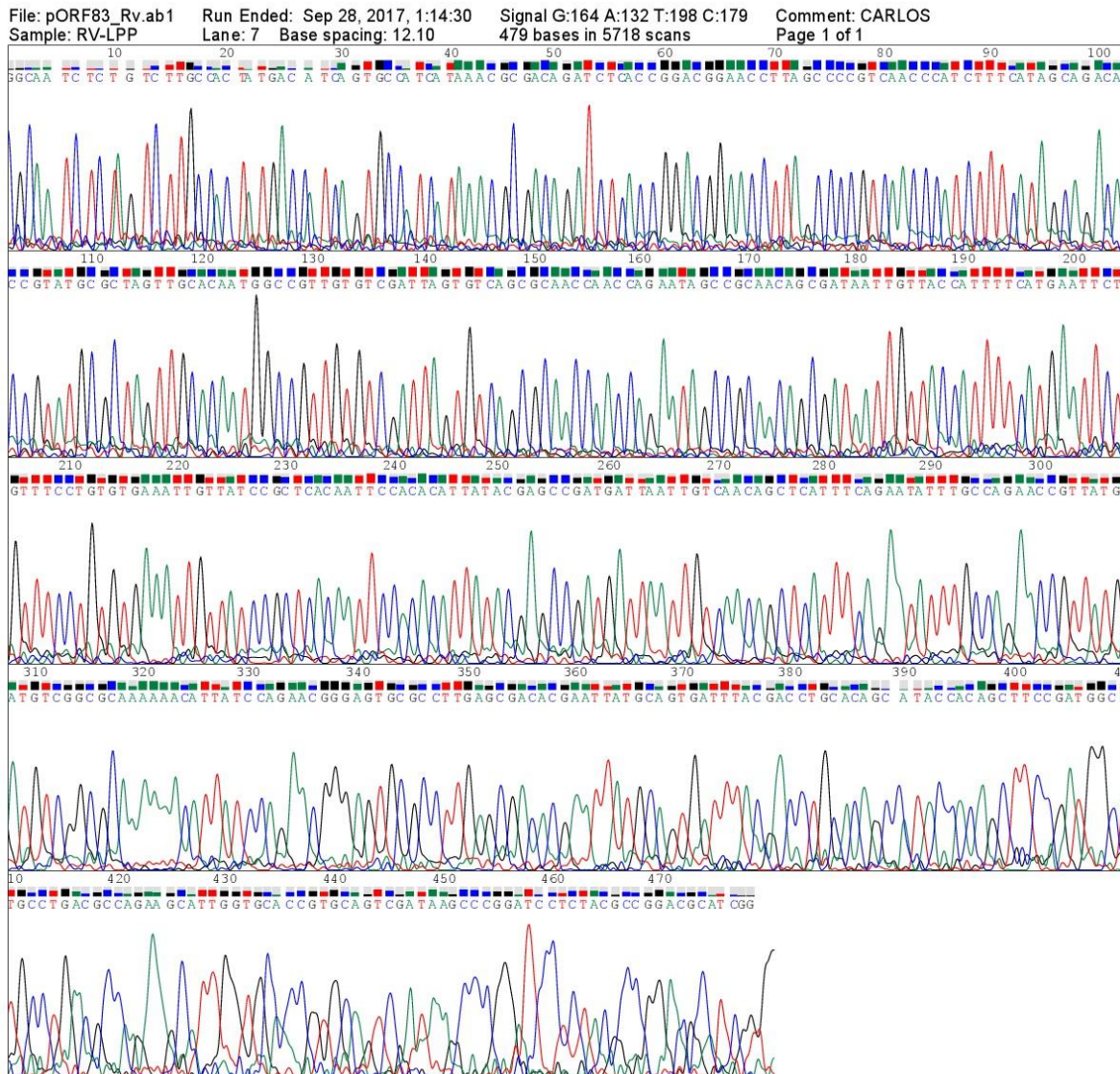


Anexo 9. Electroferograma de la construcción pORF81 (Fw).



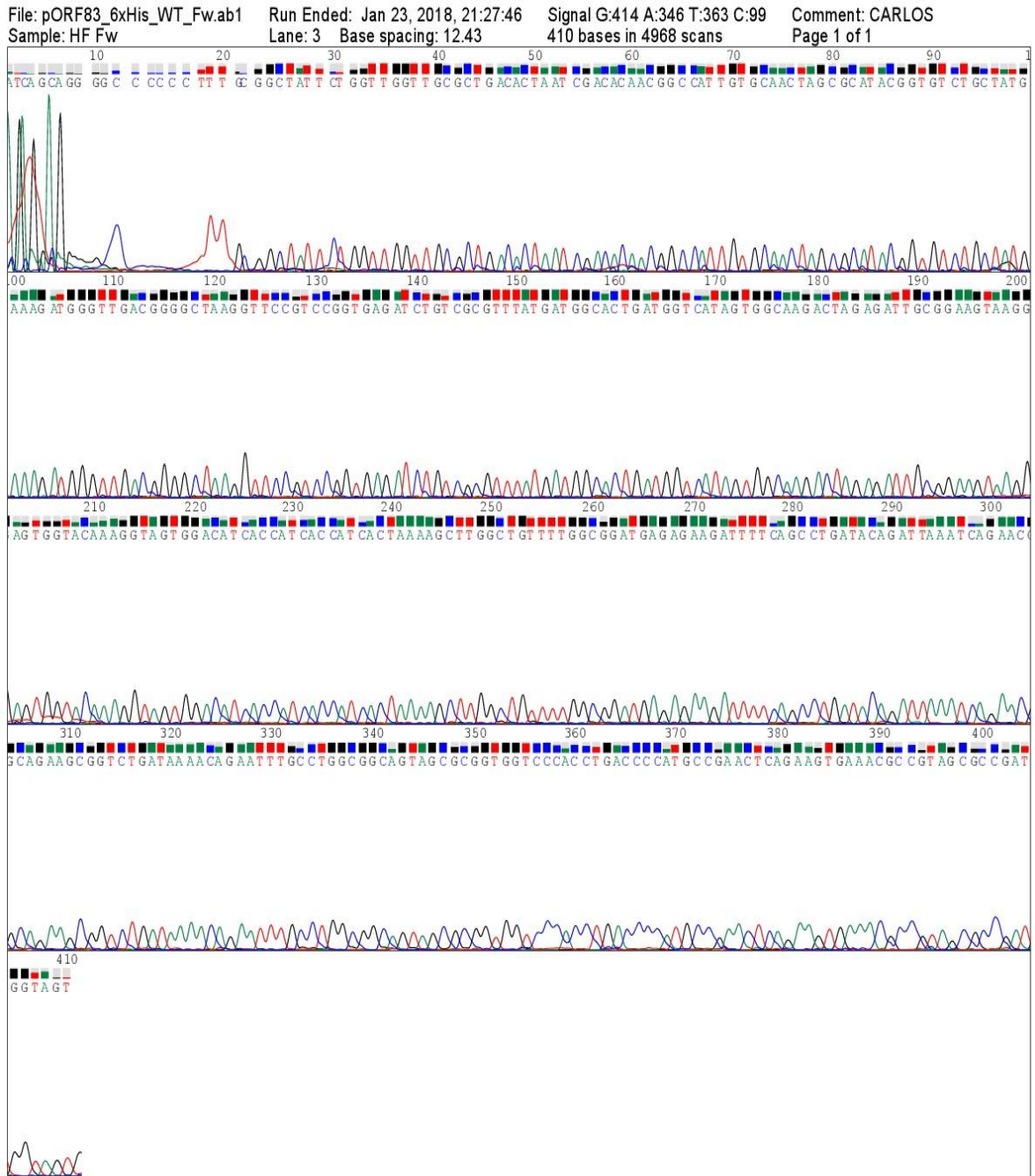


Anexo 10. Electroferograma de la construcción pORF81 (Rv).



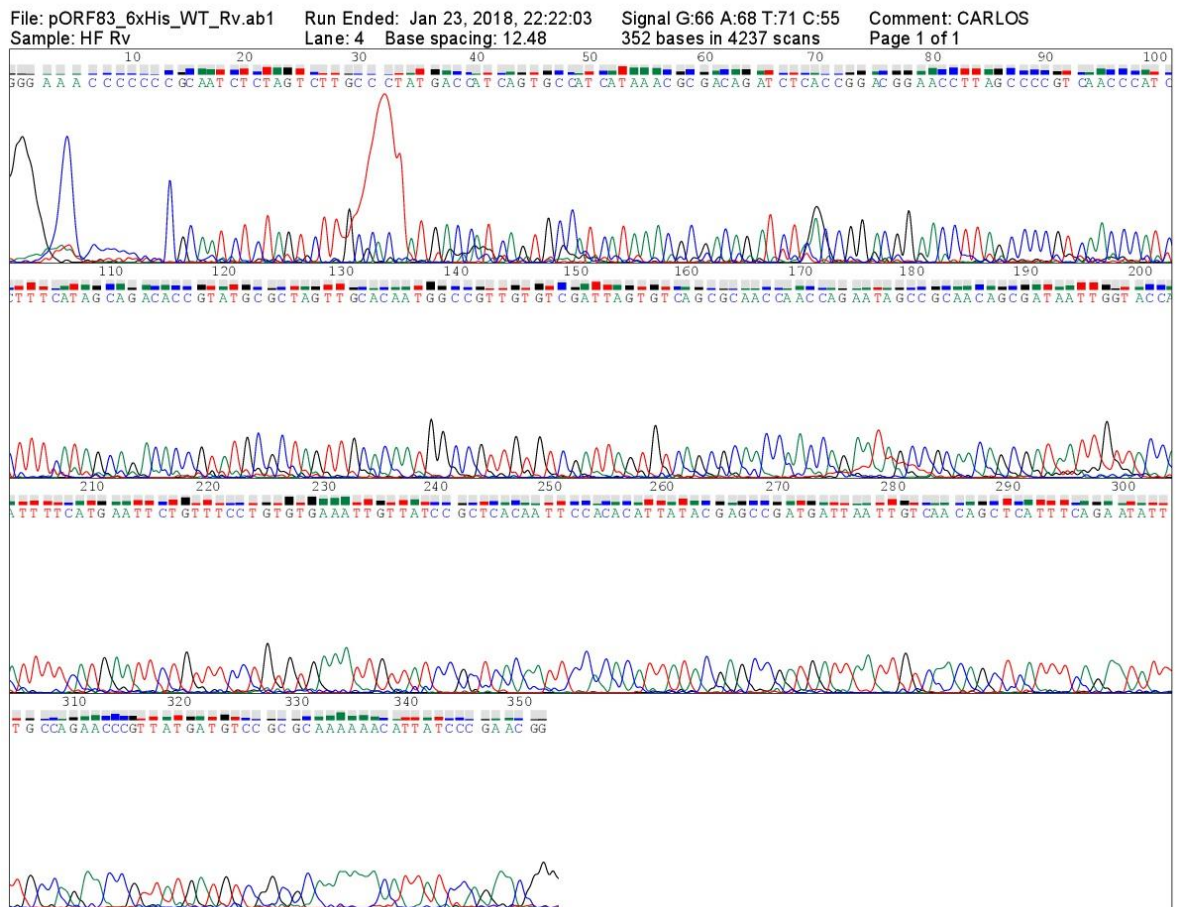


Anexo 11. Electroferograma de la construcción pORF81^{6xHis} (Fw).



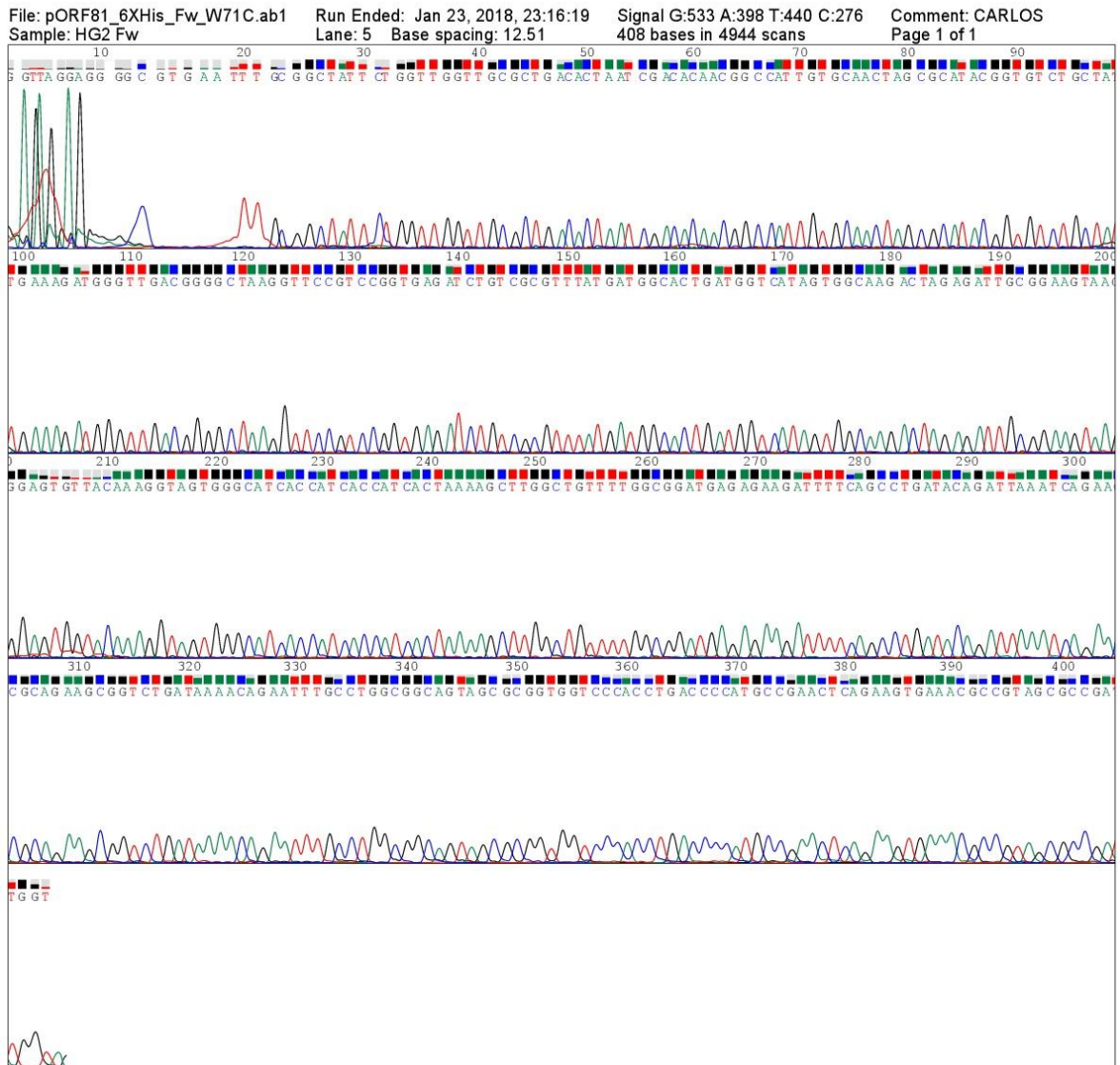


Anexo 12. Electroferograma de la construcción pORF81^{6xHis} (Rv).





Anexo 13. Electroferograma de la construcción pORF81^{6xHis}W71C (Fw).





Anexo 14. Electroferograma de la construcción pORF81^{6xHis}W71C (Rv).

