



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Identificación de genes en el profago Ps56 relacionados con la exclusión de fagos  
superinfectantes en *Pseudomonas aeruginosa*”

**TESIS QUE PRESENTA:**

M. en C. MARCO ANTONIO CARBALLO ONTIVEROS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTORADO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE:**

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**DIRECTORES DE TESIS:**

DR. LUIS YOSHIO KAMEYAMA KAWABE

DR. GABRIEL GUARNEROS PEÑA

**Ciudad de México**

**Junio del 2020**

**ASESORES:**

DRA. ROSA MARÍA DEL REFUGIO BERMÚDEZ CRUZ  
(Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV)

DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS  
(Facultad de Medicina, UNAM)

DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
(Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA  
(Facultad de Ciencias, UNAM)

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

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo de marzo de 2013 a febrero de 2017, número de becario: 374616 (CVU). Asimismo, este trabajo fue respaldado por la subvención del CONACyT-Ciencia Básica, con el número de proyecto: 255255; y del Fondo de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del CINVESTAV, con el número de solicitud: 37.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis directores:*

Dr. Gabriel Guarneros Peña, por la oportunidad de ser parte de su excepcional equipo de trabajo y por todas las enseñanzas alcanzadas en el mismo. No cabe duda que usted nos convierte en *espartanos*.

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, por todas sus atenciones y momentos en los que estuvo dispuesto a escucharme. Además de compartir sus experiencias para guiarme en mi formación.

*A mis asesores:*

Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz, porque desde el primer momento que formó parte de mi comité estuvo interesada en mi proyecto, además de estar al pendiente de mis avances.

Dr. Rodolfo García Contreras, por su enorme amabilidad y sencillez. Siempre estuvo dispuesto a apoyarme en mi proyecto con lo que le fuera posible.

Dr. Luis Servín González, por aceptar ser parte de mi comité y siempre cuestionarme y plantearme diferentes escenarios. Además de ser perspicaz en todas sus observaciones.

Dr. Luis David Alcaraz Peraza, porque, a pesar de ser bioinformático, aceptó con mucha amabilidad y entusiasmo el asesorarme. Asimismo, siempre me abrió las puertas de su laboratorio y me apoyo en pulir mi proyecto.

*A los auxiliares y posdoctorales del laboratorio L3 y L8:*

Marco Antonio Magos Castro (*Súper Tocayo*), por darme el privilegio de ser mi amigo y por siempre contar con tu apoyo en todas las ideas estremecedoras o locuras que se nos ocurrían para sacar adelante nuestros respectivos proyectos. Honor a quien honor merece.

José Bueno, Eva Jacinto y Augusto Uc; por la amabilidad y cordialidad que me mostraron como un miembro más del laboratorio.

*A mis compañeros del laboratorio L3 y L8:*

Omar, Manuel, Rodolfo, Yuritzá, Irais, Víctor Arenas, Leonor, Nelby, Ana, Carlos Aviles, Carlos (*el Charly*), Jair (*Yayo Malayo*), Enith, Francisco, Emma y Adrián; por todos los gratos momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

*Al técnico del laboratorio:*

Sra. Flor Revillas Mejía, porque usted siempre ha estado “al pie del cañón” en el laboratorio. Su trabajo es sumamente valioso para todos los del L3 y L8. Sin éste, los experimentos no salen y/o avanzan. No cabe duda que es nuestro centinela. Además de darme el privilegio de ser su amigo y por todas las pláticas que tuvimos a primera hora de la mañana (honestamente, las voy a extrañar mucho).

*A la Secretaria Académica, Gabriela Mora, por el compromiso y amor que siempre has demostrado a tu trabajo, el cual se refleja en el servicio y atenciones que les das a todos los alumnos sin excepción.*

A Rosa María García (Cocina Bacteriológica), por el esfuerzo realizado para proporcionar los medios de cultivo que se emplearon para mi proyecto.

## DEDICATORIAS

*Francisco Javier Carballo Cruz,  
María de Lourdes Irma Ontiveros Zárate,  
y Luis Javier Carballo Ontiveros*  
A mi *Trifuerza*, porque de los tres siempre recibí la energía,  
apoyo y comprensión para alcanzar esta nueva meta.  
Este trabajo es por y para ustedes.

*Berenice Abigail Velasco Herrera*  
Por darme la oportunidad de estar a tu lado.  
Tu amor y cariño siempre me han inspirado  
para dar lo mejor de mí.  
Eres quién me hacía falta en mi vida.  
Te amo.

*Jessica Téllez Conejo y  
Vania Karemy Carballo Téllez*  
Por la enorme felicidad de que sean parte  
de mi núcleo familiar.

*Familia Carballo y Familia Ontiveros*  
No cualquiera tiene la fortuna y dicha de ser  
un Carballo y un Ontiveros.  
Siempre han estado presentes  
en mi vida, con su amor y cariño.

*José Raúl Armida y Marco Antonio Padilla*  
A pesar de la distancia y el tiempo, nuestra amistad continúa.  
Ustedes son grandes y legendarios,  
como todas nuestras *justas*.

*Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán*  
Porque fue, es y seguirá siendo mi mentora en esta inefable  
ciencia que es la Genética.

*Francisco Javier Carballo Ontiveros,  
Guadalupe Zárate Rodríguez, Luis Ontiveros Zárate  
Clemencia Cruz Luna y Manuel Carballo Hernández*  
Mis cinco estrellas que me cuidan desde lo más alto  
del firmamento. Nos volveremos a encontrar.

Y en especial a:  
*Sandra Ortega, Víctor Flores, Angélica Saldaña, Otoniel Maya,*  
*Eva Martínez, Saida Briones y Ricardo Amador*

A mis grandes amigos de CINVESTAV. Porque los encontré  
y me han permitido compartir muchos momentos con ustedes.  
Además de que en más de una ocasión han estado a mi lado  
y me han permitido luchar junto a ustedes para alcanzar  
esta nueva meta.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>II</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
1.1 Bacteriófagos.	3
1.1.1 Composición de los fagos.	3
1.1.2 Clasificación de los fagos.	3
1.1.3 Ciclos replicativos.	5
1.1.3.1 Importancia de los profagos.	6
1.2 Proceso de Infección.	7
1.2.1 Etapas.	7
1.2.2 Mecanismos de Exclusión.	8
1.3 Uso clínico de los fagos (fago terapia).	11
1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.3.2 Importancia nosocomial de <i>P. aeruginosa</i> .	12
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>12</b>
2.1 Fagos de <i>Pseudomonas</i> .	13
2.2 Fagos transponibles.	14
2.2.1 Fago Mu.	14
2.2.2 Fagos Mu-like en <i>Pseudomonas</i> .	15
2.2.3 Fagos B3-like.	16
2.2.3.1 Pangenoma B3-like.	17
2.3 Mecanismos de exclusión por profagos en <i>P. aeruginosa</i> .	20
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>23</b>
5.1 Objetivo General.	23
5.2 Objetivos Particulares.	23
<b>VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b>	<b>24</b>



<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
7.1 Cepas bacterianas de <i>P. aeruginosa</i> .	25
7.1.1 Almacenamiento de cepas.	25
7.2 Fagos de <i>P. aeruginosa</i> .	25
7.3 Tapices bacterianos.	27
7.4 Generación de <i>stocks</i> de fagos.	27
7.4.1 Titulación de fagos.	28
7.4.2 Disminución del título.	28
7.5 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de CsCl.	29
7.5.1 Diálisis de los fagos.	30
7.6 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).	31
7.7 Construcción de lisógenas.	32
7.8 Ensayos de infección.	32
7.9 Grupos de inmunidad.	33
7.10 Estrategia para la búsqueda de genes de exclusión.	34
7.10.1 Determinación de fragmentos del genoma de Ps56.	34
7.10.2 Extracción del DNA de Ps56.	34
7.10.3 Cuantificación de DNA.	35
7.10.4 Restricción del DNA de Ps56.	35
7.10.5 Restricción del plásmido pHERD30T.	36
7.10.6 Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas.	37
7.10.7 Reacciones de ligación [clonación].	37
7.10.8 Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .	38
7.10.9 Transformación química en <i>E. coli</i> .	39
7.10.10 Extracción de clonas en <i>E. coli</i> .	40
7.10.11 Secuenciación de las clonas.	40
7.10.12 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i> .	41
7.10.13 Electroporación en <i>P. aeruginosa</i> .	42
7.10.14 Procesamiento del fragmento B.2 con <i>NcoI</i> y <i>SalI</i> .	42
7.10.15 Amplificación del fragmento B.2 $\Delta$ <i>SalI</i> (inv) y de los ORFs 9 y 10.	44
7.10.16 Construcción del plásmido pSEVA55*.	45

7.10.17 Amplificación y clonación del ORF 10 en pSEVA55*.	47
7.10.18 Alineamiento de secuencias y búsqueda de homólogos.	49
7.10.19 Resumen de la estrategia realizada.	49
7.11 Ensayo de adsorción.	50
7.12 Ensayo de eflujo de K <sup>+</sup> .	51
7.13 Análisis estadístico.	52
7.14 Números de acceso.	52
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>53</b>
8.1 Morfología de los siete fagos B3- <i>like</i> .	54
8.2 Patrones de exclusión de profagos B3- <i>like</i> en Ps33.	55
8.3 Identificación de los genes responsables del fenotipo de exclusión en el fago Ps56.	55
8.3.1 Simulación <i>in silico</i> de la restricción de Ps56.	55
8.3.2 Fragmentos del genoma de Ps56.	56
8.3.3 Evaluación de los fragmentos de Ps56.	58
8.3.4 Evaluación de los ORFs presentes en el fragmento B.2.	59
8.3.5 Actividad concertada de los ORFs 9 y 10.	61
8.3.6 Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas de los ORFs 9 y 10.	63
8.4 Nivel de exclusión de los ORFs 9 y 10 en el proceso de infección.	66
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>68</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	<b>75</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>76</b>
<b>SITIOS ELECTRÓNICOS</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>100</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Clasificación de los fagos. A partir de su material genético	5
<b>Figura 1.2.</b> Ciclos replicativos de los fagos	6
<b>Figura 1.3.</b> Etapas del proceso de infección de los fagos	8
<b>Figura 1.4.</b> Nivel de acción de los mecanismos de exclusión en el proceso de infección fago-bacteria	9
<b>Figura. 2.1.</b> Identidad de nucleótidos entre los doce fagos B3- <i>like</i>	17
<b>Figura 2.2.</b> Pangenoma de los fagos B3- <i>like</i>	19
<b>Figura 7.1.</b> Obtención de fagos concentrados por gradientes discontinuos de CsCl.	30
<b>Figura 7.2.</b> Dimensiones de la cuadrícula guía empleada para gotear fagos	33
<b>Figura 7.3.</b> Ejemplo del criterio de reciprocidad para identificar grupos de inmunidad	34
<b>Figura 7.4.</b> Plásmido compatible con pHERD30T	47
<b>Figura 7.5.</b> Resumen de la estrategia para localizar los genes de exclusión de Ps56	50
<b>Figura 8.1.</b> Micrografías de los siete fagos B3- <i>like</i> del laboratorio	54
<b>Figura 8.2.</b> Patrones de exclusión de siete profagos B3- <i>like</i> en la cepa Ps33	57
<b>Figura 8.3.</b> Restricción <i>in silico</i> del genoma de Ps56	56
<b>Figura 8.4.</b> Obtención de fragmentos A.1, B.1 y B.2 del genoma del fago Ps56	57
<b>Figura 8.5.</b> Ensayo de infección con los fragmentos A.1, B.1 y B.2 de Ps56	59
<b>Figura 8.6.</b> Restricciones y amplificaciones de los ORFs del fragmento B.2	60
<b>Figura 8.7.</b> Evaluación de los ORFs del fragmento B.2 de Ps56	61
<b>Figura 8.8.</b> Amplificación y restricción del ORF 10 para su clonación en el plásmido pSEVA55*	62
<b>Figura 8.9.</b> Actividad concertada de los ORFs 9 y 10 en el fenotipo de exclusión.	63
<b>Figura 8.10.</b> Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas del ORF 9	64
<b>Figura 8.11.</b> Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas del ORF 10	65
<b>Figura 8.12.</b> Ensayo de adsorción de los ORFs 9 y 10 con el fago virulento PaMx53	67
<b>Figura 8.13.</b> Ensayo de eflujo de K <sup>+</sup>	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Clasificación de fagos que infectan a <i>Pseudomonas</i> spp	13
<b>Tabla 7.1.</b> Origen de aislamiento de los siete fagos temperados de <i>P. aeruginosa</i>	26
<b>Tabla 7.2.</b> Fagos temperados y virulentos que infectan a la cepa Ps33 de <i>P. aeruginosa</i>	27
<b>Tabla 7.3.</b> <i>Primers</i> para secuenciar clonas en pHERD30Ta	40
<b>Tabla 7.4.</b> <i>Primers</i> para amplificar ORFs del fragmento B.2 $\Delta$ Sa/I	44
<b>Tabla 7.5.</b> <i>Primers</i> para la construcción del plásmido pSEVA55*	46
<b>Tabla 7.6.</b> <i>Primers</i> para la clonación del ORF 10 en el plásmido pSEVA55*	48

## ANEXOS

A.1 Preparación de Medios.	100
A.2 Equipos	101
A.3 Preparación de Soluciones, Buffers y Geles.	103
A.4 Tablas Suplementarias	105
A.5 Detalles Técnicos	105
A.6 Secuencia del plásmido pSEVA55*.	107
A.7 Alineamiento de clonas	110
A.8 Resultados de BLASTp de los ORFs 9 y 10.	118

## RESUMEN

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente a las bacterias y son considerados como los reservorios de información genética más novedosos. Cuando los fagos se integran al genoma de sus hospederos, a manera de profagos, aportan nuevos atributos fenotípicos como la exclusión a fagos superinfectantes. Debido a que se desconoce la función de un 20-25% de los ORFs que forman parte del genoma de los fagos, algunos de estos pueden ser responsables del fenotipo de exclusión a la superinfección. En este trabajo se abordó el estudio de siete fagos B3-*like* (Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H71), los cuales han pasado inadvertidos como un grupo a pesar de que su información se ha acumulado en las bases de datos. Los experimentos realizados con los siete ejemplares aportan evidencia de su parecido morfológico con los cinco fagos B3-*like* reportados en las bases de datos (B3, JBD18, JBD25, JBD67 y MP105), además de que en su estado de profago confieren exclusión a fagos superinfectantes temperados y virulentos. Para identificar a los ORFs responsables del fenotipo de exclusión observado, se eligió al fago Ps56 como representante del grupo. El genoma de Ps56 fue restringido para generar una biblioteca parcial y, a partir de ésta, delimitar a los ORFs que retuvieron el fenotipo de exclusión. Los ORFs 9 y 10 fueron identificados como los responsables, además de demostrar que ambos son necesarios para generar el fenotipo de exclusión. Asimismo, se evaluó en qué etapa del proceso de infección de los fagos intervienen ambos ORFs. Los resultados obtenidos demuestran que los ORFs 9 y 10 permiten la adsorción de fagos superinfectantes, pero bloquean la inyección de su DNA. El trabajo presente corresponde al primer reporte en el tema de exclusión a la superinfección en fagos B3-*like*, además de reportar el primer fenotipo de bloqueo de inyección de DNA en profagos de *P. aeruginosa*.

**Palabras clave:** Profagos, conversión lisogénica, resistencia a la superinfección, asignación de función a genes, librería genómica de fagos, fagos B3-*like*.

## ABSTRACT

Bacteriophages or phages are viruses that exclusively infect bacteria and are considered the major genetic reservoir. When phages integrate into the genome of their hosts, as prophages, they provide new phenotypic traits such as the exclusion to superinfecting phages. Because 20-25% of the ORFs in the phage genome have unknown function, some of these may be responsible for the superinfection exclusion phenotype. In this work, seven phages (Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 and H71) were studied and which present homology with the unnoticed group B3-like. The experiments with the seven phages provided evidence of their morphological similarity with five B3-like phages reported in the databases (B3, JBD18, JBD25, JBD67, and MP105), and that they also confer exclusion to temperate and virulent superinfecting phages in their prophage state. To identify the ORFs responsible of the observed exclusion phenotype, phage Ps56 was chosen as the group representative. The genome of Ps56 was restricted to generate a partial library and, from this, delimit the ORFs that retained the exclusion phenotype. ORFs 9 and 10 were identified as responsible, in addition to demonstrating that both are necessary to generate the exclusion phenotype. Likewise, it was evaluated in which stage of the phage infection process both ORFs intervene. The results showed that ORFs 9 and 10 allow the adsorption of superinfecting phages, but block the injection of their DNA. This work corresponds to the first report on the topic of exclusion to superinfection in B3-like phages, and also the first case of DNA injection blockage in *P. aeruginosa* prophages.

**Keywords:** Prophages, lysogenic conversion, superinfection resistance, gene function assignment, phage genomic library, B3-like phages.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan exclusivamente a las bacterias. Estos fueron descubiertos inicialmente por el bacteriólogo inglés Frederick William Twort en 1915 y, posteriormente, por microbiólogo y micólogo franco-canadiense Félix d'Hérelle en 1917 (Jenkins, 1986; Kuchment, 2012). Actualmente se reconoce la abundancia e influencia de los fagos en la biósfera, siendo de  $\sim 10^{31}$  partículas. Estos pueden encontrarse tanto en reservorios marinos como terrestres y son responsables de eliminar entre el 15 y 40% de las bacterias que se generan diariamente, interviniendo en procesos biológicos y ambientales. Asimismo, los fagos constituyen el reservorio de material genético más diverso sobre el planeta (Hendrix, 2003; Suttle, 2005; Snyder & Champness, 2007; Danovaro *et al.*, 2011; Keen, 2015).

#### 1.1.1 Composición de los fagos.

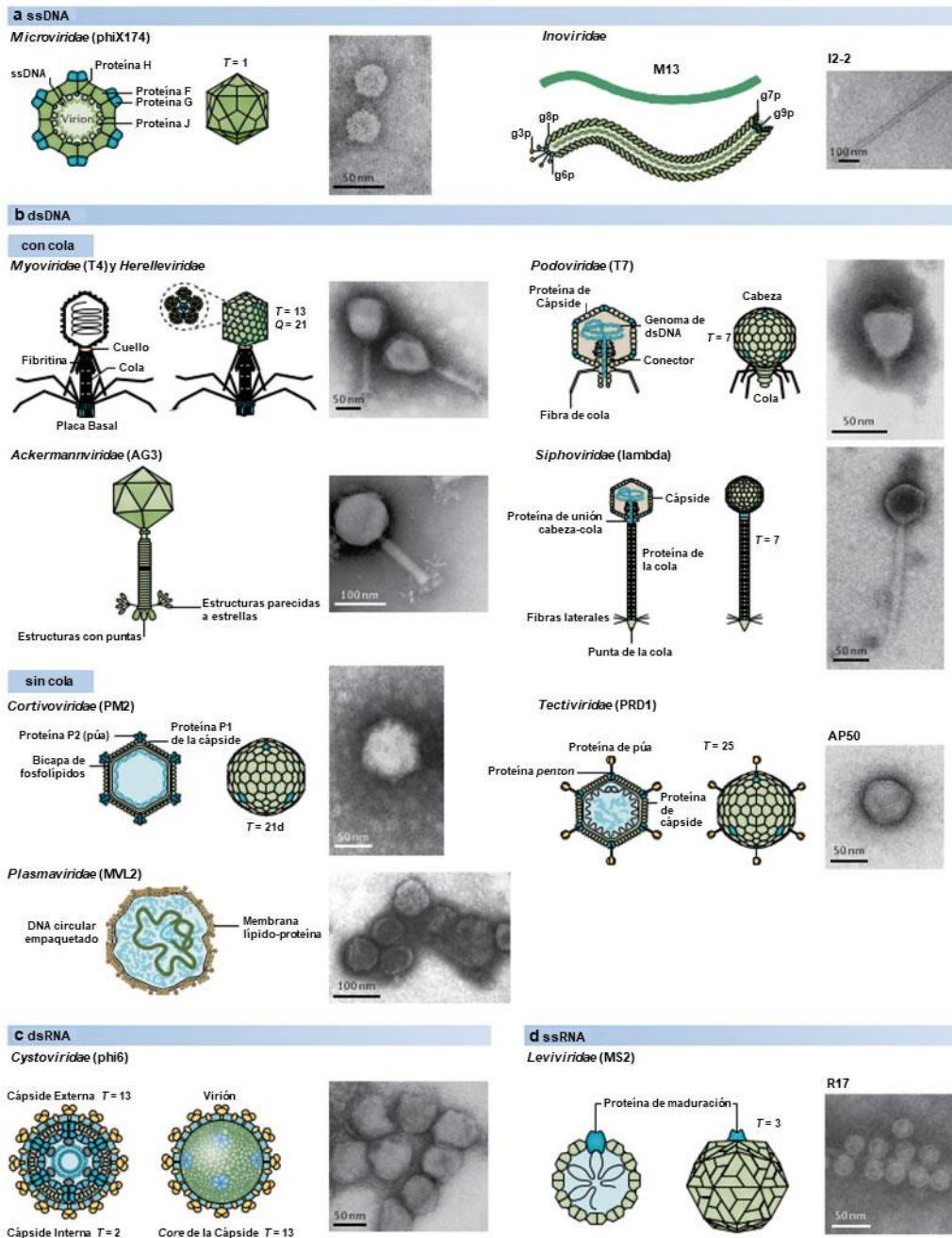
Al igual que otros virus, los fagos están constituidos por material genético, el cual pueden ser DNA o RNA, de cadena sencilla (ss) o doble (ds). Este material se encuentra protegido por una cubierta de proteínas y/o lipoproteínas. Debido a estos componentes, los fagos pueden presentar distintas morfologías que pueden ser analizadas a partir de su simetría, como en: binaria, cúbica, helicoidal y pleomórfica (Calendar, 2006).

#### 1.1.2 Clasificación de los fagos.

A partir de las características que los fagos presentan tanto en su composición como en su morfología, estos pueden ser clasificados en diferentes niveles taxonómicos: órdenes, familias, géneros y especies (Fig. 1.1). El Comité de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés) clasifica al 95% de los fagos en el orden de los *Caudovirales*, los cuales se distinguen en su morfología al presentar una cabeza icosaédrica, seguida por una *cauda* o cola que termina en una placa basal y que



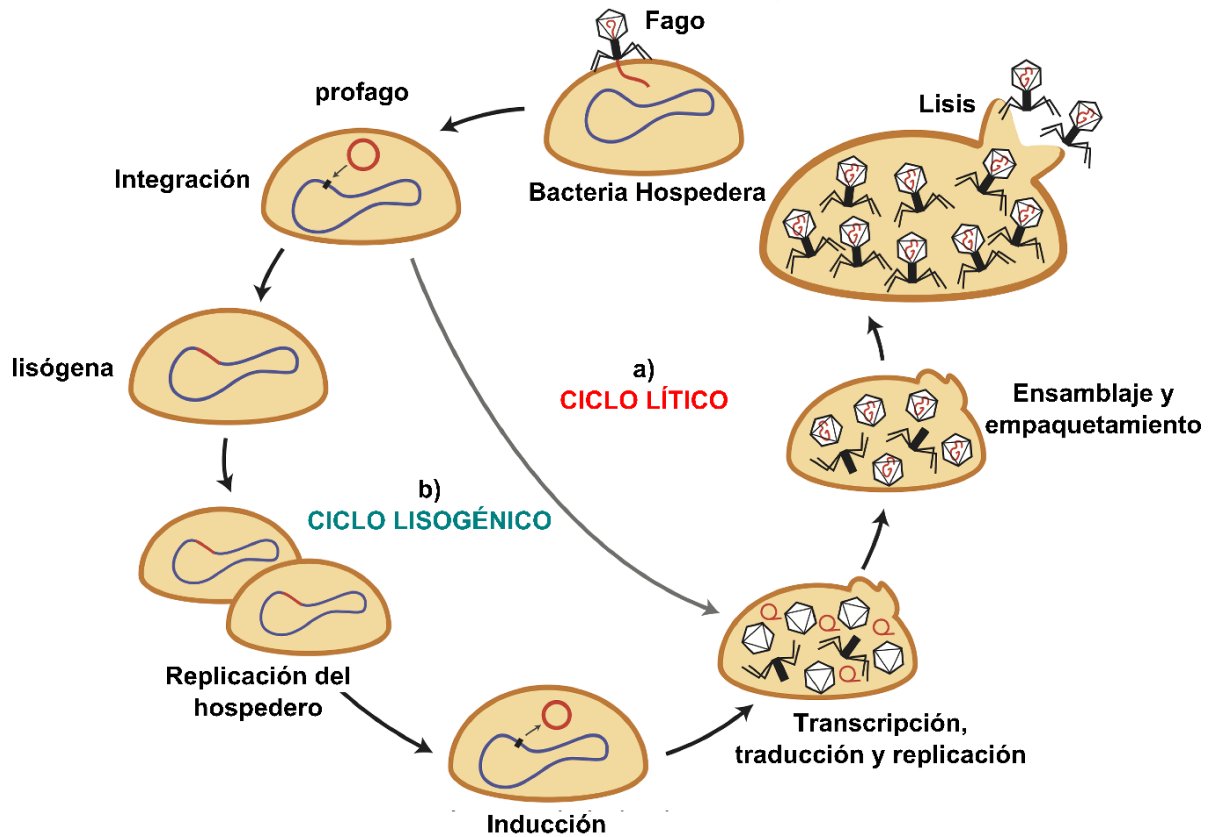
cuenta con fibras asociadas. Por las distintas características que presentan las colas de los fagos, los *Caudovirales* pueden subdividirse en tres familias: *Siphoviridae*, fagos con cola flexible (el 60% de los fagos reportados pertenecen a esta familia); *Myoviridae*, fagos con cola contráctil (25%); y *Podoviridae*, fagos con cola corta (15%) (Fig. 1.1b-con cola) (Calendar, 2006; Ackermann, 2007, sitio electrónico del ICTV, 2020).



**Figura 1.1.** Clasificación de los fagos. A partir de su material genético, los fagos pueden clasificarse en: **a) ssDNA** (DNA de cadena sencilla), **b) dsDNA** (DNA de cadena doble), **c) dsRNA** (RNA de cadena doble) y **d) ssRNA** (RNA de cadena sencilla). Asimismo, por sus características morfológicas también pueden clasificarse en distintas familias. Tomado y modificado de Dion *et al.*, 2020.

### 1.1.3 Ciclos replicativos.

En cuanto a su desarrollo, los fagos también se clasifican en dos grandes grupos conocidos como fagos *virulentos* (o líticos) y *temperados* (o lisogénicos). Los fagos virulentos se distinguen por introducir su genoma al interior de su hospedero para apoderarse de su metabolismo y maquinaria molecular. Al realizar esto, los fagos comienzan con la transcripción de sus genes en un prodecimiento altamente coordinado para asegurar la replicación de su genoma (siendo los genes tempranos y tempranos-tardíos los responsables) y, posteriormente, la síntesis de las proteínas estructurales necesarias para la formación de su progenie (donde participan los genes tardíos), denominada como *viriones*. La liberación de los viriones conlleva a la lisis o muerte del hospedero y es por ello que se le conoce como *ciclo lítico* (Fig. 1.2a). Por otro lado, los fagos temperados, además de seguir un ciclo lítico para su desarrollo, pueden seguir otro en el cual su genoma entra en un estado de latencia conocido como *profago*. Éste puede permanecer en forma episomal, o bien, integrarse al genoma del hospedero. Por su parte, a las bacterias que presentan profagos se les denomina *lisógenas*, y es en éstas donde los fagos pueden perpetuarse de forma indefinida y aportar nuevas cualidades o atributos fenotípicos que pueden favorecer a la bacteria (esto es conocido como *conversión lisogénica*) (De Smet *et al.*, 2017). A este ciclo de vida se le conoce como *ciclo lisogénico* y sólo es posible su mantenimiento cuando los profagos expresan una proteína represora. Esta proteína es la responsable de reprimir la expresión de los genes correspondientes al ciclo lítico, pero al ser inhibida, se induce la lisis del hospedero (Fig. 1.2b) (Guttman *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2008; Russell, 2010; Lewin *et al.*, 2011).



**Figura 1.2.** Ciclos replicativos de los fagos. a) Ciclo lítico. b) Ciclo lisogénico. Tomado y modificado de Chiang *et al.*, 2019.

### 1.1.3.1 Importancia de los profagos.

En algunos casos, los profagos experimentan eventos de mutación o recombinación que ocasionan su deterioro y transformación en elementos fijos en el genoma de sus hospederos (y por ello se les denomina como *profagos crípticos*). De acuerdo a los estudios del genoma de las bacterias, se ha observado que hasta un 20% del mismo corresponde a DNA de profagos (Canchaya *et al.*, 2003; Casjens, 2003; Hatfull & Hendrix, 2011). Esto se explica en que, independientemente del estado del fago (como profago o profago críptico), la bacteria obtiene beneficios por la presencia de genes adicionales. Por ejemplo, el fago  $\phi$ CTX provee a *Pseudomonas aeruginosa* de una toxina formadora de poros (a través del gen *ctx*) logrando alterar la virulencia de esta bacteria (Baltch *et al.*, 1994; Nakayama *et al.*, 1999). Un segundo ejemplo es el conjunto o *cluster* de 6 profagos derivados de F10, D3112,

D3 y Pf1 que son responsables de contribuir en la virulencia de la cepa LESB58 de *P. aeruginosa* (Winstanley *et al.*, 2009; Kung *et al.*, 2010).

Por otro lado, la resistencia a infecciones secundarias a través de diversos mecanismos de exclusión es otro rasgo conferido por los profagos a sus bacterias hospederas (Labrie *et al.*, 2010; Samson *et al.*, 2013). Uno inherente a la naturaleza de todo profago es la expresión de su proteína represora, la cual confiere inmunidad a una lisógena contra otros genomas fágicos homólogos; como se ha descrito a detalle para el fago lambda y *Escherichia coli* (Ptashne, 2004; Oppenheim *et al.*, 2005; Snyder & Champness, 2007).

## 1.2 Proceso de Infección.

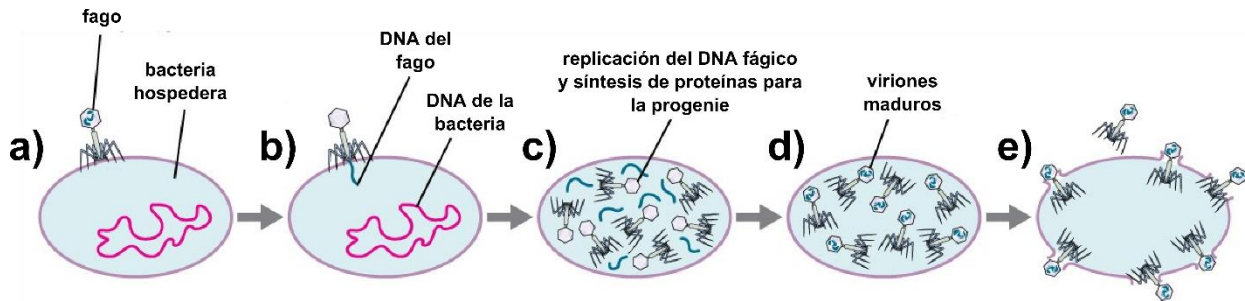
Todos los fagos, independientemente del ciclo replicativo que presenten, llevan acabo un proceso de infección definido, el cual está integrado por una serie de etapas que se realizan el mismo orden.

### 1.2.1 Etapas.

De acuerdo a Hyman & Abedon (2010), el proceso de infección esta integrado por cinco etapas claramente definidos, los cuales son:

- I) *Adsorción*, reconocimiento del fago hacia su bacteria hospedera a través de los receptores localizados en la membrana externa.
- II) *Captación o Inyección de DNA*, liberación del genoma del fago al interior del citoplasma de la bacteria.
- III) *Secuestro del hospedero*, re-direccionamiento de la maquinaria replicativa, transcripcional y traduccional de la bacteria para la replicación del genoma fágico, así como para la síntesis de todas las proteínas necesarias para la producción de la progenie del fago.

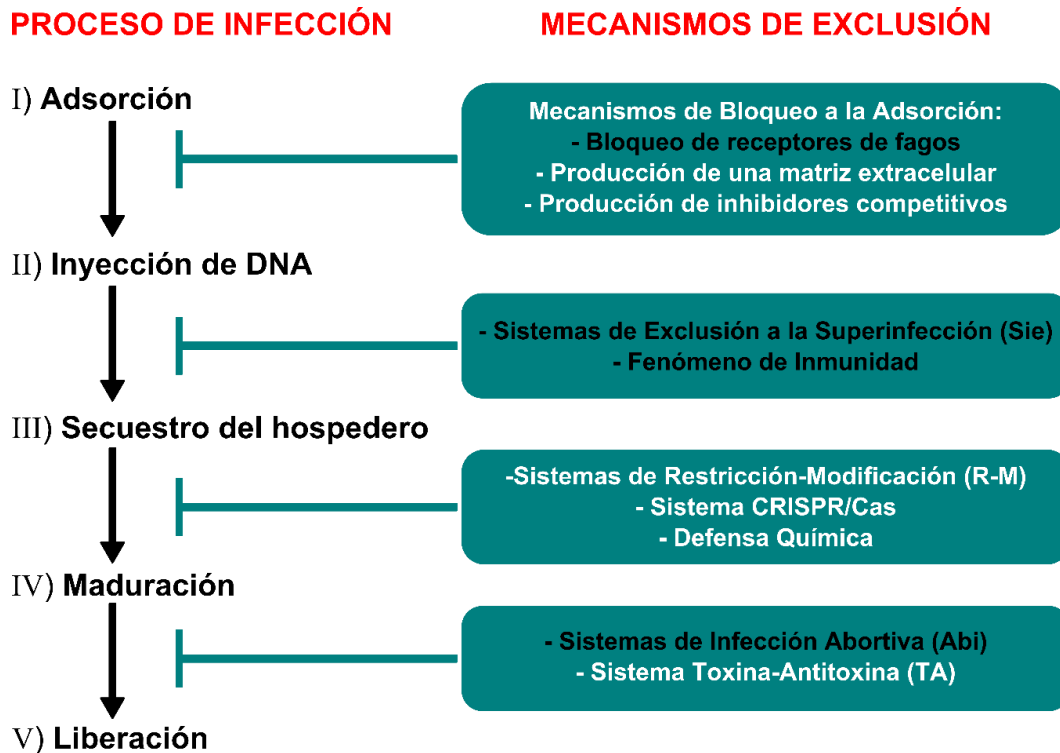
- IV) *Maduración*, empaquetamiento y formación de los nuevos viriones.
- V) *Liberación*, salida o escape de la progenie del fago a expensas de la lisis de la bacteria o por el fenómeno denominado como *extrusión*, el cual no implica la lisis del hospedero.



**Figura 1.3.** Etapas del proceso de infección de los fagos. **a)** Adsorción, **b)** Inyección de DNA, **c)** Secuestro del hospedero, **d)** Maduración, y **e)** Lisis. Tomado y modificado del sitio electrónico Lumen Learning (2020).

### 1.2.2 Mecanismos de Exclusión.

Las bacterias hacen frente a cada una de las etapas de infección del fago a partir de un conjunto de estrategias o mecanismos conocidos como de *exclusión* o de *resistencia* (Fig. 1.4).



**Figura 1.4.** Nivel de acción de los mecanismos de exclusión en el proceso de infección fago-bacteriana. Los mecanismos de exclusión presentes se han descrito en bacterias modelo y algunos de ellos (color negro) son el producto de genes procedentes de profagos. Tomado y modificado de Carballo-Ontiveros (2012).

De acuerdo a Labrie y colaboradores (2010), los mecanismos de exclusión se clasifican en:

**Mecanismos de Bloqueo a la Adsorción:** son los responsables de impedir el reconocimiento del receptor que requiere el fago para infectar a su hospedero específico. Estos se dividen en: el *bloqueo de los receptores del fago*, cuando la bacteria modifica la superficie o configuración tridimensional de las moléculas que emplean los fagos como receptores (donde algunos cambios son producidos por la acción de profagos); la *producción de la matriz extracelular*, cuando la síntesis de polímeros extracelulares genera una barrera física entre los receptores de la bacteria y los fagos; y la *producción de inhibidores competitivos*, cuando se sintetizan moléculas que reconocen específicamente a los receptores que emplean los fagos, impidiendo así la interacción fago-hospedero.

**Sistemas de Exclusión a la Superinfección (Sie,** por sus siglas en inglés): consisten en el bloqueo a la entrada de un genoma fágico al citoplasma de la bacteria mediante la síntesis de proteínas procedentes de un profago residente; el

cual confiere resistencia contra fagos específicos. Un mecanismo independiente a los Sistemas Sie es el **Fenómeno de Inmunidad**, el cual implica la síntesis de una proteína represora por parte del profago residente, que es la responsable tanto de evitar la expresión de los genes del ciclo lítico del mismo como también de fagos homólogos que intentan infectar a la misma bacteria. Es a partir de esta proteína como el profago protege a su hospedera y, así, asegura su propia existencia (Kameyama *et al.*, 2001; Ptashne, 2004).

**Sistemas de Restricción-Modificación (R-M**, por sus siglas en inglés): corresponden a mecanismos que recurren al uso de *nucleasas* para degradar ácidos nucleicos foráneos a la bacteria, ya que reconocen secuencias o grupos funcionales específicos. Estos sistemas son los responsables de la coevolución de las bacterias y sus fagos, ya que ambas partes buscan estrategias de cómo evadirse entre sí.

Actualmente se reconoce la existencia de un mecanismo adicional a los Sistemas R-M, el cual corresponde al **Sistema CRISPR/Cas**. Los CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) constituyen secuencias palindrómicas repetidas que están separadas por otras secuencias denominadas como espaciadores, que proceden de segmentos capturados de plásmidos o virus. Asociadas a estas secuencias se encuentran los genes *cas* (*CRISPR-associated*), los cuales, en conjunto, confieren resistencia contra ácidos nucleicos foráneos tanto a bacterias como arqueas (Barrangou *et al.*, 2007; Sorek *et al.*, 2008; Hyman & Abedon, 2010).

Por otro lado, Kronheim y colaboradores (2018) reportaron un novedoso mecanismo de exclusión denominado **Defensa Química**. Este mecanismo consiste en la síntesis de metabolitos secundarios pequeños por parte de la bacteria, cuya función consiste en bloquear la replicación de fagos con dsDNA. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios con acción inhibitoria son: agentes intercalantes, compuestos anti-cancerígenos (antraciclinas), alcaloides, fluorocromos y compuestos de la familia de las acridinas.

**Sistema de Infección Abortiva (Abi, por sus siglas en inglés):** implican la síntesis de proteínas que notifican a la bacteria que ha sido infectada para proceder con su muerte, de esta manera se impide la propagación de fagos a las bacterias que no han sido infectadas. Este sistema también puede ser conferido por la presencia de profagos en las bacterias (Yu & Snyder, 1994). Una variante de este mecanismo de exclusión son los *Sistemas Toxina-Antitoxina* (TA, por sus siglas en inglés), los cuales consisten en las interacciones de genes que encaminan a la bacteria hacia su muerte (toxinas, correspondientes al sistema Abi) y de otros que inhiben la acción de los primeros (antitoxinas). Este sistema también se considera como mecanismo de exclusión ya que por su comportamiento se puede contener la infección de fagos al limitar o impedir su producción (Magnuson, 2007).

### 1.3 Uso clínico de los fagos (fago terapia).

En los últimos años se ha explorado el uso de los fagos como una alternativa al tratamiento con antibióticos convencionales para hacer frente a bacterias multi-resistentes (MDR, por sus siglas en inglés), lo que se conoce como *fago terapia* (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Mandal *et al.*, 2014; Kaur, 2016). Dentro del conjunto de bacterias MDR existen seis patógenos que se distinguen por su reiterada aparición en nosocomios, así como por su virulencia. Este grupo de patógenos recibe el acrónimo de ESKAPE y está integrado por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp. (Mulani *et al.*, 2019). Entre las bacterias ESKAPE, *P. aeruginosa* genera un especial interés para emplear la fago terapia (Hagens *et al.*, 2004; Harper & Enright, 2011; Krylov, 2014; Al-Wrafy *et al.*, 2017).

#### 1.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Se trata de una bacteria Gram-negativa que se caracteriza por presentar una morfología bacilar recta o ligeramente curvada, además de contar con flagelos polares para su desplazamiento (Brock *et al.*, 2004). Ésta se clasifica dentro de las Gammaproteobacterias y actualmente se sabe que posee un genoma entre 5.5 y



7Mb (Klockgether *et al.*, 2011; Segata *et al.*, 2013; sitio electrónico NCBI, 2020). En la naturaleza puede localizarse en el suelo, en hábitats marinos-costeros e incluso en distintos hospederos que van desde plantas hasta animales, donde también se incluye al ser humano (Winsor *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Importancia nosocomial de *P. aeruginosa*.

Esta bacteria se distingue por ser capaz de infectar pacientes que han sido expuestos por largo tiempo a utensilios quirúrgicos, tales como: catéteres, sondas, prótesis, válvulas, entre otros. No obstante, es frecuentemente aislada de pacientes inmunocomprometidos (Janjua *et al.*, 2012) y con fibrosis quística, donde causa infecciones pulmonares agudas (Govan & Deretic, 1996; Valderrey *et al.*, 2010).

## II. ANTECEDENTES

## 2.1 Fagos de *Pseudomonas*.

Para el género *Pseudomonas*, se sabe que >97% de los fagos que lo infectan corresponden al orden de los *Caudovirales* y que <3% pertenecen a familias sin un orden asignado. En el caso particular de la especie *P. aeruginosa*, la mayoría de los fagos conocidos que pueden infectarla se clasifican en la familia *Siphoviridae* (~61%), seguida por las familias *Myoviridae*, *Podoviridae* y, en menor proporción, por el grupo minoritario de fagos con morfología polihédrica, filamentosa o pleomórfica (conocidos como los fagos PFP). Esta distribución asemeja las proporciones observadas para fagos que infectan a otras especies bacterianas (Ackermann, 2007; Knezevic *et al.*, 2009; Ceysens & Lavigne, 2010; Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012a; sitio electrónico del ICTV, 2020). Asimismo, con la secuencia genómica de los fagos reportados en bases de datos (como GenBank) se pueden realizar agrupaciones más precisas entre estos con base en su similitud de secuencia nucleotídica, aminoacídica, morfología microscópica y propiedades biológicas (Tabla 2.1) (Flores, 2017).

**Tabla 2.1.** Clasificación de fagos que infectan a *Pseudomonas* spp<sup>(a,b)</sup>.

Material Genético	Familia <sup>(c)</sup>	Género	Especie
dsDNA	<i>Podoviridae</i>	F116- <i>like</i>	F116
		Lit1- <i>like</i>	LIT1
		Luz7- <i>like</i>	LUZ7
		Luz24- <i>like</i>	LUZ24
		φKMV- <i>like</i>	φKMV
		T7- <i>like</i>	gh-1
		No clasificados	119X
		<i>Myoviridae</i>	El- <i>like</i>
	<i>Kpp10-like</i>		KPP10
	<i>Peduo-like</i>		φCTX
	<i>Pakpuna-like</i>		PAK_P1

		Pb1- <i>like</i>	PB1
		$\phi$ KZ- <i>like</i>	$\phi$ KZ
		No clasificados	Lu11
	<i>Siphoviridae</i>	Ab18- <i>like</i>	vB_PaeS_PA01_Ab18
		D3112- <i>like</i>	D3112
		D3- <i>like</i>	D3
		Np1- <i>like</i>	NP1
		PaMx74- <i>like</i>	PaMx74
		Septima3- <i>like</i>	73
		YuA- <i>like</i>	YuA
		No clasificados	B3
ssRNA(+)	<i>Leviviridae</i>	Levivirus	PP7
dsRNA	<i>Cystoviridae</i>	Cystovirus	phi6
ssDNA(+)	<i>Inoviridae</i>	Inovirus	pf1

a: Tomada y modificada de Ceyssens & Lavigne, 2010.

b: Tomada y modificada de Flores, 2017.

c: sitio electrónico de la base de datos del ICTV, 2020.

## 2.2 Fagos transponibles.

Otro criterio para agrupar a los fagos es a partir de su capacidad de moverse por el genoma de su hospedero, cambiando así de localización y replicando su material genético (dsDNA) por el mecanismo de transposición replicativa. A estos se les conoce como *fagos transponibles* (Toussaint, 2018), siendo el primer caso identificado y estudiado el del fago Mu (Calendar, 2006; Toussaint & Rice, 2017).

### 2.2.1 Fago Mu.

El fago Mu fue descubierto en 1963 y desde entonces se reconoce que su capacidad de integración es responsable de generar mutaciones en su hospedero, *E. coli* K12 (Taylor, 1963). El nombre de este fago surge de dicha observación y de tomar las primeras dos letras de la palabra en inglés *Mu*tator. No obstante, Mu también se distingue por la replicación de su material genético mediante el mecanismo de

transposición, conocido como *transposición replicativa* (Shapiro, 1979); y por el empaquetamiento de este material genético mediante un mecanismo conocido como *head-full* (Bukhari & Taylor, 1975). La transposición de Mu se lleva a cabo esencialmente por la actividad de las transposasas MuA y MuB. MuA es la encargada de recombinar los extremos del fago con el DNA de su hospedero, mientras MuB es responsable de seleccionar los sitios de transposición. El resultado de la actividad de MuA es la formación de estructuras entre el DNA del fago y el hospedero, las cuales sólo pueden resolverse mediante un evento de replicación. Como consecuencia de esto se generan dos copias del DNA de Mu (Shapiro, 1979; Calendar, 2006). Las copias de Mu generadas por el mecanismo de transposición replicativa son empleadas por el mecanismo *headful* en la formación de la nueva progenie del fago. Esto sucede cuando una copia de Mu es cortada en su extremo izquierdo (aproximadamente 100-200 bp del sitio *pac*) y se encapsula en la cápside de un nuevo virión hasta ocupar todo el espacio interior posible para, finalmente, ser cortada en su extremo derecho. Como resultado de esto, el genoma de Mu puede quedar unido a secuencias cortas de DNA de su hospedero a ambos extremos (Daniell *et al.*, 1973, 1975; Hsu & Davidson, 1974; Bukhari *et al.*, 1976; Morgan *et al.*, 2002; Harshey, 2014). Mediante estudios de genómica comparativa se han identificado fagos que infectan a otras especies bacterianas y que comparten rasgos con el fago Mu. A estos se les conoce como fagos *Mu-like* y su sello distintivo es el mecanismo de transposición replicativa (Morgan *et al.*, 2002; Summer *et al.*, 2004; Fogg *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Fagos *Mu-like* en *Pseudomonas*.

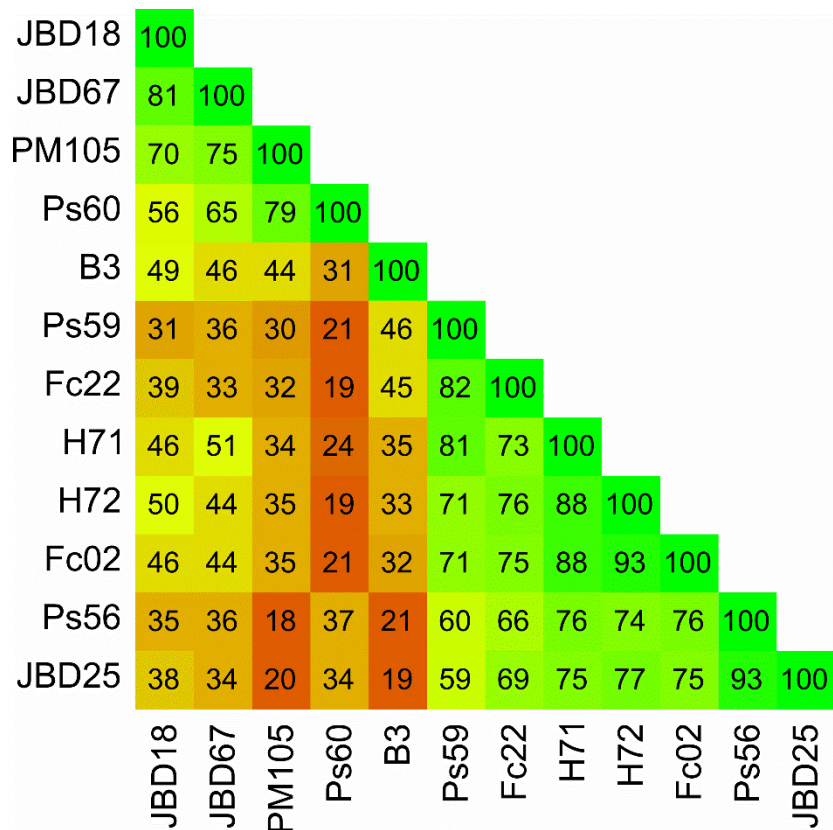
Krylov y colaboradores (1980b) aislaron varios fagos transponibles de *P. aeruginosa*, entre los cuales los fagos D3112-*like* (Krylov *et al.*, 1980b, Salmon *et al.*, 2000) y B3-*like* (Akhverdian *et al.*, 1984, 1985) constituyen los dos grupos principales. No obstante, el grupo D3112-*like* ha sido el más estudiado con su fago representante: el propio D3112. Dicho fago se distingue por presentar una estructura genómica y un ciclo de vida parecido al fago Mu (Rehmat & Shapiro, 1983; Autexier & DuBow, 1992; Salmon *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2002), aunque

la estructura de su virión, particularmente su cola, presenta parecido con el fago lambda (Bidnenko *et al.*, 2000). En estudios más recientes se ha logrado conocer su secuencia genómica completa (37,611bp) (Wang *et al.*, 2004), junto a la de otros miembros de grupo, para identificar por genómica comparativa que marcos de lectura abierta (ORFs, por sus siglas en inglés) son conservados (ORFs *core*) y cuales son variables (ORFs accesorios) entre ellos. A esto se le conoce como el pangenoma del grupo D3112-*like* (Cazares *et al.*, 2014).

### 2.2.3 Fagos B3-*like*.

Es un grupo de fagos transponibles en *P. aeruginosa* en el cual su representante o arquetipo es el fago B3. Este fago fue aislado de una cepa australiana (Holloway 1955, 1960) y está relacionado con los fagos B39, D3112 y con el propio Mu (Krylov *et al.*, 1980a, 1980b, 1985; Akhverdian *et al.*, 1985). Mediante un estudio de genómica comparativa, se reveló que el genoma de B3 (38,439 bp) se replica por transposición replicativa al igual que Mu. Sin embargo, B3 se distingue del Mu y otros fagos Mu-*like* por la presencia de reordenamientos genéticos en su genoma (Braid *et al.*, 2004). Asimismo, B3 codifica para otro tipo de transposasas, las cuales se encuentran relacionadas con el transposón Tn552 de *Staphylococcus aureus* (Rowland & Dyke, 1990). No obstante, estos fagos no han sido reportados en la literatura como un grupo formal.

Desde 2016, Cázares realizó análisis de genómica comparativa con los cinco fagos B3-*like* reportados en la base de datos del GenBank: B3 (Braid *et al.*, 2004), JBD18, JBD25, JBD67 (Cady *et al.*, 2012) y PM106 (Pourcel *et al.*, 2016); y observó que estos sólo presentan homología con siete ejemplares de la colección de fagos temperados del Laboratorio 3 y 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular (DGBM) del CINVESTAV, Zacatenco. Estos ejemplares son los fagos: Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H72. En la Figura 2.1 se puede observar el porcentaje de identidad, a nivel nucleotídico, cuando se comparan los doce fagos B3-*like* uno contra uno.



**Figura. 2.1.** Identidad de nucleótidos entre los doce fagos B3-like. El porcentaje de identidad entre pares de secuencias se calculó como el número de coincidencias dividido por la longitud de la secuencia más corta. Los números fueron codificados por colores usando un gradiente de rojo (menos identidad) a verde (más identidad).

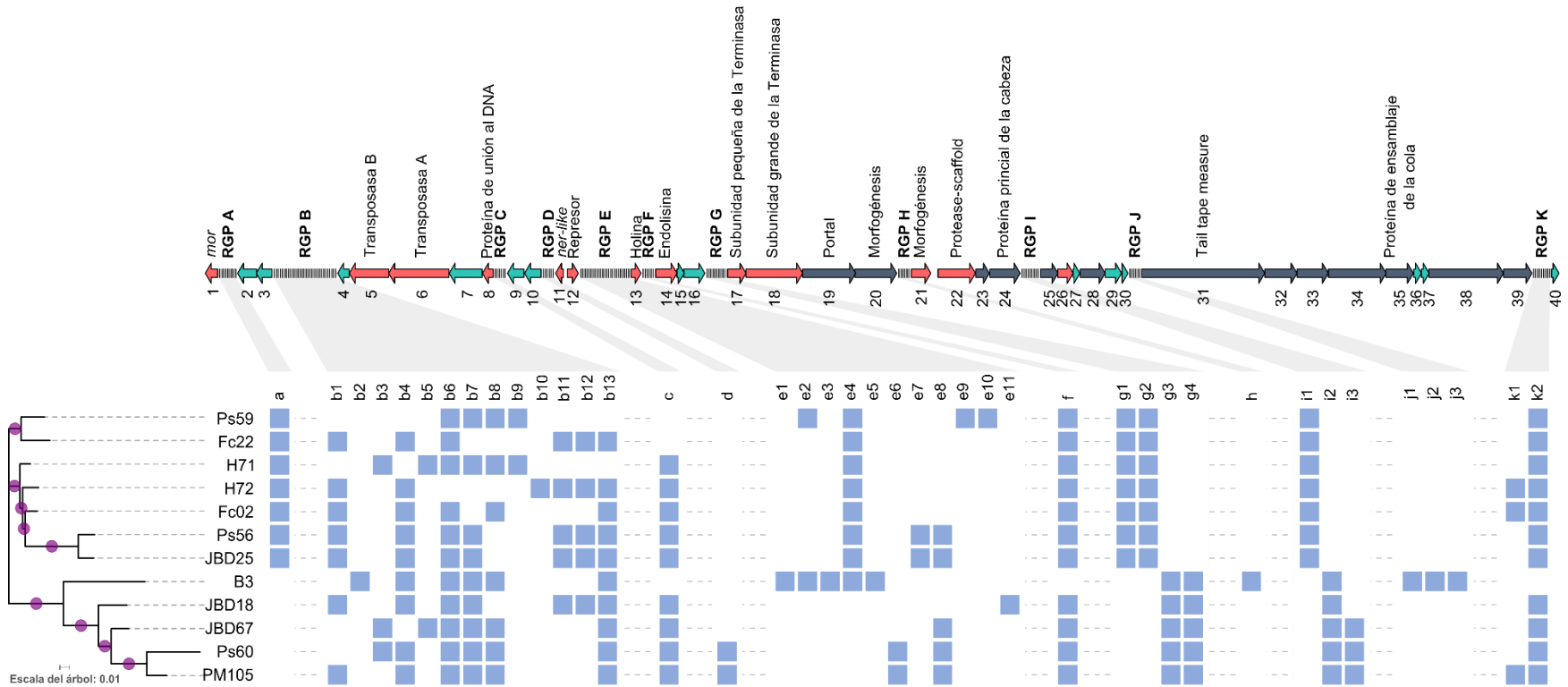
### 2.2.3.1 Pangenoma B3-like.

El estudio de genómica comparativa permite a su vez identificar los ORFs que se encuentran conservados entre todos los genomas integrantes de un grupo (denominados como *core*) y también de aquellos cuya presencia y frecuencia es variable (denominados como accesorios). El conjunto de ORFs *core* y accesorio es conocido como *pangenoma* y ha sido descrito tanto para grupos de bacterias (Tettelin *et al.*, 2005, Medini *et al.*, 2005) como de fagos, incluidos aquellos que infectan a *P. aeruginosa* (Cazares *et al.*, 2014). Para el caso de los fagos B3-like su pangenoma también ha sido descrito (Cazares, 2016).

En la Figura 2.2 se puede observar el conjunto de ORFs *core*, representados con flechas de colores y en los cuales se especifica si poseen alguna función asignada.

Por otro lado, se observan los ORFs accesorios, localizados en once posiciones denominadas como Regiones de Plasticidad Genómica (RGP, por sus siglas en inglés). Estas regiones se nombraron de la letra *A* a la *K*, y en su parte inferior se especifica cuáles y cuántos ORFs accesorios albergan cada una de ellas. A su vez, los ORFs accesorios fueron nombrados con una letra, alusiva a la RGP que pertenecen, y a un número arábigo para su identificación. Algunas RGPs contienen arreglos complejos de ORFs accesorios a lo largo de los doce genomas *B3-like*, como la *B* y la *E*; mientras que otras RGPs son determinadas por la presencia/ausencia de un solo ORF, como la *A* y la *C*. Asimismo, un análisis filogenómico a los doce *B3-like* reveló que se trata de un grupo diverso, en el que existen al menos dos grupos principales: 1) *B3/PM105* y 2) *Ps59/JBD25* (Fig. 2.2, árbol al costado izquierdo). Estas dos agrupaciones pueden ser apreciadas mediante la presencia/ausencia de algunos ORFs accesorios, como es el caso de las RGPs *G* e *I*.

El criterio de pangenoma permite integrar y clasificar la información que se tiene de los ORFs de un grupo de genomas, como lo es el caso de los doce fagos *B3-like*. Sin embargo, existen conjuntos de genes de los cuales se desconoce su función. En los genomas de fagos de *Pseudomonas*, alrededor del 20 al 25% de los ORFs no están caracterizados y no muestran similitud detectable con otras secuencias reportadas en bases de datos (Ha & Denver, 2018). Aunque no es claro si estos ORFs están relacionados con procesos bacterianos o virales no esenciales, representan una fuente amplia y diversa de información genética. Es probable que entre éstas se encuentren genes relacionados con el fenotipo de exclusión a fagos superinfectantes.



**Figura 2.2.** Pangenoma de los fagos B3-like. El mapa superior corresponde a los ORF compartidos (*core*) entre todos los doce fagos, los cuales están numerados del 1 al 40 y codificados el siguiente sistema de colores: ORF con función asignada (rojo), ORF sin función asignada (verde) y morfogénesis del virión y ORFs estructurales (gris). En la parte superior del mapa están las funciones asignadas por homología a las proteínas de fagos conocidos. Por otro lado, los ORFs que están presentes en sólo algunos miembros del grupo (*accesorio*) se indican en sus RGP correspondientes. En la matriz inferior al mapa se indican con cuadros azules los ORFs accesorios para cada fago. Estos se designan con letras en minúscula (*a - k*) de acuerdo con la RGP (*A - K*) a la que pertenecen. Los genomas de los fagos se ordenaron de acuerdo a un árbol filogenético, el cual refleja su relación genómica (lado izquierdo). Los puntos morados corresponden a valores de *bootstrap* (soporte) de 100.



### 2.3 Mecanismos de exclusión por profagos en *P. aeruginosa*.

Uno de los atributos fenotípicos que pueden conferir los profagos, producto de la conversión lisogénica, es la resistencia a infecciones secundarias por fagos mediante diversos mecanismos de exclusión (ver 1.2.2 *Mecanismos de Exclusión, INTRODUCCIÓN*). Sin embargo, los estudios que abordan este tema para los profagos de *P. aeruginosa* son pocos y hasta el momento sólo han descrito la existencia de dos mecanismos, que son:

- 1) El Bloqueo de receptores.** Para este mecanismo se ha observado que algunos profagos son capaces de alterar los receptores que emplean fagos infectantes heterólogos para impedir así su infección. Los casos estudiados son: los fagos D3 y JBD30 que alteran la estructura del antígeno-O (Holloway & Cooper, 1962; Kuzio & Kropinski, 1983; Newton *et al.*, 2001; Tsao *et al.*, 2018), el fago 2 que modifica tanto polisacáridos como lipopolisacáridos (Castillo & Bartell, 1974), los fagos JBD26 y JBD44 que comprometen la expresión del flagelo bacteriano (Tsao *et al.*, 2018), y los fagos D3112, JBD24, JBD26, JBD30 y JBD44 que afectan la expresión del pili tipo IV (Chung *et al.*, 2014; Tsao *et al.*, 2018).
- 2) El Fenómeno de Inmunidad.** Este mecanismo, inherente a todo profago, consiste en la expresión de su proteína represora, la cual confiere inmunidad a las lisógenas contra fagos homólogos. Los casos reportados son para fagos D3112-*like* (Akhverdian *et al.*, 1984; Salmon *et al.*, 2000; Heo *et al.*, 2007) y el fago D3 (Farinha *et al.*, 1994, 1997).

Cabe señalar que de los trabajos realizados en profagos de *P. aeruginosa* no se ha abordado el estudio de mecanismos de exclusión en fagos B3-*like*, siendo el presente trabajo el primero en realizarlo.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La identificación de genes novedosos vinculados al fenómeno de exclusión en fagos de *P. aeruginosa* permitirá revelar la existencia de uno o varios mecanismos que impiden la infección de fagos superinfectantes. Esto contribuiría al conocimiento de los genes de los cuales se desconoce su función, como también sobre la interacción fago-hospedero en procesos considerados como no esenciales para la viabilidad del fago.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Si se desconoce la función de un porcentaje considerable de los genes de los fagos, entonces es posible la existencia de genes relacionados específicamente con la exclusión y que sean novedosos en su secuencia o mecanismo de acción.

## V. OBJETIVOS

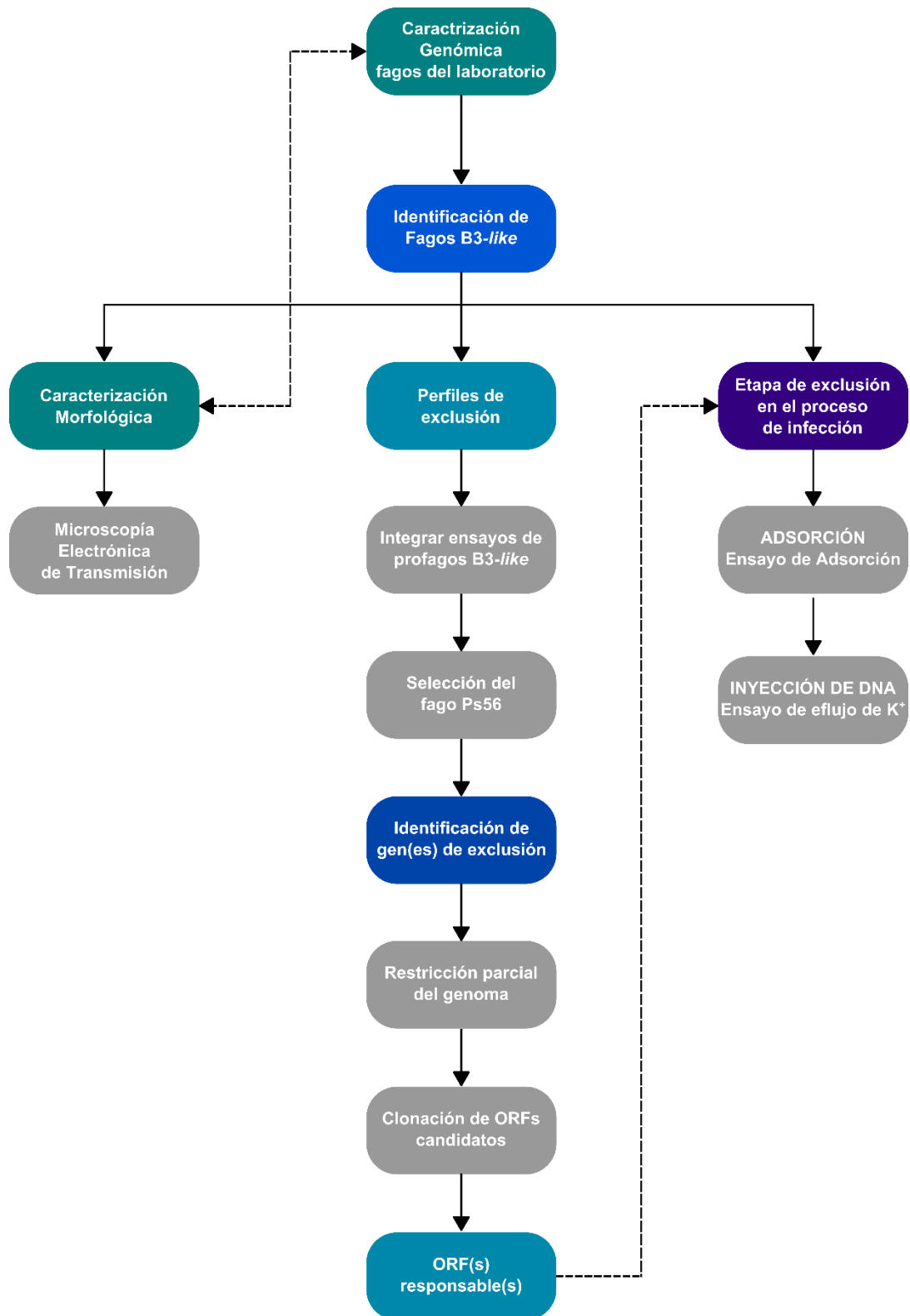
### 5.1 Objetivo General.

- Identificar el o los genes en el profago Ps56 que estén relacionados con la exclusión a fagos superinfectantes de *P. aeruginosa*.

### 5.2 Objetivos Particulares.

1. Concluir la caracterización morfológica de los siete fagos B3-*like* del laboratorio.
2. Integrar ensayos de infección de profagos B3-*like* [en Ps33] contra fagos superinfectantes temperados y virulentos.
3. Identificar el/los gen(es) responsables del fenotipo de exclusión en el profago Ps56 a través de la restricción parcial de su genoma y su clonación en un plásmido de expresión.
4. Determinar en qué etapa del proceso de infección tiene lugar el fenómeno de exclusión observado para el/los gen(es) identificado(s) del profago Ps56.

## VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Cepas bacterianas de *P. aeruginosa*.

La cepa Ps33 corresponde a un aislado clínico procedente del Instituto Nacional de Pediatría (Castañeda-Montes *et al.*, 2018), mientras que la cepa PAO1 procede de una muestra solicitada a la colección de bacterias de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM (Sepúlveda-Robles, 2007, 2012a, b; Carballo-Ontiveros 2012). Ambas cepas forman parte de la colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa* del Laboratorio 3 del DGBM, CINVESTAV (Carballo-Ontiveros, 2012).

#### 7.1.1 Almacenamiento de cepas.

El almacenamiento de las cepas Ps33 y PAO1 se realizó en condiciones de esterilidad tanto en *stabs* como en criotubos. Los *stabs* corresponden a viales de vidrio con 3 mL de agar suave (Stab Agar) (ver A.1 *Preparación de Medios, ANEXOS*), los cuales se mantuvieron completamente cerrados y a temperatura ambiente (25°C) para evitar la deshidratación del agar (Maniatis *et al.*, 1982). Los criotubos (Corning®, número de catálogo 430659) corresponden a viales estériles de plástico en los que se colocaron 0.6 mL de cultivo de la cepa de interés con 0.4 mL glicerol al 50%. Estos se almacenaron en un ultracongelador a -70°C (ver A.2 *Equipos, ANEXOS*) (LaBauve & Wargo, 2012).

### 7.2 Fagos de *P. aeruginosa*.

A partir de la colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa* del Laboratorio 3 del DGBM, CINVESTAV; se aislaron 78 fagos temperados (Carballo-Ontiveros, 2012). Entre los cuales se emplearon a los fagos Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H72 para construir lisógenas (ver 7.9 *Construcción de lisógenas, MATERIALES Y MÉTODOS*). En la Tabla 7.1 se especifica el origen de aislamiento de los fagos temperados utilizados y su respectiva cepa de propagación.

**Tabla 7.1.** Origen de aislamiento de los siete fagos temperados de *P. aeruginosa*.

Fago	Tamaño de genoma (bp)	Cepa de aislamiento	Hospital <sup>(a)</sup>	Tipo de muestra	Cepa de propagación
Fc02	38,122	Fc11	Instituto	Pulmón	PAO1
Fc22	38,255	Fc1	Nacional de Pediatría	(Fibrosis quística)	
Ps56	39,816	Ps19	Instituto	Hemocultivo	
Ps59	39,020	Ps34	Nacional de		Ps33 <sup>(a, b)</sup>
Ps60	39,676	Ps42	Pediatría		
H71	38,223	H7	Hospital	Infecciones	
H72	38,579	H11	Infantil de México	(varias)	

a: Castañeda-Montes *et al.*, 2018.

b: Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012.

Adicionalmente, se obtuvo una muestra del fago temperado JBD18, el cual fue proporcionado por el Dr. Alan R. Davidson de la Universidad de Toronto, Canadá (de la Cruz, 2016); y del cual también se construyó su lisógena con la cepa Ps33 (ver 7.9 *Construcción de lisógenas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**).

Para la realización de algunos experimentos, se utilizaron 32 fagos de la colección de temperados que infectan exclusivamente a la cepa Ps33, así como de 16 fagos virulentos que infectan a esta misma cepa y que proceden de una colección generada a partir de muestras de aguas residuales y ambientales tomadas de distintos puntos de la República Mexicana (Sepúlveda-Robles, 2007, 2012a, b). En la Tabla 7.2 se especifican los ejemplares utilizados que proceden de las colecciones mencionadas.

**Tabla 7.2.** Fagos temperados y virulentos que infectan a la cepa Ps33 de *P. aeruginosa*.

<b>Colección</b>	<b>Ejemplares</b>	<b>Total de Fagos</b>
<b>Temperados<sup>(a)</sup></b>	Fc22, Fc23, Fc24, Fc25, Fc26, Fc27, Fc28, Fc29, Fc30, Fc31, Fc32, Fc33, Fc34, Ps54, Ps55, Ps56, Ps57, Ps58, Ps59, Ps60, Ps61, Ps62, H70, H71, H72, H73, H74, H75, H76, H77, H78, JBD18	32
<b>Virulentos<sup>(a,b)</sup></b>	PaMx46, PaMx47, PaMx48, PaMx49, PaMx50, PaMx51, PaMx52, PaMx53, PaMx54, PaMx55, PaMx56, PaMx57, PaMx58, PaMx59, PaMx60, PaMx61	16

a: Carballo-Ontiveros, 2012.

b: Sepúlveda-Robles, 2007, 2012a, b.

### 7.3 Tapices bacterianos.

A partir de un cultivo líquido de la cepa hospedera de interés, en medio LB e incubado *overnight* (O/N) a 37°C en agitación continua (180 rpm) (ver A.2 Equipos, **ANEXOS**), se tomaron 300 µL y se mezclaron con 3 mL de medio Tϕ previamente derretido (ver A.1 Preparación de Medios, **ANEXOS**). La mezcla se homogenizó con vórtex (ver A.2 Equipos, **ANEXOS**) y se vertió sobre una caja Petri con medio LB o Tϕ, cubriendo la superficie de la caja evitando generar burbujas. La mezcla, ahora tapiz, se enfrió y solidificó en un intervalo de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) previo a su uso.

### 7.4 Generación de *stocks* de fagos.

Los *stocks* de los fagos de interés se realizaron tomando una gota (10 µL) del *stock* original de la colección y depositando la gota sobre el tapiz de la cepa hospedera correspondiente. Se dejó secar la gota y se procedió a incubar el tapiz durante 12-16 h a 37°C (ver A.2 Equipos, **ANEXOS**). A partir del conjunto de placas de lisis (*spot de lisis*) se tomó muestra del centro con un palillo estéril y ésta fue estriada, en línea recta, sobre una caja Petri con medio Tϕ. Posteriormente, se vertió un nuevo tapiz de la cepa correspondiente al fago y se incubó en las condiciones previamente mencionadas. De las placas aisladas generadas, se tomó muestra del



centro de una con un palillo estéril y se repitió el procedimiento de generación de placas hasta realizar tres pasajes. Del último pasaje se recolectaron 30 placas con ayuda de una pipeta Pasteur y se depositaron en un tubo Eppendorf® estéril con 1 mL de medio SM (ver A.1 *Preparación de Medios*, **ANEXOS**). El tubo se centrifugó a ~9,000 X g durante 10 minutos a 4°C (ver A.2 *Equipos*, **ANEXOS**) para recuperar el sobrenadante, depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf® estéril y tratarlo con 3 gotas (*perlas*) de Cloroformo. Se realizó una segunda ronda de centrifugación, con las condiciones previamente mencionadas, para recuperar el sobrenadante y depositarlo en un nuevo tubo Eppendorf® estéril. El tubo generado corresponde a un nuevo *stock* de fago (con un título de ~10<sup>9</sup> UFP/mL), el cual fue guardado en frío (4°C) para su posterior uso.

#### 7.4.1 Titulación de fagos.

El número de fagos o unidades formadoras de placa (UFP) de los *stocks* generados se determinó al realizar diluciones seriadas. Este procedimiento consistió en tomar 10 µL del fago de interés y mezclarlos con 990 µL de medio SM, agitando brevemente con vórtex. De esta primera dilución se tomaron 10 µL y se mezclaron con otro volumen de 990 µL de medio SM. Este procedimiento se repitió hasta realizar cuatro diluciones: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-8</sup>. De cada dilución se gotearon 5 µL sobre un tapiz de la cepa hospedera correspondiente al fago en una caja Petri con medio Tφ y se procedió con la incubación de la caja por 12-16 h a 37°C. Posteriormente, se realizó el conteo de las placas aisladas identificadas en la menor dilución para hacer el cálculo de UFP por mililitro mediante la siguiente fórmula (Douglas, 1975).

$$\frac{\# \text{ placas}}{\text{volumen goteado}} \times \text{inverso de la dilución} = \text{UFP/mL}$$

(en mL)

#### 7.4.2 Disminución del título.

Mediante el siguiente cálculo se disminuyó el título de los *stocks* de cada fago (Carballo-Ontiveros, 2012).

$$\begin{array}{rcl} \text{Título del } \textit{stock} \text{ conocido} & \text{-----} & 1000 \mu\text{L} \\ & & (\text{UFP/mL}) \\ \text{Título deseado (UFP/mL)} & \text{-----} & X \mu\text{L} \end{array}$$

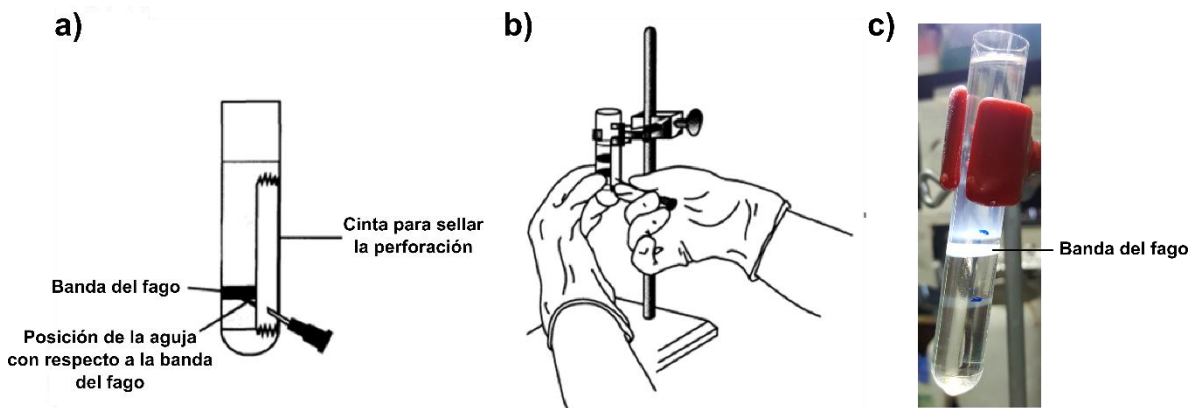
Donde  $X$  corresponde a los microlitros ( $\mu\text{L}$ ) que se deben tomar del *stock* con el título conocido para diluirse hasta 1 mL en medio SM.

#### 7.5 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de CsCl.

Este procedimiento comenzó con el raspado de cinco cajas Petri de medio LB con la mezcla de tapiz bacteriano (300  $\mu\text{L}$ ), medio T $\phi$  derretido (3 mL) y el fago de interés (75  $\mu\text{L}$ ). Tanto el tapiz como el fago se recuperaron vertiendo 5 mL de medio LB en cada caja y, posteriormente, concentrándolos en un tubo de 50 mL (Axygen<sup>®</sup> Scientific, número de producto SCT-50ML-R-S). El raspado se centrifugó a  $\sim 9,000 \times g$  durante 10 minutos a 4°C y se recuperó sólo el sobrenadante ( $\sim 25$  mL), el cual contiene fagos con un título mínimo de  $1 \times 10^{10}$  UFP/mL. A este volumen se le adicionó DNAsa y RNAsa a una concentración de [1  $\mu\text{g/mL}$ ] y se dejó en incubación por 30 minutos a 37°C. Después de dicho tiempo, se adicionó 4 g de Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) y 2 g de NaCl, los cuales se mezclaron hasta disolverse. La mezcla generada se depositó en hielo y se guardó en frío (4°C) O/N para favorecer la precipitación de los fagos. Posteriormente, se centrifugó la mezcla a  $\sim 9,000 \times g$  durante 20 minutos y desechó el sobrenadante para conservar la pastilla generada. Ésta se resuspendió con 1 mL de medio SM y se dividió para su almacenamiento en dos tubos Eppendorf<sup>®</sup> estériles. Para eliminar el PEG-8000 remanente en los volúmenes obtenidos se adicionó Cloroformo (500  $\mu\text{L}$ ) a cada tubo Eppendorf<sup>®</sup> y estos se centrifugaron a  $\sim 9,000 \times g$  durante 10 minutos. De las fases generadas por dicho proceso sólo se recuperó la fase acuosa (superior), ya que es en ésta

donde se concentran los fagos. El volumen obtenido se depositó en un nuevo tubo Eppendorf® estéril y se almacenó en frío (4°C) (Maniatis *et al.*, 1982).

Una vez limpios los fagos, estos se sometieron a un gradiente discontinuo de CsCl. Para ello se depositaron soluciones de CsCl con densidades de 1.08, 1.31, 1.51 y 1.72 (ver A.3 *Preparación de Soluciones, Buffers y Geles*, **ANEXOS**) en un tubo Beckman Ultra-Clear™ (número de catálogo 344060). El orden de adición en los tubos es de mayor a menor densidad, colocando 3.5 mL para la mayor y 2.5 mL para el resto de las soluciones. Por último, se colocó el fago de interés (2 mL) mezclado con la solución de CsCl con densidad de 1.08. El gradiente preparado se centrifugó a ~61,000 X g durante 2:30 h a 4°C haciendo uso de un rotor SW 40 Ti Beckman, sin freno (ver A.2 *Equipos*, **ANEXOS**). El resultado de este proceso fue la concentración del fago en una banda blanca en la zona correspondiente a la densidad de 1.51. Ésta se succionó mediante la perforación del tubo con una aguja hipodérmica 20G (Fig.7.1). El volumen recuperado de la banda se depositó en un nuevo tubo Eppendorf® estéril y se almacenó en frío (4°C) (Maniatis *et al.*, 1982).



**Figura 7.1.** Obtención de fagos concentrados por gradientes discontinuos de CsCl. **a)** Posición de la aguja hipodérmica para obtener la banda correspondiente al fago concentrado. **b)** Representación del procedimiento para perforar el tubo con los gradientes discontinuos de CsCl. **c)** Fotografía de la purificación del fago Ps56. La banda correspondiente al fago se localiza en la solución con densidad de 1.51. Las bandas adicionales corresponden a residuos en la muestra procesada (Esquemas tomados y modificados de Sambrook & Russell, 2001).

### 7.5.1 Diálisis de los fagos.

Las muestras obtenidas de fagos concentrados fueron procesadas para eliminar los remanentes de CsCl. Para esto se dializaron las muestras haciendo uso de tubos de membrana Spectra/Pro<sup>®</sup> con porosidad de 6-8,000kD (número de artículo 132645), en las que se depositaron y retuvieron las muestras de los fagos. El sistema muestra-membrana se sumergió en buffer de diálisis (en proporción 1:1000) (ver *A.3 Preparación de Soluciones, Buffers y Geles*, **ANEXOS**) y se realizó el cambio de éste cada hora. Después de alcanzar tres cambios del buffer, se procedió a recuperar la muestra purificada, la cual se depositó en un nuevo tubo Eppendorf<sup>®</sup> estéril y se almacenó en frío (4°C) para su uso en experimentos posteriores.

#### 7.6 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

De los fagos previamente purificados por CsCl y dializados (ver *7.5 Purificación de fagos por gradientes discontinuos de CsCl* y *7.5.1 Diálisis de los fagos*, **MATERIALES Y MÉTODOS**), se tomó de cada uno una alícuota de 10  $\mu$ L y se colocó sobre una rejilla de cobre (Electron Microscopy Sciences, número de catálogo G200H-Cu), previamente cubierta con Formvar al 0.3% (Polyscience Inc., número de catálogo 0631) y carbón. Se dejó reposar la muestra por 3 minutos y después se retiró el exceso de líquido con papel filtro. Posteriormente, la muestra de fago se tiñó negativamente con 10  $\mu$ L de acetato de uranilo al 2% (Ackermann & Haldal, 2010) y se retiró el exceso de líquido inmediatamente con papel filtro. El proceso de tinción negativa se repitió por otras dos rondas, dejando reposar el acetato de uranilo al 0.3% en un intervalo de 30 segundos y después de 2 minutos. Al final de cada intervalo, el exceso de líquido se retiró con papel filtro.

Las muestras teñidas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEM-1400 (JEOL) a un voltaje de 80 Kv. Cada muestra se observó y digitalizó a un aumento de 50X, 150X y 200X. A partir de las imágenes obtenidas se midió el diámetro de las cápsides y la longitud de las colas de los fagos con el software ImageJ (v1.47). Las mediciones y sus desviaciones estándar se obtuvieron al medir diez ejemplares de cada fago.

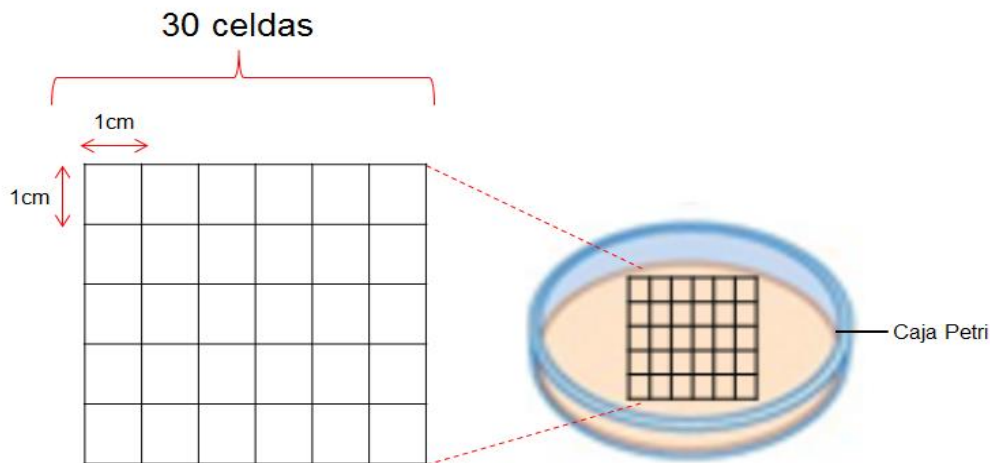
## 7.7 Construcción de lisógenas.

Para construir lisógenas se goteó 5  $\mu$ L del fago temperado de interés sobre el tapiz de su cepa de propagación, previamente colocado sobre una caja Petri con medio LB. Se dejó secar la gota y se incubó la caja a 12-16 h a 37°C. Del *spot de lisis* generado se tomó muestra de su centro con un palillo estéril y la muestra se estrió en una nueva caja Petri con LB, la cual se dejó incubar en las condiciones previamente mencionadas. La muestra, ahora candidata a lisógena, se volvió a estriar hasta realizar tres pasajes. Posteriormente, se tomó una colonia del tercer pasaje para preparar un O/N en medio LB a 37°C en agitación continua (180 rpm). A partir de este cultivo se realizaron dos pruebas para probar si las candidatas corresponden a lisógenas verdaderas. La primera prueba (*inmunidad*) consistió en tomar 300  $\mu$ L del cultivo O/N para preparar un tapiz bacteriano con éste. Encima del tapiz se goteó 10  $\mu$ L del fago del que se espera tener su lisógena. La gota se dejó secar y después se incubó en las condiciones previamente mencionadas. Posterior a su incubación, se observó la ausencia de un *spot de lisis*, lo cual reveló que la candidata fue capaz de excluir al mismo fago. Por otro lado, la segunda prueba (*inducción espontánea*) consistió en centrifugar el cultivo O/N a  $\sim 9,000 \times g$  durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante. De éste se tomaron y gotearon 5  $\mu$ L sobre un tapiz de la cepa de propagación del fago de interés. Después de su incubación en las condiciones previamente mencionadas, se observó sobre el tapiz la presencia de un *spot de lisis*, lo cual confirmó que la candidata pudo liberar fagos. Sólo las candidatas que fueron exitosas en ambas pruebas se consideraron como lisógenas verdaderas y se almacenaron en criotubos (ver 7.1.1 *Almacenamiento de cepas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para su uso en ensayos posteriores.

## 7.8 Ensayos de infección.

Estos ensayos consistieron en la preparación de tapices de las lisógenas construidas y el goteo de 5  $\mu$ L de los *stocks* de fagos temperados y virulentos (con un título de  $\sim 10^6$  UFP/mL) que se mencionan en la Tabla 7.2. Las gotas de cada

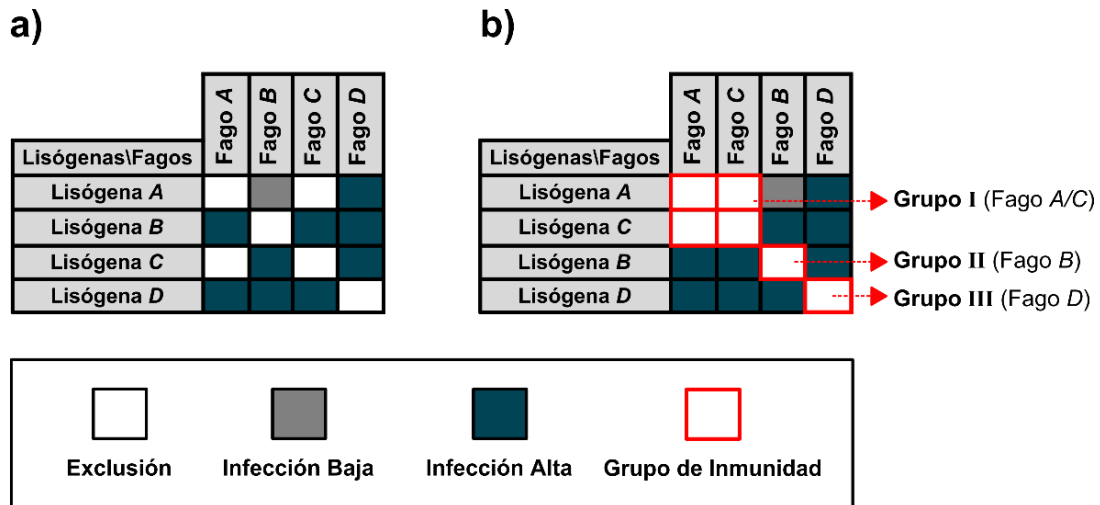
fago se colocaron siguiendo una cuadrícula guía para optimizar el uso de la superficie del tapiz (Fig. 7.2). Después de su incubación por 12-16 h a 37°C, se registró la presencia o ausencia de placas aisladas en sitio de goteo para clasificar cada evento en una de tres categorías: Exclusión ( $<10^{-4}$ ), Infección Baja ( $10^{-4}$ – $10^2$ ) e Infección Alta ( $>10^2$ ). Los umbrales de cada categoría se establecieron de acuerdo a la frecuencia del número más alto y más bajo de placas detectadas en todo el ensayo. Dichos números se dividieron entre el volumen goteado sobre el tapiz (5  $\mu$ L) y entre el título del *stock* empleado ( $\sim 10^6$  UFP/mL). Todos los ensayos de infección se realizaron por triplicado.



**Figura 7.2.** Dimensiones de la cuadrícula guía empleada para gotear fagos (Tomado de Carballo-Ontiveros, 2012).

### 7.9 Grupos de inmunidad.

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de infección previamente mencionados, se agruparon los casos de exclusión para identificar eventos de reciprocidad entre los fagos y sus respectivas lisógenas (exclusión de infección cruzada) (Fig. 7.3). Los fagos que cumplieron este criterio se consideraron como un grupo de inmunidad único.



**Figura 7.3.** Ejemplo del criterio de reciprocidad para identificar grupos de inmunidad. **a)** Resultados obtenidos y registrados de un ensayo de infección donde se emplean a los Fagos A, B, C y D contra sus respectivas lisógenas. **b)** Reordenamiento de los casos de exclusión agrupando a los fagos con el mismo comportamiento. Este agrupamiento permite identificar tres grupos de inmunidad: I) integrado por los Fagos A y C, II) Integrado sólo por el Fago B, y III) Integrado sólo por el Fago D (Tomado y modificado de Carballo-Ontiveros, 2012).

## 7.10 Estrategia para la búsqueda de genes de exclusión.

### 7.10.1 Determinación de fragmentos del genoma de Ps56.

Para identificar a los ORFs responsables del fenotipo de exclusión de fagos superinfectantes virulentos, se realizó una simulación *in silico* de la restricción del genoma de Ps56 con las enzimas *Bsp*HI y *Eco*RI en el software NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>). Esto permitió conocer el número de fragmentos que se podrían generar, además de cuáles ORFs cada uno abarcaría. Los fragmentos fueron clasificados con letras (A→H) y con un número arábigo. Este número permite identificar las versiones cortas de algunos fragmentos.

### 7.10.2 Extracción del DNA de Ps56.

A partir de la muestra de Ps56 previamente purificadas por CsCl y dializada (ver 7.5 *Purificación de fagos por gradientes discontinuos de CsCl* y 7.5.1 *Diálisis de los fagos*, **MATERIALES Y MÉTODOS**), se extrajo su DNA mediante la técnica modificada de Fenol-Cloroformo y su precipitación con etanol absoluto (Sepúlveda-Robles, 2012b). Esta técnica consistió en agregar a la muestra purificada de Ps56

un volumen equivalente de Fenol-Cloroformo (1:1). Esta mezcla se agitó en vórtex y se centrifugó a ~9,000 X g durante 10 minutos a 4°C para eliminar las proteínas del fago, las cuales quedaron entre dos fases: una acuosa (superior) y otra orgánica (inferior). La fase acuosa fue recuperada cuidadosamente para repetir el tratamiento con Fenol-Cloroformo hasta un total de tres rondas. Posteriormente, a la fase acuosa se le adicionó un volumen equivalente de Cloroformo para después agitarse en vórtex y centrifugarse a ~9,000 X g durante 10 minutos a 4°C para eliminar remanentes de proteínas y de fenol. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y a ésta se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío. La mezcla se agitó por inversión suave para precipitar el DNA de Ps56 y, posteriormente, se centrifugó a ~9,000 X g durante 10 minutos a 4°C. Con cuidado se decantó el sobrenadante para retener el *pellet* de DNA, el cual posteriormente se lavó por dos rondas con 1 mL de etanol al 70% (entre cada ronda, el DNA se centrifugó a ~9,000 X g durante 5 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante). El *pellet* de DNA se secó en un Concentrador SpeedVac® (ver A.2 Equipos, **ANEXOS**) a alta temperatura hasta observar su cambio de tonalidad blanca por una translúcida. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en agua estéril y se almacenó a -20°C.

#### 7.10.3 Cuantificación de DNA.

El DNA de Ps56 (como el de plásmidos, clonaciones y amplificaciones de PCR) se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop™ (ver A.2 Equipos, **ANEXOS**), tomando en cuenta la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  en un rango de 1.6 – 2.0 como aceptable. Se realizó la lectura de una muestra por triplicado para obtener un promedio de su cantidad.

#### 7.10.4 Restricción del DNA de Ps56.

Una vez identificados los fragmentos esperados del genoma de Ps56 y purificado su DNA, se procedió a realizar la siguiente reacción de restricción:

**DNA de Ps56**            X (2 µg)<sup>a</sup>



<b><i>Bsp</i>HI</b>	1 $\mu$ L
<b><i>Eco</i>RI</b>	1 $\mu$ L
<b>Buffer Universal [10x]</b>	2 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	X $\mu$ L
<hr/>	
<b>Volumen Final</b>	20 $\mu$ L

a: Para concentrar la cantidad de DNA de interés en volúmenes pequeños se debe colocar la muestra en un equipo Concentrador SpeedVac® a temperatura alta. El tiempo en que se deja la muestra dependerá del volumen al que se quiera reducir.

Debido a la actividad estrella que puede presentar *Eco*RI (es decir, la generación de cortes inespecíficos de la enzima debido a condiciones de reacción que difieren de las óptimas), primero se procedió con la digestión de *Bsp*HI a 37°C durante toda la noche en un incubador Eppendorf® (ver A.2 Equipos, ANEXOS) y después se adicionó *Eco*RI para que actuara sólo durante 1 h a 37°C.

#### 7.10.5 Restricción del plásmido pHERD30T.

Para clonar los fragmentos de interés del fago Ps56 se seleccionó al plásmido de expresión pHERD30T, debido a que puede replicarse tanto en *E. coli* como *P. aeruginosa* (es decir, es un *shuttle vector*), porta un marcador de resistencia a gentamicina y puede inducirse con arabinosa (Qiu *et al.*, 2008). La reacción de restricción de pHERD30T se realizó con la siguiente manera:

<b>DNA de pHERD30T</b>	X (2 $\mu$ g) <sup>a</sup>
<b><i>Nco</i>I</b>	1 $\mu$ L
<b><i>Eco</i>RI</b>	1 $\mu$ L
<b>Buffer Universal [10x]</b>	2 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	X $\mu$ L
<hr/>	
<b>Volumen Final</b>	20 $\mu$ L

a: Para concentrar la cantidad de DNA de interés en volúmenes pequeños se debe colocar la muestra en un equipo Concentrador SpeedVac® a temperatura alta. El tiempo en que se deja la muestra dependerá del volumen al que se quiera reducir.

Al igual que en la restricción del genoma de Ps56 (ver 7.10.4 *Restricción del DNA de Ps56, MATERIALES Y MÉTODOS*), en la reacción de restricción de pHERD30T se adicionó primero la enzima *NcoI* y se incubó a 37°C durante toda la noche en un incubador Eppendorf®. Posteriormente, se añadió la enzima *EcoRI* para dejarla actuar durante 1 h debido a su actividad estrella.

#### 7.10.6 Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas.

Para separar, visualizar y purificar muestras de DNA (como restricciones o productos de PCR), se realizaron electroforesis con geles de agarosa al 1% (ver A.3 *Preparación de Soluciones, Buffers y Geles, ANEXOS*). Las muestras de DNA se hicieron correr en dichos geles a 80 V durante 1 h 30 minutos (ver A.2 *Equipos, ANEXOS*) y después se tiñeron con bromuro de etidio por 40 minutos. Los geles se observaron en un transiluminador de luz UV (ver A.2 *Equipos, ANEXOS*) para recortar y purificar las bandas de interés con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

#### 7.10.7 Reacciones de ligación [clonación].

La clonación de fragmentos u ORFs (ahora denominados insertos) en plásmidos depende en primera instancia en que ambos elementos hayan sido restringidos con las enzimas pertinentes. Posterior a la purificación de los elementos, se realiza la reacción de ligación. Para esto se tiene que tener en cuenta la relación inserto:plásmido, siendo empleada en este trabajo la de 3:1. El cálculo para obtener esta relación se realiza con los siguientes pasos:

1) Obtener el factor de tamaño entre el plásmido y el inserto.

$$\frac{\text{tamaño del plásmido (nts)}}{\text{tamaño del inserto (nts)}} = \text{factor de tamaño}$$

2) Obtener la cantidad de inserto necesario con respecto a una cantidad base de plásmido (por ejemplo: 100 ng).


$$\frac{100 \text{ ng base de plásmido}}{\text{factor de tamaño}} = \text{ng de inserto calculado}$$

La cantidad de inserto calculado corresponde a una relación (1:1) con respecto a la cantidad base de plásmido utilizada. Es decir:

$$(100 \text{ ng base de plásmido} : \text{ng de inserto calculado}) = (1:1)$$

3) Finalmente, multiplicar la cantidad del inserto calculado por la proporción deseada. Para las reacciones de ligación empleadas en este trabajo se hizo por tres (X3).

Una vez obtenidas las cantidades del inserto y del plásmido en la proporción deseada, se realiza siguiente reacción de ligación:

<b>DNA del inserto</b>	X µL (ng calculado) <sup>a</sup>	
<b>DNA del plásmido</b>	X µL (100 ng) <sup>a</sup>	
<b>Ligasa</b>	1 µL	
<b>Buffer Universal [10x]</b>	1 µL	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8 µL	
<b>Volumen Final</b>	10 µL	

**a:** Los volúmenes correspondientes a la cantidad de inserto y plásmido que se quieren utilizar se mezclan y concentran en un equipo Concentrador SpeedVac<sup>®</sup> a temperatura alta hasta retirar todo el líquido posible. Después de esto se adicionan 8 µL de H<sub>2</sub>O, 1 µL de Buffer Universal y, por último, 1 µL de ligasa para asegurar que el volumen final de la reacción sea de 10 µL. **NOTA:** En volúmenes pequeños se favorece la interacción y reconocimiento entre las moléculas del inserto y el plásmido.

La reacción de ligación se deja en incubación a 16°C durante 16 h, en un incubador Eppendorf<sup>®</sup>, para favorecer la interacción entre los sitios de corte complementarios entre el inserto y el plásmido. Después de su incubación, la reacción se almacenó en frío (4°C) para su posterior uso.

#### 7.10.8 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*.

Para confirmar la obtención de ligaciones o clonaciones, las reacciones almacenadas deben ser transformadas en bacterias. Este procedimiento se realiza en primera instancia en *E. coli* debido a la facilidad de manipulación que ofrece con respecto a *P. aeruginosa*. Por lo tanto, las células de *E. coli*, cepa DH5 $\alpha$ , se prepararon de acuerdo al método de Green & Rogers (2013). Brevemente, este método consistió en hacer una dilución 1:100 en medio LB de un cultivo O/N de *E. coli*. La dilución se incubó en agitación continua (180 rpm) a 37°C, aproximadamente por 2:30 h, hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> de 0.5 - 0.6. Posteriormente, la muestra se incubó 5 minutos en hielo y se centrifugó a ~2,000 X g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el *pellet* se resuspendió en 33 mL de solución Tfb I (ver A.3 Preparación de Soluciones, Buffers y Geles, **ANEXOS**). Nuevamente, el *pellet* se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó a ~2,000 X g durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el *pellet* se resuspendió en 4 mL de solución Tfb II (ver A.3 Preparación de Soluciones, Buffers y Geles, **ANEXOS**). Del *pellet* resuspendido se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L, las cuales se depositaron en tubos Eppendorf® y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido (ver A.5 Detalles Técnicos, **ANEXOS**). Las alícuotas se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

#### 7.10.9 Transformación química en *E. coli*.

Preparadas las alícuotas quimiocompetentes de *E. coli* (100  $\mu$ L) y las reacciones de ligación de interés (10  $\mu$ L), se realizó la mezcla de ambas y se dejó incubar en hielo durante 30 minutos. Después se realizó el choque térmico de la mezcla a 42°C durante 5 minutos en un incubador Eppendorf® y se incubó la mezcla nuevamente en hielo durante 3 minutos. Posteriormente, a la mezcla se le añadió 1 mL de medio LB precalentado y se dejó en incubación con agitación a 37°C durante 1 h para favorecer la recuperación de las células. Finalmente, las células se centrifugaron a ~18,000 X g durante 1 minuto y el *pellet* recuperado se resuspendió en ~200  $\mu$ L de medio LB. El volumen con células resuspendidas se plaqueó en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente. Para el caso de reacciones de ligación con

el plásmido pHERD30T (Qiu *et al.*, 2008), el antibiótico de selección es gentamicina y la concentración utilizada para *E. coli* es de 15 µg/mL.

#### 7.10.10 Extracción de clonas en *E. coli*.

La extracción de clonas (o cualquier otro plásmido) en *E. coli*, se realizó con el kit comercial *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* (PP-204S, Jena Bioscience). Para recuperar una cantidad suficiente de plásmido se preparó un cultivo O/N de 10 mL con la *E. coli* transformada con la clona de interés. Asimismo, en el paso final del kit de extracción, se utilizó H<sub>2</sub>O estéril precalentada para eluir la clona. Por último, la clona se almacenó a -20°C para su posterior uso.

#### 7.10.11 Secuenciación de las clonas.

Una vez purificadas las clonas, se procedió a conocer el estado de su secuencia. Es decir, que el inserto clonado se encontrara en la orientación correcta y sin mutaciones. Para realizar la secuenciación de las clonas hechas en pHERD30T se utilizó una pareja de *primers* que flaquean el sitio de clonación de este plásmido. En la Tabla 7.3 se especifica la información de estos *primers*.

**Tabla 7.3.** Primers para secuenciar clonas en pHERD30Ta.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5' → 3')</b>	<b>Coordenadas en pHERD30T<sup>b</sup></b>
<b>pHERD#T_MCS_Fwd</b>	ctactgttctccataccg	3045..3026
<b>pHERD#T_Rev_preMCS</b>	tgcaaggcgattaagttggg	2830..2849

a: Aunque los *primers* fueron diseñados con la secuencia de pHERD30T, estos también pueden ser utilizados con otras versiones del plásmido pHERDT. De ahí su nombre con el símbolo "#".

b: Estas coordenadas pueden utilizarse en el software Artemis.

Con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific, número de catálogo 4337455), la clona de interés purificada y los *primers* previamente mencionados; se realizó la siguiente reacción de secuenciación:

**Clona**

X µL (1 µg)

<b>Primer Fwd o Rev</b>	0.5 $\mu$ L
<b>BigDye™ Terminator v3.1</b>	1 $\mu$ L
<b>Sequencing Buffer [5X]</b>	2 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	X $\mu$ L
<hr/>	
<b>Volumen Final</b>	10 $\mu$ L

La reacción se colocó en un termociclador Bio-Rad® (ver A.2 Equipos y A.5 Detalles Técnicos, ANEXOS) y se utilizó el siguiente programa:

<b>Desnaturalización inicial</b>	96°C	5 min	
<b>Desnaturalización</b>	96°C	30 s	X30 ciclos
<b>Alineamiento</b>	57°C	20 s	
<b>Extensión</b>	60°C	2 min	
<b>Extensión final</b>	60°C	7 min	
	4°C	$\infty$	

Concluida la reacción de secuenciación, ésta se centrifugó a ~18,000 X g durante 1 minuto y se transfirió a un tubo Eppendorf®. Al tubo se le añadió 5  $\mu$ L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) [125mM] a pH de 8.0 y 60  $\mu$ L de etanol absoluto. La reacción se mezcló brevemente con vórtex y se centrifugó nuevamente a ~18,000 X g durante 1 minuto. Se dejó reposar la reacción 30 minutos a temperatura ambiente y, después, se centrifugó a ~18,000 X g durante 20 minutos. Del tubo se retiró el sobrenadante con ayuda de una micropipeta hasta eliminar todo el líquido posible. Posteriormente, el *pellet* se lavó con 250  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugó a ~18,000 X g durante 5 minutos. Este paso se repitió para lavar nuevamente el *pellet*, antes de retirar todo el líquido presente y dejarlo secar por 5 minutos en un Concentrador SpeedVac® a temperatura media. Finalmente, el *pellet* se envió a la Unidad de Ácidos Nucleicos (DGBM, CINVESTAV-Zacatenco) para su secuenciación.

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

A partir del método de Choi *et al.* (2006) se prepararon células electrocompetentes de la cepa Ps33 de *P. aeruginosa* para su transformación con las clonas de interés. Este método consistió en preparar 6 mL de cultivo O/N de la cepa Ps33 en medio LB a 37°C y en agitación continua (180 rpm). El cultivo se centrifugó a ~9,000 X g durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante. El *pellet* recuperado se lavó con 1 mL de solución de sacarosa [300mM] y se centrifugó en las condiciones previamente mencionadas. Este procedimiento se repitió hasta realizar 3 rondas de lavado. Por último, el *pellet* se resuspendió en 500 µL de solución de sacarosa [300mM] y se prepararon alícuotas de 100 µL. Las alícuotas se almacenaron a -70°C para su posterior uso.

#### 7.10.13 Electroporación en *P. aeruginosa*.


Se utilizaron las alícuotas de Ps33 almacenadas a -70°C y se les añadió la clona de interés (de 20 a 1000 ng, según la cantidad disponible) para ser transformadas. La mezcla se dejó incubar por 20 minutos en hielo y, después, se transfirió a una celda de 0.2 cm de Bio-Rad® (número de catálogo 1652086) para someterla a una descarga en un electroporador Bio-Rad® a 2.2 kV, 25 µF y 200 Ω (Choi *et al.*, 2006) (ver A.2 Equipos y A.5 Detalles Técnicos, **ANEXOS**). Posterior a la descarga, se añadió 1 mL de medio LB precalentado a la mezcla y ésta se pasó a un tubo Eppendorf® para recuperar las células en agitación a 37°C durante 2 h (Cadoret *et al.*, 2014). Finalmente, las células se centrifugaron a ~18,000 X g durante 1 minuto y el *pellet* recuperado se resuspendió en ~200 µL de medio LB. El volumen con células resuspendidas se plaqueó en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente. Para el caso de reacciones de ligación con el plásmido pHERD30T, el antibiótico de selección es gentamicina y la concentración utilizada para *P. aeruginosa* es de 50 µg/mL. Las células que fueron transformadas exitosamente se almacenaron en criotubos (ver 7.1.1 Almacenamiento de cepas, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para su posterior uso.

#### 7.10.14 Procesamiento del fragmento B.2 con *NcoI* y *SalI*.

Para realizar combinaciones de los ORFs que abarca el fragmento B.2 (ver Fig. 7.5), se hizo un análisis *in silico* de su secuencia con el software NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para determinar qué enzimas hacen un solo corte en su interior y en la secuencia del gen *lacZ $\alpha$*  del plásmido pHERD30T. Las enzimas *Nco*I y *Sa*I cumplieron este criterio y se utilizaron de forma independiente para restringir la clonación del fragmento B.2 en pHERD30T a partir de siguiente reacción:

<b>pHERD30T/B.2</b>	X (1 $\mu$ g)
<b><i>Nco</i>I o <i>Sa</i>I</b>	1 $\mu$ L
<b>Buffer Universal [10x]</b>	2 $\mu$ L
<b>H<sub>2</sub>O</b>	X $\mu$ L
<b>Volumen Final</b>	20 $\mu$ L

La restricción se realizó a 37°C durante toda la noche en un incubador Eppendorf® y al día siguiente se corrió en un gel de agarosa al 1% (ver 7.10.6 *Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para recuperar las bandas más grandes, las cuales consistieron en el plásmido pHERD30T todavía ligado al fragmento B.2. Para circularizar nuevamente la clona, se realizó la siguiente reacción de ligación:

<b>pHERD30T/B.2 restringido</b>	X $\mu$ L (ng recuperados) <sup>a</sup>	
<b>Ligasa</b>	1 $\mu$ L	
<b>Buffer Universal [10x]</b>	1 $\mu$ L	
<b>H<sub>2</sub>O</b>	8 $\mu$ L	
<b>Volumen Final</b>	10 $\mu$ L	

**a:** El volumen de la clona pHERD30T/B.2 restringido con *Nco*I o *Sa*I se concentró en un equipo Concentrador SpeedVac® a temperatura alta hasta retirar todo el líquido posible. Después de esto se adicionan 8  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L de Buffer Universal y, por último, 1  $\mu$ L de ligasa para asegurar que el volumen final de la reacción sea de 10  $\mu$ L.



La reacción de ligación se deja en incubación a 16°C durante 16 h, en un incubador Eppendorf®, para favorecer la interacción entre los sitios de corte del plásmido. Después de su incubación, la reacción se almacenó en frío (4°C) para su posterior uso.

#### 7.10.15 Amplificación del fragmento B.2Δ*SaI*(inv) y de los ORFs 9 y 10.

Para evaluar los ORFs presentes en el fragmento B.2Δ*SaI* (ver Fig. 7.5), se realizó la amplificación del fragmento B.2Δ*SaI* en sentido inverso, así como de los ORFs 9 y 10. Los *primers* diseñados para la amplificación de estas secuencias se presentan en la Tabla 7.4.

**Tabla 7.4.** *Primers* para amplificar ORFs del fragmento B.2Δ*SaI*.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia (5'→3')<sup>a</sup></b>	<b>Enzima de restricción usada</b>	<b>Amplificación (bp)</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
<b>B.2Δ<i>SaI</i>(inv) (F)</b>	atgacagcaccatggtca	<i>NcoI</i>	1081	<b>54°C</b>
<b>B.2Δ<i>SaI</i>(inv) (R)</b>	cccaagctttaggaacccccgcatgaac	<i>HindIII</i>		
<b>ORF_10 (F)</b>	catgtcatgatgctcgcactcaaccg	<i>BspHI</i>	510	
<b>ORF_10 (R)</b>	cccaagcttctatccccgatcacctgg	<i>HindIII</i>		
<b>ORF_9 (F)</b>	catgccatggtgatcggggatagtcac	<i>NcoI</i>	648	
<b>ORF_9 (R)</b>	cccaagcttctactcatcgtagccac	<i>HindIII</i>		

a: Los codones de inicio y paro de los ORFs se indican con negritas, mientras que los sitios de restricción incorporados a las secuencias están subrayados.

Con los *primers* previamente mostrados y tomando como DNA molde el genoma de Ps56, se realizó la siguiente reacción de amplificación:

<b>DNA de Ps56</b>	X μL (100 ng)
<b>Primer Fwd</b>	0.2 μL
<b>Primer Rev</b>	0.2 μL
<b>dNTPs</b>	0.4 μL
<b>Polimerasa High Fidelity<sup>a</sup></b>	0.2 μL
<b>Buffer High Fidelity [10X]<sup>a</sup></b>	2 μL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	X μL

---

**Volumen Final**20  $\mu$ L

a: Marca Jena Bioscience (PCR-204S).

La reacción se colocó en un termociclador Bio-Rad® y se utilizó el siguiente programa:

<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 min	
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 s	X35 ciclos
<b>Alineamiento</b>	<b>54°C</b>	30 s	
<b>Extensión</b>	72°C	<b>X</b>	
<b>Extensión final</b>	72°C	5 min	
	4°C	$\infty$	

X: El tiempo de extensión se calculó considerando la relación: 1,000 bp = 1 min.

Concluida la reacción, ésta se hizo correr en un gel de agarosa al 1% (ver 7.10.6 *Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para observar y recuperar la banda correspondiente al amplicón esperado.

Los amplicones de interés se restringieron con las enzimas indicadas en la Tabla 7.4 y siguiendo las pautas de una doble restricción como se realizó con el DNA de Ps56 (ver 7.10.4 *Restricción del DNA de Ps56*, **MATERIALES Y MÉTODOS**; y A.5 *Detalles Técnicos*, **ANEXOS**). Posteriormente, se realizó la clonación de estos en el plásmido pHERD30T, el cual fue previamente restringido con las mismas enzimas que los amplicones (ver 7.10.5 *Restricción del plásmido pHERD30T* y 7.10.7 *Reacciones de ligación [clonación]*, **MATERIALES Y MÉTODOS**).

#### 7.10.16 Construcción del plásmido pSEVA55\*.

Para la evaluación concertada de los ORFs 9 y 10 en el fenotipo de exclusión, se optó por construir un plásmido que fuera compatible con el plásmido pHERD30T. La construcción del nuevo plásmido consistió de la unión de dos módulos procedentes de pSEVA658 y pSEVA541 (Silva-Rocha *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2015). Del plásmido pSEVA658 se utilizó el origen de replicación RSF1010 (Guerry *et al.*, 1974), el cual fue liberado con las enzimas *AscI* y *FseI*, siguiendo las

pautas de una doble restricción como se realizó con el DNA de Ps56 (ver 7.10.4 *Restricción del DNA de Ps56*, **MATERIALES Y MÉTODOS**). Por otro lado, del plásmido pSEVA541 se amplificó el gen de resistencia a tetraciclina que porta. En la Tabla 7.5 se muestran los *primers* diseñados para esta amplificación. Asimismo, se siguieron los mismos parámetros empleados para la amplificación de los ORFs 9 y 10 (ver 7.10.15 *Amplificación del fragmento B.2ΔSalI(inv)* y de los ORFs 9 y 10, **MATERIALES Y MÉTODOS**).

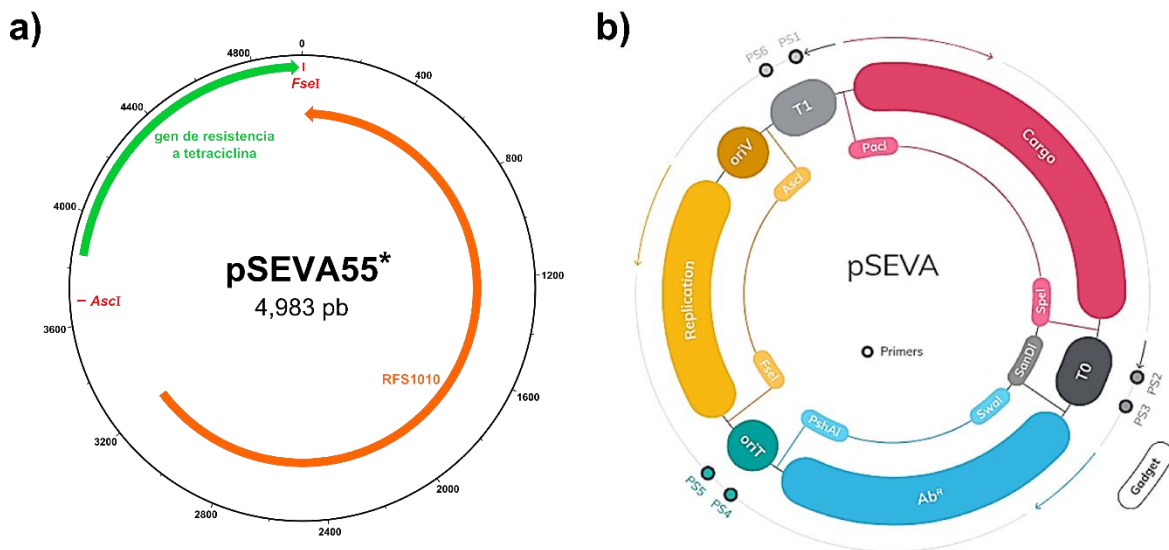
**Tabla 7.5.** *Primers* para la construcción del plásmido pSEVA55\*.

<i>Primers</i>	Secuencia (5'→3') <sup>a</sup>	Enzima de restricción usada	Amplícón (bp)	Tm
Tetracycline-pSEVA541 (F)	ttg <u>g</u> ccg <u>g</u> ccatttaaatttgacagctt	<i>AscI</i>	1305	51°C
Tetracycline-pSEVA541 (R)	ttg <u>g</u> ccg <u>g</u> ccgacaattgtctcaggtcg	<i>FseI</i>		

a: Los sitios de restricción incorporados a las secuencias están subrayados.

Concluida la reacción, ésta se hizo correr en un gel de agarosa al 1% (ver 7.10.6 *Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para observar y recuperar la banda correspondiente al amplicón esperado. Posteriormente, el amplicón de interés se restringió con las enzimas *AscI* y *FseI*, siguiendo las pautas de una doble restricción como se realizó con el DNA de Ps56 (ver 7.10.4 *Restricción del DNA de Ps56*, **MATERIALES Y MÉTODOS**; y A.5 *Detalles Técnicos*, **ANEXOS**). Finalmente, se realizó la unión de los módulos de pSEVA658 y pSEVA541 mediante una reacción de ligación (ver 7.10.7 *Reacciones de ligación [clonación]*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) y ésta fue transformada en células quimiocompetentes de *E. coli* para confirmar su obtención (ver 7.10.9 *Transformación química en E. coli*, **MATERIALES Y MÉTODOS**). El antibiótico de selección utilizado fue la tetraciclina a una concentración de 12 µg/mL para el caso de *E. coli*.

El plásmido obtenido fue nombrado como pSEVA55\* (Fig. 7.4a) (ver A.6 *Secuencia del plásmido pSEVA55\**, **ANEXOS**). Esto se hizo siguiendo la nomenclatura establecida para los plásmidos pSEVA (Silva-Rocha *et al.*, 2013; Martínez-García *et al.*, 2015), la cual implica el uso de tres dígitos que corresponden a los siguientes módulos: I) el gen de resistencia a un antibiótico, II) el origen de replicación del plásmido, y III) el módulo de carga que se utiliza (por ejemplo: un Sitio de Clonación Múltiple o el gen para una proteína de fluorescencia) (Fig. 7.4b). En el caso de pSEVA55\* (Fig. 7.4a) se utilizó el símbolo (\*) para indicar que carece de un módulo de carga.



**Figura 7.4.** Plásmido compatible con pHERD30T. **a)** Mapa del plásmido pSEVA55\*. El origen de replicación RFS1010 procede de pSEVA658 (naranja) y el gen de resistencia a tetraciclina procede de pSEVA541 (verde). **b)** Estructura general de los plásmidos pSEVA. Todos los plásmidos consisten de tres módulos: I) gen de resistencia a un antibiótico (azul), II) origen de replicación (amarillo), y III) módulo de carga (rojo). Entre cada módulo se especifican los sitios de corte con enzimas de restricción para su liberación (esquema tomado y modificado del sitio electrónico Standard European Vector Architecture 3.0, 2020).

#### 7.10.17 Amplificación y clonación del ORF 10 en pSEVA55\*.

Una vez construido el plásmido pSEVA55\*, se procedió a clonar al ORF 10 procedente de la clona en pHERD30T. Debido a que en el diseño pSEVA55\* no existe un sistema para inducir, se procedió a amplificar al ORF 10 junto al promotor

pBAD de pHERD30T. En la Tabla 7.6 se muestra el diseño de los *primers* para hacer dicha amplificación.

**Tabla 7.6.** *Primers* para la clonación del ORF 10 en el plásmido pSEVA55\*.

<i>Primer</i>	<i>Sequence (5'→3')<sup>a</sup></i>	<i>Enzima de restricción usada</i>	<i>Amplicón (bp)</i>	<i>T<sub>m</sub></i>
AraC_pBAD-pHERD30T (F)	ccacctcgacctgagaca <u>caattg</u> tctta tgacaactgacggc	<i>MfeI</i>	1,784	52°C
ORF_10(R)	aggctgag <u>ggccggcc</u> ctatccccga tcacctgg	<i>FseI</i>		

a: El codón de paro del ORF 10 se indica con negritas, mientras que los sitios de restricción incorporados a las secuencias están subrayados.

Concluida la reacción, ésta se hizo correr en un gel de agarosa al 1% (ver 7.10.6 *Electroforesis con geles de agarosa y recuperación de bandas*, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para observar y recuperar la banda correspondiente al amplicón esperado. Posteriormente, el amplicón de interés se restringió con las enzimas *MfeI* y *FseI*, siguiendo las pautas de una doble restricción como se realizó con el DNA de Ps56 (ver 7.10.4 *Restricción del DNA de Ps56*, **MATERIALES Y MÉTODOS**; y A.5 *Detalles Técnicos*, **ANEXOS**). Posteriormente, se realizó la clonación del amplicón en el plásmido pSEVA55\*, el cual fue previamente restringido con las mismas enzimas que el amplicón (ver 7.10.5 *Restricción del plásmido pHERD30T* y 7.10.7 *Reacciones de ligación [clonación]*, **MATERIALES Y MÉTODOS**). La reacción de ligación fue transformada en células quimiocompetentes de *E. coli* para confirmar su obtención (ver 7.10.9 *Transformación química en E. coli*, **MATERIALES Y MÉTODOS**). El antibiótico de selección utilizado fue la tetraciclina a una concentración de 12 µg/mL para el caso de *E. coli*.

Una vez que se extrajo la clona del ORF 10 en pSEVA55\* (ver 7.10.10 *Extracción de clonas en E. coli*, **MATERIALES Y MÉTODOS**), se realizó la cotransformación de ésta en células Ps33/pHERD30T/ORF\_9 mediante el procedimiento de electroporación (ver 7.10.13 *Electroporación en P. aeruginosa*, **MATERIALES Y MÉTODOS**). Para seleccionar a las células cotransformadas con pHERD30T y

pSEVA55\* se utilizaron como antibióticos de selección la gentamicina [50 µg/mL] y la tetraciclina [80 µg/mL]. Finalmente, estas células fueron almacenadas en criotubos (ver 7.1.1 Almacenamiento de cepas, **MATERIALES Y MÉTODOS**) para su posterior uso.

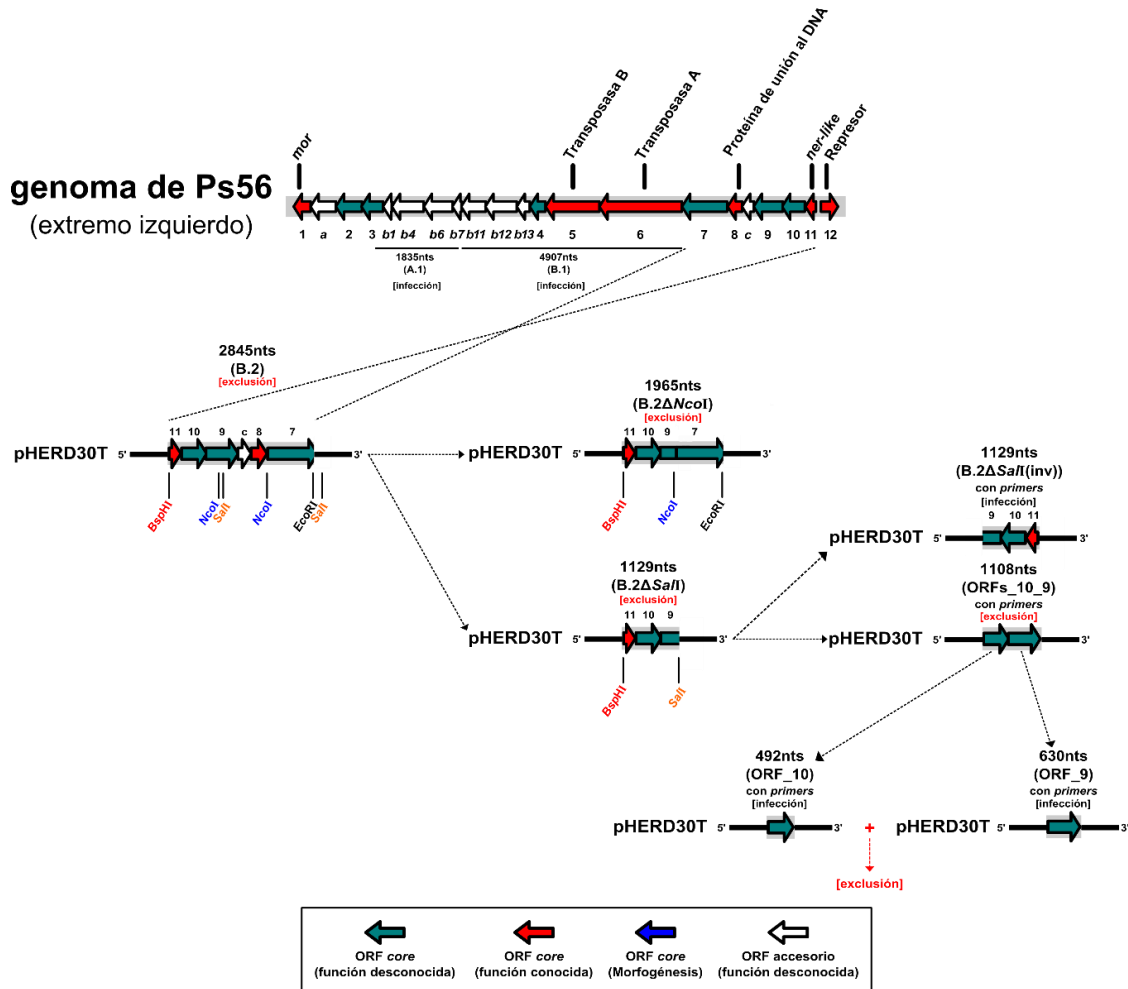
#### 7.10.18 Alineamiento de secuencias y búsqueda de homólogos.

Para comparar las secuencias aminoacídicas de los ORFs 9 y 10 de los fagos estudiados, se generó un archivo con las secuencias en formato FASTA y éste se cargó en el software SeaView V4.6 (Galtier *et al.*, 1996; Gouy *et al.*, 2010) para su alineamiento.

La búsqueda de homólogos de los ORFs 9 y 10 del fago Ps56 se realizó mediante el algoritmo BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (Altschul *et al.*, 1997), seleccionando tanto el programa *blastp* (*protein-protein BLAST*) como el *DELTA-BLAST* (*Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST*), este último con 4 iteraciones *PSI-BLAST*. Para ambos programas se utilizaron los parámetros de búsqueda con los valores predeterminados. Los resultados obtenidos corresponden a homólogos identificados en la base de datos NR (4 de agosto del 2020).

#### 7.10.19 Resumen de la estrategia realizada.

En la Figura 7.5 se integran varios de los pasos previamente mencionados en el apartado presente.



**Figura 7.5.** Resumen de la estrategia para localizar los genes de exclusión de Ps56. El genoma de Ps56 se restringió con las enzimas *Bsp*HI y *Eco*RI para clonar los ORFs del extremo izquierdo con función desconocida. Se realizaron ensayos de infección con fagos virulentos superinfectantes para evaluar los fragmentos A.1, B.1 y B.2. El fragmento B.2 fue el único en retener el fenotipo de exclusión como el profago Ps56. La secuencia de este fragmento alberga seis ORFs, los cuales se evaluaron generando diferentes combinaciones con las enzimas *Nco*I y *Sal*I. Entre las combinaciones generadas, la secuencia B.2Δ*Sal*I fue la más corta en retener el fenotipo de exclusión. La manipulación posterior de B.2Δ*Sal*I requirió del diseño de *primers* para clonar y evaluar los ORFs que albergaba. Los esquemas de los ORFs no están a escala.

### 7.11 Ensayo de adsorción.

Este ensayo se realizó basándose en el método de Roncero *et al.* (1990), el cual comenzó con la estría individual de las cepas Ps33/pHERD30T, Ps33(Ps56)/pHERD30T y Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 en cajas de LB con gentamicina [50 μg/mL]; las cuales fueron incubadas a 37°C y, posteriormente, recuperadas con 5 mL de medio LB. Las células se diluyeron a una proporción 1/100

en medio LB con gentamicina [50 µg/mL] y se dejaron incubando en agitación continua (180 rpm) a 37°C durante ~3:30 h hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> entre 1.5 - 1.7, la cual equivale a un título de 10<sup>9</sup> UFC/mL. De cada cepa se tomó un volumen de 1.5 mL para ser centrifugado a ~9,000 X g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el *pellet* se resuspendió cuidadosamente con 100 µL de medio LB. A cada *pellet* se le añadió muestra del fago virulento PaMx53 en un título de 10<sup>7</sup> UFP/mL para tener una Multiplicidad de Infección (M.O.I.) de 0.01. Las muestras se dividieron en dos mitades: la primera mitad fue inmediatamente centrifugada a ~18,000 X g durante 1 minutos (muestra a 0'), y la segunda mitad se incubó a 37°C durante 30 minutos para ser, posteriormente, centrifugada a las mismas condiciones que la primera mitad (muestra a 30'). Los sobrenadantes de cada muestra fueron recolectados para hacer diluciones seriales hasta 10<sup>-5</sup>. De esta última dilución se tomaron 300 µL y se mezclaron con 300 µL procedentes de un cultivo O/N de la cepa Ps33 para hacer tapices bacterianos (ver 7.3 *Tapices bacterianos, MATERIALES Y MÉTODOS*). El porcentaje de fagos adsorbidos se calculó a partir de la diferencia del número de placas aisladas contadas entre la muestra a 30' y la muestra a 0' (el número de placas en esta muestra se consideró como el 100%). Los ensayos de adsorción se realizaron por triplicado.

#### 7.12 Ensayo de eflujo de K<sup>+</sup>.

De acuerdo al método de Bondy-Denomy *et al.* (2016), este ensayo se realizó con las siguientes modificaciones: A partir de cultivos O/N de las cepas Ps33/pHERD30T, Ps33(Ps56)/pHERD30T y Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 en medio LB con gentamicina [50 µg/mL], se realizó una dilución 1/100 de cada cultivo en el mismo medio para, después, dejar las cepas incubando en agitación continua (180 rpm) a 37°C hasta alcanzar una O.D.<sub>600</sub> de 0.5. Las células del cultivo de concentraron por centrifugación, a ~9,000 X g durante 10 minutos, para obtener un título de 10<sup>9</sup> UFC/mL. Las células fueron lavadas dos veces con 1 mL de medio SM y, al final, se resuspendieron en 100µL del mismo medio. A cada muestra de células se le infectó con el fago virulento PaMx53 en un título de 10<sup>10</sup> UFP/mL para tener



una M.O.I. de 10. Todas las mezclas fueron divididas en dos mitades: la primera mitad fue inmediatamente centrifugada a  $\sim 18,000 \times g$  durante 1 minutos (muestra a 0 minutos'), y la segunda mitad se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para ser, posteriormente, centrifugada a las mismas condiciones que la primera mitad (muestra a 30'). Los sobrenadantes y *pellets* de cada muestra fueron recuperados y se les añadió 1 mL de medio SM para, después, ser hervidos a "baño maría" durante 20 minutos. Finalmente, a cada muestra se le añadió medio SM para alcanzar un volumen final de 2 mL, antes de realizar su lectura del  $\text{K}^+$  presente con un fotómetro de llama (ver A.2 Equipos y A.5 Detalles Técnicos, **ANEXOS**). La suma de las lecturas del  $\text{K}^+$  de un *pellet* y su sobrenadante se consideró como el 100%. El porcentaje de eflujo de  $\text{K}^+$  para cada condición se obtuvo al restar la cantidad de  $\text{K}^+$  liberado de células no infectadas del  $\text{K}^+$  total liberado tras la infección del fago PaMx53. Los ensayos de eflujo de  $\text{K}^+$  se realizaron por triplicado.

#### 7.13 Análisis estadístico.

Para calcular diferencias estadísticas entre las condiciones experimentales probadas, se realizó la prueba ANOVA de un factor (*one-way ANOVA*) junto a la prueba de Bonferroni, para hacer la comparación entre todas las condiciones experimentales, con un valor de  $\alpha=0.05$ . Los datos obtenidos se procesaron con el software GraphPad Prism 5.

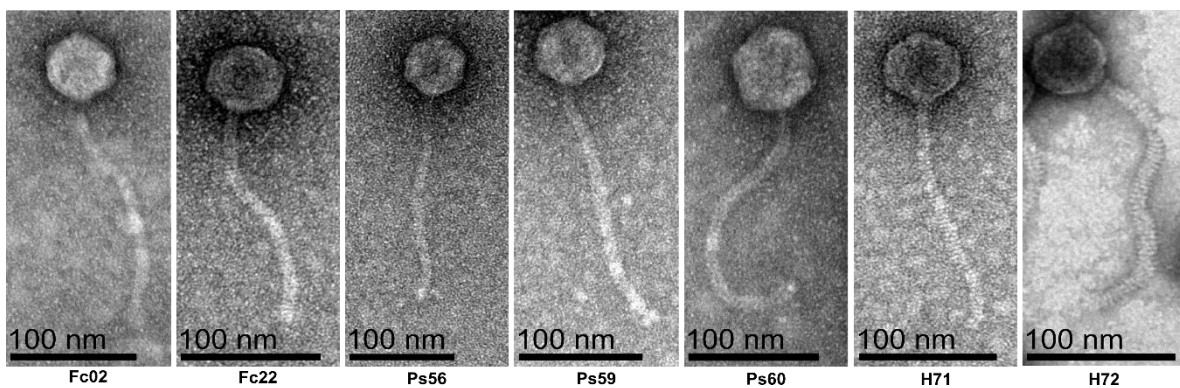
#### 7.14 Números de acceso.

Las secuencias de los fagos y plásmidos utilizados en el presente trabajo se encuentran depositadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Los números de acceso para los genomas de los fagos son los siguientes: Fc02 (MH719189), Fc22 (MH719191), Ps56 (MH719192), Ps59 (MH719195), Ps60 ((MH719194), H71 (MH719190), H72 (MH719193) y JBD18 (JX495041). Los números de acceso para las secuencias de los plásmidos son los siguientes: pHERD30T (EU603326.1) y pSEVA541 (JX560344.1). La secuencia del plásmido pSEVA658 fue proporcionada por el Dr. Esteban Martínez-García.

## **VIII. RESULTADOS**

## 8.1 Morfología de los siete fagos B3-like.

A partir de las muestras purificadas de CsCl de los fagos Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, H60, H71 y H72 (ver 7.5 *Purificación de fagos por gradientes discontinuos de CsCl, MATERIALES Y MÉTODOS*), se procesó una alícuota de cada uno para observar su morfología y registrarla a través de micrografías (ver 7.6 *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), MATERIALES Y MÉTODOS*). En la Figura 8.1 se muestra la morfología de cada uno de los siete fagos B3-like del laboratorio, la cual corresponde en todos los casos a una cápside isométrica, unida a una cola larga, flexible pero no contráctil. De acuerdo a estas características, las cápsides se clasifican dentro del morfotipo B1 (Badley, 1987; Ackermann & Eisenstark, 1974); y por el tipo de cola, los fagos corresponden a la familia *Siphoviridae* (Ackermann, 2007).



**Figura 8.1.** Micrografías de los siete fagos B3-like del laboratorio. Las medidas de los fagos (diámetro de la cápside/longitud de la cola) se presentan a continuación: **Fc02** ( $62.4 \pm 2.9$  nm/ $193.7 \pm 9.7$  nm), **Fc22** ( $64.9 \pm 2.6$  nm/ $203.8 \pm 12.04$  nm), **Ps56** ( $66.1 \pm 2.7$  nm/ $197.2 \pm 12.6$  nm), **Ps59** ( $65.3 \pm 1.7$  nm/ $204.4 \pm 9.05$  nm), **Ps60** ( $69.6 \pm 4.4$  nm/ $219.2 \pm 15.3$  nm), **H71** ( $64.2 \pm 1.4$  nm/ $200.9 \pm 7.14$  nm), y **H72** ( $59.6 \pm 3.8$  nm/ $215.1 \pm 32.5$  nm). Las medidas se obtuvieron con el software ImageJ (v1.47) (ver 7.6 *Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), MATERIALES Y MÉTODOS*).

La obtención de las micrografías de los siete fagos del laboratorio sustenta y complementa el análisis realizado al genoma de estos, junto a los previamente reportados en bases de datos (ver 2.2.3 *Fagos B3-like, ANTECEDENTES*), para así integrarlos formalmente en un grupo denominado como B3-like. Para profundizar en el estudio de este nuevo grupo y observar las diferencias que existen entre sus miembros debido a la diversidad genómica que presentan con sus ORFs *core* y

accesorios (ver 2.2.3.1 *Pangenoma B3-like* y Figura 2.2, **ANTECEDENTES**), se procedió a analizarlos a nivel fenotípico con base al análisis de la exclusión a fagos superinfectantes.

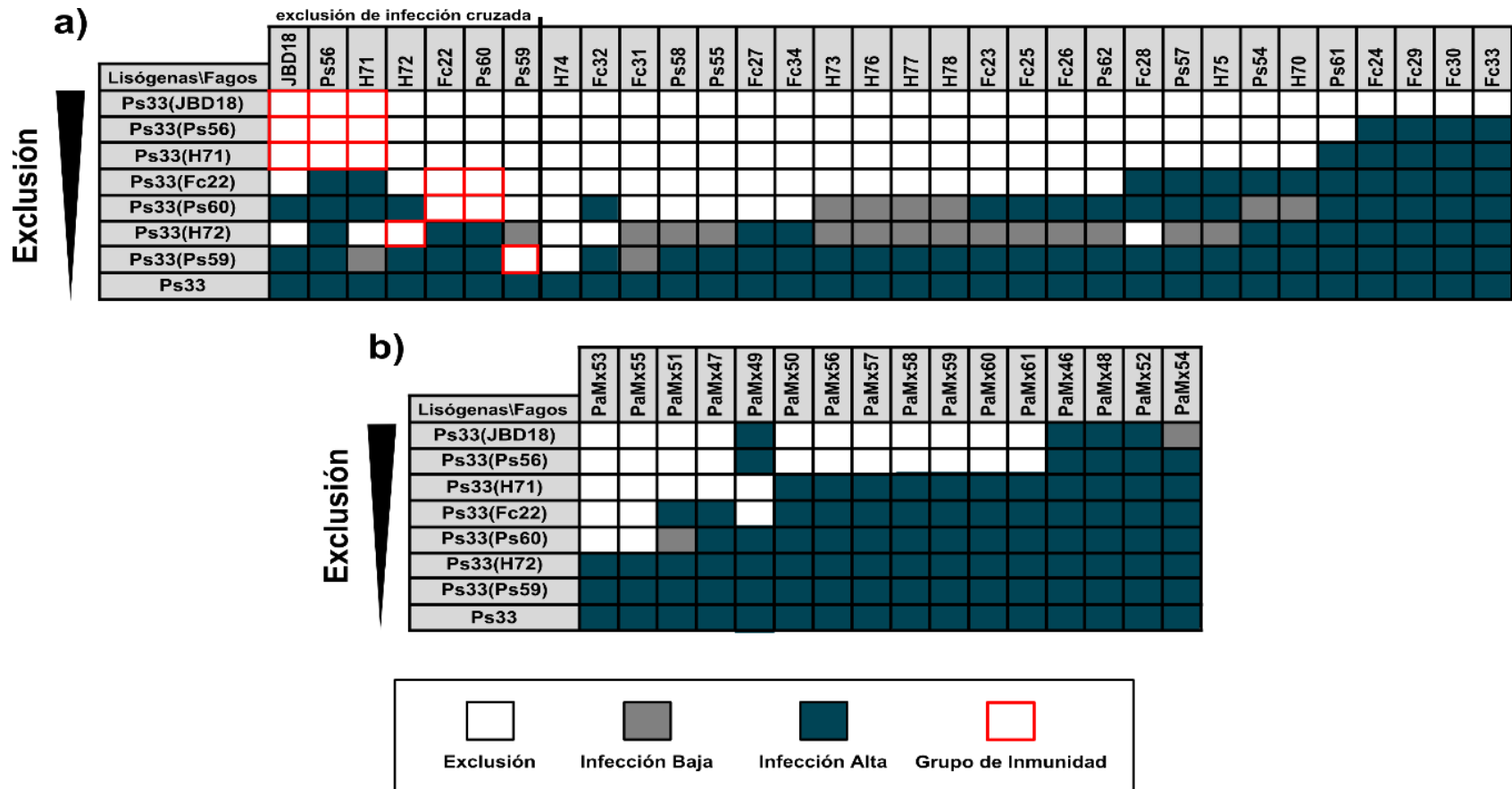
## 8.2 Patrones de exclusión de profagos B3-like en Ps33.

De acuerdo a las cepas de *P. aeruginosa* en las que se pueden propagar los siete fagos B3-like del laboratorio, el fago Fc02 es el único que puede infectar a la cepa PAO1. En cambio, los fagos Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H72 lo hacen en la cepa Ps33 (Tabla 7.1). Debido a esto y a la intención de hacer una comparación con otro fago B3-like de las bases de datos, como lo es el fago JBD18, los ensayos de infección realizados se enfocaron en las lisógenas que se construyeron con la cepa Ps33. Estos ensayos consistieron en la exposición de las lisógenas a la infección de dos baterías diferentes de fagos: una integrada por 32 temperados y otra por 16 virulentos (Tabla 7.2). En la Figura 8.2a se presenta el patrón de exclusión observado en las lisógenas B3-like contra la batería de fagos temperados, en el cual se registró que 4 de las 7 lisógenas empleadas mostraron exclusión a más de la mitad de los fagos temperados superinfectantes. La lisógena Ps33(Ps59) fue el único caso en ser infectado por prácticamente todos los fagos temperados probados.

Con la información obtenida del ensayo de infección contra la batería de fagos temperados y utilizando el criterio de exclusión de infección cruzada (ver 7.9 *Grupos de inmunidad*, **MATERIALES Y MÉTODOS**), se identificó la presencia de 4 grupos de inmunidad: I) JBD18/Ps56/H71, II) H72, III) Fc22/Ps60, y IV) Ps59 (Figura 8.2a, recuadros rojos). Estos grupos sugieren que los fagos miembros son mutuamente excluidos por sus represores. Sin embargo, los eventos de exclusión detectados a fuera de los grupos sugieren ser independientes a un represor fágico, pero dependientes en otros genes involucrados en el fenotipo de exclusión.

Para determinar la presencia de genes de exclusión independientes al represor fágico, se realizó el ensayo de infección de las lisógenas B3-like contra la batería de fagos virulentos. En la Figura 8.2b se presenta el patrón de exclusión obtenido,

en el cual se repite el orden de las lisógenas en cuanto a su capacidad de excluir fagos superinfectantes (JBD18 > Ps56 > H71 > Fc22 > Ps60 > H72 > Ps59), como se fue observado en el ensayo contra los fagos temperados. Sin embargo, sólo los profagos JBD18 y Ps56 mostraron excluir a 11 de los 16 fagos virulentos probados. Por otro lado, el registro de eventos de exclusión en este ensayo corroboró la presencia de genes de exclusión independientes al represor fágico.



**Figura 8.2.** Patrones de exclusión de siete profagos B3-like en la cepa Ps33. **a)** Ensayo de infección de 32 fagos temperados contra las lisógenas de fagos B3-like. Las primeras siete columnas corresponden a las lisógenas de los B3-like ordenadas por el número de fagos templados que pueden excluir (fila superior). **b)** Ensayos de infección de 16 fagos virulentos (fila superior) contra las lisógenas de fagos B3-like. En ambas matrices, las lisógenas se ordenaron por el número de fagos diferentes que pueden excluir (de mayor a menor). Asimismo, los fagos templados y virulentos en las matrices se ordenaron a partir de los más excluidos (izquierda) a los menos (derecha). Como control de infección, se incluyó a la cepa Ps33 (filas inferiores).

### 8.3 Identificación de los genes responsables del fenotipo de exclusión en el fago Ps56.

Para identificar a los genes involucrados en el fenotipo de exclusión observado en la Figura 8.2b, se seleccionó al fago Ps56 como representante del grupo B3-*like* debido a su extenso rango de exclusión. La estrategia empleada para identificar a dichos genes consistió en restringir el genoma del fago y clonar los fragmentos generados para ser evaluados mediante ensayos de infección.

#### 8.3.1 Simulación *in silico* de la restricción de Ps56.

El primer paso a seguir consistió en conocer el número de fragmentos que se pueden generar de la restricción del genoma de Ps56 con las enzimas *Bsp*HI y *Eco*RI. En la Figura 8.3a se muestra el resultado de la restricción de Ps56 sólo con *Bsp*HI. Debido a la presencia de fragmentos con un tamaño considerable y a las dificultades que esto ocasionaría en su manipulación experimental, se decidió incorporar un segundo corte con *Eco*RI para reducirlos. La Figura 8.3b muestra el resultado de la doble restricción del genoma Ps56, dando lugar a un total de 13 fragmentos parciales. La ubicación de estos fragmentos se puede apreciar en el esquema lineal de la Figura 8.3c. Para facilitar la identificación de algunos fragmentos, a estos se les asignó una letra (de la "A" a la "H") y, en algunos casos, con un número arábigo. Estos últimos corresponden a los fragmentos reducidos con el corte de la enzima *Eco*RI (Figura 8.3c, parte superior).

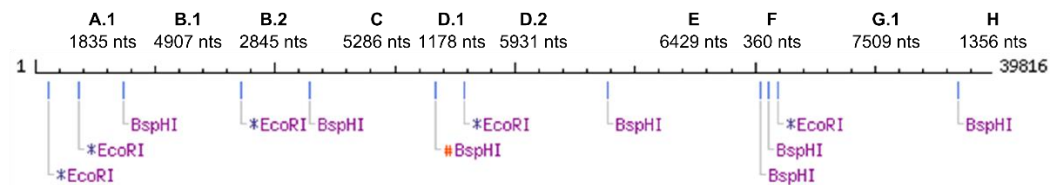
a)

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	BspHI-BspHI	30592-38460	7869
2	BspHI-BspHI	3680-11431	7752
3	BspHI-BspHI	16718-23826	7109
4	BspHI-BspHI	23827-30255	6429
5	BspHI-BspHI	11432-16717	5286
6	(LeftEnd)-BspHI	1-3679	3679
7	BspHI-(RightEnd)	38461-39816	1356
8	BspHI-BspHI	30256-30591	336

b)

#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	EcoRI-BspHI	30952-38460	7509
2	BspHI-BspHI	23827-30255	6429
3	EcoRI-BspHI	17896-23826	5931
4	BspHI-BspHI	11432-16717	5286
5	BspHI-EcoRI	3680-8586	4907
6	EcoRI-BspHI	8587-11431	2845
7	EcoRI-BspHI	1845-3679	1835
8	BspHI-(RightEnd)	38461-39816	1356
9	EcoRI-EcoRI	568-1844	1277
10	BspHI-EcoRI	16718-17895	1178
11	(LeftEnd)-EcoRI	1-567	567
12	BspHI-EcoRI	30592-30951	360
13	BspHI-BspHI	30256-30591	336

c)



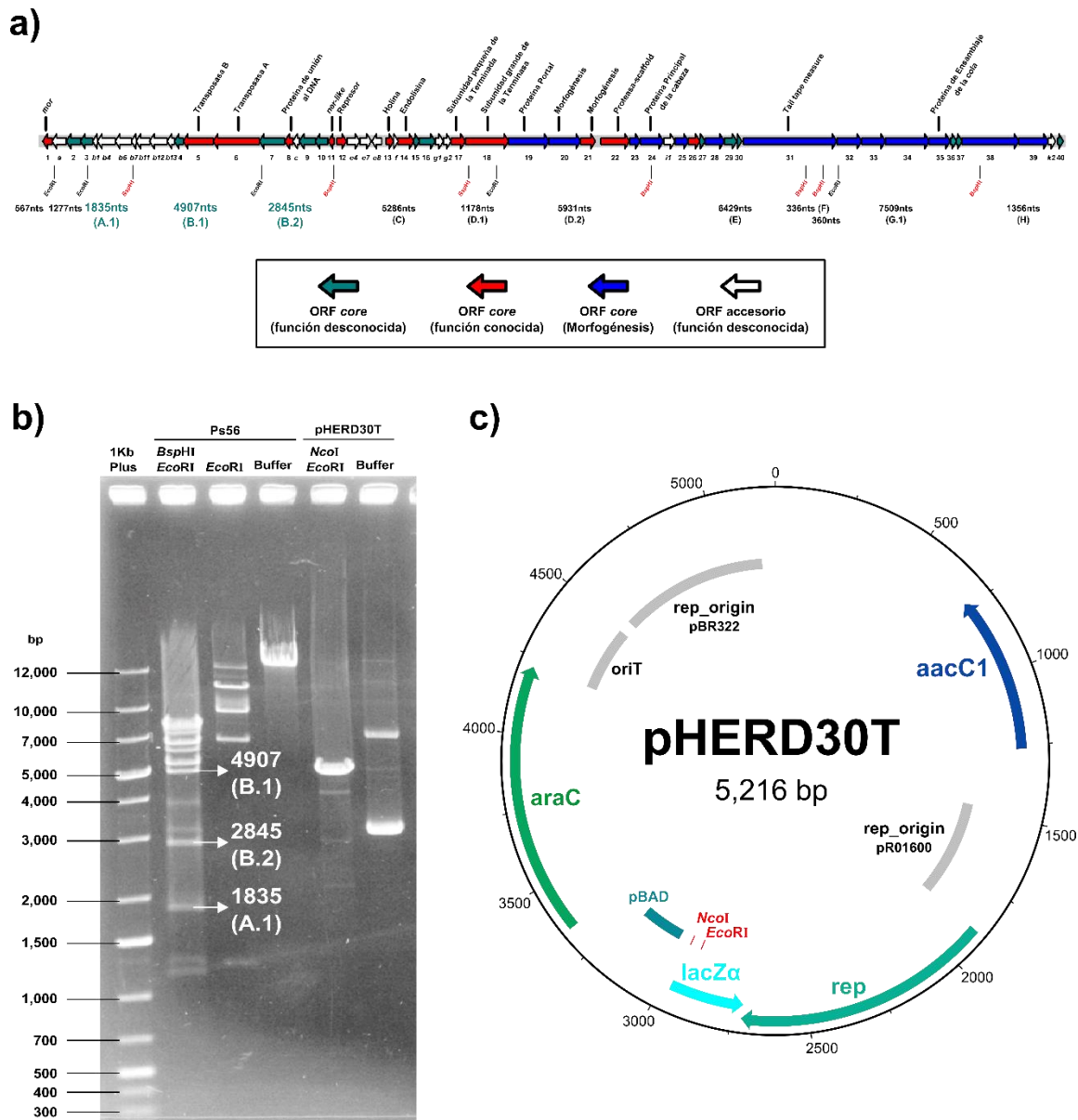
**Figura 8.3.** Restricción *in silico* del genoma de Ps56. **a)** Resultados de la simulación de restricción con *BspHI*. **b)** Resultados de la simulación de doble restricción con *BspHI* y *EcoRI*. **c)** Esquema lineal del genoma de Ps56 donde se muestran los sitios de corte por ambas enzimas. En la parte superior del esquema se indican los fragmentos de interés mediante una letra (de la "A" a la "H") y, en algunos casos, con un número arábigo. La simulación de la restricción se realizó con el software NEBcutter V2.0 (ver 7.10.1 *Determinación de fragmentos del genoma de Ps56, MATERIALES Y MÉTODOS*).

### 8.3.2 Fragmentos del genoma de Ps56.

El segundo paso de la estrategia consistió en determinar cuáles de los fragmentos predichos por la restricción *in silico* abarcan ORFs con función desconocida. Para esto se integró la información anotada del genoma de Ps56 con las coordenadas de los fragmentos predichos (Figura 8.4a). Se consideraron de interés los fragmentos A.1, B.1 y B.2, ya que son los que abarcan las regiones con el mayor número de ORFs con función desconocida reportada en bases de datos (Figura 8.4a, texto en color azul; y ver Figura 2.2, **ANTECEDENTES**). En la Figura 8.4b se presenta el gel con la doble restricción del genoma de Ps56, del cual se recortaron y purificaron los tres fragmentos de interés (indicados con flechas blancas). Los sitios de corte de *BspHI* y *EcoRI* permitieron realizar la clonación de los fragmentos en el plásmido



pHERD30T. Esto es posible debido a que los extremos que genera el corte con *NcoI* (presente en pHERD30T) (Figura 8.4c) son compatibles en su unión con los extremos que genera el corte con *BspHI* (ver A.5 *Detalles Técnicos*, ANEXOS). Por otro lado, el corte con *EcoRI* facilitó la clonación de los fragmentos en pHERD30T, ya que permitió que se unieran con una determinada orientación que coloca a los ORFs del fragmento río abajo del promotor pBAD y en sentido 5' → 3'.



**Figura 8.4.** Obtención de fragmentos A.1, B.1 y B.2 del genoma del fago Ps56. **a)** Mapa del genoma de Ps56 que integra la información de los fragmentos que se obtienen con la restricción de *BspHI* y *EcoRI*. En la parte inferior del mapa se mencionan los fragmentos y sus respectivos tamaños. **b)** Gel con la doble restricción del genoma de Ps56. Como controles se realizó la restricción individual de *EcoRI* y el corrimiento del DNA del fago

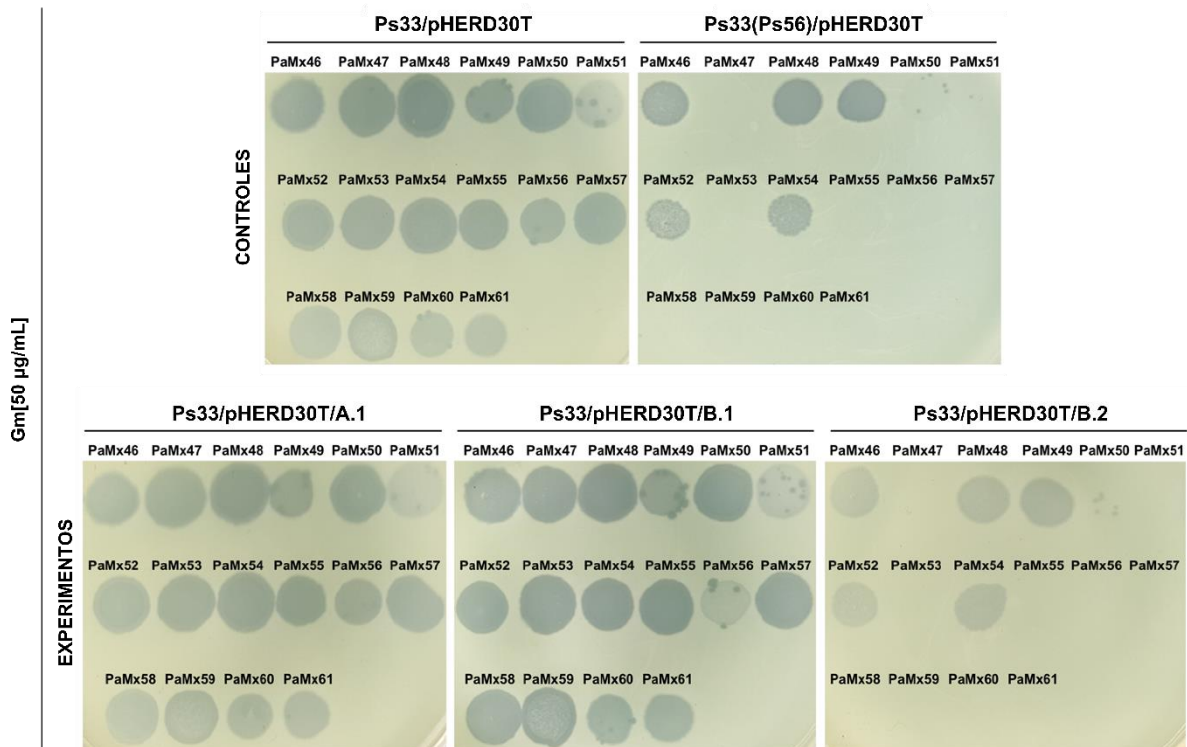
en buffer, éste último para corroborar la integridad del DNA. Asimismo, se realizó la doble restricción del plásmido pHERD30T con las enzimas *Nco*I y *Eco*RI. c) Esquema del plásmido pHERD30T. Dentro del gen *lacZ* $\alpha$  se localiza el Sitio de Clonación Múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), en el cual se utilizaron los sitios *Nco*I y *Eco*RI (indicados en rojo) para realizar clonaciones.

### 8.3.3 Evaluación de los fragmentos de Ps56.

Una vez clonados y transformados los fragmentos A.1, B.1 y B.2 en la cepa Ps33 de *P. aeruginosa* (ver 7.10.7 *Reacciones de ligación [clonación]* a 7.10.13 *Electroporación en P. aeruginosa*, **MATERIALES y MÉTODOS**); se procedió a evaluar su fenotipo de exclusión mediante un ensayo de infección contra una batería de 16 fagos virulentos (Tabla 7.2) (ver 7.8 *Ensayos de infección*, **MATERIALES y MÉTODOS**). De los tres fragmentos evaluados, sólo el fragmento B.2 presentó un fenotipo de exclusión similar al profago Ps56. Es decir, el fragmento B.2 pudo excluir a once fagos virulentos y ser infectado sólo por cinco (Figura 8.5) (ver A.7 *Alineamiento de clonas*, **ANEXOS**). En cambio, los fragmentos A.1 y B.1 mostraron un fenotipo semejante a la cepa Ps33/pHERD30T al ser infectados por los 16 fagos virulentos.

A partir de este ensayo también se observó la presencia de placas aisladas en algunos sitios de goteo, las cuales se atribuyeron a dos posibles causas: 1) salpicadura de muestras de fagos adyacentes, y 2) contaminación de algunos *stocks* de fagos por su uso en ensayos previos. Para evitar la recurrencia de este problema, sólo las muestras de fagos virulentos fueron nuevamente generadas (ver 7.4 *Generación de stocks de fagos*, **MATERIALES Y MÉTODOS**).

La evaluación del fragmento B.2 continuó con la identificación de los ORFs que abarca en su secuencia, así como la obtención de clonas en las que se eliminaron algunos de estos ORFs para identificar aquellos que retuvieran el fenotipo de exclusión observado con el profago Ps56.

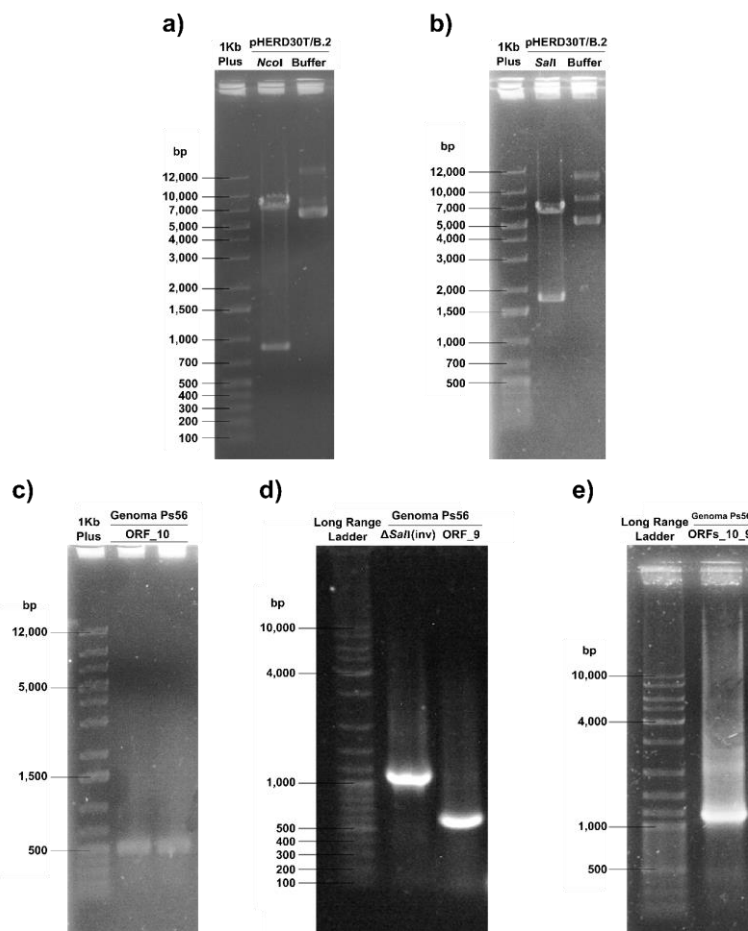


**Figura 8.5.** Ensayo de infección con los fragmentos A.1, B.1 y B.2 de Ps56. Se realizó el goteo de 16 fagos virulentos sobre tapices de la Ps33 transformada con los fragmentos de interés clonados en pHERD30T. Como control negativo y positivo de exclusión se utilizó a la cepa Ps33/pHERD30T y la cepa Ps33(Ps56)/pHERD30T, respectivamente.

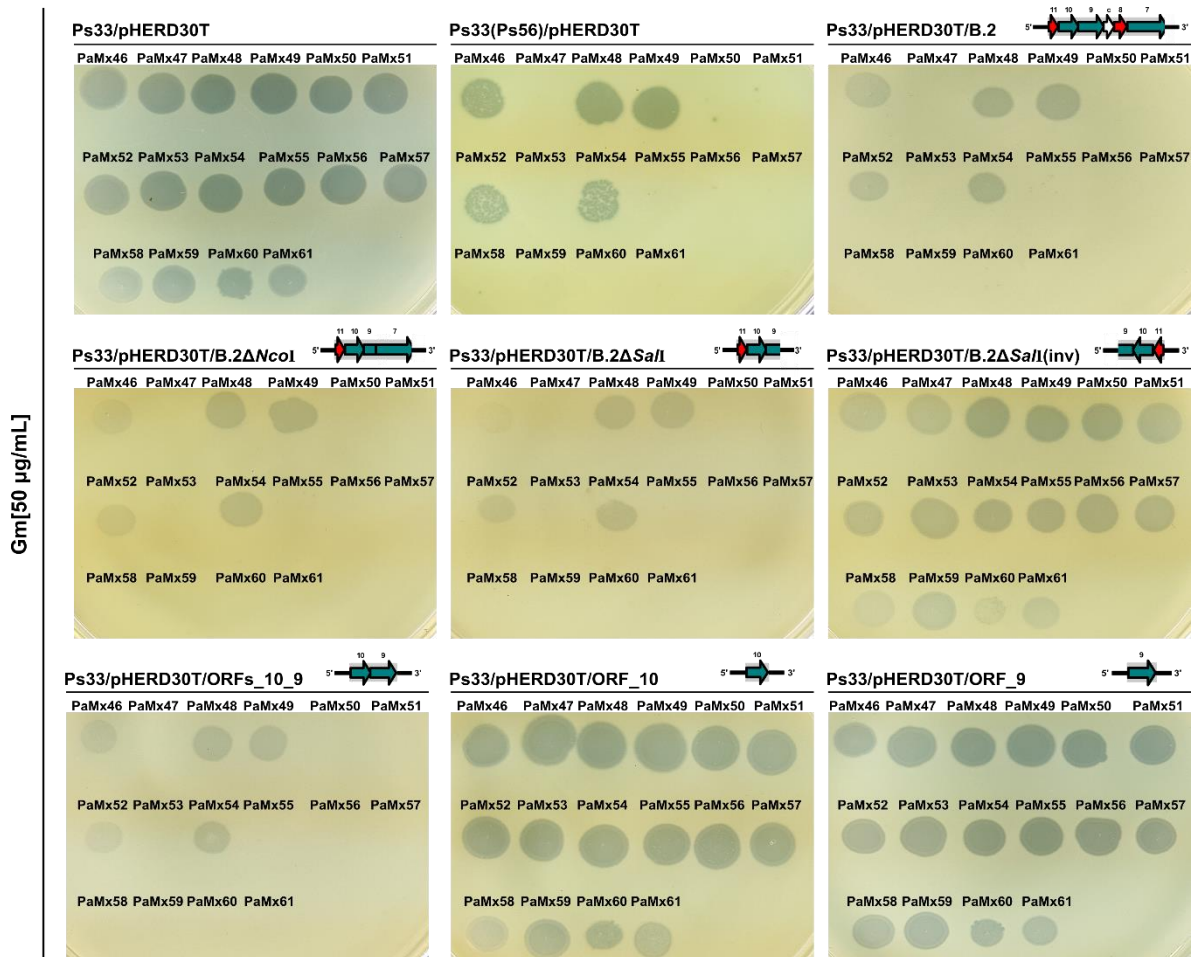
### 8.3.4 Evaluación de los ORFs presentes en el fragmento B.2.

El fragmento B.2 abarca seis ORFs en su secuencia, de los cuales dos son conservados y con función conocida (ORFs 8 y 11), tres son conservados y de función desconocida (ORFs 7, 9, 10); y, finalmente, uno accesorio de función desconocida (ORF c) (Fig. 8.4a). Para identificar al o los ORFs responsables del fenotipo de exclusión, se restringió la secuencia del fragmento B.2 con la enzima *NcoI* (Fig. 8.6a) para descartar la participación de los ORFs 8 y c (Fig. 7.5). La clona pHERD30T/B.2 $\Delta$ *NcoI* demostró retener el fenotipo de exclusión del profago Ps56 al ser expuesta a la batería de 16 fagos virulentos (Fig. 8.7), por lo que se decidió restringir el fragmento B.2 con la enzima *SaI* (Fig. 8.6b) para descartar la participación del ORF 7 (Fig. 7.5). El ensayo de infección con la clona pHERD30T/B.2 $\Delta$ *SaI* sugirió que el fenotipo de exclusión se encontraba confinado en alguno de los tres ORFs restantes: ORFs 10, 11 y ~64% de la secuencia del

ORF 9 (Fig. 7.5 y 8.7). El ORF 11 fue descartado como posible responsable debido a su anotación indica que éste codifica para una proteína *NER-like* cuya función ha sido previamente descrita (van de Putte *et al.*, 1981) y no está relacionada con la exclusión a fagos superinfectantes. Por lo tanto, se procedió a amplificar y clonar en pHERD30T los ORF 9, 10 y la secuencia de B.2 $\Delta$ SaI en sentido inverso, éste último para descartar la presencia de ORFs en la cadena complementaria (Fig. 8.6c,d) (ver 7.10.15 *Amplificación del fragmento B.2 $\Delta$ SaI(inv)* y de los ORFs 9 y 10, **MATERIALES Y MÉTODOS**; y A.7 *Alineamiento de clonas, ANEXOS*). El ensayo de infección con estas clonas resultó en la pérdida del fenotipo de exclusión (Fig. 8.7). Debido a este resultado, se decidió clonar juntos a los ORFs 9 y 10 (Fig. 8.6e) (ver A.7 *Alineamiento de clonas, ANEXOS*). El ensayo de infección reveló que el fenotipo de exclusión permanece al estar presentes ambos ORFs (Fig. 8.7).



**Figura 8.6.** Restricciones y amplificaciones de los ORFs del fragmento B.2. **a)** Restricción de pHERD30T con *NcoI*, **b)** Restricción de pHERD30T con *SalI*, **c)** Amplificación por PCR del ORF 10, **d)** Amplificación por PCR del B.2 $\Delta$ SaI y ORF 9, y **e)** Amplificación por PCR conjunta del ORF 9 y 10.

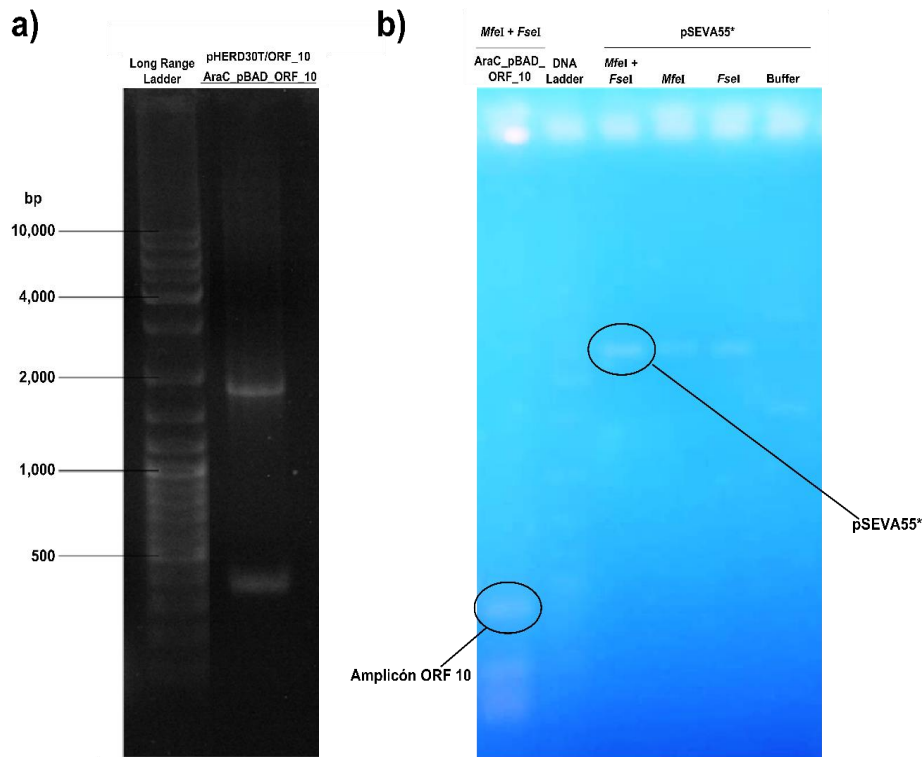


**Figura 8.7.** Evaluación de los ORFs del fragmento B.2 de Ps56. Para identificar a los genes responsables del fenotipo de exclusión observado en la lisógena Ps33(P56), se realizaron combinaciones de los genes que abarca el fragmento B.2. Algunas combinaciones se hicieron mediante la restricción del fragmento con las enzimas *NcoI* y *SalI*. Otras se hicieron con la amplificación por PCR y clonación de ORFs específicos. Todas las combinaciones se retaron a una batería de 16 fagos virulentos. Como control positivo y negativo de exclusión se utilizó a la cepa Ps33(Ps56)/pHERD30T y la cepa Ps33/pHERD30T, respectivamente. En la esquina superior derecha de cada foto se esquematiza la clona evaluada. Los esquemas no están a escala.

### 8.3.5 Actividad concertada de los ORFs 9 y 10.

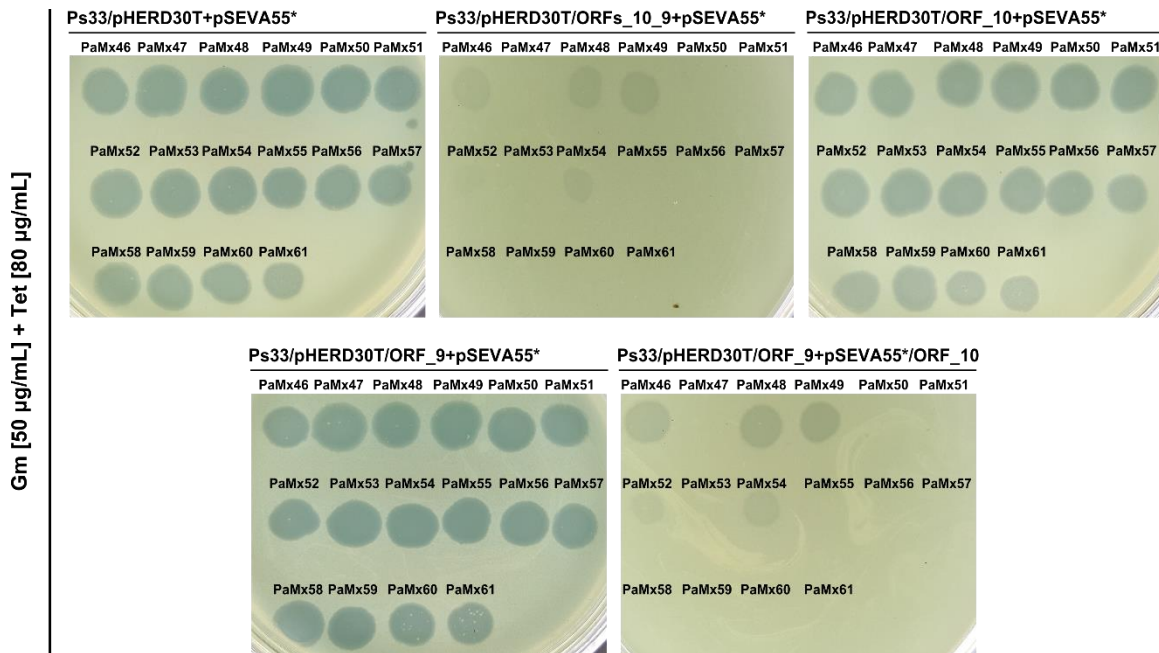
Para confirmar la participación de los ORFs 9 y 10 en el fenotipo de exclusión, se decidió clonar a ambos en un plásmido compatible a pHERD30T: el plásmido pSEVA55\*. De estas clonaciones sólo se obtuvo la del ORF 10 y para ello se amplificó al ORF junto a las secuencias AraC y pBAD de pHERD30T (Fig. 8.8a) (ver *A.7 Alineamiento de clonas, ANEXOS*). La unión de este amplificado con pSEVA55\* requirió de su restricción con las enzimas *MfeI* y *FseI*, siendo la primera responsable

de segmentar y eliminar la secuencia AraC del resto del amplificado (Fig. 8.8b, bandas inferiores al amplicón ORF 10).



**Figura 8.8.** Amplificación y restricción del ORF 10 para su clonación en el plásmido pSEVA55\*.

La clona pSEVA55\*/ORF\_10 se cotransformó junto a pHERD30T/ORF\_9 en la cepa Ps33 de *P. aeruginosa* y se evaluó mediante el ensayo de infección contra la batería de 16 fagos virulentos. El resultado de este ensayo demostró que la cepa Ps33/pHERD30T/ORF\_9+pSEVA55\*/ORF\_10 presenta el fenotipo de exclusión al igual la cepa control Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9+pSEVA55\* (Fig. 8.9). Es decir, los ORFs 9 y 10 son requeridos, independientemente de estar clonados juntos o por separado, para conferir exclusión contra fagos superinfectantes.

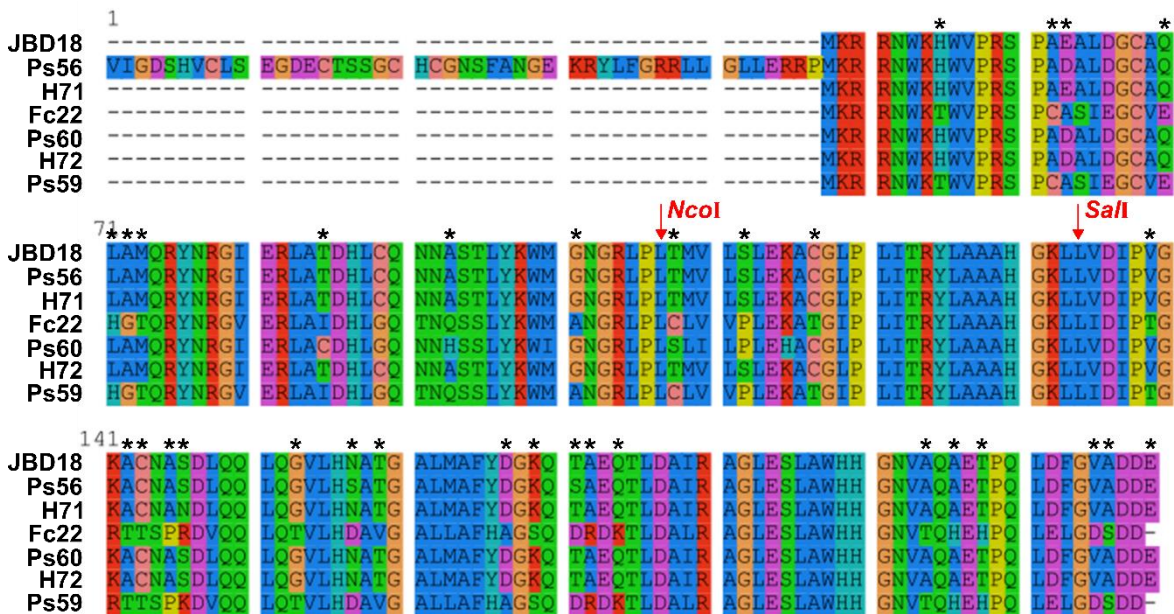


**Figura 8.9.** Actividad concertada de los ORFs 9 y 10 en el fenotipo de exclusión. Para evaluar la acción en conjunto de los ORFs 9 y 10, estos se clonaron en dos plásmidos compatibles: pHERD30T y pSEVA55\*. Las clonas se emplearon en un ensayo de infección contra una batería de 16 fagos virulentos. Como control positivo y negativo de exclusión se utilizó a la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9+pSEVA55\* y la cepa Ps33/pHERD30T+pSEVA55\*, respectivamente.

### 8.3.6 Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas de los ORFs 9 y 10.

Con el propósito de indagar en la secuencia de ambos ORFs y determinar cuáles son las diferencias que generan patrones de exclusión diferentes entre los fagos B3-*like*, se realizó el alineamiento de éstas (ver 7.10.18 *Alineamiento de secuencias y búsqueda de homólogos, MATERIALES Y MÉTODOS*). La Figura 8.10 presenta el alineamiento de las secuencias homólogas del ORF 9 en los fagos JBD18, Ps56, H71, Fc22, Ps60, H72 y Ps59; siendo la secuencia del fago Ps56 la más larga entre los fagos B3-*like* evaluados con 209 aminoácidos. A lo largo de la secuencia se identificaron 32 cambios de sentido (*missense*) o de aminoácidos de grupos bioquímicos diferentes entre los fagos con mayor capacidad de exclusión (JBD18, Ps56 y H71) y aquellos cuya capacidad es menor o nula (Fc22 y Ps59). Sin embargo, no se identificó un sólo cambio en el cual el grupo de los fagos JBD18, Ps56 y H71 fuera diferente al grupo integrado por Ps60, H72, Fc22 y Ps59. Otro elemento que se tomó en cuenta en el alineamiento fue el sitio de corte que

experimentó el ORF 9 de Ps56 con las enzimas *NcoI* y *SalI*. Para ambos casos, la secuencia del ORF permaneció siendo funcional a pesar de encontrarse reducida en ~51% por *NcoI* y en ~64% por *SalI* (Fig. 7.5 y 8.7). Esto sugiere que la parte funcional del ORF 9 se encuentra en los primeros 106 aminoácidos de su secuencia, entre los cuales habría 10 cambios *missense* potencialmente importantes.

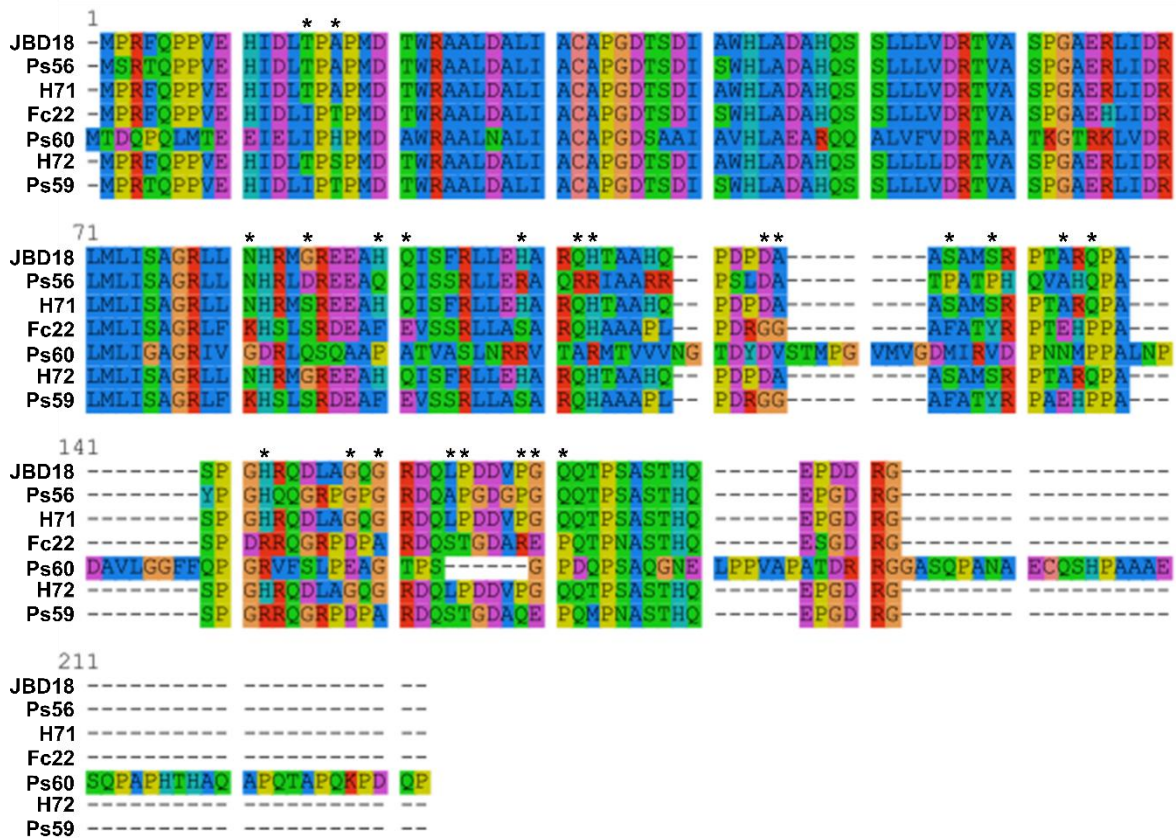


**Figura 8.10.** Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas del ORF 9. El alineamiento se realizó con las secuencias de los siete fagos B3-like de los que se obtuvieron sus patrones de exclusión como profagos. Los fagos están ordenados de acuerdo a su capacidad de excluir fagos superinfectantes (de mayor a menor). A lo largo de las secuencias se indica con un asterisco negro (\*) los cambios *missense* entre los fagos con una mayor capacidad de exclusión (JBD18, Ps56 y H71) con al menos dos que presentan una capacidad de exclusión menor o nula (Fc22 y Ps59). Con flechas en rojo se indican los sitios de corte de las enzimas *NcoI* y *SalI* en las clonas pHERD30T/B.2Δ*NcoI* y pHERD30T/B.2Δ*SalI*, respectivamente.

En la Figura 8.11 se presenta el alineamiento de las secuencias homólogas del ORF 10 en los fagos JBD18, Ps56, H71, Fc22, Ps60, H72 y Ps59; siendo la secuencia del fago Ps60 la más larga entre los fagos B3-like evaluados con 232 aminoácidos. A lo largo de la secuencia se identificaron 23 cambios *missense* entre los fagos con mayor capacidad de exclusión (JBD18, Ps56 y H71) y aquellos cuya capacidad es menor o nula (Fc22 y Ps59). Al igual que en el alineamiento del ORF 9, para el ORF 10 no se identificó un sólo cambio en el cual el grupo de los fagos JBD18, Ps56 y H71 fuera diferente al grupo integrado por Ps60, H72, Fc22 y Ps59. Asimismo, la secuencia del ORF 10 no fue reducida al momento de obtener variantes del



fragmento B.2 (Fig. 7.5). Esto sugiere que su secuencia completa es necesaria para ejercer el fenotipo de exclusión junto al ORF 9.

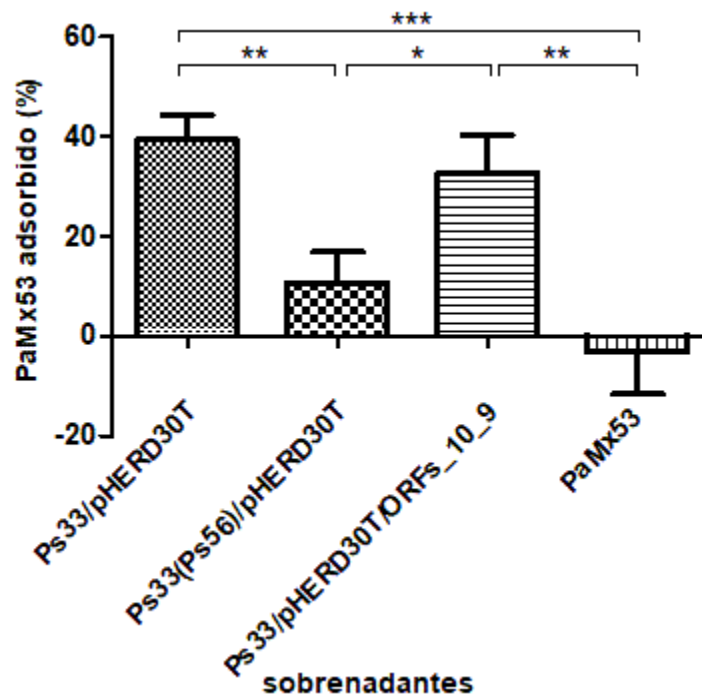


**Figura 8.11.** Alineamiento de secuencias aminoacídicas homólogas del ORF 10. El alineamiento se realizó con las secuencias de los siete fagos B3-like de los que se obtuvieron sus patrones de exclusión como profagos. Los fagos están ordenados de acuerdo a su capacidad de excluir fagos superinfectantes (de mayor a menor). A lo largo de las secuencias se indica con un asterisco negro (\*) los cambios *missense* entre los fagos con una mayor capacidad de exclusión (JBD18, Ps56 y H71) con al menos dos que presentan una capacidad de exclusión menor o nula (Fc22 y Ps59).

En cuanto a la búsqueda de homólogos de los ORFs 9 y 10 del fago Ps56, los resultados obtenidos con los programas *blastp* y *DELTA-BLAST* sólo indican parecido con proteínas hipotéticas tanto de fagos de *P. aeruginosa* como de otras cepas del género *Pseudomonas* de las cuales se desconoce su función (ver A.8 *Resultados de BLASTp de los ORFs 9 y 10, ANEXOS*). Estos resultados demuestran que hasta el momento no existe una secuencia previamente reportada de la cual se pueda obtener información adicional para los ORFs 9 y 10, por ejemplo cómo y en dónde ejercen su función ambos ORFs.

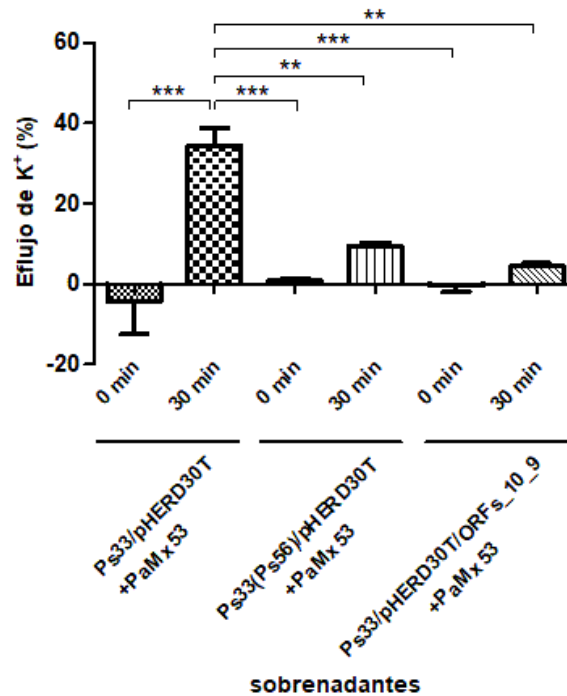
#### 8.4 Nivel de exclusión de los ORFs 9 y 10 en el proceso de infección.

El análisis de los ORFs 9 y 10 continuó con la determinación del nivel al que ejercen su fenotipo de exclusión. Para esto se realizaron ensayos enfocados en las dos primeras etapas del proceso de infección: I) adsorción, y II) inyección del DNA del fago. La evaluación de la etapa de adsorción se llevó a cabo al exponer a las células con la clonación pHERD30T/ORFs\_10\_9 a la infección del fago virulento PaMx53, el cual se sabe que es excluido por estos mismos ORFs (Fig. 8.7 y 8.9). En la Figura 8.12 se muestra que el porcentaje del fago PaMx53 adsorbido en la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 no difiere estadísticamente del porcentaje de la cepa control Ps33/pHERD30T. No obstante, la cepa Ps33(Ps56)/pHERD30T mostró un porcentaje menor al esperado. Esta observación sugiere que la adsorción es inhibida en la lisógena y es generada por la presencia de un segundo fenómeno de exclusión codificado por el profago Ps56.



**Figura 8.12.** Ensayo de adsorción de los ORFs 9 y 10 con el fago virulento PaMx53. El porcentaje de adsorción de PaMx53 no presenta diferencias significativas entre las cepas Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 y Ps33/pHERD30T, ésta última fue utilizada como control negativo de exclusión. Por otro lado, la cepa Ps33(Ps56)/pHERD30T fue utilizada como control positivo de exclusión y la muestra del fago PaMx53 sin bacteria fue incluida como un control de la estabilidad del fago (control de manipulación). Se realizó la prueba ANOVA de un factor junto a la prueba de Bonferroni para calcular diferencias estadísticas con ayuda del software GraphPad Prism 5, donde \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , y \*\*\* $p < 0.001$ .

Debido a que la clona pHERD30T/ORFs\_10\_9 no mostró inhibición de la adsorción, se procedió a evaluar la etapa de inyección de DNA de fagos superinfectantes. Para esto se realizó la medición del eflujo de  $K^+$ , el cual está asociado al ingreso de DNA fágico al citoplasma de la bacteria hospedera (Boulanger & Letellier, 1988, 1992). En la Figura 8.13 se muestra el porcentaje de eflujo de  $K^+$  para las cepas Ps33/pHERD30T, Ps33(Ps56)/pHERD30T y Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 tras su infección con el fago virulento PaMx53. En el caso particular de la cepa Ps33/pHERD30T se registró un eflujo de  $K^+$  de  $\sim 35\%$  después de 30 minutos de infección con el fago PaMx53. Este valor resultó significativo en contraste a las cepas Ps33(Ps56)/pHERD30T y Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9, de las cuales no se registró un eflujo de  $K^+$  significativo después de 30 minutos de infección con el fago PaMx53. Este resultado indica que los ORFs 9 y 10 del fago Ps56 participan en la exclusión de fagos superinfectantes a nivel de la envoltura del hospedero. Concretamente, esto lo hacen al bloquear el ingreso de DNA de fagos que han llevado a cabo la etapa de adsorción.



**Figura 8.13.** Ensayo de eflujo de K<sup>+</sup>. En las condiciones con Ps33(Ps56)/pHERD30T y Ps33/pHERD30T/ORFs\_10\_9 no hay salida de K<sup>+</sup>. Las cepas Ps33/pHERD30T y Ps33(Ps56)/pHERD30T fueron utilizadas como controles de infección y exclusión, respectivamente. Todas las muestras se midieron con y sin la infección del fago virulento PaMx53 a los 0 y 30 minutos. Se realizó la prueba ANOVA de un factor junto a la prueba de Bonferroni para calcular diferencias estadísticas con ayuda del software GraphPad Prism 5, donde \*\*p<0.01, y \*\*\*p<0.001.

## IX. DISCUSIÓN

Los fagos se distinguen morfológicamente por la prevalencia (>96%) de aquellos integrados por una cápside isométrica y una cola. Estos fagos se clasifican dentro del orden de los *Caudovirales*, quienes a su vez se subdividen en tres familias (*Siphoviridae*, *Myoviridae* y *Podoviridae*) dependiendo de las características que presentan sus colas. El 61% de los fagos reportados con cola corresponden a los *Siphoviridae*, cuya cola se distingue en ser larga y flexible (Ackermann, 2003, 2007). La abundancia de esta familia también ha sido observada para los fagos que infectan a *P. aeruginosa* (Knezevic *et al.*, 2009; Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012a). En el trabajo presente se determinó la morfología de siete fagos B3-like (Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H72), los cuales presentan colas cuyas características permiten la clasificación de estos ejemplares como *Siphoviridae* (ver Fig. 8.1, **RESULTADOS**). Con la inclusión de estos fagos a las bases de datos se contribuye con las cifras que demuestra la prevalencia de los *Siphoviridae* tanto en general como en *P. aeruginosa*. Asimismo, la morfología de los siete fagos coincide con los cinco B3-like reportados en bases de datos: B3, JBD18, JBD25, JBD67 y PM105 (Slayter *et al.*, 1964; Cady *et al.*, 2012; Pourcel *et al.*, 2016); siendo los siete ejemplares del laboratorio particularmente mayores en cuanto al diámetro de sus cápsides y la longitud de sus colas (por ejemplo, el fago Ps60).

Además de presentar características morfológicas similares, el análisis comparativo de los doce genomas B3-like (Cazares, 2016) permite demostrar que estos comparten el tamaño y la organización de sus ORFs, al grado de identificar ORFs *core* y accesorios (ver Fig. 2.2, **ANTECEDENTES**). Estos últimos pueden localizarse en ubicaciones específicas denominadas como RGP, las cuales pueden servir como marcadores distintivos para los grupos de fagos. Por ejemplo, el grupo D3112-like cuenta con las RGP C y G que contienen ocho y nueve ORFs accesorios diferentes, respectivamente (Cazares *et al.*, 2014), mientras el grupo F116-like presenta a la RGP B como distintiva al contener catorce ORFs accesorios diferentes (Cazares, 2016). Para el grupo B3-like, su RGP distintiva es la B ya que incluye hasta trece ORFs diferentes (ver Fig. 2.2, **ANTECEDENTES**). El parecido entre morfología y genoma, independientemente de su diferente aislamiento temporal y espacial, ha sido observado en otros grupos de fagos de *P. aeruginosa*,

como en los  $\phi$ KMV-like (Ceysens *et al.*, 2006; Kulakov *et al.*, 2009; Lammens *et al.*, 2009), los  $\phi$ KZ-like (Krylov *et al.*, 2007), los PB1-like (Ceysens *et al.*, 2009), los D3112-like (Cazares *et al.*, 2014) y los 119X-like (Cruz-Plancarte *et al.*, 2016) así como también para fagos que infectan otros géneros bacterianos como *Brucella* spp (Segondy *et al.*, 1988; Rigby *et al.*, 1989; Flores *et al.*, 2012). Por lo tanto, con la información recabada se puede establecer a los fagos B3-like como un grupo formal cuyos miembros no se habían organizado hasta ahora.

Dentro del estudio realizado a los fagos B3-like, se analizó su capacidad de excluir fagos superinfectantes temperados y virulentos. El análisis sistemático para este rasgo fenotípico también ha si evaluado en otro grupo de fagos, como los D3112-like (Bondy-Denomy *et al.*, 2016) entre los cuales se ha observado la presencia de ejemplares con un fenotipo de exclusión notable. Entre los fagos de nuestro grupo se identificó que el fago Ps56 presenta un fenotipo de exclusión amplio contra temperados y virulentos (ver Fig. 8.2, **RESULTADOS**), además de que éste se aproxima al fenotipo del fago JBD18, el cual corresponde a otro ejemplar del grupo B3-like pero con un origen de aislamiento diferente (Cady *et al.*, 2012). Esto demuestra que dentro de los B3-like existen igualmente ejemplares relevantes para su estudio en cuanto a su capacidad de exclusión. Asimismo, los patrones de exclusión obtenidos contra 33 temperados (Fig. 8.2a, **RESULTADOS**) permitieron evidenciar la participación de la inmunidad por represor como un mecanismo inherente al fenotipo de exclusión. A partir del criterio de exclusión de infección cruzada entre los B3-like y sus lisógenas se lograron identificar cuatro grupos de inmunidad: JBD18/Ps56/H71, II) H72, III) Fc22/Ps60, y IV) Ps59 (ver Figura 8.2a, recuadros rojos; **RESULTADOS**). Sin embargo, los eventos de exclusión registrados por fuera de los grupos de inmunidad observados sugieren que no todos los eventos pueden ser explicados sólo por este fenómeno. De hecho, esta observación surgió la necesidad de retar a las lisógenas de los B3-like contra fagos virulentos. Los ensayos de infección realizados contra 16 virulentos demostró que tanto Ps56 como JBD18 excluyen a los mismos fagos (ver Fig. 8.2b, **RESULTADOS**) y que estos eventos de exclusión *per se* son independientes a una proteína represora, además de sugerir que son los mismos genes los responsables

de excluir a fagos tanto temperados como virulentos. Los estudios que abordan el tema de exclusión a la superinfección de fagos virulentos son escasos en la literatura (Essoh *et al.*, 2013), por lo que el trabajo presente provee evidencia relevante en cuanto a los obstáculos con los que se puede enfrentar la aplicación de los fagos virulentos como agentes terapéuticos en la fago terapia.

Con el propósito de profundizar en la observación de los eventos de exclusión registrados, se procedió con la búsqueda de los genes involucrados. La posible existencia de estos genes surge al reconocer a los fagos como el reservorio de información genética más novedoso existente (Suttle, 2005), además de que un porcentaje considerable de sus secuencias codificantes (20-25%) no se relacionan con otras ni con las proteínas reportadas en bases de datos (Ha & Denver, 2018). Para la búsqueda de estos genes se eligió a Ps56 como representante del grupo B3-*like* y se procedió con la estrategia de restringir su genoma para evaluar simultáneamente varios de sus ORFs, principalmente aquellos localizados en su extremo izquierdo y que no tuvieran una función asignada (ver Fig. 7.5, **MATERIALES Y MÉTODOS**). A partir del fragmento B.2, que retuvo el fenotipo de exclusión (ver Fig. 8.5, **RESULTADOS**), se continuó con la restricción y clonación de los ORFs que alberga para identificar a los ORFs 9 y 10 como los responsables del fenotipo de exclusión observado contra los fagos virulentos superinfectantes (ver Fig. 8.7 y 8.9, **RESULTADOS**). En nuestro laboratorio, esta estrategia ha sido empleada con éxito para identificar otras secuencias responsables de fenotipos de exclusión novedosos, como lo es el gen *cor* en el colifago mEp167 (Uc-Mass *et al.*, 2004). La identificación de los ORFs 9 y 10 en el fago Ps56 como responsables de la exclusión se distingue al corresponder a secuencias conservadas. De hecho, parece ser la tendencia de localizar este tipo de secuencias en las regiones conservadas de los fagos más que en sus RGPs. En el fago D3112 se buscó el gen responsable de inhibir el *twitching* y de causar exclusión a la superinfección en la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, siendo los genes candidatos los que fueran únicos y/o variables en este fago. Sin embargo, el gen responsable, *gp05* o *tip*, resultó ser uno conservado entre D3112 y MP22, además de otros Mu-*like* (Cazares *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014). Por otro lado, en los fagos JBD24, JBD26, JBD30 y JBD44 se

reportó la expresión de un fenotipo de exclusión independiente a la proteína represora (Bondy-Denomy *et al.*, 2016). Al clonar y evaluar experimentalmente catorce genes de estos fagos, se determinó que seis eran responsables del fenotipo de exclusión y cinco de estos (JBD24-4, JBD26-5, JBD26-31, JBD26-61 y JBD44-8) tienen una localización genómica conservada (Tsao *et al.*, 2018). Asimismo, sobresale que, en la mayoría de los casos, como en los previamente mencionados, un solo gen es requerido para producir el fenotipo de exclusión (Labrie *et al.*, 2010). La única excepción a esto en profagos de *P. aeruginosa* corresponde a D3, el cual presenta tres genes adyacentes, *iap*, *wzy<sub>β</sub>*, y *oac*, cuya acción en conjunto modifican la estructura del antígeno-O que requieren tanto el fago D3 como E79 para llevar a cabo su adsorción (Kuzio & Kropinski, 1983; Netwon *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2019).

En otro aspecto molecular de los ORFs 9 y 10, no pasó desapercibido que la secuencia del ORF 9 permanece activa aun cuando se retiene aproximadamente entre un 51 y 64% de su secuencia en las clonas Ps33/pHERD30T/B.2Δ*NcoI* y Ps33/pHERD30T/B.2Δ*SalI*, respectivamente (ver Fig. 8.7, **RESULTADOS**). Esto sugiere que el extremo N-terminal del ORF 9 retiene su función en colaboración con el ORF 10. No obstante, se requieren de más estudios moleculares para determinar el o los sitios activos de ambas secuencias, ya que por medio de la comparación de las secuencias aminoacídicas entre los homólogos de los ORF 9 y 10 en los B3-*like* evaluados experimentalmente (ver Fig. 8.10 y 8.11, **RESULTADOS**) no se identifica una sola posición de relevancia entre los fagos que excluyen de los que no. Asimismo, la búsqueda de homólogos de los ORFs 9 y 10 de Ps56 mediante BLASTp no aportó evidencia adicional sobre éstas, como su posible funcionamiento molecular. Por lo tanto, es imprescindible realizar estudios que permitan revelar si los productos de ambos genes requieren o no interactuar entre sí, además de conocer cuáles son sus proteínas bacterianas blanco para determinar el mecanismo molecular del fenotipo de exclusión observado. Un posible blanco para los ORFs 9 y 10 es el pili tipo IV, el cual es el receptor que emplea el fago arquetipo B3 para iniciar su proceso de infección (Roncero *et al.*, 1990).



Aunque todavía no se conoce el mecanismo molecular de los ORFs 9 y 10, una primera aproximación a esto consistió en determinar a qué nivel del proceso de infección de fagos intervienen. Para ello se evaluaron las dos primeras etapas de este proceso, que son: la adsorción y la inyección de DNA fágico. Mediante el ensayo de adsorción se observó que la clona pHERD30T/ORFs\_10\_9 no afecta la proporción del fago virulento PaMx53 adsorbido a la bacteria (ver Fig. 8.12, **RESULTADOS**) aun cuando se sabe que ambos ORFs pueden excluir a dicho fago (ver Fig. 8.9, **RESULTADOS**). Asimismo, el porcentaje de adsorción de PaMx53 en la lisógena Ps33(Ps56)/pHERD30T resultó de interés al ser menor de lo esperado con respecto a la clona pHERD30T/ORFs\_10\_9. Este resultado indica la presencia de otro(s) gen(es) en el profago Ps56 que interfiere en la adsorción de los fagos superinfectantes. Sin embargo, la búsqueda de esta(s) secuencia(s) no fue objeto de estudio en el trabajo presente, además de que éste o estos sugieren ser responsables de un fenotipo de exclusión que ya ha sido reportado para otros fagos de *P. aeruginosa* (Holloway & Cooper, 1962; Castillo & Bartell, 1974; Kuzio & Kropinski, 1983; Newton *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2014; Tsao *et al.*, 2018). Por otra parte, mediante el ensayo de eflujo de K<sup>+</sup> se observó que la clona pHERD30T/ORFs\_10\_9 y la lisógena Ps33(Ps56)/pHERD30T presentaron porcentajes de eflujo menores con respecto a la cepa Ps33/pHERD30T cuando son expuestos al fago virulento PaMx53 (ver Fig. 8.13, **RESULTADOS**). La diferencia en el porcentaje de K<sup>+</sup> registrado en la clona pHERD30T/ORFs\_10\_9 con respecto a la cepa Ps33/pHERD30T indica que el proceso de infección en la primera es bloqueado con la interrupción de la inyección del DNA de PaMx53. Debido a esto, los ORFs 9 y 10 de Ps56 pueden clasificarse funcionalmente dentro de los mecanismos *Sie* (Labrie *et al.*, 2010). Estos mecanismos han sido reportados en fagos de Gram-positivas, como en Tuc2009 de *Lactococcus lactis*, por la expresión del gen *sie<sub>2009</sub>* (McGrath *et al.*, 2002; Mahony *et al.*, 2008); y en TP-J34 de *Streptococcus thermophilus* por acción del gen *ltp* (Sun *et al.*, 2006). No obstante, los mecanismos *Sie* también han sido identificados en fagos de Gram-negativas, como en P22 que infecta a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo *Typhimurium* y que porta al gen *sieA* (Susskind *et al.*, 1971, 1974; Hofer *et al.*, 1995),

y en *E. coli* a T4 por sus genes *imm* y *sp* (Lu & Henning, 1994), a HK97 por su gen gp15 (Cumby *et al.*, 2012, 2015), y en mEp167 por la proteína Cor, la cual previene la infección de fagos a través del bloqueo del receptor FhuA (Uc-Mass *et al.*, 2004; Arguijo-Hernández *et al.*, 2018). Los ORFs 9 y 10 del fago Ps56 constituyen el primer reporte de genes que excluyen mediante el bloqueo de la inyección de DNA de fagos superinfectantes en *P. aeruginosa*.

## **X. CONCLUSIONES**

1. Por su morfología, los siete fagos del laboratorio (Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71 y H72) se clasifican dentro de la familia *Siphoviridae*.
2. Por su parecido morfológico y genómico, los siete fagos del laboratorio con los cinco fagos vegetativos de las bases de datos (B3, JBD18, JBD25, JBD67 y PM105) integran un grupo denominado *B3-like*.
3. Los ensayos de infección con los fagos Fc02, Fc22, Ps56, Ps59, Ps60, H71, H72 y JBD18 revelan que los *B3-like* son capaces de excluir fagos temperados y virulentos.
4. Existen eventos de exclusión en los fagos *B3-like* independientes al conferido por la proteína represora (fenómeno de inmunidad).
5. En el profago Ps56 se identificó que los ORFs 9 y 10 [conservados] son los responsables de conferir exclusión contra fagos virulentos superinfectantes. Ambos ORFs son necesarios para presentar este fenotipo.
6. Los ORFs 9 y 10 no inhiben la adsorción de fagos virulentos superinfectantes, sin embargo, impiden la inyección de su DNA. Debido a la etapa en que ejercen su fenotipo de exclusión se clasifican funcionalmente como un mecanismo de exclusión a la superinfección (Sie).
7. El fenotipo de exclusión conferido por los ORFs 9 y 10 del profago Ps56 es el primer mecanismo Sie descrito para el grupo de fagos *B3-like* y para fagos de *P. aeruginosa*.

## **XI. PERSPECTIVAS**

- Determinar si los ORFs 9 y 10 requieren interactuar o no entre ellos para ejercer su fenotipo de exclusión.
- Conocer con cuáles proteínas de la bacteria interactúan los ORFs 9 y 10 para así proponer cómo funcionan molecularmente. Es decir, conocer su mecanismo de acción.
- Analizar experimentalmente los ORFs 9 y 10 de otros fagos B3-*like* para profundizar en las diferencias de los patrones de exclusión observados y determinar los sitios activos de ambas secuencias.
- Estudiar la expresión y regulación de los ORFs 9 y 10 del profago Ps56 tanto en ciclo lisogénico como en ciclo lítico.
- Determinar si otros aislados clínicos de *P. aeruginosa* portan profagos con los ORFs 9 y 10; y expresan el fenotipo de exclusión a la superinfección de fagos. Es decir, conocer la distribución de los fagos B3-*like* a través de la exclusión conferida por estos dos ORFs.

## LITERATURA CITADA

Ackermann HW, Eisenstark A. (1974). **The Present State of Phage Taxonomy.** *Intervirology*. 3: 201-219.

----- (2003). **Bacteriophage observations and evolution.** *Research in Microbiology*. 154: 245-251.

----- (2007). **5500 Phages examined in the electron microscope.** *Archives of Virology*. 152: 227-243.

-----, Haldal M. (2010). **Basic electron microscopy of aquatic viruses.** En: *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Wilhelmn SW, Weinbauer MG, Suttle CA (eds). ASLO. pp. 182-192.

Akhverdian VZ, Khrenova EA, Bogush VG, Gerasimova TV, Kirsanov NB. (1984). **Wide distribution of transposable phages in natural *Pseudomonas aeruginosa* populations.** *Genetika*. 20: 1612-1619.

-----, Khrenova EA, Reulets MA, Gerasimova TV, Krylov VN. (1985). **Characteristics of phages-transposons of *Pseudomonas aeruginosa* belonging to 2 groups distinguished by DNA-DNA homology.** *Genetika*. 21: 735-747.

Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górská S, Gamian A. (2017). **Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* – The role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy.** *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 71: 78-91.

Altschul S, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman MD. (1997). **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Research.* 25: 3389-3402.

Arguijo-Hernández ES, Hernández-Sánchez J, Briones-Peña SJ, Oviedo N, Mendoza-Hernández G, Guarneros G, Kameyama L. (2018). **Cor interacts with outer membrane proteins to exclude FhuA-dependent phages.** *Archives of Virology.* 163: 2959-2969.

Autexier C, DuBow MS. (1992). **The *Escherichia coli* Mu/D108 phage *ner* homologue gene (*nlp*) is transcribed and evolutionary conserved among the Enterobacteriaceae.** *Gene.* 114: 13-18.

Baltch AL, Smith RP, Franke M, Ritz W, Michelsen P, Bopp L, Lutz F. (1994). ***Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin as a pathogenicity factor in a systemic infection of leukopenic mice.** *Toxicon.* 32: 27-34.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. (2007). **CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes.** *Science.* 315: 1709-1712.

Bidnenko EM, Akhverdian VZ, Krylov VN. (2000). **Transcriptional mapping and study of transcription regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* phage-transposon D3112.** *Genetika.* 36: 1645-1655.

Bondy-Denomy J, Qian J, Westra ER, Buckling A, Guttman DS, Davidson AR, Maxwell KL. (2016). **Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms.** *The ISME Journal*. 10: 2854-2866.

Boulanger P, Letellier L. (1988). **Characterization of Ion Channels Involved in the Penetration of Phage.** *The Journal of Biological Chemistry*. 263: 9767-9775.

----- (1992). **Ion channels are likely to be involved in the two steps of phage T5 DNA penetration into *Escherichia coli* cells.** *The Journal of Biological Chemistry*. 267: 3168-3172.

Bradley DE. (1967). **Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.** *Bacteriological Reviews*. 31: 230-314.

Braid MD, Silhavy JL, Kitts CL, Cano RJ, Howe MM. (2004). **Complete genomic sequence of bacteriophage B3, a Mu-like phage of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Bacteriology*. 186: 6560-6574.

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (2004). **Biología de los Microorganismos.** *Pearson Prentice Hall*. Décima Edición. Madrid, España. pp. 368-371.

Bukhari AI, Taylor AL. (1975). **Influence of insertions on packaging of host sequences covalently linked to bacteriophage Mu DNA.** *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences of the United States of America*. 72:4399-4403.

-----, Froshauer S, Botchan M. (1976). **Ends of bacteriophage Mu DNA**. *Nature*. 264:580-583.

Cadoret F, Soscia C, Voulhoux R. (2014). **Chapter 3. Gene Transfer: Transformation/Electroporation**. En: Filloux A, Ramos JL (eds). *Pseudomonas – Methods and Protocols*. Humana Press. Springer Protocols. pp. 11-15.

Cady KC Bondy-Denomy J, Heussler GE, Davidson AR, O'Toole GA. (2012). **The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages**. *Journal of Bacteriology*. 194: 5728-5738.

Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brüßow H. (2003). **Prophage genomics**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67: 238-276.

Calendar R. (2006). **The Bacteriophages**. *Oxford University Press*. Segunda Edición. EUA. pp. 8-9, 469-496.

Carballo-Ontiveros MA. (2012). **Selección de profagos que excluyen la infección secundaria por otros fagos en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa***. Tesis de Maestría. Departamento de Genética y Biología, CINVESTAV. 81p.



Casjens S. (2003). **Prophages and bacterial genomics: what we learn so far?** *Molecular Microbiology*. 49: 277-300.

Castañeda-Montes FJ, Avitia M, Sepúlveda-Robles O, Cruz-Sánchez V, Kameyama L, Guarneros G, Escalante AE. (2018). **Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* through a MLST approach and antibiotic resistance profiling a Mexican clinical collection.** *Infection, Genetics and Evolution*. 65: 43-54.

Castillo FJ, Bartell PF. (1974). **Studies on the bacteriophage 2 receptors of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Virology*. 14: 904-909.

Cazares A, Mendoza-Hernández G, Guarneros G. (2014). **Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages.** *BMC Genomics*. 15: 1-13.

----- (2016). **Genómica comparativa y funcional de fagos que infectan *Pseudomonas aeruginosa*.** Tesis de Doctorado. Departamento de Genética y Biología, CINVESTAV. 160p

Ceyssens PJ, Lavigne R, Mattheus W, Chibeu A, Hertveldt K, Mast J, Robben J, Volckaert G. (2006). **Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: Establishment of the  $\phi$ KMV subgroup within the T7 supergroup.** *Journal of Bacteriology*. 188: 6924-6931.

-----, Miroshnikov K, Mattheus W, Krylov V, Robben J, Noben JP, Vanderschraeghe S, Sykilinda N, Kropinski AM, Volckaert G, Mesyanzhinov V, Lavigne R. (2009). **Comparative analysis of the widespread and conserved PB1-like viruses infecting *Pseudomonas aeruginosa***. *Environmental Microbiology*. 11: 2874-2883.

-----, Lavigne R. (2010). **Bacteriophages of *Pseudomonas***. *Future Microbiology*. 5: 1041-1055.

Chiang YN, Penadés JR, Chen J. (2019). **Genetic Transduction by Phages and Chromosomal Islands: The New and Noncanonical**. *PLoS Pathogens*. 15:e1007878.

Choi KH, Kumar A, Schweizer HP. (2006). **A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation**. *Journal of Microbiological Methods*. 64: 391-397.

Chung I-Y, Jang H-J, Bae H-W, Cho Y-H. (2014). **A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111: 11503-11508.

Cruz-Plancarte I, Cazares A, Guarneros G. (2016). **Genomic and transcriptional mapping of PaMx41, Archetype of a new lineage of bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa***. *Applied and Environmental Microbiology*. 82: 6541-6547.

Cumby N, Edwards AM, Davidson AR, Maxwell KL. (2012). **The bacteriophage HK79 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein.** *Journal of Bacteriology*. 194: 5012-5019.

-----, Reimer K , Mengin-Lecreulx D, Davidson AR, Maxwell KL. (2015). **The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of *E. coli* phage HK97.** *Molecular Microbiology*. 96: 437-447.

Daniell E, Abelson J, Kim JS, Davidson N. (1973). **Heteroduplex structures of bacteriophage Mu DNA.** *Virology*. 51:237-239.

-----, Kohne DE, Abelson J. (1975). **Characterization of the inhomogeneous DNA in virions of bacteriophage Mu by DNA reannealing kinetics.** *Journal of Virology*. 15: 739-743.

Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT, Suttle CA. (2011). **Marine viruses and global climate change.** *FEMS Microbiology reviews*. 35: 993-1034.

de la Cruz AI. (2016). **Caracterización del gen g2 del fago H70 de *Pseudomonas aeruginosa* como anti-CRISPER.** Tesis de Maestría. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV. 82p.

De Smet J, Hendrix H, Blasdel BG, Danis-Wlodarczyk K, Lavigne R. (2017). ***Pseudomonas* predators: Understanding and exploiting phage-host interactions.** *Nature reviews. Microbiology.* 15:517–530.

Dion MB, Oechslin F, Moineau S. (2020). **Phage Diversity, Genomics and Phylogeny.** *Nature reviews. Microbiology.* 18: 125-138.

Douglas J. (1975). **Bacteriophages.** Chapman and Hall, Edited. London. 131p.

Essoh C, Blouin Y, Loukou G, Cablanmian A, Lathro S, Kutter E, Thien HV, Vergnaud G, Pourcel C. (2013). **The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages.** *PLoS One.* 8: e60575.

Farinha MA, Allan BJ, Gertman EM, Ronald SL, Kropinski AM. (1994). **Cloning of the early promoters of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: sequence of the immunity region of D3.** *Journal of Bacteriology.* 176: 4809-4815.

-----, Kropinski AM. (1997). **Overexpression, purification, and analysis of the c1 repressor protein of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3.** *Canadian Journal of Microbiology.* 43: 220-226.

Flores V, López-Merino A, Mendoza-Hernandez G, Guarneros G. (2012). **Comparative genomic analysis of two brucellaphages of distant origins.** *Genomics.* 99: 233-240.

----- (2017a). **Genómica comparativa de fagos de *Pseudomonas*: mosaicismo observado en cinco fagos novedosos.** Tesis de Doctorado. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV. 84p.

Fogg PC, Hynes AP, Digby E, Lang AS, Beatty JT. (2011). **Characterization of a newly discovered Mu-like bacteriophage RcapMu, in *Rhodobacter capsulatus* strain SB1003.** *Virology*. 421: 211-221.

Galtier N, Gouy M, Gautier C. (1996). **SEAVIEW and PHYLO\_WIN: Two Graphic Tools for Sequence Alignment and Molecular Phylogeny.** *Computer Applications in the Biosciences (CABIOS)*. 12: 543-548.

Green R, Rogers EJ. (2013). **Transformation of chemically competent *E. coli*.** *Methods in Enzymology*. 529: 329-336.

Gouy M, Guidon S, Gascuel O. (2010). **SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building.** *Molecular Biology and Evolution*. 27: 221-224.

Govan JR, Deretic V. (1996). **Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 60: 539-574.

Guerry P, van Embden J, Falkow S. (1974). **Molecular nature of two nonconjugative plasmids carrying drug resistance genes.** *Journal of Bacteriology.* 117: 619-630.

Guttman B, Raya R, Kutter E. (2005). **Basic Phage Biology.** En: Kutter E, Sulakvelidze A (eds). *Bacteriophage - Biology and Applications.* CRC Press. EUA. pp 29-66.

Ha AD, Denver DR. (2018). **Comparative genomic analysis of 130 bacteriophages infecting bacteria in the genus *Pseudomonas*.** *Frontiers in Microbiology.* 9: 1456.

Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Bläsi U. (2004). **Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48: 3817-3822.

Harper DR, Enright MC. (2011). **Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections.** *Journal of Applied Microbiology.* 111: 1-7.

Harshey RM. (2014). **Transposable Phage Mu.** *Microbiology Spectrum.* 2: 10.1128/microbiolspec.MDNA3-0007-2014.

Hatfull G, Hendrix RW. (2011). **Bacteriophages and their genomes.** *Current Opinion in Virology.* 1: 298-303.

Hendrix RW. (2003). **Bacteriophage genomics.** *Current Opinion in Microbiology.* 6: 506-511.

Heo YJ, Chung IY, Choi KB, Lau GW, Cho YH. (2007). **Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22.** *Microbiology.* 153: 2885-2895.

Hofer B, Ruge M, Dreiseikelmann B. (1995). **The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product.** *Journal of Bacteriology.* 177: 3080-3086.

Holloway BW. (1955). **Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of General Microbiology.* 13: 572-581.

-----, Egan JB, Monk M. (1960). **Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*.** *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science.* 38: 321-329.

-----, Cooper GN. (1962). **Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Journal of Bacteriology.* 84: 1321-1324.

Hsu MT, Davidson N. (1974). **Electron microscope heteroduplex study of the heterogeneity of Mu phage and prophage DNA.** *Virology.* 58: 229-239.

Hyman P, Abedon ST. (2010). **Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance**. En: Laskin A, Gadd GM, Sariaslani S (eds). *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. EUA. 70: 217-248.

Janjua HA, Segata N, Bernabò P, Tamburini S, Ellen A, Jousson O. (2012). **Clinical populations of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from acute infections show a wide virulence range partially correlated with population structure and virulence gene expression**. *Microbiology*. 158: 2089-2098.

Jenkins JB. (1986). **Genética**. Editorial Reverté. Segunda Edición. Barcelona, España. pp. 470.

Kameyama L, Oviedo N, Guarneros G. (2001). **Capítulo 18: Bacteriófago Lambda**. En: Martínez-Romero E, Martínez-Romero JC (eds). *Microbios en línea*. Publicaciones Digitales. Libros UNAM.

Kaur I. (2016). **Novel strategies to combat antimicrobial resistance**. *Journal of Infectious Diseases & Therapy*. 4: 292.

Keen EC. (2015). **A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology**. *Bioessays*. 37: 6-9.

Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. (2011). ***Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity**. *Frontiers in Microbiology*. 2: 150.



Knezevic P, Kostanjsek R, Obreht D, Petrovic O. (2009). **Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra.** *Current Microbiology.* 59: 173-180.

Kronheim S, Daniel-Ivad M, Duan Z, Hwang S, Wong AI, Mantel I, Nodwell JR, Maxwell KL. (2018). **A chemical defence against phage infection.** *Nature.* 564: 283-286.

Krylov VN, Bogush VG, Shapiro J. (1980a). **Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa* with DNA similar in structure to that of phage Mu1. I. General description, localization of sites sensitive to endonucleases in DNA, and structure of homoduplexes of phage D3112.** *Genetika.* 16: 824-832.

-----, Bogush VG, Ianenko AS, Kirsanov NB. (1980b). ***Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages with DNA structure similar to the DNA structure of Mu1 phage. II. Evidence for similarity between D3112, B3, and B39 bacteriophages: analysis of DNA splits by restriction endonucleases, isolation of D3112 and B3 recombinant phages.** *Genetika.* 16: 975-984.

-----, Akhverdian VZ, Bogush VG, Khrenova EA, Reulets MA. (1985). **Modular structure of the genes of phages-transposons of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Genetika.* 21: 724-734.

-----, Dela Cruz DM, Hertveldt K, Ackermann HW. (2007). “**φKZ-like viruses**”, a proposed new genus of myovirus bacteriophages. *Archives of Virology*. 152: 1955-1959.

----- . (2014). **Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy**. 88: 227-278.

Kuchment A. (2012). **The Forgotten Cure – The Past and Future of Phage Therapy**. *Springer Science + Business Media*. New York, NY; EUA. pp. 4 -10.

Kulakov LA, Ksenzenko VN, Shlyapnikov MG, Kochetkov V, Del Casale A, Allen CCR, Larkin MJ, Ceysens PJ, Lavigne R. (2009). **Genomes of “φKMV-like viruses” of *Pseudomonas aeruginosa* contain localized single-strand interruptions**. *Virology*. 391: 1-4.

Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. (2010). **The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa***. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74: 621-641.

Kuzio J, Kropinski AM. (1983). **O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3**. *Journal of Bacteriology*. 155: 203-212.

LaBauve AE, Wargo MJ. (2012). **Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa***. *Current Protocols in Microbiology*. 6E.1.1-6E.1.8.

Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. (2010). **Bacteriophage resistance mechanisms.** *Nature reviews. Microbiology.* 8:317–327.

Lammens E, Ceysens PJ, Voet M, Hertveldt K, Lavigne R, Volckaert G. (2009). **Representational Difference Analysis (RDA) of bacteriophage genomes.** *Journal of Microbiological Methods.* 77: 207-213.

Lewin B, Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. (2011). **Lewin's Genes X.** *Jones and Bartlett.* EUA. pp. 769.

Lu MJ, Henning U. (1994). **Superinfection exclusion by T-even-type coliphages.** *Trends in Microbiology.* 2: 137-139.

Magnuson RD. (2007). **Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems.** *Journal of Bacteriology.* 189: 6089-8092.

Mahony J, McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. (2008). **Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes.** *Applied and Environmental Microbiology.* 74: 6206-6215.

Mandal SM, Roy A, Ghosh AK, Hazra TK, Basak A, Franco OL. (2014). **Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization.** *Frontiers in pharmacology.* 5:105.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (1982). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A. pp. 80-83.

Martínez-García E, Aparicio T, Goñi-Moreno A, Fraile S, de Lorenzo V. (2015). **SEVA 2.0: an update of the Standard European Vector Architecture for de-/reconstruction of bacterial functionalities**. *Nucleic Acids Research*. 43:D1183–D1189.

McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. (2002). **Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages**. *Molecular Microbiology*. 43: 509-520.

Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. (2005). **The microbial pan-genome**. *Current Opinion in Genetics & Development*. 15: 589-594.

Morgan GJ, Hatfull GF, Casjens S, Hendrix RW. (2002). **Bacteriophage Mu genome sequence: analysis and comparison with Mu-like prophages in *Haemophilus*, *Neisseria* and *Deinococcus***. *Journal of Molecular Biology*. 317: 337–359.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. (2019). **Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance**. *Frontiers in Microbiology*. 10: 539.

Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T. (1999). **The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of**

*Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular Microbiology*. 31: 399-419.

Newton GJ, Daniels C, Burrows LL, Kropinski AM, Clarke AJ, Lam JS. (2001). **Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3.** *Molecular Microbiology*. 39: 1237-1247.

Oppenheim AB, Kobiler O, Stavans J, Court DL, Adhya S. (2005). **Switches in Bacteriophage Lambda Development.** *Annual review in genetics*. 39: 409-429.

Pourcel C, Midoux C, Bourkaltseva M, Pleteneva E. (2016). **Complete genome sequence of PM105, a new *Pseudomonas aeruginosa* B3-like transposable phage.** *Genome Announcements*. 4:e01543-15

Ptashne M. (2004). **A genetic switch: phage lambda revisited.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Tercera Edición. EUA. pp. 14-15.

Qiu D, Damron FH, Mima T, Schweizer HP, Yu HD. 2008. **PBAD-based shuttle vector for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria.** *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 7422-7426.

Rehmat S, Shapiro JA. (1983). **Insertion and replication of the *Pseudomonas aeruginosa* mutator phage D3112.** *Molecular & General Genetics*. 192: 416-423.

Rigby CE, Cerqueira-Campos ML, Kelly HA, Surujballi OP. (1989). **Properties and partial genetic characterization of Nepean phage and other lytic phages of *Brucella* species.** *Canadian Journal of Veterinary Research.* 53: 319-325.

Roncero C, Darzins A, Casadaban MJ. (1990). ***Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophages D3112 and B3 require pili and surface growth for adsorption.** *Journal of Bacteriology.* 172: 1899-1904.

Rowland SJ, Dyke KGH. (1990). **Tn552, a novel transposable element from *Staphylococcus aureus*.** *Molecular Microbiology.* 4: 961-975.

Russell PJ. (2010). **iGenetics. A Molecular Approach.** Benjamin Cummings. Tercera Edición. EUA. pp 440.

Salmon KA, Freedman O, Ritchings BW, DuBow MS. (2000). **Characterization of the lysogenic repressor (c) gene of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112.** *Virology.* 272: 85-97.

Sambrook J, Russell DW. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Tercera Edición. Cold Spring Harbor Laboratory. E.U.A. Volumen 1. pp. 2.50, A1.17.

Samson JE, Magadán AH, Sabri M, Moineau S. (2013). **Revenge of the phages: Defeating bacterial defences.** *Nature reviews. Microbiology.* 11:675–687.

Segata N, Ballarini A, Jousson O. (2013). **Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA45, a Highly Virulent Strain Isolated from a Patient with Bloodstream Infection.** *Genome Announcements*. 1: e00289-13.

Segondy M, Allardet-Servent A, Caravano R, Ramuz M. (1988). **Common physical map of four *Brucella* bacteriophage genomes.** *FEMS Microbiology Letters*. 56: 177-181.

Sepúlveda-Robles OA. (2007). **Aislamiento y caracterización de fagos que infectan cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.** Tesis de Maestría. Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV. 76p.

-----, Kameyama L, Guarneros G. (2012a). **High Diversity and Novel Species of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages.** *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 4510-4515.

----- (2012b). **Diversidad de los bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*: aislamiento, caracterización e identificación de nuevas especies.** Tesis de Doctorado. Departamento de Genética y Biología, CINVESTAV. 69p.

Shapiro JA. (1979). **Molecular model for the transposition and replication of bacteriophage Mu and other transposable elements.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 1933-1937.

Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, de Las Heras A, Páez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nickel PI, Platero R, de Lorenzo V. (2013). **The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes.** *Nucleic Acids Research* 41:D666-D675.

Slayter HS, Holloway BW, Hall CE. (1964). **The structure of *Pseudomonas aeruginosa* phages B3, E79, and F116.** *Journal of Ultrastructure Research.* 11: 274-281.

Snyder L, Champness W. (2007). **Molecular Genetics of Bacteria.** ASM Press. Tercera Edición. Washington, D.C.; EUA. pp. 293, 352-356.

Sorek R, Kunin V, Hugenholtz P. (2008). **CRISPR – A widespread system that provides acquired resistance against phage in bacteria and archaea.** *Nature reviews. Microbiology.* 6: 181-186.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. (2001). **Bacteriophage therapy.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45: 649-659.

Summer EJ, Gonzalez CF, Carlisle T, Mebane LM, Cass AM, Savva CG, LiPuma J, Young R. (2004). ***Burkholderia cenocepacia* phage BcepMu and a family of Mu-like phages encoding potential pathogenesis factors.** *Journal of Molecular Biology.* 340: 49-65.



Sun X, Göhler A, Heller KJ, Neve H. (2006). **The *ltp* gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*.** *Virology*. 350: 146-157.

Susskind MM, Wright A, Botstein D. (1971). **Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. II. Genetic evidence for two exclusion systems.** *Virology*. 45: 638-652.

-----, Botstein D, Wright A. (1974). **Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter *sieA+* lysogens.** *Virology*. 62: 350-366.

Suttle CA. (2005). **Viruses in the sea.** *Nature*. 437: 356-361.

Taylor AL. (1963). **Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 50: 1043-1051.

Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z, Maxwell KL. (2019). **The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence.** *Advances in Virus Research*. 103: 1-31.

-----, (2007). **Marine viruses – major players in the global ecosystem.** *Nature reviews. Microbiology*. 5: 801-812.

Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli S V, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. (2005). **Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome"**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.102:13950–13955.

Toussaint A, Rice PA. (2017). **Transposable phages, DNA reorganization and transfer**. *Current Opinion in Microbiology*. 38: 88-94.

----- (2018). **Transposable Bacteriophages as Genetic Tools**. *Methods in Molecular Biology*. 1681: 263-278.

Tsao Y-F, Taylor VL, Kala S, Bondy-Denomy J, Khan AN, Bona D, Cattoir V, Lory S, Davidson AR, Maxwell KL. (2018). **Phage morons play an important role in *Pseudomonas aeruginosa* phenotypes**. *Journal of Bacteriology*. 200: 1-15.

Uc-Mass A, Jacinto-Loeza E, de la Garza M, Guarneros G, Hernández-Sánchez J, 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: 425-433.

Valderrey AD, Pozuelo MJ, Jiménez PA, Maciá MD, Oliver A, Rotger R. (2010). **Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 68: 20-27.

van de Putte P, Giphart-Gassler M, Goosen N, Goosen T, van Leerdam E. (1981). **Regulation of Integration and Replication Functions of Bacteriophage Mu.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 45: 347-353.

Wang PW, Chu L, Guttman DS. (2004). **Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112.** *Journal of Bacteriology*. 186: 400-410.

Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. (2008). **Molecular Biology of the Gene.** CSHL Press. Sexta Edición. New York, EUA. pp. 784-786.

Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS. (2011). ***Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes.** *Nucleic Acid Research*. 39: 596-600.

Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I, Paradis-Bleau C, Sanschagrín F, Thomson NR, Winsor GL, Quail MA, Lennard N, Bignell A, Clarke L, Seeger K, Saunders D, Harris D, Parkhill J, Hancock RE, Brinkman FS, Levesque RC. (2009). **Newly introduced genomic prophage islands are critical**

**determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*.** *Genome Research*. 19: 12-23.

Yu YT, Snyder L. (1994). **Translation elongation factor Tu cleaved by a phage-exclusion system.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 802-806.

## **SITIOS ELECTRÓNICOS**

*Estructura general de los plásmidos pSEVA*, Standard European Vector Architecture 3.0 (consultado junio 2020). Disponible en el sitio:  
<http://seva.cnb.csic.es/backbone-modules-nomenclature/>

*Etapas del proceso de infección de los fagos*, Lumen Learning: Microbiology (consultado junio 2020). Disponible en el sitio:  
<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/the-viral-life-cycle/>

*Taxonomía de los virus (2020)*, base de datos del ICTV (consultado junio 2020). Disponible en la página:  
<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

*Taxonomía y tamaño del genoma de P. aeruginosa*, NCBI (consultado junio 2020). Disponible en la página:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Pseudomonas+aeruginosa>

## **ANEXOS**

*A.1 Preparación de Medios.*

### **Agar suave (Stab Agar)**

**Un litro** se prepara con: Bacto-nutrient broth (10 g), Bacto-agar (6 g) y NaCl (8 g). El medio preparado se esteriliza en autoclave (Carballo-Ontiveros, 2012).

### **Medio LB (Luria-Bertani)**

**Un litro** se prepara con: Bacto-triptona (10 g), Extracto de levadura (5 g) y NaCl (5 g). En caso de preparar **cajas**, se añade Agar (15 g). El medio preparado se esteriliza en autoclave (Sepúlveda-Robles, 2007).

### **Medio Tφ**

**Un litro** se prepara con: Triptona (10 g), Agar (10 g), NaCl (2.5 g), NaOH [2M] (2 mL) y MgSO<sub>4</sub> [1M] (10 mL). En caso de preparar **cajas**, no se añade MgSO<sub>4</sub> (Cocina Bacteriológica, DGBM-CINVESTAV, datos no pub).

### **Medio SM**

**Un litro** se prepara con: NaCl (11.7 g), Gelatina (1 g), Tris-HCl [1M] a pH 8.0 (1 mL) y MgSO<sub>4</sub> [1M] (0.5 mL). La mezcla se ajusta a un pH de 7.4 con HCl (*Medio TMG-SM* de la Cocina Bacteriológica, DGBM-CINVESTAV, datos no pub).

## *A.2 Equipos*

### **Ultracongelador Panasonic.**

Modelo: MDF-U53VA-PA (VIP Series)

### **Vórtex Lab-Line Instruments, Inc.**

Modelo: Super-Mixer No. 1290.

### **Shaker New Brunswick Scientific.**

Modelo: G76D Gyrotory® Water Bath Shaker.

**Incubadora Binder.**

Modelo: Serie B (Classic Line).

**Centrífuga Eppendorf®.**

Modelo: 5415R (con refrigeración).

**Refractómetro ATAGO**

Modelo: R-5000

**Ultracentrífuga Beckman Coulter**

Modelo: Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge.

**Espectrofotómetro NanoDrop™ Thermo Fisher Scientific**

Modelo: 2000/2000c

**Concentrador SpeedVac® Thermo Savant**

Modelo: DNA120

**Incubador Eppendorf®**

Modelo: ThermoStat Plus

**Fuente de poder Bio-Rad® para cámaras**

Modelo: PowerPAC 300

**Cámara de Electroforesis Select BioProducts.**

Modelo: SBE1007-7

### **Transiluminador acoplado a un sistema de captura digital UVP®**

Modelo: Benchtop UV Transilluminator M-20

### **Termociclador Bio-Rad®**

Modelo: T100™ Thermal Cycler

### **Electroporador Bio-Rad®**

Modelo: Gene Pulser™

### **Fotómetro de llama Zeiss**

Modelo: PF5

## *A.3 Preparación de Soluciones, Buffers y Geles.*

### **Soluciones de CsCl**

Las soluciones de CsCl (peso molecular=168.37) empleadas fueron de [0.71M], [2.49M], [4.13M] y [5.82M]. Estas concentraciones corresponden a una densidad de 1.08, 1.31, 1.51 y 1.72; respectivamente. La densidad de las soluciones se corroboró mediante la lectura del índice de refracción (ver *A.4 Tablas Suplementarias*) con ayuda de un refractómetro (ver *A.2 Equipos*).

### **Solución Tfb I**

**500mL** se preparan con: KOAc [5M] (3 mL), RbCl<sub>2</sub> (6 g), CaCl<sub>2</sub> [1M] (5 mL), MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O [2M] (12.5 mL) y glicerol al 100% (75 mL). La solución se ajusta a un pH de 5.8 con ácido acético y se ajusta con H<sub>2</sub>O destilada. Se debe esterilizar por filtración o autoclave (Green & Roger, 2013).

## **Solución Tfb II**

**500mL** se preparan con: MOPs o PIPES (1g), CaCl<sub>2</sub> [1M] (37.5 mL), RbCl<sub>2</sub> [0.5M] (10 mL) y glicerol al 100% (75 mL). La solución se ajusta a un pH entre 6.5 - 6.8 con KOH / NaOH y se ajusta con H<sub>2</sub>O destilada. Se debe esterilizar por filtración o autoclave (Green & Roger, 2013).

## **Buffer de diálisis**

**Un litro** se prepara con: Tris-HCl [2M] a pH 8.0 (25 mL), NaCl [4M] (2.5 mL) y MgCl<sub>2</sub> [4M] (2.5 mL). La solución se afora con H<sub>2</sub>O destilada (Sepúlveda-Robles, 2012b).

## **Buffer TAE [50x]**

**Un litro** se prepara con: Tris-base (242 g), ácido acético glacial (57.1 mL) y EDTA [0.5M] a pH 8.0 (100 mL). La solución se afora con H<sub>2</sub>O destilada y debe presentar un pH = 8.5 (Sambrook & Russell, 2001).

## **Geles de Agarosa**

**Un gel al 1% de 100mL** se prepara con: Agarosa (1 g) y H<sub>2</sub>O destilada (100 mL). Se calienta la mezcla en un horno de microondas por 2 minutos para derretir la agarosa. La mezcla se coloca en una probeta y se adiciona TAE [50X] (2 mL). Al final, se afora con H<sub>2</sub>O destilada hasta alcanzar nuevamente 100 mL. La mezcla se vierte en el molde para geles y se deja solidificar por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C), o bien, por 10-15 minutos a 4°C. Cuando se corre el gel debe ir sumergido en la cámara de electroforesis con Buffer TAE [1x].



#### A.4 Tablas Suplementarias

**Tabla de datos de concentración, densidad e índices de refracción de CsCl a 25°C.**

Density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>*</sup>	Refractive Index, $n_D$	% by Weight	mg/ml of Solution <sup>**</sup>	Molarity	Density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>*</sup>	Refractive Index, $n_D$	% by Weight	mg/ml of Solution <sup>**</sup>	Molarity
1.0047	1.3333	1	10.0	0.056	1.336	1.3657	34	454.2	2.698
1.0125	1.3340	2	20.2	0.119	1.3496	1.3670	35	472.4	2.806
1.0204	1.3348	3	30.6	0.182	1.363	1.3683	36	490.7	2.914
1.0284	1.3356	4	41.1	0.244	1.377	1.3696	37	509.5	3.026
1.0365	1.3364	5	51.8	0.308	1.391	1.3709	38	528.6	3.140
1.0447	1.3372	6	62.8	0.373	1.406	1.3722	39	548.3	3.257
1.0531	1.3380	7	73.7	0.438	1.4196	1.3735	40	567.8	3.372
1.0615	1.3388	8	84.9	0.504	1.435	1.3750	41	588.4	3.495
1.0700	1.3397	9	96.3	0.572	1.450	1.3764	42	609.0	3.617
1.0788	1.3405	10	107.9	0.641	1.465	1.3778	43	630.0	3.742
1.0877	1.3414	11	119.6	0.710	1.481	1.3792	44	651.6	3.870
1.0967	1.3423	12	131.6	0.782	1.4969	1.3807	45	673.6	4.001
1.1059	1.3432	13	143.8	0.854	1.513	1.3822	46	696.0	4.134
1.1151	1.3441	14	156.1	0.927	1.529	1.3837	47	718.6	4.268
1.1245	1.3450	15	168.7	1.002	1.546	1.3852	48	742.1	4.408
1.1340	1.3459	16	181.4	1.077	1.564	1.3868	49	766.4	4.552
1.1437	1.3468	17	194.4	1.155	1.5825	1.3885	50	791.3	4.700
1.1536	1.3478	18	207.6	1.233	1.601	1.3903	51	816.5	4.849
1.1637	1.3488	19	221.1	1.313	1.619	1.3920	52	841.9	5.000
1.1739	1.3498	20	234.8	1.395	1.638	1.3937	53	868.1	5.156
1.1843	1.3508	21	248.7	1.477	1.658	1.3955	54	895.3	5.317
1.1948	1.3518	22	262.9	1.561	1.6778	1.3973	55	922.8	5.481
1.2055	1.3529	23	277.3	1.647	1.699	1.3992	56	951.4	5.651
1.2164	1.3539	24	291.9	1.734	1.720	1.4012	57	980.4	5.823
1.2275	1.3550	25	306.9	1.823	1.741	1.4032	58	1009.8	5.998
1.2387	1.3561	26	322.1	1.913	1.763	1.4052	59	1040.2	6.178
1.2502	1.3572	27	337.6	2.005	1.7846	1.4072	60	1070.8	6.360
1.2619	1.3584	28	353.3	2.098	1.808	1.4093	61	1102.9	6.550
1.2738	1.3596	29	369.4	2.194	1.831	1.4115	62	1135.8	6.746
1.2858	1.3607	30	385.7	2.291	1.856	1.4137	63	1167.3	6.945
1.298	1.3619	31	402.4	2.390	1.880	1.4160	64	1203.2	7.146
1.311	1.3631	32	419.5	2.492	1.9052	1.4183	65	1238.4	7.355
1.324	1.3644	33	436.9	2.595					

Tomado de Sepúlveda-Robles (2012b).

#### A.5 Detalles Técnicos

**Enzima BspHI:** Este enzima se utilizó debido a que los extremos que genera su secuencia de corte son compatibles con los extremos que genera la enzima NcoI. Ésta última contiene el codón de inicio ATG que presentan los MCS de algunos plásmidos, como es el caso de pHERD30T. **NOTA:** Una vez unidos los extremos generados por ambas enzimas, se pierde la secuencia de corte.

5'... T<sup>▼</sup>C A T G A ...3'  
3'... A G T A C<sup>▲</sup>T ...5'

*Bsp*HI

5'... C<sup>▼</sup>C A T G G ...3'  
3'... G G T A C<sup>▲</sup>C ...5'

*Nco*I

**Preparación de células quimiocompetentes en *E. coli*:** Para que el método de Green & Rogers (2013) funcione óptimamente es importante respetar la cadena de frío (4°C) en la que se mantiene a las células en todo momento. Esto es, tanto las soluciones Tfb I y Tfb II, como los tubos y otro material con el que se manipula a las células (ejemplo: pipetas) también deben de estar en frío.

**Electroporación de células electrocompetentes en *P. aeruginosa*:** Para que el método de Choi *et al.* (2006) funcione óptimamente es necesario respetar la cadena de frío (4°C) durante la incubación de las clonaciones con las células de *P. aeruginosa*. Por lo mismo, es necesario que el material se encuentre frío, esto incluye a las puntas de micropipetas y a las celdas de 0.2 cm de Bio-Rad®.

**Cantidad de DNA a electroporar en *P. aeruginosa*:** La cantidad de DNA que se puede utilizar depende de la cepa. Para Ps33 se puede utilizar como mínimo 20 ng. Sin embargo, para otras se requiere más cantidad. Por ejemplo, la cepa PA14 requiere un mínimo de 1000 ng para ser electroporada exitosamente.

**Restricción con las enzimas *Hind*III, *Asc*I, *Fse*I y *Mfe*I:** Las enzimas *Hind*III, *Asc*I y *Fse*I pueden dejarse restringiendo toda la noche. La excepción a esto es la enzima *Mfe*I, la cual presente actividad estrella al igual que *Eco*RI. Las cuatro enzimas restringen a una temperatura de 37°C.

**Ensayo de eflujo de K<sup>+</sup>:** La metodología de este ensayo debe realizarse siempre a temperatura ambiente. En caso de aplicar frío (4°C), el fenómeno de eflujo de potasio se invierte. Esto consiste en que las células liberan el K<sup>+</sup> independientemente de un proceso de infección (*Depleción de K<sup>+</sup>*), y conforme pasa el tiempo el K<sup>+</sup> se reabsorbe.

## A.6 Secuencia del plásmido pSEVA55\*.

La siguiente información corresponde a la secuencia del plásmido pSEVA55\*, la cual puede introducirse en un archivo de Bloc de notas para su visualización en el software Artemis.

```
T CDS      1..8
FT         /note="Fsel"
FT rep_origin complement(9..3222)
FT         /note="RSF1010"
FT CDS      3683..3690
FT         /note="Ascl"
FT CDS      3847..4965
FT         /gene="tetA"
```

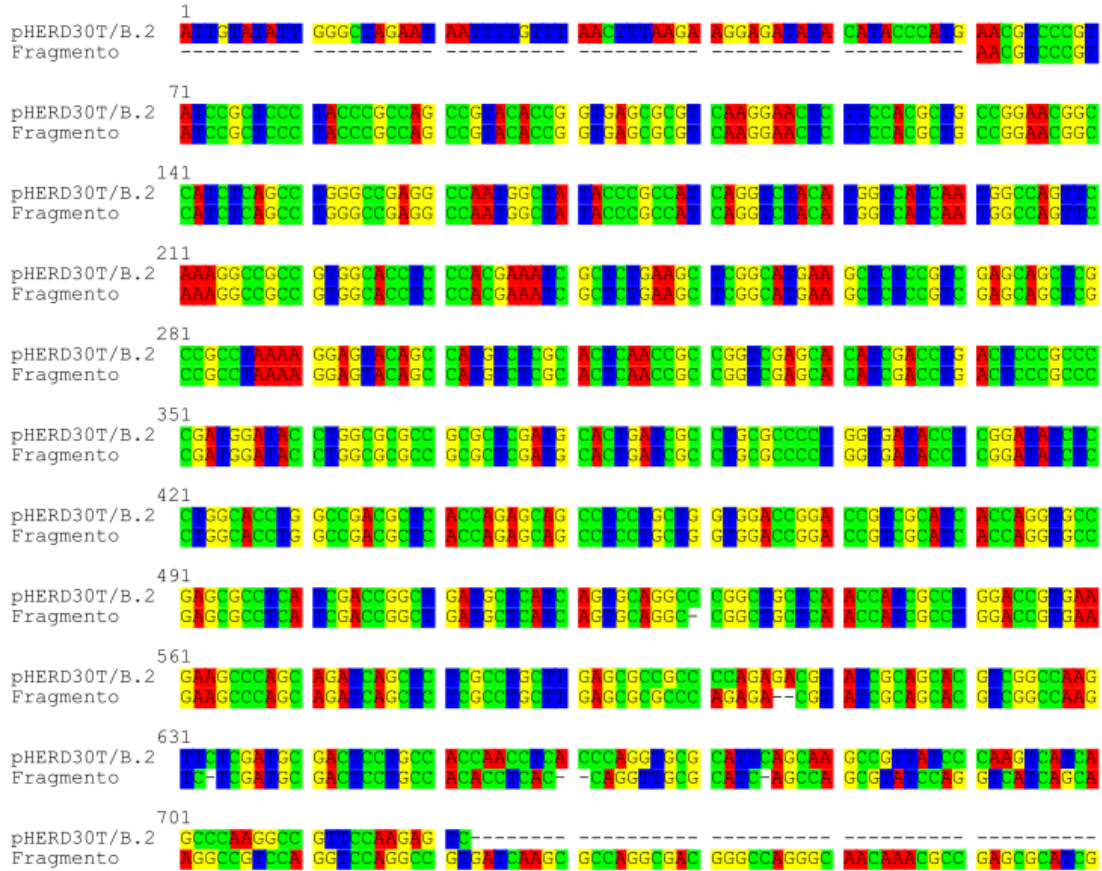
```
GGCCGGCCTCAGCCTGCCGCCTTGGGCCGGGTGATGTCGTACTTGCCCGCCGCGAACTCG
GTTACCGTCCAGCCCAGCGCGACCAGCTCCGGCAACGCCTCGCGCACCCGCTGGCGGGCGC
TTGCGCATGGTCGAACCCTGGCCTCTGACGGCCAGACATAGCCGCACAAGGTATCTATG
GAAGCCTTGCCGGTTTTGCCGGGGTCGATCCAGCCACACAGCCGCTGGTGCAGCAGGCGG
GCGGTTTCGCTGTCCAGCGCCCGCACCTCGTCCATGCTGATGCGCACATGCTGGCCGCCA
CCCATGACGGCCTGCGCGATCAAGGGGTTTCAGGGCCACGTACAGGCGCCCGTCCGCCTCG
TCGCTGGCGTACTCCGACAGCAGCCGAAACCCCTGCCGCTTGC GGCCATTCTGGGCGATG
ATGGATACCTTCCAAAGGCGCTCGATGCAGTCCTGTATGTGCTTGAGCGCCCCACCACTA
TCGACCTCTGCCCCGATTTCCCTTTGCCAGCGCCCGATAGCTACCTTTGACCACATGGCAT
TCAGCGGTGACGGCCTCCCACTTGGGTTCCAGGAACAGCCGGAGCTGCCGTCCGCCTTCG
GTCTTGGGTTCCGGGCCAAGCACTAGGCCATTAGGCCAGCCATGGCCACCAGCCCTTGC
AGGATGCGCAGATCATCAGCGCCCAGCGGCTCCGGGCCGCTGAACTCGATCCGCTTGCCG
TCGCCGTAGTCATACGTCACGTCCAGCTTGTGCGCTTGC GCTCGCCCCGCTTGAGGGCA
```

CGGAACAGGCCGGGGCCAGACAGTGCGCCGGTTCGTGCCGGACGTGGCTGAGGCTGTGC  
TTGTTCTTAGGCTTCACCACGGGGCACCCCCTTGCTCTTGCGCTGCCTCTCCAGCACGGC  
GGGCTTGAGCACCCCGCCGTCATGCCGCCTGAACCACCGATCAGCGAACGGTGCGCCATA  
GTTGGCCTTGCTCACACCGAAGCGGACGAAGAACCGGCGCTGGTCGTTCACACCCCA  
TTCTCGGCCTCGGGCGCTGGTCATGCTCGACAGGTAGGACTGCCAGCGGATGTTATCGAC  
CAGTACCGAGCTGCCCCGGCTGGCCTGCTGCTGGTCGCTGCGCCATCATGGCCGCGCC  
CTTGCTGGCATGGTGCAGGAACACGATAGAGCACCCGGTATCGGCGGGGATGGCCTCCAT  
GCGACCGATGACCTGGGCCATGGGGCCGCTGGCGTTTTCTTCCTCGATGTGGAACCGGCG  
CAGCGTGTCCAGCACCATCAGGCGGGCGCCCTCGGCGGGCGGCTTGAGGCCGTGGAACCA  
CTCCGGGGCCATGATGTTGGGCAGGCTGCCGATCAGCGGCTGGATCAGCAGGCCGTGAGC  
CACGGCTTGCCGTTCTCGGGCGCTGAGGTGCGCCCCAAGGGCGTGCAGGCCGTGATGAAT  
GGCGGTGGGCGGGTCTTCGGCGGGCAGGTAGATCACCGGGCCGGTGGGCAGTTCGCCAC  
CTCCAGCAGATCCGGCCCGCCTGCAATCTGTGCGGCCAGTTGCAGGGCCAGCATGGATTT  
ACCGGCACCACCGGGCGACACCAGCGCCCCGACCGTACCGGCCACCATGTTGGGCAAAC  
GTAGTCCAGCGGTGGCGGGCGCTGCTGCGAACGCCTCCAGAATATTGATAGGCTTATGGGT  
AGCCATTGATTGCCTCCTTTGCAGGCAGTTGGTGGTTAGGCGCTGGCGGGGTCACTACCC  
CCGCCCTGCGCCGCTCTGAGTTCTTCAGGCACTCGCGCAGCGCCTCGTATTCGTGTCG  
GTCAGCCAGAACTTGCGCTGACGCATCCCTTTGGCCTTCATGCGCTCGGCATATCGCGCT  
TGGCGTACAGCGTCAGGGCTGGCCAGCAGGTCGCCGGTCTGCTTGTCTTTTGGTCTTTC  
ATATCAGTCACCGAGAACTTGCCGGGGCCGAAAGGCTTGTCTTCGCGGAACAAGGACAA  
GGTGCAGCCGTCAAGGTTAAGGCTGGCCATATCAGCGACTGAAAAGCGGCCAGCCTCGGC  
CTTGTTTGACGTATAACCAAAGCCACCGGGCAACCAATAGCCCTTGTCACCTTTGATCAG  
GTAGACCGACCCTGAAGCGCTTTTTTCGTATTCCATAAAAACCCCTTCTGTGCGTGAGTA  
CTCATAGTATAACAGGCGTGAGTACCAACGCAAGCACTACATGCTGAAATCTGGCCCCCC  
CCTGTCCATGCCTCGCTGGCGGGGTGCCGGTGGCCGTCAGCTCGGCCCGCGCAAGCTG  
GACGCTGGGCAGACCCATGACCTTGCTGACGGTGCCTCGATGTAATCCGCTTCGTGGCC

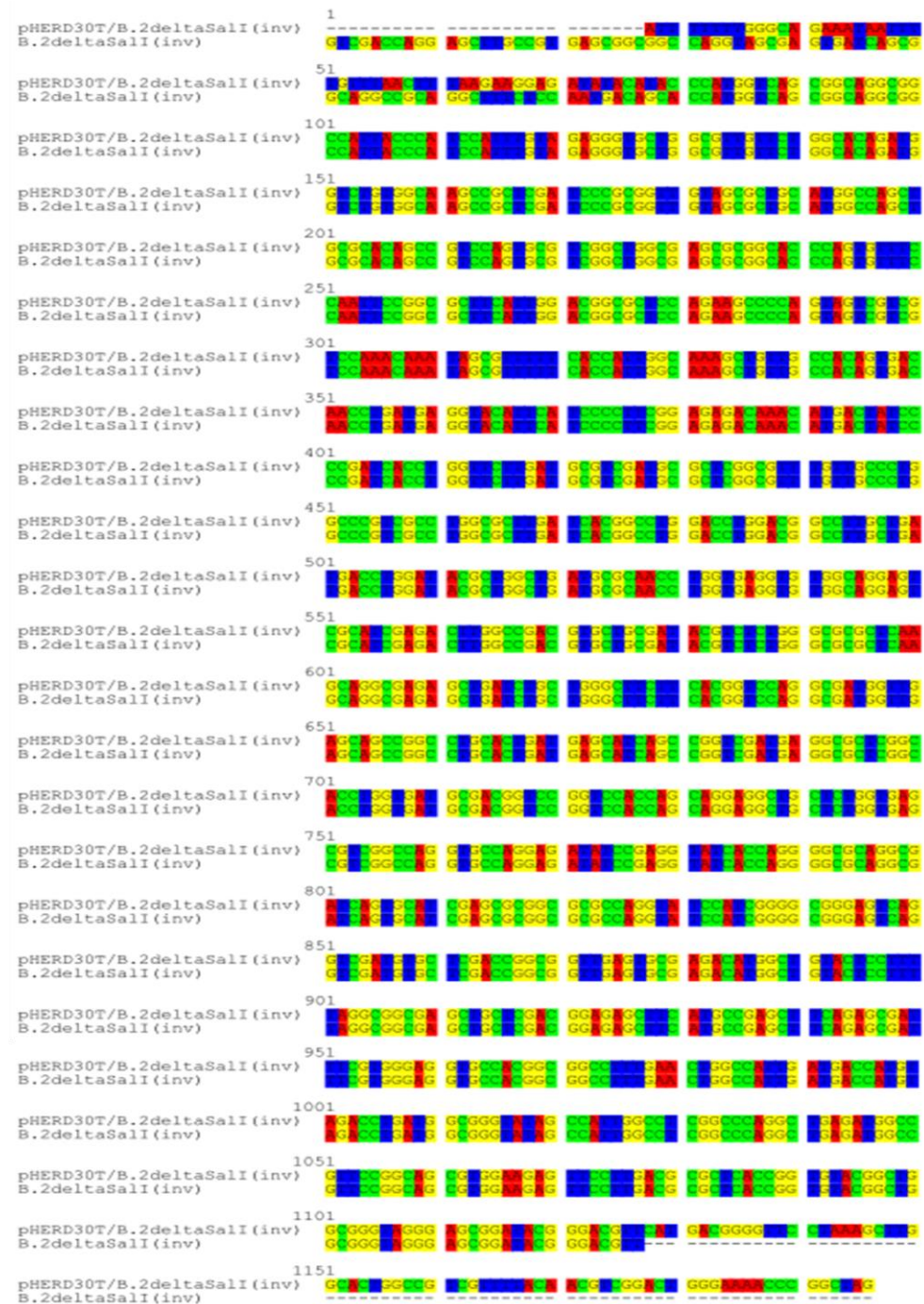
GGGCTTGCCTCTGCCAGCGCTGGGCTGGCCTCGGCCATGGCCTTGCCGATTTCTCGGC  
ACTGCGGCCCCGGCTGGCCAGCTTCTGCGCGGCGATAAAGTCGCACTTGCTGAGGTCATC  
ACCGAAGCGCTTGACCAGCCCGGCCATCTCGCTGCGGTACTCGTCCAGCGCCGTGCGCCG  
GTGGCGGCTAAGCTGCCGCTCGGGCAGTTCGAGGCTGGCCAGCCTGCGGGCCTTCTCCTG  
CTGCCGCTGGGCTGCTCGATCTGCTGGCCAGCCTGCTGCACCAGCGCCGGGCCAGCGGT  
GGCGGTCTTGCCCTTGGATTACGCAGCAGCACCCACGGCTGATAACCGGCGCGGGTGGT  
GTGCTTGTCTTGGCGTTGGTGAAGCCCGCCAAGCGGCCATAGTGGCGGCTGTCGGCGCT  
GGCCGGGTGCGCGTCTACTCGCTGGCCAGCGTCCGGGCAATCTGCCCCCGAAGTTCACC  
GCCTGCGGCGTCCGCCACCTTGACCCATGCCTGATAGTTCTTCGGGCTGGTTTCCACTAC  
CAGGGCAGGCTCCCGGCCCTCGGCTTTCATGTCATCCAGGTCAAACCTCGCTGAGGTCGTC  
CACCAGCACCAGACCATGCCGCTCCTGCTCGGCGGGCCTGATATACACGTCATTGCCCTG  
GGCATTTCATCCGCTTGAGCCATGGCGTGTCTGGAGCACTTCGGCGGCTGACCATTCCCG  
GTTTCATCATCTGGCCGGTGGTGGCGTCCCTGACGCCGATATCGAAGCGCTCACAGCCCAT  
GGCCTTGAGCTGTCGGCCTATGGCCTGCAAAGTCTGTGCTTCTTCATCGGGCCACCAAG  
CGATTCCCACACATTATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTAGATCCGAAGGATG  
AGCCGGGCTGAATGATCGACCGAGACAGGCCCTGCGGGGCTGCACACGCGCCCCACCCT  
TCGGGTAGGGGAAAGGCCGCTAAAGCGGCTAAAGCGCTCCAGCGTATTTCTGCGGGGT  
TTGGTGTGGGGTTTAGCGGGCTTTGCCCGCCTTTCCCCCTGCCGCGCAGCGGTGGGGCGG  
TGTGTAGCCTAGCGCAGCGAATAGACCAGCTATCCGGCCTCTGGCCGGGCATATTGGGCA  
AGGGCAGCAGCGCCCCACAAGGGCGCTGATAACCGCGCCTAGTGGATTATTCTTAGATAA  
TCATGGATGGATTTTTCCAACACCCCGCCAGCCCCCGCCCTGCTGGGTTTGCAGGTTTG  
GGGGCGTGACAGTTATTGCAGGGGTTTCGTGACAGTTATTGCAGGGGGGCGTGACAGTTAT  
TGCAGGGGTTTCGTGACAGTTAGGGCGCGCCATTTAAATTTGACAGCTTATCATCGATAAA  
CTGTAATGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGGCACCGTGTATGAAA  
TCTAACAATGCGCTCATCGTCATCCTCGGCACCGTCACCCTGGATGCTGTAGGCATAGGC  
TTGGTTATGCCGGTACTGCCGGGCTCTTGGGGATATCGTCCATTCCGACAGCATCGCC

AGTCACTATGGCGTGCTGCTAGCGCTATATGCGTTGATGCAATTTCTATGCGCACCCGTT  
CTCGGAGCACTGTCCGACCGCTTTGGCCGCCGCCAGTCCTGCTCGCTTCGCTACTTGGA  
GCCACTATCGACTACGCGATCATGGCGACCACACCCGTCCTGTGGATTCTCTACGCCGGA  
CGCATCGTGGCCGGCATACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCTGGCGCCTATATCGCCGAC  
ATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTCGGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTG  
GGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCCGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCCTGCACGCACCA  
TTCCTTGCGGCGGGCGGTGCTCAACGGCCTAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAG  
GAGTCGCATAAGGGAGAGCGCCGTCCGATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCC  
TTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACCATTGTGGCCGCACTTATGACTGTCTTCTTTATCATG  
CAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCGC  
TGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCGGTATTCGGAATCTTGACGCCCCTCGCT  
CAAGCCTTCGTCACTGGTCCCGCCACCAAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCC  
GGCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATG  
GCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCC  
ATGCTGTCCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCT  
CTTACCAGCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCG  
GCGAGCACATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTC  
CCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAGACAATTGTC

#### *A.7 Alineamiento de clonas*

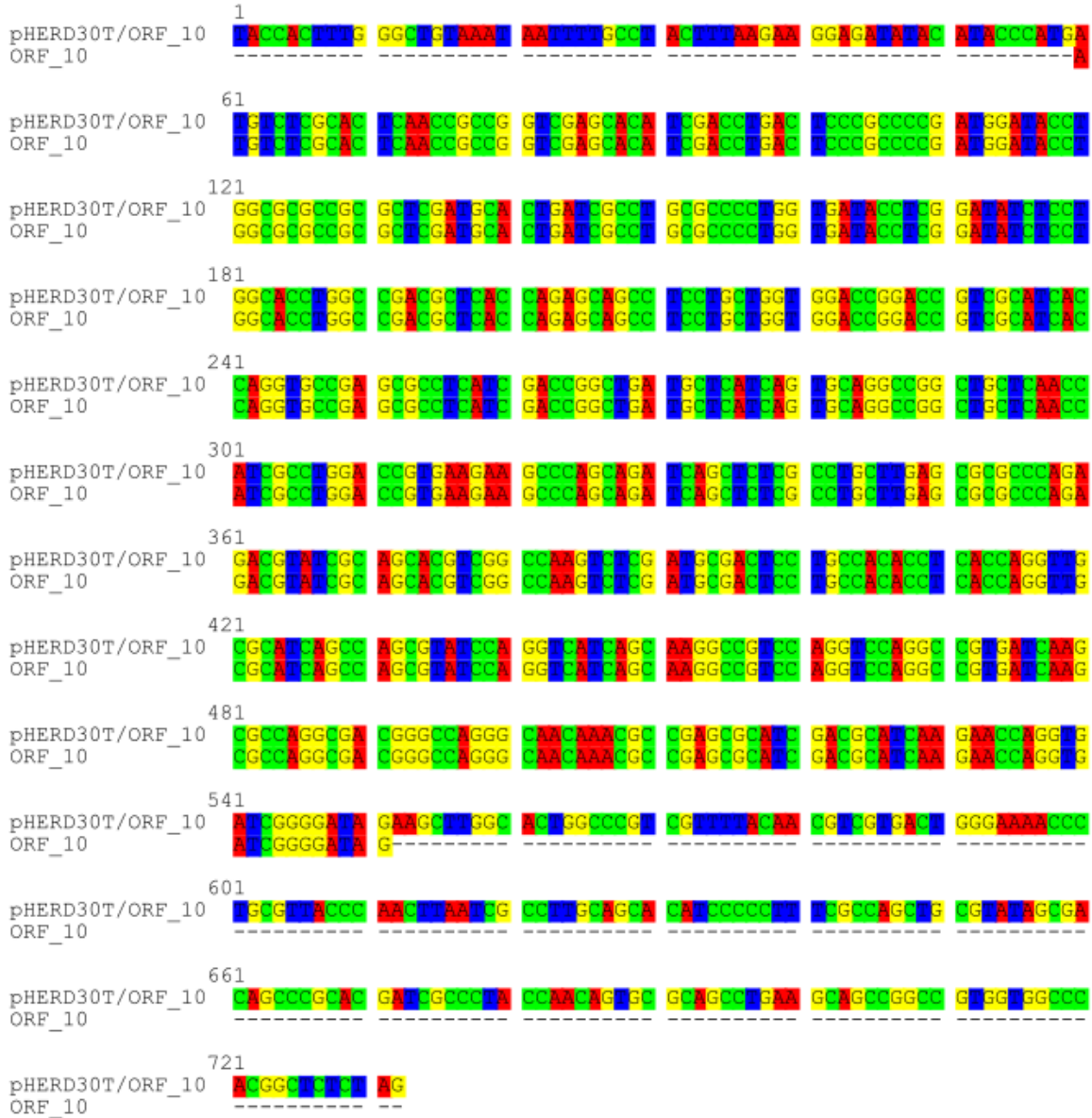


**Alineamiento del fragmento B.2 clonado en pHERD30T.** Con el propósito de confirmar la clonación del fragmento proveniente del genoma de Ps56, solamente se realizó la secuenciación de ésta en sentido *forward* (utilizando el *primer* pHERD#T\_MCS\_Fwd). Por esta razón no se observa la secuencia completa del fragmento B.2, además de que presenta un tamaño de 2845 bp.

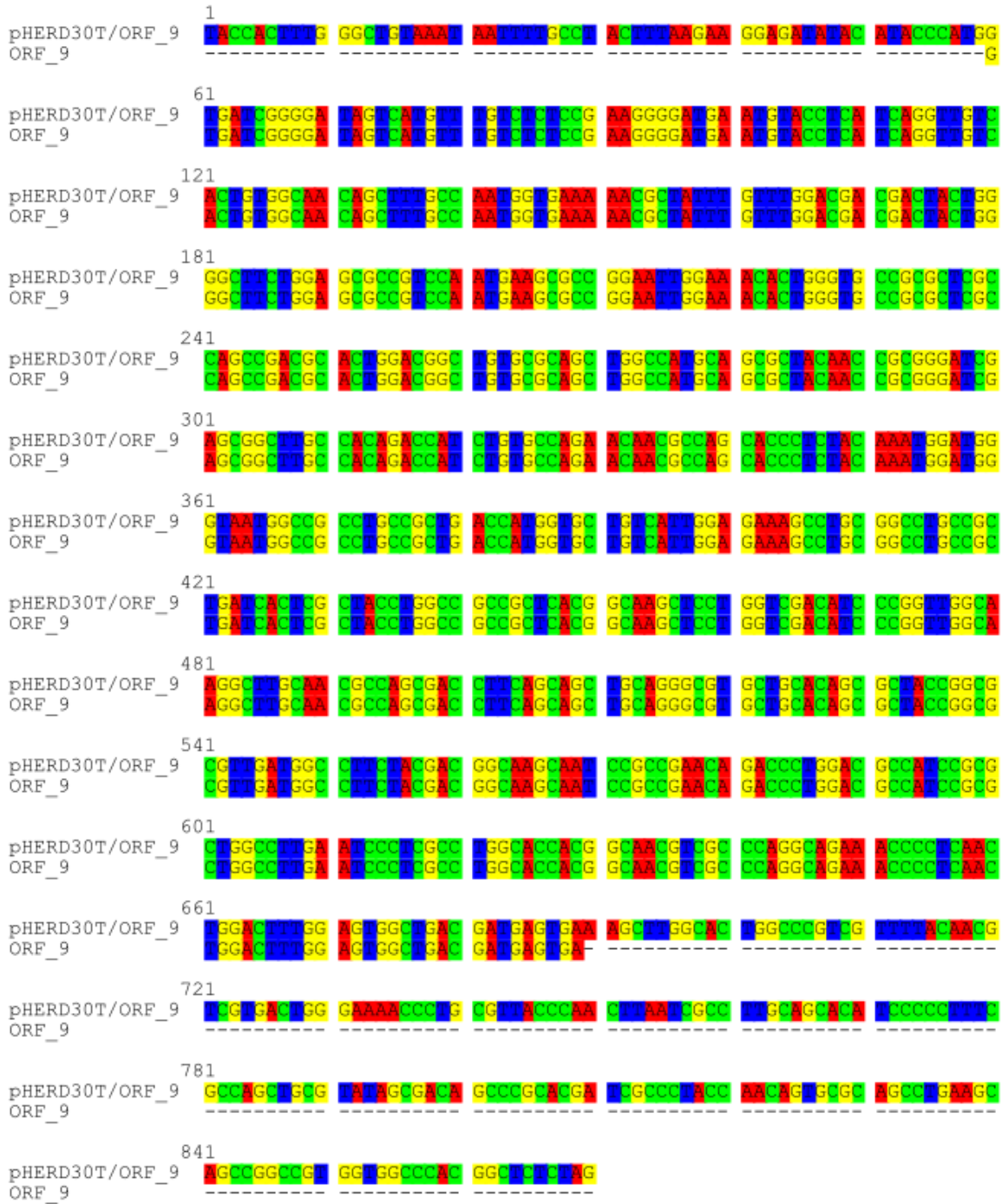


**Alineamiento de B.2SaII(inv) clonado en pHERD30T.** El alineamiento se realizó con la secuencia reversa complementaria de B.2SaII(inv) y el producto de la secuenciación de la clona tanto en sentido *forward* como en *reverse*. Se utilizaron los *primers* pHERD#T\_MCS\_Fwd y pHERD#T\_Rev\_preMCS.

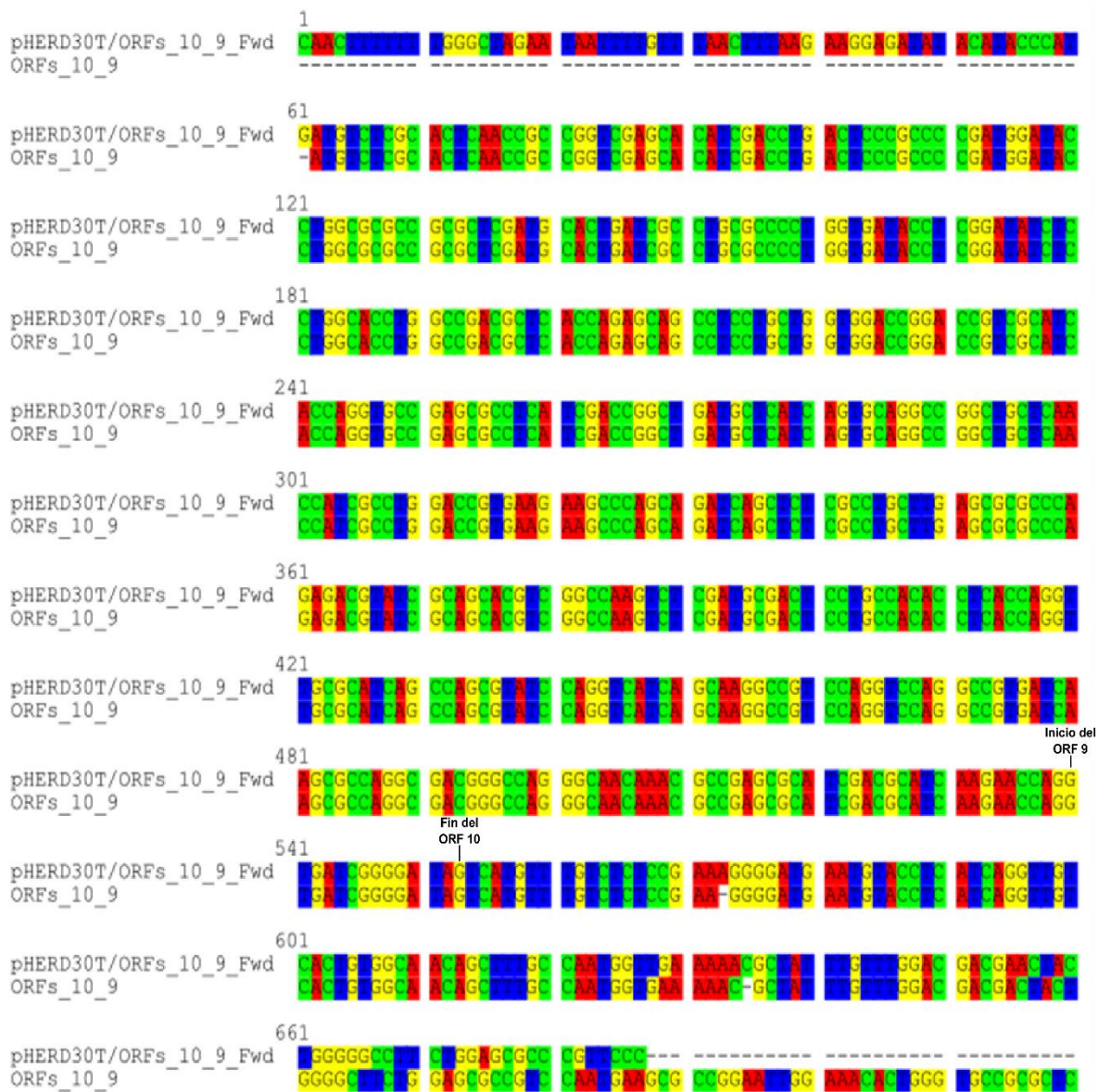




**Alineamiento del ORF 10 clonado en pHERD30T.** El alineamiento se realizó con la secuenciación de la clona tanto en sentido *forward* como en *reverse*. Se utilizaron los *primers* pHERD#T\_MCS\_Fwd y pHERD#T\_Rev\_preMCS.



**Alineamiento del ORF 9 clonado en pHERD30T.** El alineamiento se realizó con la secuenciación de la clona tanto en sentido *forward* como en *reverse*. Se utilizaron los *primers* pHERD#T\_MCS\_Fwd y pHERD#T\_Rev\_preMCS.



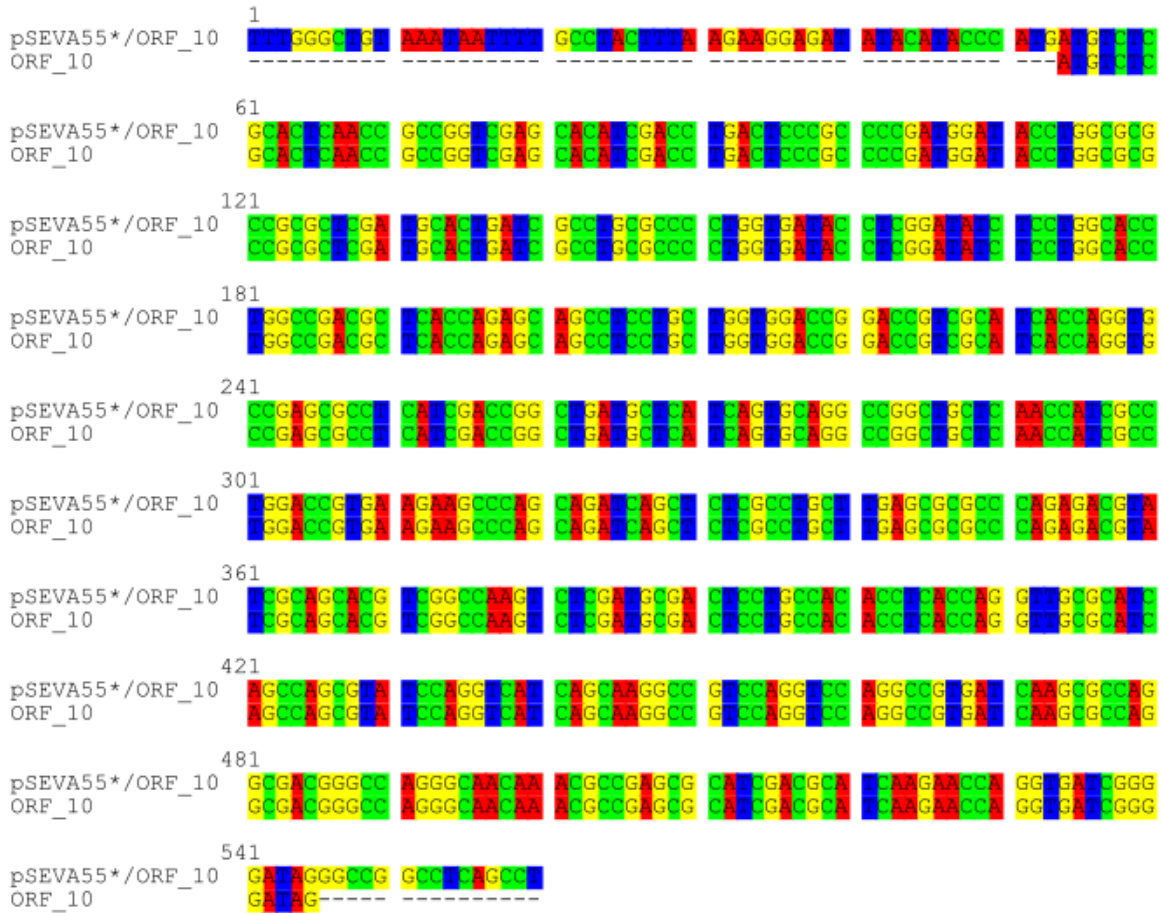
### Alineamiento de la secuenciación en *forward* de los ORFs 10 y 9 en pHERD30T.

La secuenciación logró abarcar al ORF 10 y el inicio del ORF 9 con el *primer* pHERD#T\_MCS\_Fwd. La secuencia de este último ORF se pudo leer con el *primer reverse* (pHERD#T\_Rev\_preMCS).



### Alineamiento de la secuenciación en *reverse* de los ORFs 10 y 9 en pHERD30T.

El alineamiento se realizó con la secuencia reversa complementaria del producto de la secuenciación en *reverse* utilizando el *primer* pHERD#T\_Rev\_preMCS. Ésta abarca el resto de la secuencia del ORF 9 que no se logró abarcar con el *primer forward* (pHERD#T\_MCS\_Fwd).



**Alineamiento del ORF 10 clonado en pSEVA55\*.** Para confirmar la clonación del ORF 10 en pSEVA55\* sólo se pudo realizar la secuenciación con el *primer forward* (pHERD#T\_MCS\_Fwd) debido a que esta clona abarca el promotor pBAD de pHERD30T y el *primer* en cuestión puede alinearse con dicha secuencia. Se carece de un *primer reverse* que pueda alinearse con pSEVA55\*.

## A.8 Resultados de BLASTp de los ORFs 9 y 10.

Sequences producing significant alignments							Download	Manage Columns	Show	
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected							GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein PA39016_000840085 [Pseudomonas aeruginosa 39016]</a>	437	437	100%	1e-154	100.00%	<a href="#">EFQ38282.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein HMPREFV_HMPID9847gp0018 [Pseudomonas phage JBD25]</a>	437	437	100%	3e-154	100.00%	<a href="#">YP_009168743.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein Ps56_18 [Pseudomonas phage Ps56]</a>	432	432	100%	5e-153	99.52%	<a href="#">AYD80438.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein PACI27_6123 [Pseudomonas aeruginosa CI27]</a>	373	373	100%	5e-129	91.87%	<a href="#">EKA38561.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein vBPaeSS2019XII_044 [Pseudomonas phage vB_Pae-SS2019XII]</a>	352	352	100%	1e-120	87.08%	<a href="#">QGF21188.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: <a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas]</a>	336	336	77%	1e-115	100.00%	<a href="#">WP_023127890.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	334	334	77%	5e-115	99.38%	<a href="#">WP_071576297.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	333	333	77%	1e-114	98.77%	<a href="#">WP_033967144.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	333	333	77%	2e-114	98.77%	<a href="#">WP_031636324.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	332	332	77%	3e-114	98.15%	<a href="#">WP_023123663.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	332	332	77%	5e-114	98.15%	<a href="#">WP_058355325.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	331	331	77%	6e-114	98.77%	<a href="#">WP_116806582.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	331	331	77%	9e-114	97.53%	<a href="#">WP_073656749.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	331	331	77%	1e-113	98.15%	<a href="#">WP_023132006.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: <a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas]</a>	330	330	77%	2e-113	97.53%	<a href="#">WP_010791820.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	329	329	77%	3e-113	97.53%	<a href="#">WP_061363258.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	328	328	77%	9e-113	98.15%	<a href="#">WP_124867015.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	313	313	77%	7e-107	93.21%	<a href="#">WP_039843309.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	313	313	77%	7e-107	92.59%	<a href="#">WP_179063023.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: <a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas]</a>	313	313	77%	8e-107	91.36%	<a href="#">WP_078458511.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	312	312	77%	2e-106	92.59%	<a href="#">WP_023442737.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	312	312	77%	2e-106	92.59%	<a href="#">WP_124188831.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	311	311	77%	5e-106	91.98%	<a href="#">WP_116819749.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	311	311	77%	6e-106	91.98%	<a href="#">WP_094226441.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	311	311	77%	6e-106	91.98%	<a href="#">WP_083557070.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	311	311	77%	7e-106	91.98%	<a href="#">WP_132650632.1</a>			
<input checked="" type="checkbox"/>	MULTISPECIES: <a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas]</a>	311	311	77%	9e-106	91.98%	<a href="#">WP_023102424.1</a>			

**Búsqueda de homólogos del ORF 9 con el programa *blastp*.** En la captura de pantalla se observan los primeros 27 de 100 resultados obtenidos, los cuales corresponden a proteínas hipotéticas tanto en fagos de *P. aeruginosa* como en distintas cepas del género *Pseudomonas*. La búsqueda se realizó el 4 de agosto del 2020.

Sequences producing significant alignments Download Manage Columns Show 100

select all 77 sequences selected [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	321	321	100%	1e-110	100.00%	<a href="#">WP_165948996.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein CSC43_3038 [Pseudomonas aeruginosa]</a>	307	307	100%	5e-105	96.32%	<a href="#">RCH29605.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	301	301	100%	5e-103	93.87%	<a href="#">WP_023657615.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	290	290	100%	2e-98	90.80%	<a href="#">WP_153576623.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	288	288	100%	1e-97	90.80%	<a href="#">WP_179214311.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	287	287	100%	3e-97	90.80%	<a href="#">WP_166623352.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	280	280	100%	3e-94	87.73%	<a href="#">WP_161973518.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	258	258	80%	2e-86	100.00%	<a href="#">WP_134628907.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	251	251	100%	3e-83	81.60%	<a href="#">WP_121573093.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	247	247	100%	2e-81	79.75%	<a href="#">WP_144298387.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	247	247	100%	3e-81	80.37%	<a href="#">WP_108112649.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	247	247	100%	3e-81	79.75%	<a href="#">WP_016852444.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	246	246	100%	4e-81	79.75%	<a href="#">WP_150788554.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	245	245	100%	9e-81	79.75%	<a href="#">WP_031637811.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	245	245	100%	1e-80	79.75%	<a href="#">WP_119565466.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	244	244	100%	2e-80	79.75%	<a href="#">WP_106097036.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein HMPREFV_HMPID9843gp0018 [Pseudomonas phage JD18]</a>	243	243	100%	6e-80	79.14%	<a href="#">YP_009168296.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	243	243	100%	6e-80	78.53%	<a href="#">WP_033967141.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	243	243	100%	7e-80	79.14%	<a href="#">WP_112217475.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	240	240	98%	8e-79	79.38%	<a href="#">WP_178383065.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical bacteriophage protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	240	240	100%	1e-78	77.91%	<a href="#">ACD38755.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	230	230	95%	9e-75	78.71%	<a href="#">WP_165838623.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein B3ORF16 [Pseudomonas phage B3]</a>	225	225	100%	9e-73	73.62%	<a href="#">YP_164052.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein Ps59_15 [Pseudomonas phage Ps59]</a>	224	224	100%	2e-72	73.01%	<a href="#">AYD80603.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein Fc22_17 [Pseudomonas phage Fc22]</a>	217	217	100%	2e-69	71.17%	<a href="#">AYD80384.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	210	210	65%	1e-67	100.00%	<a href="#">WP_126441684.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas nitroreducens]</a>	210	210	100%	1e-66	74.23%	<a href="#">WP_024762325.1</a>

**Búsqueda de homólogos del ORF 10 con el programa *blastp*.** En la captura de pantalla se observan los primeros 27 de 100 resultados obtenidos, los cuales corresponden a proteínas hipotéticas tanto en fagos de *P. aeruginosa* como en distintas cepas del género *Pseudomonas*. La búsqueda se realizó el 4 de agosto del 2020

**Run PSI-Blast iteration 5**

Number of sequences  **Run**

**Descriptions** | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** Download ▾ Manage Columns ▾ Show  ?

500 sequences selected sequences newly added this iteration ? [GenPept](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [Multiple alignment](#)

**Sequences with E-value BETTER than threshold**

select all 500 sequences selected [Skip to the first new sequence](#) **PSI-BLAST iteration 4**

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Per. Ident	Accession	Select for PSI blast	Used to build PSSM	Newly added
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein vBPaeSS2019XII_044 [Pseudomonas phage vB_Pae-SS2019XII]</a>	318	318	100%	4e-107	87.08%	<a href="#">QGF21188.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein PACI27_6123 [Pseudomonas aeruginosa CI27]</a>	311	311	100%	2e-104	91.87%	<a href="#">EKA38561.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein PA39016_000840085 [Pseudomonas aeruginosa 39016]</a>	308	308	100%	1e-103	100.00%	<a href="#">EFQ38282.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein HMPREFV_HMPID9847gp0018 [Pseudomonas phage JBD25]</a>	308	308	100%	3e-103	100.00%	<a href="#">YP_009168743.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein Ps56_18 [Pseudomonas phage Ps56]</a>	306	306	100%	3e-103	99.52%	<a href="#">AYD80438.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein CV_2153 [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]</a>	293	293	87%	3e-98	42.62%	<a href="#">AAQ59826.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Chromobacterium violaceum]</a>	292	292	87%	4e-98	41.53%	<a href="#">WP_115648425.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Chromobacterium violaceum]</a>	292	292	87%	6e-98	42.62%	<a href="#">WP_080762406.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Chromobacterium sphagni]</a>	292	292	87%	9e-98	40.44%	<a href="#">WP_080962035.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Ralstonia solanacearum]</a>	283	283	76%	4e-95	43.40%	<a href="#">WP_087452074.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

**Búsqueda de homólogos del ORF 9 con el programa DELTA-BLAST con 4 iteraciones PSI-BLAST.** En la captura de pantalla se observan los primeros 10 de 500 resultados obtenidos, los cuales corresponden a proteínas hipotéticas tanto en fagos de *P. aeruginosa* como en distintas cepas del género *Pseudomonas*. También aparecen resultados con otras bacterias como *Chromobacterium violaceum*, *C. sphagni* y *Ralstonia solanacearum*. La búsqueda se realizó el 4 de agosto del 2020.



**Run PSI-Blast iteration 5**

Number of sequences

**Descriptions** | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

**Sequences producing significant alignments** Download  Manage Columns  Show

85 sequences selected  sequences newly added this iteration

No new sequences were found above the 0.005 threshold

**Sequences with E-value BETTER than threshold**

select all 75 sequences selected **PSI-BLAST iteration 4**

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Per. Ident	Accession	Select for PSI blast	Used to build PSSM	Newly added
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	206	206	99%	5e-65	88.27%	<a href="#">WP_161973518.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	205	205	99%	6e-65	91.36%	<a href="#">WP_153576623.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	204	204	99%	2e-64	91.36%	<a href="#">WP_166623352.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	200	200	100%	1e-62	90.80%	<a href="#">WP_179214311.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein CSC43_3038 [Pseudomonas aeruginosa]</a>	198	198	100%	3e-62	96.32%	<a href="#">RCH29605.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical bacteriophage protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	198	198	100%	4e-62	77.91%	<a href="#">ACD38755.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	196	196	100%	4e-61	79.75%	<a href="#">WP_031637811.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	195	195	100%	5e-61	78.53%	<a href="#">WP_033967141.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein [Pseudomonas aeruginosa]</a>	195	195	100%	7e-61	93.87%	<a href="#">WP_023657615.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">hypothetical protein HMPREFV_HMPID9843gp0018 [Pseudomonas phage JD18]</a>	195	195	100%	8e-61	79.14%	<a href="#">YP_009168296.1</a>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	

**Búsqueda de homólogos del ORF 10 con el programa DELTA-BLAST con 4 iteraciones PSI-BLAST.** En la captura de pantalla se observan los primeros 10 de 500 resultados obtenidos, los cuales corresponden a proteínas hipotéticas tanto en fagos de *P. aeruginosa* como en distintas cepas del género *Pseudomonas*. La búsqueda se realizó el 4 de agosto del 2020.

À quiconque lit ceci:  
Nous avons tous nos luttes respectives.  
C'était à moi. Bonne chance avec le vôtre.