



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

“Identificación de profagos que portan genes Anti-CRISPR/Cas contra el subtipo I-F de la cepa PA14 de *Pseudomonas aeruginosa*”

**TESIS QUE PRESENTA:**

IBT. RICARDO ISRAEL AMADOR ZAFRA

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE:**

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**DIRECTORES DE TESIS:**

DR. GABRIEL GUARNEROS PEÑA

DR. LUIS YOSHIO KAMEYAMA KAWABE

**ASESORES DE TESIS:**

DRA. ROSA MA. DEL REFUGIO BERMÚDEZ CRUZ

DRA. MA. DEL REFUGIO GARCÍA VILLEGAS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 3 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. Gabriel Guarneros Peña y el Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante el periodo de septiembre de 2014 a agosto de 2016, número de becario: 628326 (CVU).

# Contenido

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>I. Introducción.</b> .....	7
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
1.2 Bacteriófagos.....	8
1.3 Sistemas de bloqueo a la adsorción.....	10
1.3.1 Bloqueo de receptores de fagos.....	10
1.3.2 Producción de matriz extracelular.....	11
1.3.3 Producción de inhibidores competitivos.....	11
1.3.4 Sistemas Sie en bacterias Gram-Negativas.....	12
1.3.5 Sistemas Sie en bacterias Gram-Positivas.....	12
1.3.6 Fenómeno de Inmunidad. ....	13
1.4 Sistemas de corte de ácidos nucleicos.....	13
1.4.1 Sistemas de restricción-modificación.....	13
1.5 Sistemas de bloqueo contra la liberación.....	14
1.5.1 Sistemas de infección abortiva. ....	14
1.5.2 Recientes sistemas de bloqueo.....	14
1.5.2.1 CRISPR/Cas (Descripción General y Clasificación).....	14
1.6 Anti-CRISPR/Cas (Descripción General y Clasificación).....	16
<b>II. Antecedentes.</b> .....	18
2.1 Mecanismos de defensa en <i>P. aeruginosa</i> . ....	18
2.2 CRISPR/Cas en <i>P. aeruginosa</i> .....	18
2.3 Anti-CRISPR/Cas en fagos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	19
2.4 Anti-CRISPR en el laboratorio. ....	19
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	22
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	23
5.1 Objetivo General. ....	23
5.2 Objetivos Particulares. ....	23
<b>VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b> .....	24
<b>VII. Materiales y Métodos</b> .....	25
7.1 Cepa bacteriana hospedera.....	25

7.2 Almacenamiento de cepas.....	25
7.3 Colección de fagos.....	25
7.3.1 Fagos Control. ....	26
7.4 Tapices Bacterianos.....	27
7.5 Re-propagación de fagos.....	27
7.7 Titulación de fagos.....	30
7.7.1 Homogenización de títulos. ....	30
7.8 Ensayo de infección. ....	31
7.8.1 Lectura de los resultados. ....	32
7.9 Extracción de DNA de fago por gradientes de CsCl. ....	33
7.11 Diseño de <i>primers</i> . ....	35
7.12 PCR. ....	36
7.13 Secuenciación. ....	38
7.14 Búsqueda en bases de datos. ....	39
7.15 Alineamientos.....	39
<b>VIII. Resultados</b> .....	40
8.1 Clasificación de los fagos temperados. ....	40
8.2 Identificación de los fagos resistentes y los fagos sensibles. ....	42
8.3 Construcción y verificación de lisógenas.....	42
8.4 Homogenización del título de los fagos sensibles.....	44
8.5 Ensayos de Infección sobre las lisógenas para identificar fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas. ....	44
8.6 Análisis de las regiones conservadas y accesorias de los fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas. ....	48
8.7 Secuenciación de los fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas.....	52
8.8 Análisis de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados. ....	53
8.8.1 Alineamiento de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos. 53	
8.8.2 Alineamiento de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos Mu-like Tipo 2. (Figuras 8.20 a 8.25 y Tablas 8.12 a 8.15) .....	56
8.8.3 Dominios conservados en los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos Mu-like Tipo 1 y 2. ....	62
8.9 Patrones de restricción de los fagos con actividad anti-CRISPR. ....	63
<b>IX. Discusión</b> .....	64
<b>X. Conclusiones</b> .....	72

<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	73
<b>XII. APÉNDICE</b> .....	75
<b>XIII. Equipo</b> .....	76
<b>XIV. PERSPECTIVAS</b> .....	76

## RESUMEN

La constante amenaza que representan los bacteriófagos para las bacterias ha desembocado en la evolución de numerosos mecanismos bacterianos cuya principal función es evitar las estrategias llevadas a cabo por los fagos, y que a través del tiempo se vuelven más sofisticadas.

Uno de los principales mecanismos de defensa bacterianos es el denominado sistema CRISPR/Cas. Este sistema utiliza pequeñas moléculas de RNA que actúan como guías de secuencias específicas para permitir la actividad de nucleasas sobre material genómico foráneo. El sofisticado mecanismo del sistema CRISPR/Cas combinado con su habilidad para ir recolectando secuencias exógenas que le permitan reconocer cada vez más bacteriófagos ha conducido a que este sistema este ampliamente estudiado desde hace algunos años. Sin embargo, los bacteriófagos no se han quedado atrás, y en los últimos años han surgido las primeras evidencias que apuntan a que los bacteriófagos han desarrollado contra estrategias para inhibir los mecanismos de defensa bacterianos, estamos hablando de los genes anti-CRISPR.

En este trabajo se llevó a cabo la identificación de genes anti-CRISPR en una colección de 80 fagos temperados. Lo primero que se realizó fue identificar aquellos fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14 wt, que es portadora del sistema CRISPR/Cas I-F. Una vez identificados dichos fagos (30 fagos de 80) se construyeron cepas lisógenas de PA14 wt (27 lisógenas de 30) con cada uno de los fagos mencionados. Posteriormente se gotearon fagos sensibles al sistema CRISPR/Cas I-F de la cepa PA14 wt sobre cada una de las lisógenas construidas y se observó que 8 de los 27 fagos permitió la infección los fagos sensibles. Por último, se empleó la técnica de PCR para clasificar los fagos con fenotipo anti-CRISPR, encontrándose lo siguiente: que todos eran del tipo *Mu-like*, 5 de ellos tenían RGP B, 1 tiene genes anti-CRISPR de tipo 1 y 6 tenían genes anti-CRISPR de tipo 2. En conclusión, se demostró un método basado en las técnicas de PCR y secuenciación para identificar genes anti-CRISPR en fagos temperados.

## **ABSTRACT**

The constant threat posed by bacteriophages for bacteria has led to the evolution of many bacterial mechanisms whose main function is to avoid the strategies carried out by the phages, and over time become more sophisticated.

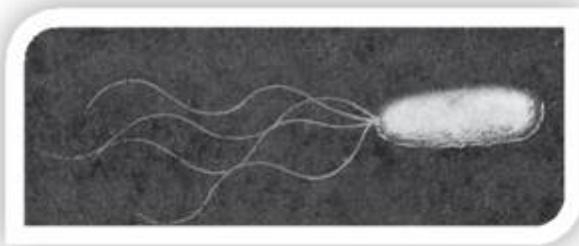
One of the main mechanisms of bacterial defense is called CRISPR / Cas system. This system uses small RNA molecules that act as guide sequences to enable specific nuclease activity of foreign genomic material. The sophisticated mechanism of CRISPR / Cas system combined with its ability to go collecting exogenous sequences that allow it to recognize increasingly bacteriophages has led to this system is widely studied for some years. However, bacteriophages are not left behind, and in recent years have seen the first evidence to suggest that bacteriophages have developed counter strategies to inhibit bacterial defense mechanisms, we are talking about anti-CRISPR genes.

This work was carried out the identification of anti-CRISPR genes in a collection of 80 temperate phages. The first thing done was to identify those phages were able to infect PA14 wt strain, which carries the CRISPR / Cas I-F system. Once these phages (30 80 phages) PA14 identified strains lysogenic wt (27 lysogenic 30) with each of the aforementioned phages were constructed. Subsequently sensitive CRISPR / Cas I-F system PA14 strain wt phages on each lysogenic constructed and it was observed that the 27 8 phages allowed infection sensitive phages were added dropwise. Finally, the PCR technique was used to classify the phages with anti-CRISPR phenotype, being the following: all were of the Mu-like, five of them had RGP B, one has anti-CRISPR Type 1 genes and 6 he had genes anti-CRISPR type 2. In conclusion, based on PCR and sequencing techniques to identify genes in anti-CRISPR tempered phage method was demonstrated.

## I. Introducción.

### 1.1 Pseudomonas aeruginosa.

De acuerdo a Carl Woese (1990), el árbol de la vida consiste en tres dominios: el Arquea, el Bacteria y el Eucariota. El dominio Bacteria contiene una enorme variedad de organismos procariontes. Todos los procariontes patógenos conocidos son del dominio Bacteria y dentro de éste, las Proteobacteria corresponden al *phylum* más grande de esta clasificación. Algunos procariontes del suelo y el agua, que viven en plantas y animales, son Proteobacteria; como las del género *Pseudomonas* (Figura 1.1) (Brock *et al.*, 2012 p.38).



**Figura 1.1. Sombra proyectada por micrografía electrónica de transmisión de una célula de Pseudomonas.** La célula mide aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. (Tomada y modificada de Brock *et al.*, 2012)

La versátil y ubicua bacteria *P. aeruginosa* (Gram negativa) es el patógeno oportunista por excelencia, ya que puede infectar una gran cantidad de hospederos, desde amibas hasta humanos. Está vinculada con infecciones asociadas a quemaduras severas, fibrosis quística, SIDA y cáncer (He *et al.*, 2004). Este patógeno produce un arsenal de factores de virulencia, lo cual puede ejemplificarse con la cepa clínica PA14, que tiene un amplio rango de hospederos y se considera más virulenta (por sus islas de patogenicidad) que PAO1, aunque tienen un alto grado de conservación en sus genomas (Mikkelsen *et al.*, 2011).

Como ya se mencionó, *P. aeruginosa* está vinculada a la infección asociada con la fibrosis quística, debido a que esta bacteria forma *biofilms* en los pulmones del paciente durante el desarrollo de la enfermedad. Estas barreras protectoras impiden el éxito de los antibióticos usados para tratar

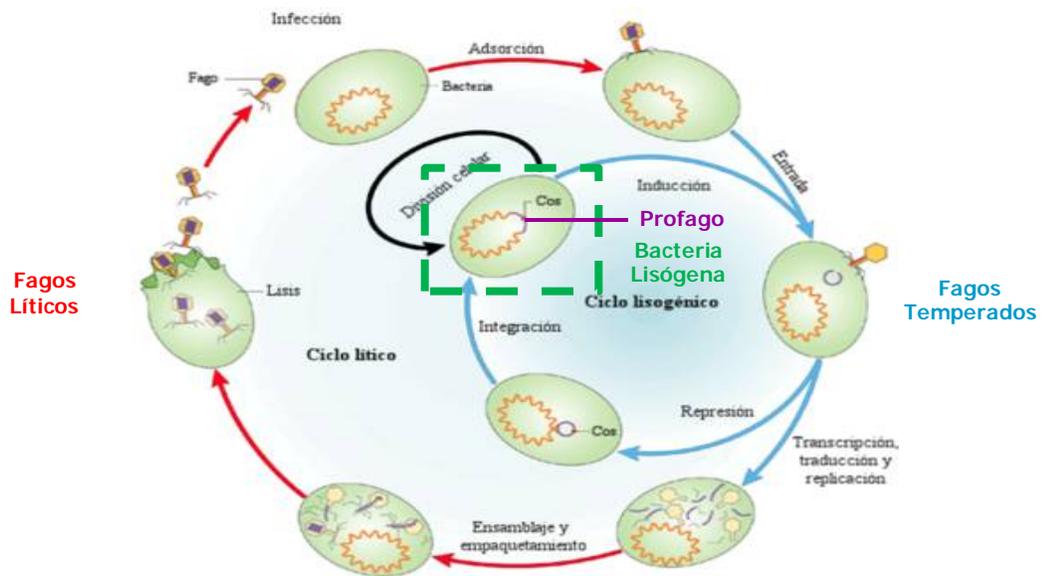
dicho padecimiento, por lo que en los últimos años se han recurrido a otras soluciones, como el uso de bacteriófagos altamente específicos (Brock *et al.*, 2012 p.133). Los bacteriófagos son biocidas naturales de las bacterias, y gracias a que evolucionan tan rápido como ellas, se puede decir que poseen ventaja sobre los antibióticos cuando se trata de superar la resistencia bacteriana (Wei *et al.*, 2015), se han estado usando clínicamente en Rusia, Georgia y Polonia (la Unión Europea está desarrollando actualmente el proyecto ©Phagoburn), y dicho método ha recibido el nombre de Fagoterapia (Reardon *et al.*, 2014).

## 1.2 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos o fagos fueron descubiertos por Frederick Twort hace 100 años, y reconocidos oficialmente por el mundo en 1917 gracias a Félix D'Hérelle. Como todos los virus, los fagos son partículas infecciosas compuestas de ácidos nucleicos (DNA o RNA, de cadena sencilla o doble) y proteínas. Si un fago invade una bacteria, el fago activará su ciclo de producción, y la célula será reprogramada para convertirse en una fábrica de fagos, donde sus componentes biosintéticos como ribosomas y generadores de ATP serán manipulados para este fin. Las vías de reprogramación son iniciadas por proteínas específicas del fago (Campbell *et al.*, 2003).

La replicación de ácidos nucleicos ocurre primero, seguida de la síntesis de proteínas estructurales del fago, así los nuevos fagos se ensamblan y son liberados de la bacteria por la disrupción de la envoltura nuclear y la repentina lisis de la bacteria, estos fagos se denominan líticos o virulentos (Figura 1.2, flechas rojas). Otros fagos tienen un ciclo de vida alternativo, en donde una fracción de bacterias infectadas va a ciclo lítico, mientras que otras sobreviven a la infección y en su interior reside el genoma del fago en una forma inactiva denominada como profago (Figura 1.2, flechas azules). Estos fagos son conocidos como temperados, y las bacterias que hospedan un profago reciben el nombre de lisógenas. Algunos agentes del entorno (como la luz UV) pueden

provocar que bacterias lisógenas activen los genes del ciclo lítico del profago (Campbell *et al.*, 2003).



**Figura 1.2. Ciclo de vida de los fagos.** El fago se ancla a la superficie celular, mediante el receptor de su cola e inyecta su DNA. Después ese DNA adopta una forma circular, cuyo punto de clausura es llamado sitio cohesivo (cos). En algunas células infectadas el DNA es transcrito, traducido y replicado. Existen 2 vías de replicación: de la forma e y círculo rodante. La replicación de círculo rodante genera colas multigenómicas de DNA lineal de doble cadena, que después es introducido en envolturas proteicas preformadas; las colas son añadidas y la célula se lisa para liberar a la progenie del fago. En otras células infectadas, el desarrollo del fago es reprimido y su DNA se integra en el cromosoma bacteriano. La célula lisogénica resultante puede replicarse indefinidamente, pero puede ser inducida al ciclo lítico con la escisión del DNA del fago del cromosoma. (Tomada y modificada de Campbell *et al.*, 2003)

Las fases del ciclo de replicación de los fagos pueden dividirse en 6 etapas (Figura 1.2): 1. Adsorción: los fagos con cola reconocen a las bacterias hospederas a través de la interacción entre los sitios de anclaje de sus colas y las moléculas de superficie hospederas. 2. Entrada del DNA o Captación: un apropiado posicionamiento de la cola del fago en la superficie celular activa eventos irreversibles que conducen a la entrega del DNA en la célula hospederas. Los mecanismos son variados, pero usualmente requieren ATP, potencial de membrana o acción enzimática. 3. Replicación del DNA: la mayoría de los fagos temperados usan la maquinaria de recombinación de la

bacteria hospedera para sus ciclos de replicación como profago. En cambio, los fagos líticos usualmente codifican sus propias DNA polimerasas para replicarse. 4. Transcripción y Traducción: los genes que se transcriben inmediatamente después de la infección sirven para reestructurar el metabolismo de la bacteria para facilitar la continuidad del proceso de infección. El control a nivel de traducción involucra estructuras de RNA que afectan el acceso de los sitios de unión al ribosoma. 5. Ensamblaje de los fagos o Maduración: esta fase involucra la morfogénesis del fago (formación de sus proteínas estructurales) y el empaquetamiento de su DNA. 6. Lisis de la célula hospedera o Liberación: en un gran número de casos, este proceso está a cargo de la endolisina (ataca la capa de peptidoglicanos) y la holina (permite que la endolisina se mueva entre el citoplasma y el espacio periplásmico). Con esto se logra la liberación de nuevos fagos con capacidad infectiva (Kutter & Sulakvelidze., 2004 pp.188-217).

Cuando los fagos infectan a las bacterias y luchan contra sus mecanismos antivirales, suelen recurrir a estrategias para evadirlos o eliminarlos, y así proliferar en muchos ambientes, de acuerdo a (Labrie *et al.*, 2010) los mecanismos de defensa bacteriana pueden dividirse en 4 categorías:

1.3 Sistemas de bloqueo a la adsorción.

1.3.1 Bloqueo de receptores de fagos.

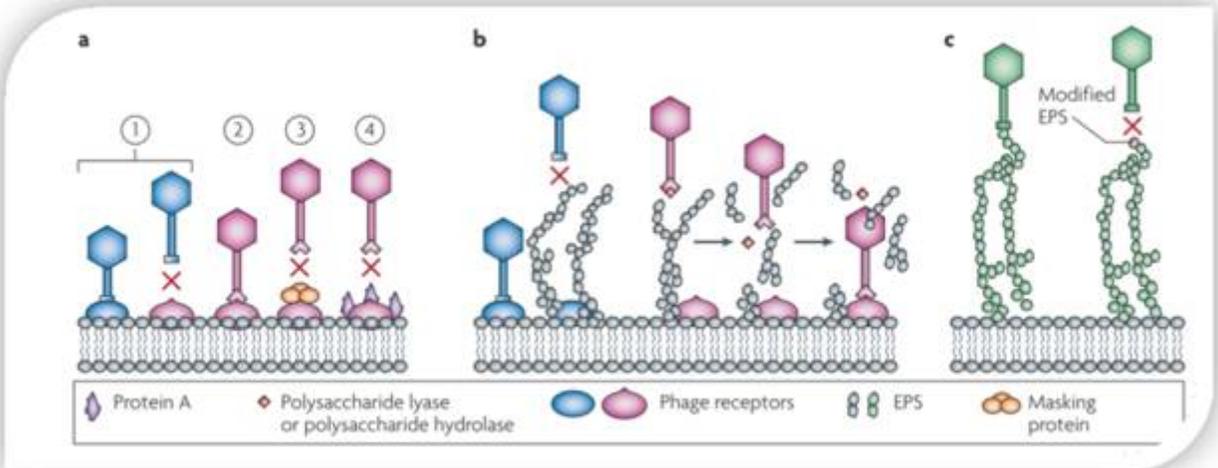
Las bacterias pueden adaptar la estructura de sus receptores de superficie celular o su conformación tridimensional. Por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* produce un factor de virulencia anclado a la pared celular, la proteína A de unión a inmunoglobulina G. Por lo que, la adsorción de fagos mejora cuando la bacteria produce menos proteína A, lo cual indica que el receptor de fagos esta enmascarado por esta proteína (Figura 1.3a-4) (Labrie *et al.*, 2010).

### 1.3.2 Producción de matriz extracelular.

La producción de polímeros estructurados extracelulares puede promover la supervivencia bacteriana en varios nichos ecológicos mediante la protección de la bacteria contra condiciones ambientales severas, y en algunos casos proporcionando una barrera física entre fagos y sus receptores. Algunos fagos han evolucionado para reconocer específicamente estos polímeros extracelulares e incluso degradarlos. Las enzimas degradadoras de polisacáridos pueden ser clasificadas en dos grupos: las hidrolasas (rompen el enlace glicosil-oxígeno) y liasas (rompen el enlace de monosacáridos). Estas enzimas virales pueden estar unidas a la estructura del fago o existir como enzimas solubles libres obtenidas de bacterias lisadas. Por ejemplo, las bacterias de *Azotobacter spp.* Tienen una gran resistencia a los fagos debido a que producen alginatos (Fig. 1.3 b y c) (Labrie *et al.*, 2010).

### 1.3.3 Producción de inhibidores competitivos.

Las moléculas que están presentes naturalmente en el ambiente bacteriano pueden unirse específicamente a los receptores de los fagos, dejándolos inaccesibles para los fagos. Por ejemplo, el receptor FhuA de *Escherichia coli* es un transportador de hierro y también el puerto de entrada para colifagos como T1, T5 y  $\phi$ 80. La molécula anti-microbiana microcin J25 también usa FhuA como un receptor y puede competir contra el fago T5 (Labrie *et al.*, 2010).



**Figura 1.3. Diferentes estrategias usadas por la bacteria para bloquear la absorción de fagos.** (a) La bacteria puede modificar sus receptores de superficie celular (punto 1), aunque los fagos pueden adaptarse (punto 2), la bacteria podría enmascarar el receptor (punto 3), o producir otra proteína para impedir la absorción. (b) La absorción también puede ser bloqueada por la producción de exopolisacáridos, los cuales podrían ser degradados por las liasas e hidrolasas de los fagos. (c) Los fagos también son capaces de reconocer polisacáridos, como antígenos de tipo O y K. (Tomada de J. Labrie *et al.*, 2010).

fagos de tipo T (Labrie *et al.*, 2010).

### 1.3.5 Sistemas Sie en bacterias Gram-Positivas.

Sólo algunos ejemplos de mecanismos que inhiben la inyección de DNA del fago han sido identificados en bacterias Gram-Positivas. Muchos fueron identificados en *Lactococcus lactis*, el mejor sistema caracterizado en este microorganismo es el Sie<sub>2009</sub>, que fue identificado en el genoma del fago temperado lactococcal Tuc2009, y subsecuentemente encontrado en otros profagos en los genomas de algunas cepas de *L. lactis* (Labrie *et al.*, 2010).

### 1.3.6 Fenómeno de Inmunidad.

Corresponde a la expresión de una proteína represora de un profago residente. Dicha molécula impide la expresión de los genes del ciclo lítico del mismo profago al igual que el de otros ejemplares homólogos que intentan infectar al mismo hospedero. Este fenómeno ha sido estudiado ampliamente en el fago  $\lambda$  (Kameyama *et al.*, 2001; Ptashne., 2004).

## 1.4 Sistemas de corte de ácidos nucleicos

### 1.4.1 Sistemas de restricción-modificación.

Muchas, si no es que todas las bacterias, poseen sistemas de restricción-modificación (R-M; por sus siglas en inglés). Sus funciones son debido a algunas proteínas heterogéneas que han sido clasificadas dentro de cuatro grupos. La principal función de los sistemas R-M es proteger a la célula contra DNA invasor, incluyendo a los virus. Cuando un DNA de fago no metilado entra a un célula que tiene un sistema R-M, el DNA será reconocido por las enzimas de restricción y rápidamente degradado, acortado o metilado. El destino del DNA del fago está determinado en su mayoría por los rangos de procesamiento de estas dos enzimas. Como la restricción enzimática es usualmente más activa que las metilasas, el DNA del fago que entra es usualmente cortado y el DNA de la bacteria está protegido de la actividad de las metilasas. Además, las metilasas son usualmente más específicas para DNA hemimetilado (DNA que contiene grupos metilo en sólo una de sus cadenas). Cuando el DNA del fago es metilado, los nuevos viriones llegan a ser insensibles a las enzimas de restricción similares y fácilmente pueden infectar células vecinas conteniendo el mismo sistema R-M (Labrie *et al.*, 2010).

El fago permanecerá insensible hasta que infecte a una bacteria que no codifique el mismo gen de esa metilasa, en cuyo caso los nuevos viriones llegarán a estar desmetilados otra vez y en consecuencia, serán sensibles de nuevo al sistema R-M de la bacteria original.

Para luchar contra estos sistemas R-M, los fagos han evolucionado para desarrollar algunas estrategias anti-restricción. Una de estas estrategias es la ausencia de sitios de reconocimiento de endonucleasas en sus genomas a través de la acumulación de mutaciones puntuales. La eficiencia antiviral de un sistema R-M es directamente proporcional al número de sitios de reconocimiento en un genoma viral de doble cadena. Además, algunos fagos han superado los sistemas R-M a través de la adquisición de los genes de metilasa análogos en sus genomas (Labrie *et al.*, 2010).

## 1.5 Sistemas de bloqueo contra la liberación.

### 1.5.1 Sistemas de infección abortiva.

La bacteria contiene un amplio rango de proteínas heterólogas que proveen de resistencia a través de abortar la infección del fago. Estos sistemas de infección abortiva (Abi; por sus siglas en inglés) también pueden conducir a la muerte de la célula infectada, lo cual es muy diferente a los sistemas descritos anteriormente. Típicamente, estos sistemas Abi tienen como objetivo un paso crucial en la multiplicación del fago, como la replicación, la transcripción y la traducción. Los estudios en los sistemas Abi comenzaron hace 50 años, y aún ahora, sus modos de acción no están completamente comprendidos, debido a que son complejos y también existen “huecos” en la biología de los fagos (Labrie *et al.*, 2010).

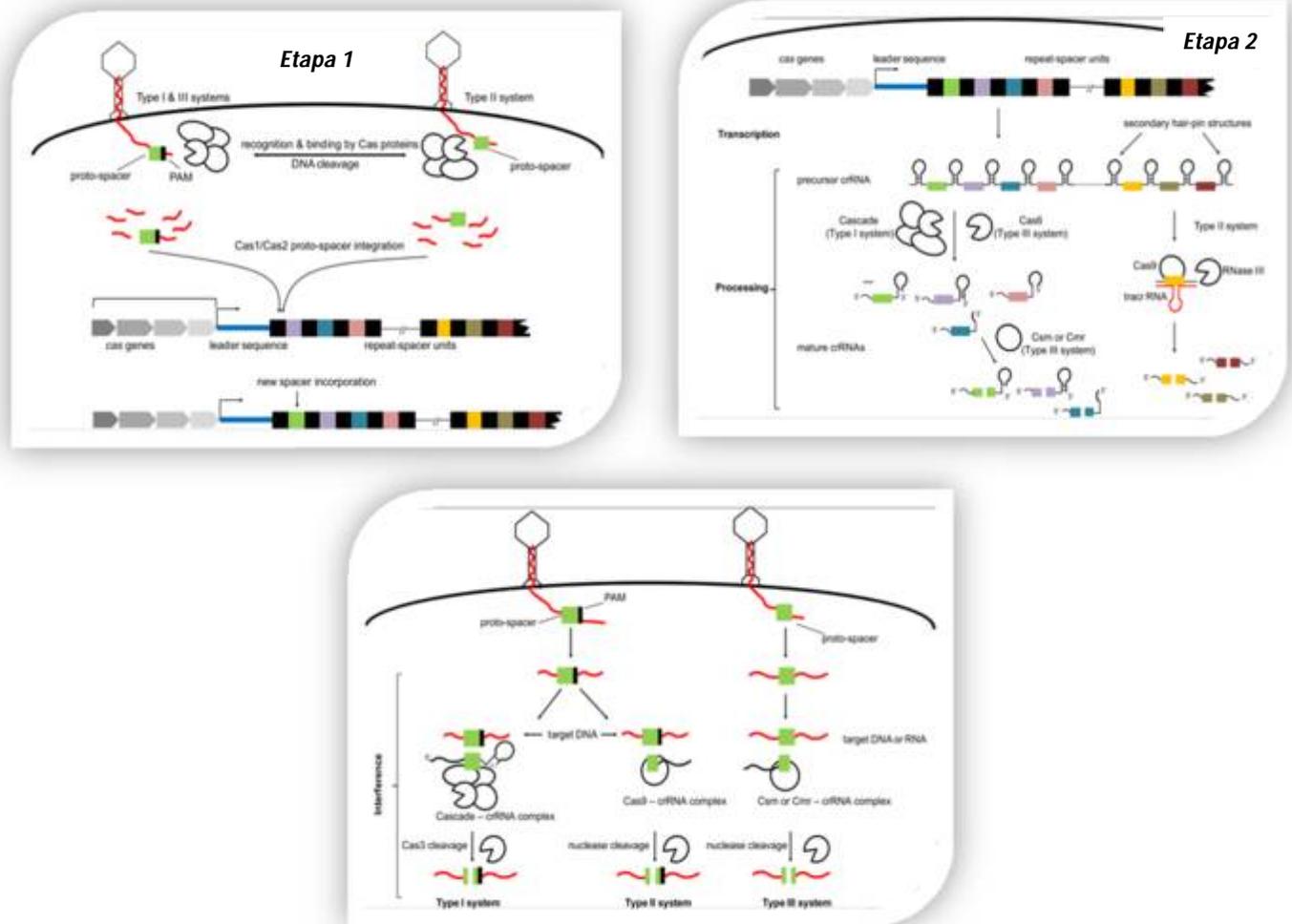
### 1.5.2 Recientes sistemas de bloqueo.

#### 1.5.2.1 CRISPR/Cas (Descripción General y Clasificación).

El *loci* CRISPR/Cas (Repetidos Palindrómicos Cortos Interespaciados Regularmente Agrupados/genes Asociados a CRISPR) fue descrito por primera vez en 1987 y diversos análisis comparativos han revelado que está presente en un gran número de genomas completos de bacterias y arqueas.

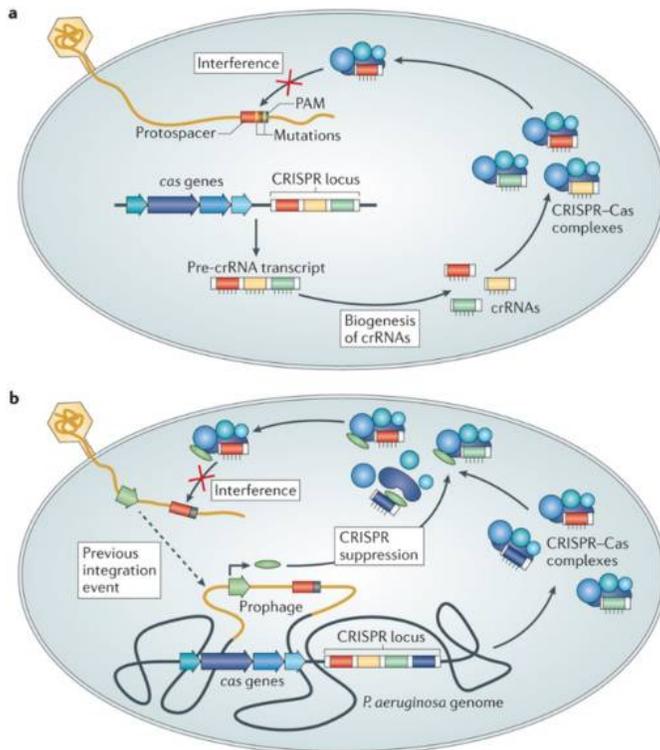
El *loci* CRISPR/Cas es un sistema inmune que tiene como objetivo los ácidos nucleicos foráneos, incluyendo genomas de fagos y plásmidos. También se tiene evidencia (Heussler G. *et al.*; 2015) de que la interacción de este sistema con los protoespaciadores y PAM's (motivos adyacentes a protoespaciadores) puede inhibir la formación del *biofilm* en *P. aeruginosa*.

Algunos grupos de investigación han purificado proteínas Cas y han mostrado que algunas de ellas rompen el mRNA de CRISPR en la región repetida dentro de pequeños RNA listos para detectar fagos o plásmidos entrantes de DNA o RNA. El sistema CRISPR/Cas y la respuesta de los fagos contra este mecanismo ilustran perfectamente la coevolución dinámica entre ambos grupos de microorganismos (Labrie *et al.*, 2010). Ahora se sabe que el sistema CRISPR/Cas tiene un papel muy importante en la estructura de las comunidades microbianas. Estos sistemas han sido agrupados en 3 tipos (I - III) y en algunos subtipos (desde I-A hasta I-F) con base en los genes Cas y en los modos de acción que los caractericen. Los sistemas de Tipo I tienen como blanco al DNA, mientras que algunos sistemas del Tipo III apuntan hacia el RNA (Pawluk *et al.*, 2014). El funcionamiento de este sistema puede verse ilustrado en la Figura 1.4.



**Figura 1.4. Modo de acción del sistema CRISPR/cas.** Etapa 1: el sistema reconoce, se une y corta al DNA invasor. Las secuencias derivadas de fagos (proto-espaciadores) son introducidas en el CRISPR mediante Cas1 y Cas2. En los sistemas Tipo I y II, la selección de proto-espaciadores posiblemente requiere PAM's (motivos adyacentes a proto-espaciadores). Etapa 2: CRISPR es transcrito en un RNA largo. En los sistemas Tipo I y II los transcritos son cortados por Cas6 en pequeños crRNAs, compuestos de una secuencia espaciadora. En los sistemas Tipo III, los crRNAs son procesados por Csm o Cmr. Dichos complejos son reconocidos por la RNase III, que en presencia de Cas9, rompe el transcrito en secuencias repetidas. Etapa 3: la interferencia con ácidos nucleicos externos ocurre por la unión complementaria de los espaciadores de crRNA con la secuencia blanco (proto-espaciadora) y el subsecuente corte por los componentes del sistema CRISPR. En los sistemas Tipo I, los crRNA se unen con Cascada, formando un complejo que marca el DNA con secuencias complementarias (Tomada y modificada de Szczepankowska A. *et al.*, 2012).

estudios en la bacteria *Sulfolobus solfataricus*, sugieren que su profago residente codifica una proteína con actividad Anti-CRISPR/Cas, ya que se une a los repetidos del sistema CRISPR e induce un cambio conformacional en el DNA, formando una estructura abierta cerca del centro del repetido (Figura 1.5). Se ha especulado que la unión de dicha proteína al DNA dentro de la secuencia repetida rompe el emparejamiento de bases entre el cr-RNA y los protoespaciadores necesarios para “marcar” la degradación. Genes que codifican para proteínas homólogas a ésta se han descubierto en otros genomas bacterianos (siempre en las secuencias de los profagos) indicando que sistemas Anti-CRISPR/Cas similares funcionan en otras especies bacterianas (Szczepankowska *et al.*, 2012). Los sistemas CRISPR/Cas y Anti-CRISPR/Cas demuestran una verdadera coevolución entre las bacterias y los fagos que ha venido ocurriendo desde hace millones de años.



**Figura 1.5. Posible mecanismo anti-CRISPR/Cas.** (a) Las mutaciones en los proto-espaciadores del fago o en los motivos adyacentes a los proto-espaciadores (PAM) hacen que el fago sea insensible a la interferencia del sistema CRISPR, debido al requerimiento para complementariedad entre el crRNA y el DNA blanco. (b) El sistema Anti-CRISPR de lisógenas de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína Anti-CRISPR codificada por el fago bloquea el paso de interferencia a través de evitar la formación del sistema CRISPR. (Tomada y modificada de E. Samson *et al.*, 2013).

## II. Antecedentes.

### 2.1 Mecanismos de defensa en *P. aeruginosa*.

Se ha observado que *P. aeruginosa* también presenta mecanismos de bloqueo de adsorción para impedir la infección del fago F116 a través de la producción de alginatos (exopolisacáridos) que impiden la interacción entre el fago y su receptor. Sin embargo, el fago es capaz de sintetizar liasas que degradan a los alginatos, permitiéndole de esta manera llegar hasta su respectivo receptor. Por otro lado, los fagos 2 y  $\Phi$ PLS-I, que también infectan a *P. aeruginosa*, son capaces de utilizar a los alginatos como receptores para llevar a cabo su infección (Castillo & Bartell., 1974; Temple *et al.*, 1986; Hanlon *et al.*, 2001).

Por otro lado, el fenómeno de inmunidad también ha sido analizado en los fagos de *P. aeruginosa*, en dichos estudios se ha constatado que los fagos utilizados corresponden a distintos grupos de inmunidad (con los fagos PH2, PH51, PH59, PH93 y PH132 (Akhverdian *et al.*, 1984), o bien, en los que se ha localizado, comparado y evaluado la función de los genes que codifican para la proteína represora con los fagos D3 (Farinha *et al.*, 1994; Farinha & Kropinski, 1997) y D3112 (Salmon *et al.*, 2000; Heo *et al.*, 2007).

### 2.2 CRISPR/Cas en *P. aeruginosa*.

Se han realizado estudios que demuestran las estrategias de *Pseudomonas aeruginosa* contra los fagos a través del sistema CRISPR/Cas. Primeramente, en el estudio de Cady *et al.*, (2011) se caracterizaron 122 aislados clínicos de tres localizaciones geográficas distintas, identificándose el sistema CRISPR/Cas en 45 de esos aislados: 33% con regiones CRISPR del subtipo *Yersinia* (subtipo I-F) y 6% del subtipo *Escherichia* (subtipo I-E).

### 2.3 Anti-CRISPR/Cas en fagos de *Pseudomonas aeruginosa*.

En contraste, también se han realizado estudios que describen las estrategias de los fagos contra el sistema CRISPR/Cas. **Bondy-Denomy et al., (2013)** identificó los primeros ejemplos de genes Anti-CRISPR/Cas contenidos en fagos que codifican proteínas inhibitorias para el sistema CRISPR/Cas del subtipo I-F de *P. aeruginosa* (JBD30, JBD24, JBD26, JBD5, JBD88a, JBD25 y D3112) todos ellos parecidos al fago Mu (es decir *Mu-like*). Posteriormente, **Pawluk et al., (2014)** demostró la existencia de genes Anti-CRISPR/Cas contra el subtipo I-E, igualmente, en fagos *Mu-like*. Ambos trabajos enfatizan la importancia de los genes Anti-CRISPR/Cas en la evolución del fago y refuerza la hipótesis de que existen más familias de genes Anti-CRISPR/Cas.

### 2.4 Anti-CRISPR en el laboratorio.

En el laboratorio se cuenta con una colección de 80 fagos (78 fagos de muestras clínicas: B3-*like*, Mu-*like* y F116-*like* por lo menos; y 2 fagos control: D3112 y LKA5). Se han realizado estudios de exclusión sobre la cepa PA14 wt de *P. aeruginosa* (**Carballo-Ontiveros, . datos no pub.**), encontrándose que sólo 30 de todos los fagos de la colección son capaces de lisar a dicha cepa.

En cuanto a la identificación de genes Anti-CRISPR/Cas, **Cazares et al., (2014)** identificó dos nuevos fagos *Mu-like* (PaMx73 y H70) de *P. aeruginosa*; en los cuales se detectaron los genes Anti-CRISPR/Cas: *g1* y *g5*, y uno nuevo: *g2*; al compararse con la secuencia de otros 10 fagos reportados y localizándose en la misma Región de Plasticidad Genómica (RGP G) (Fig. 2.1). Por análisis *in silico*, **Cazares y Cruz (Trabajo de Tesis 2015)** desarrollaron *primers* para amplificar la RGP G de fagos *Mu-like* (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1. Genes Anti-CRISPR en la Región de Plasticidad Genómica**

Fago	Primer Forward	Genes	Amplicón
PaMx73	Fs1	g1, g5, g9	1067
H70	Fs1	g2, g9	782
LESB58	Fs1	g6, g7, g8, g9	
D3112	Fs1	g3, g6, g9	1028
MP29	Fs1	g3, g9	867
PA1/KOR	Fs1	g6, g7, g8, g9	-
DMS3	Fs2	g1, g9	781
39016	Fs2	g1, g5, g9	1070
MP22	Fs2	g4, g7, g9	1317

### **III. JUSTIFICACIÓN**

A pesar del auge en el estudio de los genes Anti-CRISPR/Cas, hay muy pocos reportes y fagos identificados con estos genes que infecten a *P. aeruginosa*. Por ello, es importante identificar más fagos que porten tales genes para acrecentar el conocimiento en contra-estrategias de defensa.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Es posible identificar nuevos genes Anti-CRISPR/Cas contra el sistema CRISPR/Cas del subtipo I-F en la colección de fagos temperados de *P. aeruginosa* del laboratorio.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General.

- Identificar genes Anti-CRISPR/cas no descritos o nuevos en los fagos de la colección de temperados mediante ensayos de infección.

### 5.2 Objetivos Particulares.

1. Identificar los fagos sensibles y resistentes al sistema CRISPR/Cas utilizando las cepas PA14 wt y PA14  $\Delta$ CRISPR.
2. Identificar los fagos resistentes que porten posibles genes Anti-CRISPR/Cas.
3. Clasificar los fagos portadores de gen(es) Anti-CRISPR/Cas identificados en dos grupos: *Mu-like* y *No Mu-like*.
4. Analizar *in silico* los genes Anti-CRISPR/Cas de los fagos identificados.

## VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

### VII. Materiales y Métodos

#### 7.1 Cepa bacteriana hospedera.

Las cepas bacterianas PA14 wt (*Taxonomy* ID: 208963., *NCBI* 2016) y PA14  $\Delta$ CRISPR (versión de la cepa PA14 wt sin el sistema CRISPR/Cas de tipo I-F) de *Pseudomonas aeruginosa* fueron facilitadas por el grupo de trabajo del Dr. Joseph Bondy-Denomy del Departamento de Genética Molecular de la Universidad de Toronto de Ontario, Canadá.

#### 7.2 Almacenamiento de cepas.

Debido al uso continuo de las cepas de *P. aeruginosa*, éstas se guardaron en condiciones de esterilidad dentro de *stabs* (viales de vidrio con

3 mL de agar suave; ver Preparación de Medios de Cultivo, Apéndice). Estos se almacenaron completamente cerrados para evitar la deshidratación del medio de cultivo a temperatura ambiente (Maniatis *et al.*, 1982).

### 7.3 Colección de fagos.

Se utilizó la colección de fagos temperados que consta de 80 ejemplares (78 fagos aislados y 2 fagos control), los cuales fueron extraídos de la colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa* del Laboratorio 3 del DGBM, CINVESTAV. En la Tabla 7.1 se presentan los ejemplares de fagos que integran dicha colección, y como se agrupan de acuerdo a la cepa bacteriana hospedera que pueden infectar.

**Tabla 7.1. Colección de fagos temperados por cepa bacteriana hospedera<sup>φ</sup>.**

Cepa Hospedera	Fagos Temperados	Total de Fagos
PAO1	$\phi$ Fc1, $\phi$ Fc2, $\phi$ Fc3, $\phi$ Fc4, $\phi$ Fc5, $\phi$ Fc6, $\phi$ Fc7, $\phi$ Fc8, $\phi$ Fc9, $\phi$ Fc10, $\phi$ Fc11, $\phi$ Fc12, $\phi$ Fc13, $\phi$ Fc14, $\phi$ Fc15, $\phi$ Fc16, $\phi$ Fc17, $\phi$ Fc18, $\phi$ Fc19, $\phi$ Ps41, $\phi$ Ps42, $\phi$ Ps43, $\phi$ Ps44, $\phi$ Ps45, $\phi$ Ps46, $\phi$ Ps47, $\phi$ Ps48, $\phi$ Ps49, $\phi$ Ps50, $\phi$ Ps51, $\phi$ Ps52, $\phi$ Ps53, $\phi$ H63, $\phi$ H64, $\phi$ H65, $\phi$ H66, $\phi$ H67, $\phi$ H68.	38
Ps-9	$\phi$ H69	1
Ps-26	$\phi$ Fc20 y $\phi$ Fc21	2

Ps-33	$\phi$ Fc22, $\phi$ Fc23, $\phi$ Fc24, $\phi$ Fc25, $\phi$ Fc26, $\phi$ Fc27, $\phi$ Fc28, $\phi$ Fc29, $\phi$ Fc30, $\phi$ Fc31, $\phi$ Fc32, $\phi$ Fc33, $\phi$ Fc34, $\phi$ Ps54, $\phi$ Ps55, $\phi$ Ps56, $\phi$ Ps57, $\phi$ Ps58, $\phi$ Ps59, $\phi$ Ps60, $\phi$ Ps61, $\phi$ Ps62, $\phi$ H70, $\phi$ H71, $\phi$ H72, $\phi$ H73, $\phi$ H74, $\phi$ H75, $\phi$ H76, $\phi$ H77, $\phi$ H78	31
Ps-53	$\phi$ Fc35, $\phi$ Fc36, $\phi$ Fc37, $\phi$ Fc38, $\phi$ Fc39, $\phi$ Fc40	6

$\phi$ : Sepúlveda-Robles (datos no pub.).

### 7.3.1 Fagos Control.

Para este proyecto se incluyeron 2 fagos pertenecientes a la colección de fagos temperados cuya infección en las dos cepas bacterianas está caracterizada. En la Tabla 7.2 se presentan éstos fagos.

**Tabla 7.2. Fagos Control.**

Fago	Tipo de Fago	Ácido Nucleico	Procedencia	Cepa que infecta
LKA5	Lisogénico	dsDNA <sup><math>\beta</math></sup>	Bélgica (Elke-Lecoutere)	PA14 wt y PA14 $\Delta$ CRISPR
JBD18	Lisogénico	dsDNA	Canadá (Bondy-Denomy)	PA14 $\Delta$ CRISPR

$\beta$ : dsDNA: DNA de doble cadena.

### 7.4 Tapices Bacterianos.

Se realizaron usando 300 $\mu$ L de cultivo líquido de la cepa bacteriana en medio LB, previamente incubado por 18 horas a 37°C en agitación continua a 200 G, y 3mL de medio T $\phi$  previamente calentado (ver Preparación de Medios de Cultivo, Apéndice). La mezcla se homogenizó y se vertió en una caja Petri con medio LB, cubriendo toda el área de ésta sin provocar la aparición de burbujas. Se dejó que la mezcla se enfriara y solidificara durante 15 minutos, para hacer uso del tapiz.

### 7.5 Re-propagación de fagos.

Se generó un *stock* de cada ejemplar para propagar la colección de fagos temperados. Para esto se vertieron 10 $\mu$ L del fago de interés, procedentes del *stock* original de la colección, sobre un tapiz de la cepa bacteriana correspondiente. Se dejó secar la gota y posteriormente, el tapiz se incubó de 18 horas a 37°C. El resultado de esto fue el conjunto de placas de lisis denominado *spot* de lisis, del cual se tomaron muestras usando un asa bacteriológica que se pasó en línea recta sobre una caja Petri nueva con medio LB. Inmediatamente después, se vertió un tapiz con la cepa PA14 *wt* y se incubó en las condiciones previamente mencionadas. De las placas aisladas se tomó una muestra con el asa bacteriológica y se repitió el procedimiento de la generación de placas hasta realizar 3 pasajes. Del tercer pasaje se tomaron 10 placas con ayuda de una pipeta *Pasteur* y se depositaron en un tubo *ependorf* con 1mL de medio TMG-SM (ver Preparación de Medios de Cultivo, Apéndice). El tubo se dejó en agitación en frío durante 18 horas para después ser centrifugado a 10, 000 G por 10 minutos a 4°C (ver Equipo, Apéndice).

Al final, se recuperaron aproximadamente 700 $\mu$ L del sobrenadante y se depositaron en un tubo *ependorf*, el cual se almacenó a 4°C. Este procedimiento se hizo para cada uno de los 80 fagos de la colección.

### 7.6 Obtención de lisógenas.

Para cada lisógena, el procedimiento consistió en colocar 10 $\mu$ L del fago de interés sobre un tapiz de la cepa PA14 *wt*, haciendo uso de una caja Petri con medio LB. Se dejó secar la gota y se incubó la caja por un periodo de 18 horas a 37°C. Del *spot* de lisis generado se tomaron 10 muestras del centro usando un asa bacteriológica. Este procedimiento aseguró la extracción de bacterias que hayan sido lisogenizadas por el fago de interés. Las 10 muestras se estiraron en cajas Petri con medio LB y se incubaron en las condiciones previamente mencionadas para permitir el crecimiento de colonias aisladas.

De cada una de las 10 estrías se tomó una colonia aislada, y se volvieron a estriar en cajas Petri con medio LB. Este paso se volvió a repetir, dando un total de 3 pasajes, lo cual aseguraba que no se estuviera arrastrando el fago resistente en cuestión (Figura 7.1). A partir de este punto se realizaron dos pruebas para confirmar si las candidatas a lisógenas construidas realmente estaban portando el fago de interés.

#### **Figura 7.1. Construcción de lisógenas.**

En la primera prueba, para cada candidata a lisógena obtenida del tercer pasaje se tomó muestra para preparar un cultivo líquido de ésta, el cual se incubó por 18 horas a 37°C en agitación continua a 200 G. Posteriormente, se pasó 1mL de cada cultivo *overnight* a tubos *eppendorf*, que fueron centrifugados a 10,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. De cada tubo se tomaron 5µL de sobrenadante, los cuales fueron goteados en una caja Petri con tapiz de la cepa PA14 *wt*. La caja se incubó bajo las condiciones antes mencionadas. Si el sobrenadante del cultivo de la colonia en cuestión lograba provocar un *spot* de lisis, entonces dicha colonia pasaba exitosamente la primera prueba, ya que se evidenciaba que dicha colonia estaba formada por bacterias que portaban fagos, los cuales fueron liberados al medio de cultivo y al ser recuperados y goteados en el tapiz, causaron infección. En la segunda prueba, para cada candidata a lisógena obtenida del tercer pasaje se

tomaron muestras que fueron estriadas en cajas Petri con medio LB. Cada una de estas estrías fue estriada perpendicularmente con una muestra del *stock* del fago que debe portar como profago. Si se observaba que la estría de la colonia en cuestión presentaba un crecimiento homogéneo y sin interrupciones, entonces dicha colonia pasaba exitosamente la prueba, ya que se evidenciaba que dicha colonia estaba formada por bacterias que portaban fagos, los cuales no permitieron la infección del mismo fago debido al fenómeno de inmunidad.

### **Figura 7.2. Comprobación de Lisógenas.**

Las colonias de cada lisógena que pasaron exitosamente ambas pruebas se consideraron lisógenas verdaderas y se almacenaron tanto en *stabs* a temperatura ambiente (25°C) como en viales con glicerol a -80°C (ver Preparación de Medios de Cultivo, Apéndice).

### 7.7 Titulación de fagos.

Este procedimiento consistió en la elaboración de diluciones seriadas y se realizó para conocer las unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL) en cada uno de los *stocks* de fagos que se re-propagaron. De cada *stock* de fago se tomó una muestra de 10µL y se homogenizó con 990µL de medio TMG-SM. De esta dilución se tomaron 10µL para mezclarse con otro volumen de 990µL del mismo medio. Esto se repitió hasta alcanzar un

total de cuatro diluciones:  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  (Figura 7.3). Posteriormente se gotearon 5  $\mu$ L del *stock* del fago y 5  $\mu$ L de cada dilución sobre un tapiz de PA14 wt, en una caja Petri con medio LB. La caja se incubó por 18 horas a 37°C y se identificó en que dilución aparecieron placas aisladas para realizar el conteo de éstas. El número resultante se introdujo en la siguiente fórmula para conocer el título del fago:

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

### 7.7.1 Homogenización de títulos.

Una vez conocido el título del *stock* de cada uno de los fagos re-propagados, se procedió a bajar el título de los fagos sensibles hasta  $10^6$  UFP/mL mediante la fórmula antes mencionada y a través del método descrito en la Figura 7.3.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \qquad V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$C_1$  = concentración del *stock* original

$V_1$  = volumen tomado del *stock* original para tener la concentración del nuevo *stock*

$C_2$  = concentración del nuevo *stock*

$V_2$  = volumen del nuevo *stock*

**Figura 7.3. Comprobación del título de los fagos sensibles homogenizados por el método de las diluciones seriadas.**

7.8 Ensayo de infección.

Este ensayo consistió en la preparación de tapices bacterianos, en cajas Petri de LB con medio T $\phi$ , a partir de las cepas PA14 *wt*, PA14 $\Delta$ CRISPR y las lisógenas generadas, y exponiéndolas a la infección de la colección de fagos temperados y controles. Esto se realizó goteando 5 $\mu$ L de cada fago, con un título de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> UFP/mL, sobre la superficie del tapiz bacteriano en cuestión y procediendo con su incubación por 18 horas a 37°C. Para optimizar el uso de la superficie del tapiz se hizo uso de una cuadrícula guía para así gotear todos los fagos posibles (Figura 7.4) (Sepúlveda-Robles, datos no pub.).

**Figura 7.4. Dimensiones de la cuadrícula guía utilizada para gotear los fagos.**

7.8.1 Lectura de los resultados.

Después de la incubación del tapiz bacteriano y los fagos goteados, se procedió a identificar la presencia o ausencia de *spots* de lisis.

Como se indica en la Figura 7.5, cuando se presenta uno donde se goteó el fago, se considera como una infección; pero de no observarse alguno, se trata de una no infección (cuando se gotean sobre PA14 *wt* o PA14 $\Delta$ CRISPR) o de una exclusión (cuando se gotean sobre las lisógenas). Cada ensayo de infección se hizo por triplicado.

**Figura 7.5. Lectura de los resultados del ensayo de infección.**

**7.9 Extracción de DNA de fago por gradientes de CsCl.**

Para cada fago, se preparó un cultivo *overnight* con 3mL de medio LB líquido que se inoculó con la cepa bacteriana correspondiente y se dejó en incubación por 18 horas a 37°C con agitación de 200 g. Pasado ese tiempo, se tomó 1mL del cultivo y se añadió a un matraz que contenía 100 $\mu$ L del *stock* del fago de interés y 1mL de CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub> (0.4M/0.1M), se dejó reposar la mezcla por 10 minutos. Posteriormente, a la mezcla se le adicionaron 50 mL de medio LB líquido y se incubó por 6 horas a 37°C con agitación de 200 g. Después, al matraz se le agregaron 5mL de cloroformo y se dejó en agitación a 37°C por 10 minutos a 200 g. Al terminar este paso la mezcla se transfirió a un tubo falcon de 50 mL que fue centrifugado a 6,000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo falcon de 50 mL, y se le

agregaron 4g de PEG (Polietilenglicol), 2g de NaCl, 2.5  $\mu$ L de DNAsa y 2.5 $\mu$ L de RNAsa, la mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego la mezcla se agitó vigorosamente hasta que el PEG y el NaCl se disolvieron completamente, lo que permitió dejar el tubo a 4°C durante 18 horas. Pasado ese tiempo el tubo fue centrifugado a 10,000 g por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante fue eliminado. La pastilla resultante fue resuspendida con 1mL de medio TMG-SM y transferida a dos tubos *ependorf* que contenían 500 $\mu$ L de cloroformo, los tubos se mezclaron y se centrifugaron a 10,000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue recuperado. Se realizó este paso dos veces más, lo que dio un total de 3 lavados con cloroformo. Al final se recuperaron 500 $\mu$ L de muestra de cada tubo *ependorf*, que se mezclaron con 1mL de medio TMG-SM. Los 2mL resultantes de la mezcla se vaciaron en un tubo *Beckman Ultra Clear*<sup>®</sup> que previamente fue llenado con 4 soluciones de CsCl a diferente molaridad y densidad (Figura 7.6). Posteriormente, el tubo fue centrifugado a 22,000 g durante 2 horas y media a 4°C en condiciones de vacío y sin desaceleración. Pasado este tiempo, se usó una jeringa de 5mL para recuperar 1mL de la muestra de fago purificado que se observaba en la “Zona de Fagos Verdaderos” (Figura 7.6). La muestra recolectada se transfirió a una membrana *Spectra/Por*<sup>®</sup> de 6-8 kD y se dejó reposar en 1L de solución de diálisis (ver Preparación de Soluciones, Apéndice) durante 18 horas a 4°C bajo condiciones de agitación. Consecutivamente, dicha muestra dializada se recuperó en dos tubos *ependorf* (cada uno con 500 $\mu$ L de muestra).

Las muestras fueron sometidas al método de extracción de DNA por fenol/cloroformo, el cual se describe a continuación:

A los tubos se les agregó un volumen equivalente de fenol/cloroformo y se centrifugaron a 10,000 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y sometido a otros dos lavados de fenol/cloroformo. Posteriormente, al sobrenadante del tercer lavado se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío, dicha mezcla se agitó durante 1 minuto y se centrifugo a 10,000 g durante 3 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante de los tubos y se invirtieron sobre papel durante 5 minutos para dejar secar la pastilla formada.

El siguiente paso fue agregarle a cada tubo 1mL de etanol al 70%, la mezcla se agitó durante 1 minuto y se centrifugó a 10,000 g durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado y la pastilla se sometió a otros dos lavados con etanol al 70%. Finalmente, después del tercer lavado, se eliminaron los remanentes de etanol en la pastilla por medio del *SpeedVac*<sup>®</sup> (ver Equipo, Apéndice) a temperatura media durante 20 minutos y pasado ese tiempo la pastilla se resuspendió en 50 a 100µL de agua estéril. La muestra de DNA de fago purificado se cuantificó en el NanoDrop<sup>®</sup> (ver Equipo, Apéndice) y se almacenó a -20°C.

#### 7.10 Patrones de Restricción (RFLP's).

Cada reacción de secuenciación requirió un volumen de 20µL y los siguientes reactivos:

- 1 µg de DNA del fago en cuestión purificado por gradientes de CsCl.
- 10 U de la Enzima de Restricción.
- *Buffer* de la Enzima de Restricción 1X.
- Agua estéril.

Se agregó cada reactivo a un tubo *ependorf* y se centrifugó a 14,000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente para favorecer el contacto entre los reactivos. La mezcla en el tubo se incubó a 37°C durante 4 horas y pasado ese tiempo se cargó en un gel de agarosa al 1% y se corrió en una cámara de electroforesis a 70V por 2 horas. Pasado ese tiempo el gel se dejó reposar en

una solución de *buffer* TAE 1X con 5µL de bromuro de etidio durante 40 minutos. Finalmente el gel se fotografió en el *Transilluminator UVP®* (ver Equipo, Apéndice) bajo luz UV.

#### 7.11 Diseño de *primers*.

Para el diseño de *primers* se usó *PerlPrimer v1.1.21*. En esta aplicación se introdujo la secuencia que se deseaba amplificar y se consideraron los siguientes parámetros de diseño:

- Temperatura de fusión de los *primers* ( $T_m$ ).
- Diferencia de  $T_m$  entre el *primer forward* y el *primer reverse*.
- La longitud de los *primers*.
- Posicionamiento de los *primers* en la secuencia problema.
- Porcentaje de Guaninas y Citosinas (%GC).

Una vez que la aplicación encontraba los *primers* óptimos para amplificar la secuencia deseada, éstos se comprobaron con el programa *jPCR v.3.16*. En esta aplicación, se introdujeron los *primers* diseñados y la secuencia de interés para realizar *PCR in silico*, y verificar que se obtenían las secuencias deseadas a través del tamaño de las mismas.

#### 7.12 PCR.

Método 1 - *PCR* a partir de *stock* de fago.

Para cada fago de interés se usaron 10 cajas Petri con LB a las cuales se les añadió un tapiz de medio Tφ con la cepa PA14 *wt*. Los tapices de cada una de las cajas fueron extraídos y vaciados en un tubo falcon de 50mL usando una espátula de metal. A las cajas de donde se extrajeron los tapices se les agregó 5mL de medio TMG-SM y se dejaron en agitación a 100 g durante una hora. Posteriormente, se vació el medio TMG-SM de cada caja en el tubo falcon de 50mL y se dejó en rotación a 4°C por 4 horas. Posteriormente el tubo se centrifugó a 10,000 g por 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se recuperó y se

sometió a un lavado con cloroformo para eliminar los remanentes bacterianos. Dicho sobrenadante se cuantificó por el método de las diluciones seriadas para conocer las UFP/mL y de esta manera pudo ser usado para llevar a cabo las reacciones de *PCR*. Cada reacción de *PCR* requirió un volumen de 20µL y los siguientes reactivos:

- 3 µL del *stock* del fago en cuestión [ $10^9$ - $10^{10}$  UFP/mL].
- 2 µL de *Buffer* [10X].
- 0.4 µL de *dNTPs*.
- 0.2 µL de *Primer Forward* [10µM].
- 0.2 µL de *Primer Reverse* [10µM].
- 0.2 µL de *High Fidelity Pol* [2.5U/µL].
- Agua inyectable.

#### Método 2 - *PCR* a partir de DNA de fago extraído con DEAE-Celulosa.

Para cada fago de interés se hizo exactamente lo mismo que en el Método 1, pero el sobrenadante cuantificado por el método de las diluciones seriadas fue tratado con celulosa como se describe a continuación:

Para cada fago de interés, se vaciaron 600µL del *stock* de fago en cuestión y 600µL de DEAE-Celulosa equilibrada con medio líquido LB en un tubo *ependorf*. La mezcla se invirtió 30 veces de forma lenta para no provocar espuma y se centrifugó a 11,000 g por 5 minutos a 4°C. Se recuperaron 800µL de sobrenadante, los cuales fueron mezclados con 100µL de NaCl 5M y 540µL de isopropanol frío, la mezcla se agito y se dejó reposar a -20°C por 20 minutos. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14,000 g por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el tubo se invirtió para dejar secar la pastilla formada. Después, la pastilla se lavó con etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 14,000 g por 5 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante.

Finalmente se eliminaron los remanentes de etanol en la pastilla por medio del *SpeedVac*® (ver Equipo, Apéndice) a temperatura media durante 20 minutos y pasado ese tiempo la pastilla se resuspendió en 50 a 100µL de agua estéril. La muestra de DNA de fago purificado se cuantificó en el *NanoDrop*® (ver Equipo, Apéndice) y se almacenó a -20°C. De esta manera el DNA de fago purificado pudo ser usado para llevar a cabo las reacciones de *PCR*. Cada reacción de *PCR* requirió un volumen de 20µL y los siguientes reactivos:

- 100 ng de DNA de fago extraído con DEAE-Celulosa.
- 2 µL de *Buffer* [10X].
- 0.4 µL de *dNTPs*.
- 0.2 µL de *Primer Forward* [10µM].
- 0.2 µL de *Primer Reverse* [10µM].
- 0.2 µL de *High Fidelity Pol* [2.5U/µL].
- Agua inyectable.

En ambos métodos, las reacciones de *PCR* se llevaron a cabo en el *Thermocycler Bio-Rad*® (ver Equipo, Apéndice) bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 95°C – 5:00
- Desnaturalización: 95°C – 0:30
- Alineamiento: T<sub>m</sub> – 0:30
- Extensión: 72°C – T
- Extensión Final: 72°C – 10:00

T<sub>m</sub> fue la temperatura de fusión específica de los *primers* y T fue el tiempo específico de extensión que dependía del tamaño de amplicón esperado en cada reacción de *PCR*.

Una vez terminadas las reacciones de *PCR* en el *Thermocycler Bio-Rad*®, éstas se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se corrieron en una cámara de electroforesis a 70V por 2 horas. Pasado ese tiempo el gel se dejó reposar

en una solución de *buffer* TAE 1X con 5µL de bromuro de etidio durante 40 minutos a temperatura ambiente y pasado ese tiempo se fotografió en el *Transilluminator UVP®* (ver Equipo, Apéndice) bajo luz UV.

### 7.13 Secuenciación.

Cada reacción de *PCR* requirió un volumen de 20µL y los siguientes reactivos:

- 700 ng de DNA de fago extraído con DEAE-Celulosa.
- 1µL del *Primer Forward o Reverse* [10µM].
- 2 µL de *Mix (Big Dye Terminator® v3.1 Cycle Sequencing RR-24)*.
- 4 µL de *Buffer (Big Dye Terminator® v1.1, v3, 5X Sequencing)*.
- Agua inyectable.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el *Thermocycler Bio-Rad®* (ver Equipo, Apéndice) bajo las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial: 94°C – 5:00
- Desnaturalización: 94°C – 0:30
- Alineamiento: T<sub>m</sub> – 0:30
- Extensión: 72°C – 4:00
- Extensión Final: 72°C – 10:00

T<sub>m</sub> fue la temperatura de fusión específica de los *primers*. Una vez terminadas las reacciones de *PCR* en el *Thermocycler Bio-Rad®*, éstas se purificaron por el método de precipitación con EDTA/Etanol como se describe a continuación: las muestras se transfirieron a un tubo *ependorf* de 1.5mL que contenía 5µL de EDTA 125mM pH 8 y 60 µL de Etanol absoluto. La mezcla se trató brevemente con el *vortex* y se centrifugó por 1 minuto a 14,000 g, se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado ese tiempo, la mezcla se centrifugó a 14,000 g por 20 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante usando la micropipeta de 200µL. A la pastilla resultante se le agregaron 250µL de etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 g por 5 minutos a 4°C eliminando el

sobrenadante, esto se repitió dos veces más. Finalmente se eliminó todo remanente de alcohol con el SpeedVac® (ver Equipo, Apéndice) a temperatura media durante 20 minutos y pasado ese tiempo la muestra estaba lista para mandarse a secuenciar.

#### 7.14 Búsqueda en bases de datos.

Para la identificación de genes en las secuencias se usó la herramienta bioinformática *BLAST v. 2.4.0* del *NCBI*.

#### 7.15 Alineamientos.

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con la herramienta bioinformática *SEAVIEW v.4.1*

### **VIII. Resultados**

#### 8.1 Clasificación de los fagos temperados.

Se llevó a cabo el goteo de cada uno de los fagos de la colección de temperados sobre tapices de las cepas PA14 *wt* y PA14  $\Delta$ *CRISPR*. De esta manera se identificaron 3 grupos basados en su capacidad de infección (Figuras 8.1 a 8.2 y Tablas 8.1 a 8.2).

**Figura 8.1. Fagos temperados que infectaron a la cepa PA14 wt.** Se realizó un tapiz bacteriano con 300µL de un cultivo *overnight* de la cepa PA14 wt y 3 mL de medio TΦ. Posteriormente se gotearon 5 µL de cada fago perteneciente a la colección de temperados. Aquí se muestran todos los fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14 wt. Los fagos ΦFc19, ΦFc20, ΦFc35, ΦFc37 y ΦFc38 causaron un *spot* de lisis tan tenue que no se pueden apreciar tan fácilmente en la fotografía, sin embargo dicho *spot* si fue evidente cuando se observaron las cajas muy de cerca y a contra luz.

**Figura 8.2. Fagos temperados que infectaron a la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR.** Se realizó un tapiz bacteriano con 300 $\mu$ L de un cultivo *overnight* de la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR y 3 mL de medio T $\Phi$ . Posteriormente se gotearon 5  $\mu$ L de cada fago perteneciente a la colección de temperados. Aquí se muestran todos los fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR. Se puede apreciar que los mismos fagos capaces de infectar a la cepa PA14 wt también pudieron infectar a la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR. El fago JBD18 no se incluyó en esta prueba debido a que ya ha sido usado por el grupo de trabajo del laboratorio y se sabe muy bien que si puede infectar a la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR pero no a la PA14 wt.

## 8.2 Identificación de los fagos resistentes y los fagos sensibles.

Para la construcción de las lisógenas, primero se tuvieron que identificar los fagos que pudieran residir en la cepa PA14 wt como profagos y los fagos que pudieran evidenciar una infección secundaria en dichas lisógenas.

De esta manera, se decidió usar sólo a dos grupos: a los fagos capaces de infectar a PA14 wt y PA14  $\Delta$ CRISPR (Fagos Resistentes) y a los fagos capaces de infectar sólo a PA14  $\Delta$ CRISPR (Fagos Sensibles). Los fagos que conformaron cada grupo aparecen en la tabla 8.1.

## 8.3 Construcción y verificación de lisógenas.

Se construyeron las lisógenas usando cada uno de los fagos resistentes identificados, posteriormente cada candidata a lisógena fue evaluada con 2 pruebas para verificar si era una lisógena verdadera. En total, 27 de las 30

candidatas a lisógenas pasaron las 2 pruebas exitosamente y se consideraron como lisógenas verdaderas (Tabla 8.1). un ejemplo de las pruebas llevadas a cabo puede apreciarse en las figuras 8.3 y 8.4.

**Figura 8.3. Prueba de producción de fago.** La prueba no. 1 consistió en evaluar si el sobrenadante de un cultivo de la candidata a lisógena contenía fagos que fueran capaces de causar lisis en un tapiz de la cepa PA14 wt. Aquí es posible apreciar que las candidatas a lisógena número 2 y 4 del fago  $\Phi$ Ps42 causaron *spot* de lisis porque ya son portadoras de dicho fago, el cual al ser liberado en el medio de cultivo y posteriormente goteado es capaz de causar infección en la cepa PA14 wt.

**Figura 8.4. Prueba de inmunidad.** La prueba no. 2 se trató de observar si el crecimiento de una estría proveniente de una candidata a lisógena no se interrumpía cuando era estriada con el fago que debería estar portando. Aquí se observa que las candidatas a lisógena número 2 y 4 del fago  $\Phi$ Ps42 tuvieron un crecimiento uniforme porque ya son portadoras de dicho fago, el cual inhibió una infección secundaria del mismo fago.

#### 8.4 Homogenización del título de los fagos sensibles.

Por otro lado, los fagos sensibles fueron tratados con el método de las diluciones seriadas y los cálculos necesarios para que alcanzaran un título de  $10^6$  UFP/mL, los resultados se muestran en la tabla 8.1. Todos los fagos sensibles tuvieron un título de  $10^6$  UFP/mL.

#### 8.5 Ensayos de Infección sobre las lisógenas para identificar fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas.

Para este experimento se gotearon todos los fagos sensibles sobre cada una de las 27 lisógenas construidas y verificadas. El perfil de infección se muestra en la tabla 8.3. Los controles usados se muestran en la figura 8.5. Si se observaba que los fagos sensibles eran capaces de infectar por completo alguna lisógena, entonces se consideraba que el profago de dicha lisógena

estaba portando genes anti-CRISPR (Tabla 8.1). Se identificaron 8 fagos que permitieron la infección de todos los fagos sensibles (Tabla 8.2).

**Figura 8.5. Controles del ensayo de Infección sobre las lisógenas.** Los controles para este experimento fue el goteo de todos los fagos resistentes sobre la cepa PA14 *wt* y el goteo de todos los fagos sensibles sobre la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR.

**Tabla 8.1. Clasificación de los fagos temperados.** En la columna número 1 (Cepa PA14 wt) se marca con un signo + a todos aquellos fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14 wt. En la columna número 2 (Cepa PA14  $\Delta$ CRISPR) se marca con un signo + a todos aquellos fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14  $\Delta$ CRISPR. En la columna número 3 (Fagos que no infectaron a ninguna) se marcaron todos los fagos que no causaron infección en ninguna cepa. En la columna número 4 se marcan los mismos fagos que en la columna número 1, pero ahora son llamados Fagos Resistentes. En la columna número 5 se marcan los mismos fagos que en la columna número 2, pero ahora son llamados Fagos Sensibles. En la columna número 6 se indican las lisógenas que pudieron ser construidas y verificadas a partir de los Fagos Resistentes (27 de 30). En la columna número 7 se marcan los Fagos Sensibles que alcanzaron un título de  $10^6$  UFP/mL. Finalmente, en la columna número 8 se indican los Fagos Resistentes que presentaron un fenotipo anti-CRISPR al realizar el ensayo de infección descrito en el apartado 8.5. Las celdas en color verde indican fagos sensibles, las celdas de color amarillo los fagos no compatibles y las celdas en color gris los fagos con actividad anti-CRISPR.

Fagos con fenotipo anti-CRISPR	Fagos sin fenotipo anti-CRISPR
<p>ΦFc05, ΦFc13, ΦFc30, ΦPs44,  ΦPs46, ΦPs49, ΦPs61, ΦH70  (control).</p>	<p>ΦFc14, ΦFc15, ΦFc17, ΦPs42, ΦFc18,  ΦPs43, ΦPs48, ΦFc20, ΦPs51, ΦFc21,  ΦH64, ΦFc24, ΦH65, ΦFc29, ΦH67, ΦFc33,  ΦH74, ΦFc35, LKA5.</p>

**Tabla 8.2. Actividad Anti-CRISPR/Cas en los fagos resistentes.** El fenotipo anti-CRISPR se presentó en 8 de las 27 lisógenas construidas con los 30 fagos que fueron capaces de infectar a la cepa PA14 wt (3 lisógenas no pasaron las 2 pruebas antes mencionadas y se descartaron).

**Tabla 8.3. Perfil de infección.** Este experimento se llevó a cabo con los tapices bacterianos de cada una de las 27 lisógenas construidas. El método se basó en gotear cada uno de los fagos sensibles sobre cada una de las lisógenas y observar la presencia de un *spot* de lisis. En la tabla se utilizó un (+) para denotar que el resultado del goteo fue un *spot* de lisis tenue, dos (++) para indicar un *spot* de lisis normal y tres (+++) para evidenciar que el resultado fue un *spot* de lisis fuerte. Aquellos fagos que no permitieron la infección de todos los fagos sensibles no se consideraron con fenotipo anti-CRISPR.

8.6 Análisis de las regiones conservadas y accesorias de los fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas.

Primero se empleó la técnica de PCR para analizar las regiones conservadas de los fagos que presentaron fenotipo anti-CRISPR:

**Figura 8.6. PCR para la Transposasa B y Ner.** La Transposasa B es parte del sistema de transposición-replicación y Ner se encuentra muy conservado en los fagos de tipo *Mu-like*. Los controles positivos para este experimento fueron los fagos  $\Phi$ H70 y PaMx73, mientras que los controles negativos fueron los fagos  $\Phi$ Ps56 y  $\Phi$ H66. Se observa que todos los fagos son portadores tanto de la transposasa B (amplicón de 769 bp) como de Ner (amplicón de 287 bp).

Después se empleó la técnica de PCR para analizar las regiones accesorias de los fagos que presentaron fenotipo anti-CRISPR:

**Figura 8.7. PCR para la RGP B.** Los genes b de la Región de Plasticidad Genómica B son muy característicos de los fagos *Mu-like* porque representan regiones de inserción-delección, algo muy común en fagos con una alta actividad de transferencia horizontal. Los controles para este experimento fueron los fagos  $\Phi$ H70 que se sabe que presenta un amplicón de 949 pb y PaMx73 con un amplicón conocido de 224 pb. Se puede observar que 5 fagos presentaron la RGP B (similares a  $\Phi$ H70) y 2 no (similares a PaMx73).

**Figura 8.8. PCR para g9.** En la región de plasticidad genómica G se ha reportado que el gen firma g9 está presente en todos los *locus* anti-CRISPR. Los controles positivos para este experimento fueron los fagos  $\Phi$ H70 y PaMx73, mientras que los controles negativos fueron los fagos  $\Phi$ Ps56 y  $\Phi$ H66. Se observó que todos los fagos presentaron un amplicón de 178 pb, por lo tanto se evidenciaba la presencia del gen firma g9, y un *locus* anti-CRISPR.

**Figura 8.9. PCR para la RGP G.** Para confirmar exactamente si los fagos con fenotipo anti-CRISPR estaban portando genes anti-CRISPR, se usaron *primers* capaces de amplificar la región de plasticidad genómica G, ya que es ahí donde se han reportado todos los genes anti-CRISPR hasta el momento (Cazares et al., 2014). Los *primers* usados clasificaron a los fagos identificados en *Mu-like* de tipo 1 y *Mu-like* de tipo 2. Los fagos  $\Phi$ H70 y PaMx73 fueron controles positivos en la PCR con los *primers* de la RGP G Tipo 1. Y sirvieron como controles negativos en la PCR con los *primers* de la RGP G Tipo 2. Se observó que sólo el fago  $\Phi$ Fc05 dio señal con los *primers* de la RGP G de tipo 1, mientras que los otros 6 fagos presentaron el amplicón esperado para los *primers* de tipo 2.

En resumen, la técnica de PCR permitió obtener los resultados que se muestran en la tabla 8.8:

**Tabla 8.4. Clasificación de los fagos portadores de genes Anti-CRISPR/Cas.**

<i>Primers</i>	ΦFc05	ΦFc13	ΦFc30	ΦPs44	ΦPs46	ΦPs49	ΦPs61
<b>Transposasa B</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Ner</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>RGP B</b>	+			+	+	+	+
<b>Firma g9</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>RGP G Tipo 1</b>	1600 bp						
<b>RGP G Tipo 2</b>		1070 bp					

En resumen, la técnica de PCR permitió saber que los fagos con fenotipo anti-CRISPR poseen un sistema de transposición-replicación y una región accesoria B (5 de 7). Además de que portan genes anti-CRISPR de tipo 1 (ΦFc05) y tipo 2 (ΦFc13, ΦFc30, ΦPs44, ΦPs46, ΦPs49 y ΦPs61).

### 8.7 Secuenciación de los fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas.

Se realizó la secuenciación de las RGP G de cada uno de los fagos con actividad Anti-CRISPR/Cas para identificar los genes que portan. Los resultados se muestran en las tablas 8.9 y 8.10.

<b>Fago</b>	<b>Tipo de Secuencia</b>	<b>Tamaño de Secuencia</b>	<b>Genes Identificados</b>	<b>BLAST NCBI</b>
ΦFc05	Forward	No determinado	No determinado	---

	<b>Reverse</b>	<b>738 pb</b>	<b>g7, g8, g9</b>	<b>99%</b> <b>JBD5</b>
--	----------------	---------------	-------------------	---------------------------

**Tabla 8.5. Secuenciación con los primers de la RGP G Tipo 1.** La secuenciación de la RGP G del fago  $\Phi$ Fc05 se llevó a cabo con el *primer forward* *Fs1* y *reverse* *R*, sin embargo sólo se obtuvieron resultados con la secuenciación donde se usó el *primer reverse*. Al realizar el BLAST en el NCBI se observó que el porcentaje de identidad entre la RGP G del fago  $\Phi$ Fc05 y la RGP G del fago JBD5 era de 99%.

<b>Fago</b>	<b>Tipo de Secuencia</b>	<b>Tamaño de Secuencia</b>	<b>Genes Identificados</b>	<b>BLAST NCBI</b>
$\Phi$ Fc13	<b>Forward</b>	<b>841 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>99%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
	<b>Reverse</b>	<b>741 pb</b>	<b>g5, g9</b>	<b>97%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
$\Phi$ Fc30	<b>Forward</b>	<b>819 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>98%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
	<b>Reverse</b>	<b>735 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>99%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
$\Phi$ Ps44	<b>Forward</b>	<b>812 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>97%</b> <b>PaMx73</b>
	<b>Reverse</b>	<b>714 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>99%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
$\Phi$ Ps46	<b>Forward</b>	<b>727 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>96%</b> <b>PaMx73</b>
	<b>Reverse</b>	<b>613 pb</b>	<b>g5, g9</b>	<b>97%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
$\Phi$ Ps49	<b>Forward</b>	<b>864 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>97%</b> <b>PaMx73</b>
	<b>Reverse</b>	<b>672 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>99%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>
$\Phi$ Ps61	<b>Forward</b>	<b>793 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>98%</b> <b>PaMx73</b>
	<b>Reverse</b>	<b>674 pb</b>	<b>g1, g5, g9</b>	<b>99%</b> <b>vB_PaeS_PAO1_Ab30</b>

**Tabla 8.6. Secuenciación con los primers de la RGP G Tipo 2.** La secuenciación de la RGP G de los fagos  $\Phi$ Fc13,  $\Phi$ Fc30,  $\Phi$ Ps44,  $\Phi$ Ps46,  $\Phi$ Ps49 y  $\Phi$ Ps61 se llevó a cabo con el *primer forward* *Fs2* y *reverse* *R*, ambas secuenciaciones dieron

resultados coherentes. Al realizar el BLAST en el NCBI se observó que el porcentaje de identidad entre la RGP G de estos fagos y la RGP G del fago vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30 (en general, porque con los fagos  $\Phi$ Ps44,  $\Phi$ Ps46,  $\Phi$ Ps49 y  $\Phi$ Ps61 se presentó un *match* en la secuenciación a través del *forward* con PaMx73) era del 90%.

## 8.8 Análisis de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados.

Una vez obtenidas las secuencias de los genes Anti-CRISPR/Cas se realizaron alineamientos (a nivel de *DNA* y aminoácidos) tomando como referencia los genes Anti-CRISPR/Cas de los fagos *Mu-like* PaMx73 y  $\Phi$ H70.

### 8.8.1 Alineamiento de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos

**Figura 8.10. Alineamiento del gen g7 a nivel de *DNA*.** En esta figura se puede apreciar que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 no alcanzó a cubrir todo el gen g7 del fago JBD5. Sin embargo, se observa una alta identidad a partir del nucleótido 240 y hasta el final.

**Figura 8.11. Alineamiento del gen g8 a nivel de *DNA*.** En esta figura se puede apreciar que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 fue suficiente para cubrir todo el gen g8 del fago JBD5. Se observa gran identidad entre las secuencias.

**Figura 8.12. Alineamiento del gen g9 a nivel de *DNA*.** En esta figura se puede apreciar que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 fue suficiente para cubrir todo el gen g9 del fago JBD5. Se observa gran identidad entre las secuencias.

**Figura 8.13. Alineamiento del gen g7 a nivel de *aminoácidos*.** En esta figura se puede apreciar lo mismo que a nivel de *DNA*, que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 no alcanzó a cubrir todo el gen g7 del fago JBD5. Y se observa una alta identidad a partir del nucleótido 240 y hasta el final.

**Figura 8.14. Alineamiento del gen g8 a nivel de DNA.** En esta figura se puede apreciar lo mismo que a nivel de DNA, que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 fue suficiente para cubrir todo el gen g8 del fago JBD5. Igual se observa gran identidad entre las secuencias.

**Figura 8.15. Alineamiento del gen g9 a nivel de DNA.** En esta figura se puede apreciar lo mismo que a nivel de DNA, que la secuenciación con el *reverse* en la RGP G del fago  $\phi$ Fc05 fue suficiente para cubrir todo el gen g9 del fago JBD5. También se observa gran identidad entre las secuencias.

Genes anti-CRISPR	Dominio	Valor de corte
g9	Winged helix-turn-helix DNA-binding; large tegument protein UL36; Provisional Largest subunit of RNA polymerase (RNAP), N-terminal domain.	5.25x10 <sup>-4</sup> 4.30x10 <sup>-4</sup> 4.52x10 <sup>-4</sup>

**Tabla 8.7. Dominios conservados en el gen g9 del fago  $\phi$ Fc05 a nivel de DNA y aminoácidos.** Los dominios descritos en esta tabla coinciden con los dominios ya reportados en el fago PaMx73 y  $\phi$ H70.

8.8.2 Alineamiento de los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos Mu-*like* Tipo 2. (Figuras 8.20 a 8.25 y Tablas 8.12 a 8.15)

**Figura 8.16. Alineamiento del gen g1 a nivel de DNA.** Se puede observar que las secuenciaciones llevadas a cabo con el *reverse* presentan una gran ausencia de nucleótidos al principio, por lo tanto la secuencia más confiable para el gen g1 de los fagos de tipo 2 está dada por las secuenciaciones llevadas a cabo con el *forward* solamente. F significa secuenciación con el *forward* y R secuenciación con el *reverse*.

**Figura 8.17. Alineamiento del gen g5 a nivel de DNA. Figura 8.20. Alineamiento del gen g1 a nivel de DNA.** Se puede observar que las secuenciaciones llevadas a cabo tanto con el *reverse* como con el *forward* presentan una gran similitud, por lo tanto ambas secuenciaciones para el gen g5 de los fagos de tipo 2 son confiables. F significa secuenciación con el *forward* y R secuenciación con el *reverse*.

**Figura 8.18. Alineamiento del gen g9 a nivel de DNA. Figura 8.20. Alineamiento del gen g1 a nivel de DNA.** Se puede observar que las secuenciaci3nes llevadas a cabo con el *forward* presentan una ausencia de nucle3tidos al final, por lo tanto la secuencia m3s confiable para el gen g9 de los fagos de tipo 2 est3 dada por las secuenciaci3nes llevadas a cabo con el *reverse* solamente. F significa secuenciaci3n con el *forward* y R secuenciaci3n con el *reverse*.

**Figura 8.19. Alineamiento del gen g1 a nivel de amino3cidos.** Como ya se observ3 en el alineamiento del gen g1 de los fagos tipo 2 a nivel de DNA, la 3nica secuencia confiable de amino3cidos para este gen est3 dada por la secuenciaci3n llevada a cabo con el *forward* solamente. F significa secuenciaci3n con el *forward* y R secuenciaci3n con el *reverse*.

**Figura 8.20. Alineamiento del gen g5 a nivel de amino3cidos. Figura 8.23. Alineamiento del gen g1 a nivel de amino3cidos.** Como ya se observ3 en el alineamiento del gen g5 de los fagos tipo 2 a nivel de DNA, ambas secuencias de amino3cidos para este gen son confiables. F significa secuenciaci3n con el *forward* y R secuenciaci3n con el *reverse*.

**Figura 8.21. Alineamiento del gen g9 a nivel de amino3cidos. Figura 8.23. Alineamiento del gen g1 a nivel de amino3cidos.** Como ya se observ3 en el

alineamiento del gen g9 de los fagos tipo 2 a nivel de DNA, la única secuencia confiable de aminoácidos para este gen está dada por la secuenciación llevada a cabo con el *reverse* solamente. F significa secuenciación con el *forward* y R secuenciación con el *reverse*.

### 8.8.3 Dominios conservados en los genes Anti-CRISPR/Cas identificados en los fagos Mu-*like* Tipo 1 y 2.

Los genes Anti-CRISPR/Cas g1, g5 y g9 no presentaron *match* con ningún dominio de la base de datos CDD v3.15 del NCBI cuando se usó un valor de corte de 0.001. Por lo tanto, se repitió la búsqueda pero usando un valor de corte de 0.01. Los resultados se muestran en la tabla 0.0.

Genes anti-CRISPR	Dominio	Valor de corte
g1	Intermediate filament head (DNA binding) region.	$9.59 \times 10^{-4}$
g5	Glycosyltransferase family 17.	$5.57 \times 10^{-4}$
g9	HTH_24 Winged helix-turn-helix DNA-binding  Protein Kinases, catalytic domain.	$3.92 \times 10^{-3}$

**Tabla 8.8. Dominios en los genes g1, g5 y g9 de los fagos con anti-CRISPR tipo 2.** El filamento intermedio de la cápside es un dominio que esta involucrado en el ensamblaje de fagos como el bacteriófago T4 (Stamenkovic *et al.* 1986). Las glicotransferasas por lo general participan en el anclaje del fago en la bacteria (KR Love *et al.* 2006). El dominio de unión a DNA tipo hélice-giro-hélice es una característica muy marcada en los fagos con actividad anti-CRISPR (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

## 8.9 Patrones de restricción de los fagos con actividad anti-CRISPR.

Para poder observar un panorama general de los fagos identificados y apreciar su similitud con otros fagos reportados, se realizaron digestiones enzimáticas sobre  $\Phi$ Fc13,  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 usando EcoRI, HindII y NcoI.

**Figura 8.22. Patrones de restricción.**  $\Phi$ Fc13,  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 fueron restringidos con EcoRI, HindII y NcoI a 37°C por 3 horas y media, posteriormente el DNA restringido se observó en un gel de agarosa al 1% que se sometió a un voltaje de 70V durante 2 horas. A simple vista se observa que los fagos  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 son idénticos, ya que sus 3 respectivos patrones de restricción tiene alta homología. Por otro lado, parece ser que el fago  $\Phi$ Fc13 es diferente a  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 ya que sus patrones de restricción (sobre todo con EcoRI) presentan varias diferencias con significativas en cuanto al número y tamaño de las bandas encontradas.

Para hacer la comparación con el fago más parecido a éstos 3 fagos, se realizó una restricción enzimática *in silico* sobre el genoma ya reportado del fago vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30. Los resultados se muestran a continuación.

**Figura 8.23. Restricción enzimática *in silico* del fago vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30.** Al comparar las bandas de la restricción enzimática realizada con EcoRI sobre  $\Phi$ Fc13 y vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30 puede observar similitud en cuanto al tamaño y número de bandas. Sin embargo, no se observó lo mismo cuando se comparan las restricciones con HindIII. Por otro lado, las restricciones con NcoI son similares en todos los fagos.

Estos resultados podrían sugerir que  $\Phi$ Fc13 a pesar de ser un fago anti-CRISPR de tipo 2 como  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 contiene regiones diferentes que podrían estarle confiriendo funciones diferentes a los demás fagos del mismo tipo. Hay una sugerencia muy fuerte de que  $\Phi$ Ps44 y  $\Phi$ Ps49 sean el mismo fago debido a que sus patrones de restricción mostraron mucha similitud.

## IX. Discusión

*P. aeruginosa* es una bacteria con amplia distribución en la naturaleza. Sin embargo, su identificación y aislamiento es particularmente alta en los hospitales (generalmente en los lavabos y baños de estos) (Döring *et al.*, 1991). Por esta razón se considera que las infecciones de esta bacteria en seres humanos son producto de cepas hospitalarias más que por cepas ambientales (Gruner *et al.*, 1993). Esta postura se ve reforzada por la observación de las diferencias fenotípicas que presentan cepas aisladas de ambos contextos (Orsi *et al.*, 1994). Una diferencia adicional a esto es la existencia prominente de profagos en los genomas de bacteria patógenas, ya que es a partir de estos elementos genéticos foráneos como se pueden expresar o modificar nuevos rasgos fenotípicos (como genes de virulencia) y se reconocen como los principales contribuidores de la individualidad genética de las cepas bacterianas (Canchaya *et al.*, 2003, 2004). Se sabe que los bacteriófagos representan un importante reto para la supervivencia de las bacterias, aunque éstas a su vez han sido capaces de desarrollar numerosos mecanismos de defensa para resistir las estrategias de infección de los fagos. Uno de los mecanismos de defensa que más importancia ha tenido en los últimos años es el sistema denominado CRISPR/Cas. Este sistema ha sido encontrado en el 48% de las *Eubacteria* y en el 95% de las *Archaea* (Jore, M. M., *et al* 2012). El reciente descubrimiento de las funciones CRISPR/Cas y sus similitudes con el RNA de interferencia (RNAi) de los eucariontes han hecho que este mecanismo de defensa bacteriano este ampliamente estudiado.

Por otro lado, parece que la estrecha relación evolutiva entre las bacterias y los fagos ha hecho que éstos últimos desarrollen contra-estrategias para evadir los novedosos sistemas bacterianos. En el 2013, Bondy-Denomy y colaboradores dieron evidencia de esto al usar 44 lisógenas de la cepa PA14 de *P. aeruginosa* que contenían diferentes genomas de fagos para demostrar que la actividad anti-CRISPR puede ser expresada por profagos y permitir la infección de fagos originalmente sensibles al sistema CRISPR/Cas tipo I-F de la cepa.

El ensayo de infección realizado en este proyecto arrojó los mismos resultados, ya que al construirse 27 lisógenas y gotear 27 fagos sensibles sobre cada una de ellas, se pudo observar que éstos últimos causaban una infección total sobre la cepa PA14 wt con 7 profagos diferentes. Los resultados de este experimento pueden considerarse confiables ya que fueron obtenidos por triplicado y bajo los mismos controles y condiciones.

En general el ensayo de infección no tuvo inconvenientes, aunque no se logró construir el 100% de las lisógenas esperadas. Esto pudo deberse a que los 3 fagos ( $\Phi$ Fc19,  $\Phi$ Fc37 y  $\Phi$ Fc38) que no pudieron lisogenizar a la cepa PA14 wt fueron blanco de mecanismos de defensa ajenos al sistema CRISPR/Cas, como la expresión de proteínas represoras por parte de profagos naturales en dicha bacteria. También cabe la posibilidad de que los fagos hayan experimentado condiciones que no les fueron favorables, como el fondo genético de la bacteria, un bajo porcentaje de GC en el genoma (Pawluk A. et al., 2014) y la ausencia de sitios para la integración.

Para poder saber las características de los 7 fagos que presentaron actividad anti-CRISPR se optó por analizar sus genomas, específicamente sus regiones conservadas (*core*) y variables (accesorias).

La primera cuestión que se planteó fue determinar si los fagos eran de tipo *Mu-like* o No, ya que hasta el momento sólo se han descubierto fagos con actividad anti-CRISPR que son de tipo *Mu-like* (Pawluk A. et al., 2014). Para esto se diseñaron *primers* capaces de amplificar genes como la Transposasa

del mecanismo de transposición-replicación y *Ner* que se encuentran en la región conservada y constituyen una característica muy marcada en los fagos de tipo *Mu-like* (Morgan et al., 2002; Summer et al., 2004; Fogg et al., 2011; Cazares et al., 2014). Los 7 fagos presentaron el amplicón esperado para cada gen asociado a este mecanismo, y se concluyó que eran del tipo *Mu-like*. Esto sugiere que el fondo genético de la cepa PA14 que ha sido usada por varios autores (Bondy-Denomy et al., 2013; Pawluk A. et al., 2014) es un entorno que favorece la selección de este tipo de fagos. Por lo tanto, esperar encontrar fagos No *Mu-like* en una cepa de PA14 definitivamente es poco probable. Sin embargo, esto no quiere decir que los fagos con actividad anti-CRISPR sólo son de tipo *Mu-like*, ya que no se han explorado otras cepas bacterianas portadoras de otros tipos de CRISPR/Cas. Es muy probable que existan fagos de otro tipo con actividad anti-CRISPR debido a la estrecha relación evolutiva de los fagos con las bacterias y a la gran variedad de ambientes en donde coexisten.

La segunda cuestión que se planteó fue determinar que genes estaban portando los fagos de tipo *Mu-like*. Hasta el momento se han reportado 8 genes con actividad anti-CRISPR y un gen firma que parece acompañar a los demás: el gen *g9*. Para esto se diseñaron *primers* capaces de amplificar en las regiones accesorias del fago, específicamente en la región RGP B y RGP G.

Se decidió amplificar la región RGP B porque es una región característica de estos fagos donde se pueden encontrar zonas de inserciones y deleciones resultantes de la transferencia horizontal entre los fagos de este tipo. Los *primers* fueron diseñados para amplificar la región RGP B aunque los genes *b* no estuvieran presentes (Cazares et al., 2014).

**Figura 8.24. Primers de la RGP B.** Los *primers* de la RGP B son capaces de amplificar aunque no se encuentre esta región accesorias. Esto es posible gracias a que dichos *primers* hacen contacto con regiones muy conservadas que flanquean dicha RGP B (si es que existe en el genoma del fago en

cuestión). Como puede observarse, PaMx73 no cuenta con esta región y su amplificación se limita a 224 pb, mientras que el fago  $\Phi$ H70 al contar con esta región da un amplicón más grande, de 949 pb.

Se observó que 5 fagos presentaron la región RGP B (como el fago *Mu-like*  $\phi$ H70) y 2 no la presentaron (como el fago *Mu-like* PaMx73), esto demuestra que fagos con un mismo tipo de genes anti-CRISPR pueden poseer o no otros genes accesorios y refuerza la conclusión de que los fagos identificados son del tipo *Mu-like*.

Para la región RGP G se usaron 3 parejas de *primers* (Cazares et al., 2014), una pareja sirvió para amplificar el gen firma g9 que se sabe que está presente en todos los *locus* anti-CRISPR. Se observó que los 7 fagos presentaron el gen firma, lo cual sugirió la existencia de genes anti-CRISPR en estos fagos.

**Figura 8.25. Primers de la RGP G.** Estos *primers* funcionan haciendo contacto con regiones conservadas y con regiones variables. Dicha región conservada puede encontrarse tanto en fagos con *locus* anti-CRISPR de tipo 1 como con los de tipo 2, y es la región donde hace contacto el *reverse*. Por otro lado, los *forward* Fs1 (para anti-CRISPR de tipo 1) y Fs2 (para anti-CRISPR de tipo 2) buscan regiones variables para poder llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa. Como puede observarse en el esquema, el fago PaMx73 al contar con 3 genes anti-CRISPR presenta un amplicón (1070 pb) más grande que el del fago  $\Phi$ H70 (786 pb), ya que éste último sólo cuenta con g2 y g9, mientras que PaMx73 tiene a g1, g5 y g9.

Para asegurar definitivamente la existencia de genes anti-CRISPR en fagos *Mu-like* de tipo 1 se usó la segunda pareja de *primers*. Se observó que sólo uno de los fagos ( $\phi$ Fc05) presentó amplificación, aunque tuvo un amplicón más grande de lo esperado (1600 pb) y no presentó similitud con los amplicones de los fagos  $\phi$ H70 (786 pb) y PaMx73 (1070 pb) que se sabe son *Mu-like* de tipo 1.

Para corroborar definitivamente la existencia de genes anti-CRISPR en fagos Mu-like de tipo 2 se usó la tercera pareja de *primers*. Se observó que los 6 fagos restantes ( $\phi$ Fc13,  $\phi$ Fc30,  $\phi$ Ps44,  $\phi$ Ps46,  $\phi$ Ps49 y  $\phi$ Ps61) presentaron la amplificación esperada (1070 pb) y no presentaron similitud con otros amplicones porque no se contaba con otros fagos Mu-like de tipo 2 que pudieran ser usados para la técnica de PCR.

Los resultados anteriores demuestran que el gen g9 está ampliamente conservado entre los genomas de los fagos Mu-like con actividad anti-CRISPR y refuerzan su papel como gen firma que siempre está presente. Algunos autores han sugerido que el gen g9 probablemente sólo se activa cuando el fago realiza sus procesos de infección, y es quizá por esta razón que g9 parece ser imprescindible para cualquier fago Mu-like que busque infectar a las bacterias (Pawluk A. *et al.*, 2016).

Por otro lado, los *primers* capaces de clasificar los fagos Mu-like en tipo 2 demuestran que los fagos con actividad anti-CRISPR pueden tener regiones variables (RGP G) que pueden llegar a tener cierto grado de conservación cuando el entorno al que se enfrentan es igual para todos. En este caso todos los fagos provienen de cepas clínicas, y es muy probable que los 6 fagos Mu-like de tipo 2 hayan sido extraídos de un ambiente similar. No ocurrió lo mismo con el único fago Mu-like de tipo 1, que no tuvo homólogos y presentó un amplicón muy diferente. Probablemente este fago no fue tomado del mismo ambiente que los otros 6.

Finalmente se llevó a cabo la secuenciación de los genes anti-CRISPR usando los *primers forward* y *reverse* de la región RGP G para cada tipo de fago Mu-like. Como se puede observar en las tablas 8.9 y 8.10, el primer análisis consistió en realizar un BLAST a cada una de las secuencias obtenidas por la secuenciación con el *forward* y el *reverse*.

Se puede notar que la región secuenciada del fago  $\phi$ Fc05 tuvo un 99% de identidad con los genes anti-CRISPR del fago JBD5 (g7, g8 y g9), mientras que las regiones secuenciadas de los otros 6 fagos tuvieron valores altos de

identidad con los genes anti-CRISPR del fago vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30 (ORF 36, ORF 37 y ORF 38) y PaMx73 (g1, g5 y g9). El fago vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30 fue reportado el año pasado (Essoh C. *et al.*, 2015) en un estudio de caracterización de fagos en aguas del drenaje de una ciudad de Costa de Marfil, en África. Dicho fago esta secuenciado y clasificado como un fago de tipo D3112/B3-*like*, posee tanto transposasa A como B y su genoma presenta mosaicismo. En el artículo se menciona que tienen la sospecha de que los *ORF*'s 36, 37 y 38 de este fago tienen actividad anti-CRISPR, pero nunca se demuestra. El ensayo de infección llevado a cabo en este proyecto comprobó las sospechas del grupo de trabajo, gracias a la identidad de estos *ORF*'s con los genes anti-CRISPR identificados por secuenciación en 6 de los 7 fagos con fenotipo anti-CRISPR. Por lo tanto, podría pensarse en la posibilidad de que los 6 fagos identificados como fagos Mu-*like* de tipo 2, pudieran ser del tipo D3112/B3-*like*.

Para observar la identidad entre las regiones secuenciadas y las regiones con las que apareció el *match* se realizaron alineamientos a nivel de DNA.

En el alineamiento del gen g1 a nivel de DNA se puede notar que el *reverse* en las secuenciaciones con los fagos  $\phi$ Fc30,  $\phi$ Ps44,  $\phi$ Ps49 y  $\phi$ Ps61 no alcanzó el principio del gen g1, y por lo tanto sólo se tomaron como verdaderas las secuenciaciones de g1 con el *forward*.

En el alineamiento del gen g5 a nivel de DNA se puede notar que tanto el *forward* como el *reverse* en las secuenciaciones con todos los fagos lograron abarcar completamente el gen g5, y por lo tanto todas las secuenciaciones se tomaron como confiables.

En el alineamiento del gen g9 a nivel de DNA se puede notar que el *forward* en las secuenciaciones con los fagos  $\phi$ Fc30,  $\phi$ Ps44,  $\phi$ Ps46 y  $\phi$ Ps61 no alcanzó el final del gen g9, y por lo tanto sólo se tomaron como fidedignas las secuenciaciones de g9 con el *reverse*.

Con base en las secuenciaciones anteriores se realizó el alineamiento de las secuencias pero ahora a nivel de aminoácidos. Y para los 6 fagos *Mu-like* de tipo 2 se encontró lo siguiente:

- La proteína del gen g1 tiene un alto nivel de identidad si sólo se toman en cuenta las secuenciaciones con el *forward*.
- La proteína del gen g5 tiene un alto nivel de identidad tomando en cuenta ambas secuenciaciones, con el *forward* y con el *reverse*.
- La proteína del gen g9 tiene un alto nivel de identidad si sólo se toman en cuenta las secuenciaciones con el *reverse*.

Usando las mismas secuencias, se continuó con la búsqueda de dominios conservados a nivel de DNA. Y para los 6 fagos *Mu-like* de tipo 2 se encontró lo siguiente:

- El gen g1 tiene un dominio filamento intermedio de la cápside, como en PaMx73.
- El gen g5 tiene un dominio para la glicotransferasa 17, como en PaMx73.
- El gen g9 tiene un dominio de hélice vuelta hélice HTH\_24 y un dominio catalítico para una cinasa, como en PaMx73.

La búsqueda de dominios conservados a nivel de aminoácidos sólo se pudo realizar con la proteína g9, ya que las proteínas g1 y g5 no dieron *match* alguno.

- El gen g9 tiene un dominio de hélice vuelta hélice HTH\_24, como en PaMx73.

Aunque el dominio DUF4328 se encontró en el gen g1 de los fagos  $\phi$ Ps44,  $\phi$ Ps49,  $\phi$ Ps61 con la secuencia resultante del *forward*, no se tomó en cuenta porque es un dominio de función desconocida. De la misma forma, pero con el gen g5, los dominios conservados DUF2647, PRKCSH y PHA03247 no se tomaron en cuenta por no repetirse en otros fagos durante el análisis. Todos

los dominios encontrados en el gen g9 que resultaron de la secuenciación con el *forward* fueron descartados, por lo mencionado anteriormente.

Los genes g9 de  $\phi$ Fc13,  $\phi$ Fc30,  $\phi$ Ps44,  $\phi$ Ps46,  $\phi$ Ps49 y  $\phi$ Ps61 no tienen un dominio para proteínas grandes de tegumento como PaMx73 y H70, pero tienen un dominio catalítico para cinasa. Esto demuestra que una misma secuencia puede tener pequeñas variaciones que permiten cambios en la ruta de un gen para cumplir su función.

En cuanto a los patrones de restricción, se puede sugerir que hasta el momento  $\phi$ Ps44 y  $\phi$ Ps49 son fagos muy similares, o hasta se podrían sospechar que se trata del mismo fago. Y que  $\phi$ Fc30 es el fago más parecido a vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30.

## X. Conclusiones

Conclusión principal:

Si se buscan anti-CRISPR con las características de búsquedas anteriores, se encuentran los mismos anti-CRISPR. Por lo tanto, no parece haber mucha variabilidad entre anti-CRISPR conocidos.

- Se identificaron 7 fagos resistentes con actividad anti-CRISPR en la colección de fagos temperados del laboratorio.
- Todos los fagos tienen mecanismo de transposición-replicación y al regulador NER, por lo tanto todos son *Mu-like*.
- Todos los fagos presentan el gen g9; por lo tanto este gen acompaña posibles genes anti-CRISPR.
- Los genes anti-CRISPR del fago  $\phi$ FC05 tienen un 99% de identidad con los genes anti-CRISPR g7, g8 y g9 del fago JBD5.
- $\phi$ FC13,  $\phi$ FC30,  $\phi$ PS44,  $\phi$ PS46,  $\phi$ PS49 y  $\phi$ PS61 tienen porcentajes de identidad del 90% o más con los genes anti-CRISPR g1, g5 y g9 de los fagos vB\_PaeS\_PAO1\_Ab30 y PaMx73.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Akhverdian VZ, Khrenova EA, Bogush VG, Gerasimova TV, Kirsanov NB. [Wide distribution of transposable phages in natural *Pseudomonas aeruginosa* populations]. *Genetika*. 1984 Oct;20(10):1612-9. PubMed PMID: 6094307.
2. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):429-32. PubMed PMID: 23242138.
3. **LIBRO: Biology of Microorganisms.**
4. Cady KC, White AS, Hammond JH, Abendroth MD, Karthikeyan RS, et al. Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiology*. 2011 Feb;157(Pt 2):430-7. PubMed PMID: 21081758; PubMed Central PMCID: PMC3090132.
5. Cady KC, Bondy-Denomy J, Heussler GE, Davidson AR, O'Toole GA. The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. *J Bacteriol*. 2012 Nov;194(21):5728-38. PubMed PMID: 22885297; PubMed Central PMCID: PMC3486085.
6. Campbell A. The future of bacteriophage biology. *Nat Rev Genet*. 2003 Jun;4(6):471-7. PubMed PMID: 12776216.
7. Castillo FJ, Bartell PF. Studies on the bacteriophage 2 receptors of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Virol*. 1974 Oct;14(4):904-9. PubMed PMID: 4213969; PubMed Central PMCID: PMC355597.
8. Cazares A, Mendoza-Hernández G, Guarneros G. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics*. 2014 Dec 19;15:1146. PubMed PMID: 25527250; PubMed Central PMCID: PMC4378225.
9. Farinha MA, Allan BJ, Gertman EM, Ronald SL, Kropinski AM. Cloning of the early promoters of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: sequence of the immunity region of D3. *J Bacteriol*. 1994 Aug;176(16):4809-15. PubMed PMID: 8050993; PubMed Central PMCID: PMC196314.
10. Farinha MA, Kropinski AM. Overexpression, purification, and analysis of the c1 repressor protein of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *Can J Microbiol*. 1997 Mar;43(3):220-6. PubMed PMID: 9090110.

11. Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2001 Jun;67(6):2746-53. PubMed PMID: 11375190; PubMed Central PMCID: PMC92934.
12. He J, Baldini RL, Déziel E, Saucier M, Zhang Q, et al. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2530-5. PubMed PMID: 14983043; PubMed Central PMCID: PMC356984.
13. Heo YJ, Chung IY, Choi KB, Lau GW, Cho YH. Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. *Microbiology.* 2007 Sep;153(Pt 9):2885-95. PubMed PMID: 17768233.
14. **<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap18/>**
15. **LIBRO: BACTERIOPHAGES. Biology and Applications.**
16. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol.* 2010 May;8(5):317-27. PubMed PMID: 20348932.
17. Mikkelsen, H., McMullan, R., & Filloux, A. (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* Reference Strain PA14 Displays Increased Virulence Due to a Mutation in *ladS*. *PLoS ONE*, 6(12), e29113. doi:10.1371/journal.pone.0029113
18. Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung VH, Maxwell KL, Davidson AR. A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio.* 2014 Apr 15;5(2):e00896. PubMed PMID: 24736222; PubMed Central PMCID: PMC3993853.
19. **LIBRO: A GENETIC SWITCH. Phage Lambda Revisited**
20. Reardon S. Phage therapy gets revitalized. *Nature.* 2014 Jun 5;510(7503):15-6. PubMed PMID: 24899282.
21. Salmon KA, Freedman O, Ritchings BW, DuBow MS. Characterization of the lysogenic repressor (*c*) gene of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112. *Virology.* 2000 Jun 20;272(1):85-97. PubMed PMID: 10873751.
22. **LIBRO: Chapter 8. Role of CRISPR/cas System in the Development of Bacteriophage Resistance.**
23. Temple GS, Ayling PD, Wilkinson SG. Isolation and characterization of a lipopolysaccharide-specific bacteriophage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbios.* 1986;45(183):81-91. PubMed PMID: 3086673.
24. Wei H. Bacteriophages, revitalized after 100 years in the shadow of antibiotics. *Virolog Sin.* 2015 Feb;30(1):1-2. PubMed PMID: 25680442.

## **XII. APÉNDICE**

### **Preparación de Medios de Cultivo**

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

Para un litro se prepara con: Bacto-nutrient broth (10g), Bacto-agar (6g) y NaCl (8g) (Sepúlveda-Robles, datos no pub.).

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

Para un litro se prepara con: Bacto-triptona (10g), Extracto de levadura (5g) y NaCl (5g). Cuando se preparan cajas, se añade: Agar (15g) (Sepúlveda-Robles, 2007).

#### **Medio Tφ**

Para un litro se prepara con: Triptona (10g), Agar (10g), NaCl (2.5g), NaOH 2M (2mL) y MgSO<sub>4</sub> 1M (10mL). Cuando se preparan cajas no se añade MgSO<sub>4</sub> (Cocina Bacteriológica. DGBM-CINVESTAV, datos no pub).

### **Medio TMG-SM**

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

### **XIII. Equipo**

Agitador New Brunswick Scientific  
Modelo: G10 Gyrotory® Shaker.

Centrífuga eppendorf  
Modelo: 5415R (con refrigeración).

DNA SpeedVac® Savant  
Modelo: DNA 120

NanoDrop®  
Modelo: ThermoScientific NanoDrop2000

Transilluminator UVP®  
Modelo: Multi Doc-It

Thermocycler Bio-Rad®  
Modelo:

### **XIV. PERSPECTIVAS**

- **Completar los patrones de restricción para todos los fagos candidatos**
- **Repetir el mismo experimento pero usando otra cepa que no sea la PA14 wt.**