



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Determinación de la interacción de la proteína
Cor del fago mEp167 con posibles receptores de
membrana externa de Escherichia coli “**

TESIS

Que presenta:

Q.F.B. SAIDA JESSICA BRIONES PEÑA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de tesis.

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

México, D. F.

AGOSTO, 2015.

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) por brindarme la oportunidad de ingresar y desarrollar la maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por proporcionarme la beca de maestría.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe por darme la oportunidad de ingresar a su laboratorio, por su paciencia y por compartirme su conocimiento y sabiduría para la realización de este trabajo.

Al Dr. Gabriel Guarneros por su invaluable asesoría y por facilitarme un lugar en su laboratorio para la realización de este trabajo.

A los asesores: Dr. Javier Hernández, Dra. Refugio García por su amable apoyo e interés para la revisión de este trabajo.

A la Dra. Rosa María Bermúdez por su especial apoyo para la revisión de este trabajo.

A la M. en C. Emma Socorro Arguijo Hernández por su paciencia, por compartirme su conocimiento y experiencia para la realización de los experimentos.

Al M. en C. Marco A. Magos Castro y a la Dra. Eva Martínez Peñafiel por compartirme su conocimiento y experiencia para la realización de los experimentos.

A Gabriela Mora y Beatriz Vázquez por su asistencia secretarial durante mi estancia en el departamento.

A los técnicos Arturo rojas y Flor por su apoyo para el lavado y preparación de material.

A Lizdy Ortiz, Nelby Cruz y Ana de la Cruz por su amistad incondicional y apoyo en esta etapa.

A los chicos del laboratorio: Marco Carballo, Victor Flores, Sandra Ortega, Yuri, Rodolfo, Paco y Enith por su compañerismo.

DEDICADO A

A mis padres David Briones y Carmen Peña que me dieron la oportunidad de existir, por su infinito cariño y apoyo para alcanzar una meta más en mi vida y que también es de ustedes. ¡Los amo!

A mis hermanos David Iván Briones y Miguel Angel Briones quienes han estado a mi lado y que me han brindado su cariño y apoyo para seguir adelante.

A mi mejor amigo Luis León Fuentes Romero por tu amistad leal y sincera, por ser mi compañero de vida y por tu invaluable apoyo para alcanzar una meta más en mi vida. Este éxito también es tuyo. ¡Te quiero!

A mi familia y amigos.

Contenido

LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	10
ABSTRACT.....	11
1. Introducción.....	12
1.1 <i>Escherichia coli</i>	12
1.2 Estructura de la envoltura de <i>E. coli</i>	12
1.2.1 Proteínas de membrana externa como receptores.....	14
1.2.2 Lipopolisacáridos (LPS) como receptores.	15
1.3 Bacteriófagos.....	17
1.3.1 Bacteriófagos lambdoides.....	17
1.3.2 Ciclo lítico y lisogénico.....	19
1.4 Infección por bacteriófagos.	20
1.4.1 Adsorción.....	20
1.4.2 Eyección del DNA.....	21
1.5 Exclusión de fagos.....	23
1.5.1 Mecanismos de exclusión de fagos.	23
1.5.1.1 Evitando la adsorción del fago.....	23
1.5.1.2 Evitando la eyección del DNA.	25
1.5.1.3 Sistema de infección abortiva.....	26
1.6 Proteína cor del fago mEp167.	27
2. Antecedentes.....	29
3. Justificación.	31
4. Hipótesis.	31
5. Objetivo general.....	32
6. Objetivos específicos.....	32
7. Metodología.	33
7.1 Resiembra de bacterias silvestres y mutantes.....	33

7.2 Propagación de fagos.....	33
7.3 Titulación de fagos.....	34
7.4 Extracción de plásmidos.....	34
7.5 Preparación de bacterias electrocompetentes.....	35
7.6 Electroporación y selección de bacterias transformadas.....	35
7.7 Ensayo de infección.....	36
7.8 Obtención de las proteínas de membrana externa.....	36
7.9 Cuantificación de proteínas.....	38
7.10 Ensayo de “pull-down”.....	38
7.11 SDS-PAGE.....	39
7.12 Tinción con nitrato de plata.....	40
7.13 Amplificación de <i>cor</i> a partir de pPHCCor.....	41
7.14 Clonación del producto de PCR de <i>cor</i> en pJET1.2.....	41
7.15 Transformación del producto de ligación de pJET1.2.....	41
7.16 PCR de colonia.....	42
7.17 Electroforesis.....	42
7.18 Restricción de pJET1.2_ <i>cor</i> y pBAD28.....	43
7.19 Ligación.....	43
7.20 Electroporación del producto de ligación pBAD28_ <i>cor</i> y selección de las clonas.....	43
7.21 PCR de las clonas y electroforesis.....	44
7.22 Secuenciación de las clonas.....	44
7.23 Purificación de la reacción de secuenciación.....	44
7.24 Western blot.....	45
7.25 Ensayo de complementación de la mutante OmpA ⁻	45
7.26 Ensayo de infección en la mutante OmpA ⁻ y en la complementada con pOmpA.....	46
8. Resultados.....	47
8.1 La expresión de las proteínas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpF, OmpW, LamB y FhuE es necesaria para que Cor excluya al fago mEp167, FhuA-dependiente.....	47

8.2 La falta de expresión de OmpA y OmpW afecta la presencia de Cor sobre la membrana externa.	50
8.3 Clonación del gen <i>cor</i> en pBAD28.....	51
8.4 La cantidad de las proteínas OmpA y Cor es importante para la exclusión del fago mEp167.....	59
9. Discusión.....	62
10. Conclusiones.....	65
11. Conjetura.....	66
12. Bibliografía.....	67
ANEXO 1.....	73
Cepas, bacteriófagos y plásmidos.	73
Oligonucleótidos.....	75
ANEXO 2.....	76
Medios de Cultivo.....	76
Soluciones.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>Escherichia coli</i>	12
Figura 2. Estructura de la envoltura celular de <i>E. coli</i>	13
Figura 3. Estructura del barril β de las proteínas de membrana externa (OMPs)	14
Figura 4. Proteínas de membrana externa (OMPs).....	15
Figura 5. Transporte de los LPS a través de la envoltura celular.....	16
Figura 6. Estructura y microfotografía del bacteriófago λ	18
Figura 7. Ciclo de vida lítico y lisogénico de los bacteriófagos.....	20
Figura 8. Proceso de infección del fago T4.	22
Figura 9. Mecanismos para evitar la adsorción del fago.....	24
Figura 10. Sistema de exclusión de la superinfección.....	25
Figura 11. Sistema Rex como sistema de infección abortiva en <i>E. coli</i>	26
Figura 12. Alineamiento de la secuencia de la proteína Cor del fago mEp167.	27
Figura 13. Ensayo de “pull-down” de Cor en las diferentes mutantes	51
Figura 14. Amplificación de <i>cor</i> de las 10 clonas de pJET1.2/blunt.	52
Figura 15. Doble restricción de pJET_cor y pBAD28 con <i>NheI</i> y <i>HindIII</i>	53
Figura 16. Amplificación del gen <i>cor</i> en las clonas pBAD28_cor.....	54
Figura 17. Ensayo de infección de las candidatas pBAD28_cor.....	55
Figura 18. Inducción de Cor con arabinosa usando el plásmido de la candidata 8.....	56
Figura 19. Western blot de la inducción de Cor con arabinosa	57
Figura 20. Ensayo de “pull-down” de Cor en las diferentes mutantes usando el plásmido pC8.....	58
Figura 21. Transformación de la mutante <i>ompA</i> ⁻	59
Figura 22. Complementación de <i>ompA</i> ⁻ /pC2 y <i>ompA</i> ⁻ /pC8	60
Figura 23. Ensayo de infección de <i>ompA</i> ⁻ /pC8 complementada con el plásmido pOmpA.	61

ABREVIATURAS

Abi	Infección abortiva		
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	μF	microFaradios
APS	Persulfato de amonio	μg	microgramos
ATP	Adenosin Trifosfato	mA	miliampers
BrEt	Bromuro de etidio	μL	microlitro
dNTP's	Desoxinucleótidos	mEp	Mexican <i>E. coli</i> phages
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	mL	mililitro
Fe^{+3}	Fierro	mM	milimolar
<i>g</i>	número de ges	MMx	"Master mix"
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados	ng	nanogramos
HisPurNi-NTA	Histidina Purificación Níquel-Ácido Nitriloacético	nD β Dm	n-dodecil- β -D-maltósido
IM	Membrana interna	OM	Membrana externa
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido	OmpA	Proteína A de membrana externa
Kb	Kilo-bases	OmpC	Proteína c de membrana externa
KDa	Kilo-daltons	OmpF	Proteína F de membrana externa
k Ω	Kilo-ohms	OMPs	Proteínas de membrana externa
L	Litro	O/N	Toda la noche
LB	Medio Luria Bertani	pM	Picomoles
Lip	Lipoproteína	pb	pares de bases
LPS	Lipopolisacáridos	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
M	Molar	pC8	Plásmido candidata 8

PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
PL	Fosfolípidos
RBP	“Receptor Binding Protein”/ Proteína de unión a receptor
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
Sie	Sistemas de exclusión de la superinfección
SB	Medio “Super Broth”
SOB	Medio “Super Optimal Broth”
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TMG	Buffer Tris-Magnesio-Gelatina
UFP	Unidades formadoras de placa

RESUMEN

El gen *cor* que codifica para la proteína Cor fue encontrado en los fagos N15 y Φ 80, observándose que esta proteína es la responsable de excluir a estos fagos. En nuestro grupo de trabajo, se encontró en el fago FhuA-dependiente mEp167 un gen *cor* ortólogo, que codifica para una proteína Cor, la cual inhibió la captación de ferricromo- Fe^{+3} y excluyó a fagos, ambos procesos FhuA-dependiente. Por otro lado se ha reportado una alta incidencia del fenotipo *cor* en fagos FhuA-dependientes. Adicionalmente, la M. en C. Arguijo-Hernández Emma encontró los dominios funcionales de Cor, así como que Cor asociado a otras proteínas de membrana externa: LamB, OmpA, OmpC, OmpW y Slp. Asimismo, las cepas *lamB*⁻, *ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompW*⁻ con fondo genético *fhuA*⁺ y *cor*⁺ permitieron la infección del fago mEp167. Con estos datos se sugirió que pudiera haber una interacción entre todas estas proteínas en forma de complejo para excluir fagos FhuA-dependientes, inactivando al receptor FhuA. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evidenciar la posible interacción de Cor, FhuA, LamB, OmpA, OmpC, OmpW y Slp, mediante ensayos de purificación de Cor en cepas *lamB*⁻, *ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompW*⁻ y ensayos de infección en estas mutantes complementadas con sus respectivos genes silvestres en presencia de Cor. Encontramos que en la *ompA*⁻, la expresión de Cor disminuyó notablemente y al complementarla con pOmpA sólo se observó una disminución en la intensidad del halo de infección del fago mEp167, aún cuando se sobre expresó OmpA. Estos resultados sugieren que debe haber una estequiometría en las cantidades de OmpA, FhuA y Cor para la eficiente exclusión de mEp167.

ABSTRACT

cor gene codes for Cor protein which was found initially in phages N15 and $\Phi 80$. This protein is involved in the exclusion of these phages. In our group an orthologue of *cor* gene was found in the FhuA-depent mEp167 phage. In addition Cor protein inhibits the uptake of ferrichrome- Fe^{+3} through the FhuA pathway, as well as excludes the FhuA-dependent phages. A high incidence of *cor* gene was found in the FhuA-dependent phages. In addition, functional domains of Cor were found. Cor co-purified with proteins of the outer membrane: LamB, OmpA, OmpC, OmpW and Slp. It was found that mutant strains for these proteins under a *fhuA*⁺ and *cor*⁺ background, are infected by mEp167 phage. This results suggest a possible interaction among Cor, FhuA, and the outer membrane proteins for the exclusion of mEp167. Therefore, our goal was to determine the interaction of these proteins using the same Cor co-purification assay with Cor in these mutant strains (*lamB*⁻, *ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompW*⁻), and monitoring the phage infection in mutant cells complementaed with the outer membrane protein and Cor protein. We found a reduced expresion of Cor in *ompA*⁻ cells and a reduced infection when OmpA was overexpressed. Therefore, these results suggest that at least OmpA, Cor and FhuA are closely related, and that some stoichiometric ratio is required for the exclusion of mEp167.

1. Introducción.

1.1 *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un microorganismo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*⁽¹⁰⁾. Esta familia está formada por bacilos Gram-negativos de 1.5 a 5.5µm de largo y de 0.5 a 1.0µm de ancho, son no esporulados, poseen pared celular y está compuesta de dos bicapas lipídicas; membrana externa (OM) y membrana interna (IM) con un espacio entre ellas conocido como periplasma.

Tienen de 5 a 10 flagelos distribuidos alrededor de la célula, por lo que son móviles, también presentan fimbrias que sirven para el anclaje a los huéspedes, no presentan un núcleo definido, pero su DNA se encuentra en el centro de la célula y se le llama nucleoide (Figura 1).

⁽¹¹⁾ ⁽¹²⁾. El genoma de *E. coli* K-12 tiene 4,639,221 pares de bases y una longitud de 1.5mm⁽¹³⁾.

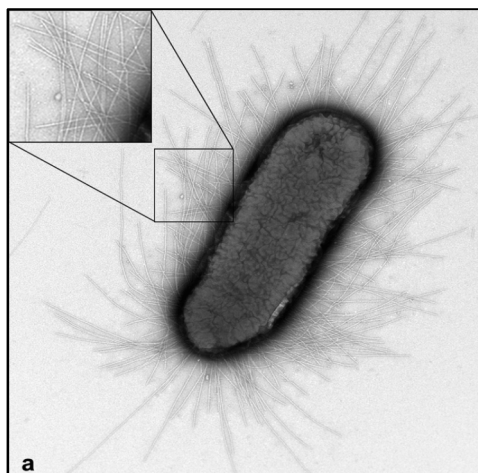


Figura 1. Micrografía electrónica de *Escherichia coli* cepa W3110. La zona en rectángulo muestra las fimbrias. (Tomada de Hahn *et al.* 2002).⁽¹⁾

1.2 Estructura de la envoltura de *E. coli*.

Las bacterias Gram-negativas como la *Escherichia coli* presentan cuatro estratos: el citoplasma, la membrana interna, el periplasma y la membrana externa (Figura 2). Tanto la capa interna (que mira al citoplasma) como la capa externa (que mira al periplasma) de la membrana interna están

compuestas de fosfolípidos (PL), en contraste, la membrana externa es una bicapa asimétrica de lipopolisacáridos (LPS) contenidos exclusivamente en la capa externa y fosfolípidos en la capa interna ⁽¹⁴⁾.

La membrana externa contiene numerosas proteínas en forma de barril β llamadas proteínas de membrana externa (outer membrane proteins, OMPs) (Figura 3), las cuales tienen diversas funciones como en el transporte y señalización, y otras son esenciales para la biogénesis de membranas ⁽¹⁵⁾. Estas pueden ser divididas en 5 clases:

- 1) Proteínas estructurales que interactúan con la capa de peptidoglicanos.
- 2) Porinas específicas y no específicas que forman canales en la membrana.
- 3) Enzimas.
- 4) Receptores con alta afinidad a sustratos.
- 5) Proteínas de transporte responsables para la secreción.

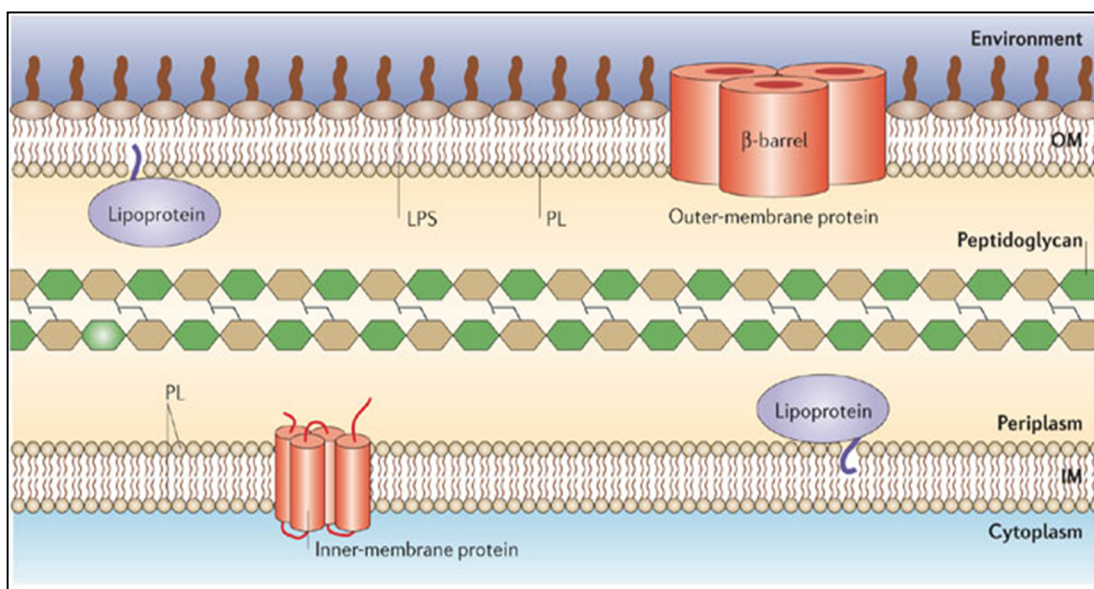


Figura 2. Estructura de la envoltura celular de *E. coli*. Está constituida de membrana externa, periplasma y membrana interna. (Tomado de Ruiz *et al.* 2006) ⁽⁵⁾

una alta afinidad a sustratos son los componentes del sistema de transporte activo y su función es llevar a cabo primeramente la unión de sustancias como la vitamina B12 y agentes quelantes como los que unen al Fe^{+3} (Figura 4).⁽¹⁶⁾

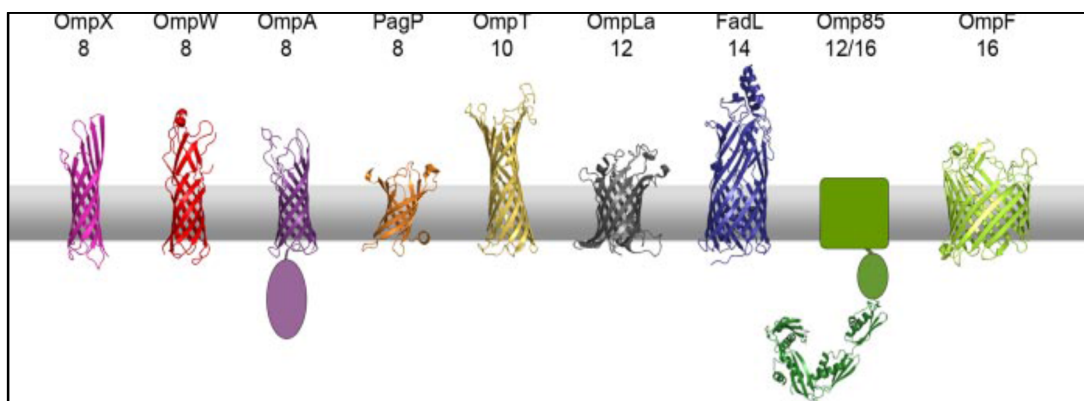


Figura 4. Estructura de las proteínas de membrana externa (OMPs). En la parte superior se muestra el nombre de las OMPs y el número de láminas β que constituyen el barril de cada proteína: OmpX se sintetiza en situaciones de stress para bloquear la entrada de proteínas extrañas; OmpW es un receptor de la Colicina S4; OmpA participa en la formación de biofilm, en la evasión inmunológica, como receptor de bacteriófagos T-like, en la adherencia a tejidos, le brinda estabilidad a la OM; PagP de las bacterias patógenas funciona como una enzima palmito transferasa que evade la respuesta inmune del hospedero; OmpT de las bacterias patógenas funciona como una proteasa; OmpLa hidroliza fosfolípidos; FadL funciona como transportador de ácidos grasos; Omp85 puede tener 12 o 16 láminas β sirve para integrar proteínas a la OM; OmpF funciona como receptor del bacteriófago K20, sirve para la difusión de moléculas y como receptor de la Colicina N (Modificado de Burgess *et al.*, 2008).⁽⁸⁾

1.2.2 Lipopolisacáridos (LPS) como receptores.

Además de las proteínas de membrana externa, los LPS sirven como receptores para la adsorción de fagos. El LPS es un polímero relativamente complejo constituido de monosacáridos y ácidos grasos. Estructuralmente se constituye de tres partes: lípido A, "core" o núcleo y la cadena O (Figura 5). Hay dos tipos de LPS:

- 1) Tipo liso (Smooth; S), los cuales contienen la estructura clásica como la antes mencionada.

2) Tipo rugoso (Rough; R), a los cuales les falta la cadena O.

Existen algunos bacteriófagos que pueden adsorberse en ambos tipos de LPS. Los fagos específicos para el LPS de tipo S despliegan un estrecho rango de hospedero y la especificidad está determinada por la gran variabilidad de la estructura del antígeno O. Los bacteriófagos que reconocen el LPS de tipo R muestran un rango más amplio de huéspedes ya que la estructura “core” es más conservada en varias especies y géneros de bacterias Gram-negativas. ⁽¹⁶⁾.

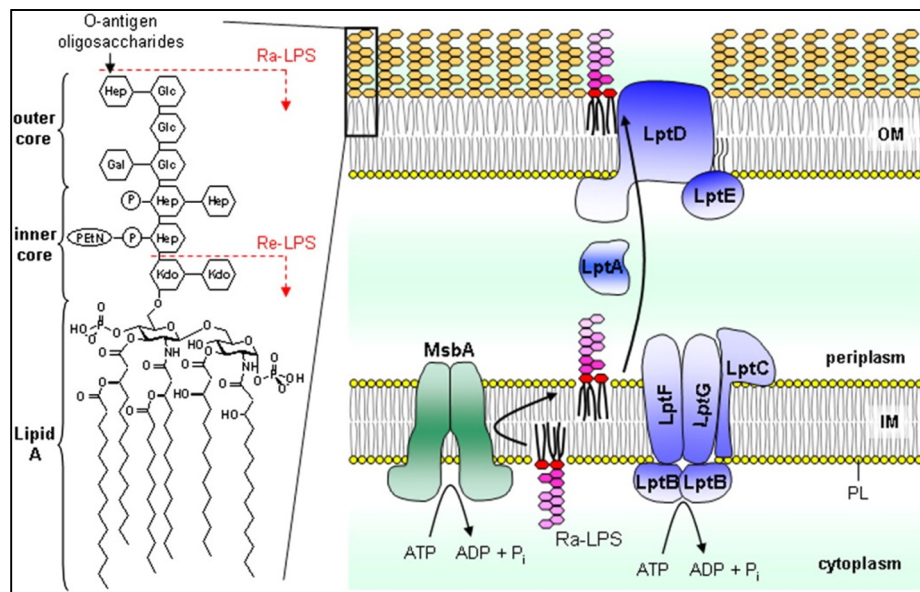


Figura 5. Transporte de los LPS a través de la envoltura celular. De lado izquierdo se muestra la estructura de los lipopolisacáridos de *E. coli* K-12, los cuales carecen del “antígeno O”. El LPS es sintetizado como lípido A-Kdo₂ o Re-LPS y cuando se adiciona el “core” de azúcares se produce el Ra-LPS. De lado derecho se muestra el Ra-LPS localizado en el lado interno de la IM y el MsbA provoca el giro del Ra-LPS hacia el lado externo de la IM. Ya en el periplasma el “antígeno O” se puede ligar al Ra-LPS (no se muestra). Posteriormente el transportador compuesto de LptB, LptC, LptF y LptG extrae el LPS de la IM mediante hidrólisis del ATP. Después LptA transporta al LPS hacia la OM a través del periplasma. Ya en la OM, LptD y LptE forman un complejo que recibe y ensambla al LPS en la superficie celular. Gal, D-galactosa; Glu, D-glucosa; Hep, L-glicero-D-manoheptosa; Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico; P, fosfato; PEtN, fosfoetanolamina. Tomado de (Chng *et al.*, 2010). ⁽⁴⁾

1.3 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos o “fagos” son virus que infectan bacterias ⁽⁹⁾. Su abundancia sobre el planeta se estima en alrededor de $>10^{31}$ ⁽¹⁸⁾. Los bacteriófagos pueden tener diferentes aplicaciones tales como en la terapia de infecciones bacterianas en humanos y animales o para controlar la contaminación bacteriana en la industria alimentaria, en la agricultura, así como para controlar los patógenos que causan enfermedades transmitidas por agua contaminada. ⁽¹⁶⁾.

1.3.1 Bacteriófagos lambdoides.

La estructura del fago lambda (λ) está constituido de la cápside (cabeza), y de una cola flexible. La cabeza es icosaédrica compuesta de 415 copias de la proteína gpE y de 405-420 copias de la proteína gpD, en su interior se encuentra el DNA lineal de doble cadena, el cual tiene una extensión de 48,490 pb; la cola es helicoidal constituida principalmente de la proteína gpV (Figura 6) ⁽¹⁹⁾.

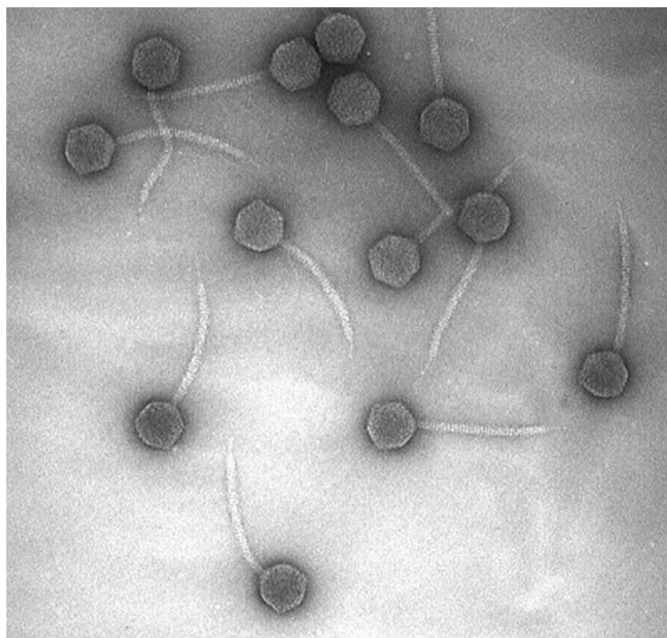


Figura 6. Estructura y microfotografía del bacteriófago λ . (Tomado de <http://phages.org/lambda-phages/>)

Los fagos llamados “lambdoides” son aquellos que están relacionados con el fago lambda ya que tienen una organización común de distribución de sus módulos funcionales en su genoma, tal como, las regiones o módulos que codifican para: la recombinación, la regulación génica, la exclusión de fagos, la replicación del DNA, la lisis celular así, como los “clusters” de genes que codifican para las proteínas estructurales de la cabeza y cola. Esta organización génica ha facilitado la recombinación entre fagos lambdoides permitiendo que existan un gran número de fagos híbridos en el ambiente natural ⁽²⁰⁾, por lo que han sido aislados, con diferentes cepas de *E. coli* de diferentes regiones. Kameyama y cols. (1999) aislaron y caracterizaron un grupo nuevo de fagos lambdoides a partir de muestras fecales, los cuales se clasificaron arbitrariamente en 19 grupos de diferente inmunidad, entre estos fagos se encontró el fago mEp167, el cual presenta la inmunidad tipo VI.⁽²¹⁾

1.3.2 Ciclo lítico y lisogénico.

Los fagos se dividen en dos categorías de acuerdo al ciclo de vida que llevan a cabo: en virulentos (ciclo lítico) o temperados (ciclo lisogénico) (Figura 7). En el caso de los fagos virulentos su ciclo de vida, en forma resumida, consiste en la replicación de su genoma, multiplicación de los viriones y después el lisis a su bacteria huésped; en cambio, los fagos temperados pueden decidir por alguno de los dos ciclos, es decir que después de replicarse pudieran lisis a la bacteria o generalmente integrar su genoma al de la bacteria, de tal forma que ciertos genes se expresen junto con los de la bacteria. Este fenómeno es conocido como estado de lisogenia y en esta condición el DNA del fago es llamado *profago* ⁽²²⁾.

Las transición del estado lítico a lisogénico y viceversa depende de las condiciones del desarrollo de la infección y del genotipo del fago y la bacteria. Por ejemplo el profago es liberado de las restricciones de la lisógena por medio de un proceso denominado inducción; en donde primero el DNA del fago es liberado del cromosoma bacteriano por escisión y después el DNA libre continúa hacia el ciclo lítico; mientras que en la lisogenia, el profago se mantiene por la interacción del represor con sus operadores. La transición entre los dos ciclos se logra por el establecimiento de la represión (proceso infectivo a lisógena) o por la liberación de la represión (inducción del profago a proceso lítico) ⁽²³⁾.

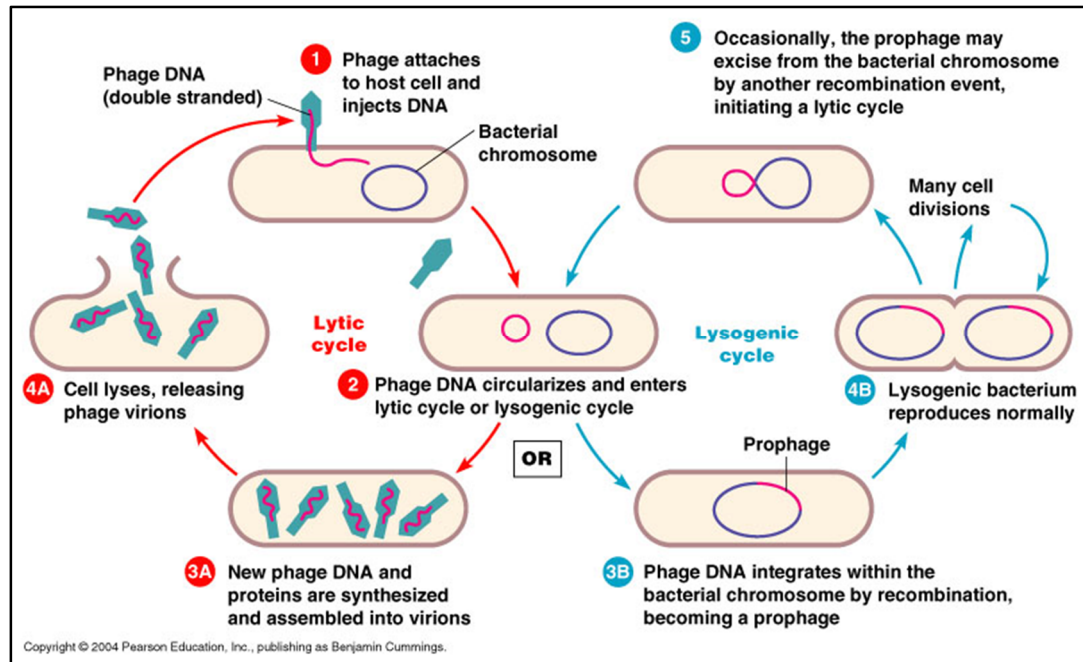


Figura 7. Ciclo de vida lítico y lisogénico de los bacteriófagos. (Tomado de Tortora, 2004) ⁽³⁾

1.4 Infección por bacteriófagos.

La infección por bacteriófagos es un proceso que consiste de varias etapas: la adsorción del fago a la superficie de la bacteria, penetración del ácido nucleico al citoplasma, síntesis intracelular de los componentes del fago, su ensamble, posteriormente la lisis de la bacteria y liberación del fago (Figura 7) ⁽¹⁶⁾.

1.4.1 Adsorción.

La adsorción es la etapa clave en el reconocimiento del fago por su bacteria huésped, por lo tanto la especificidad de la infección del fago está definida por este momento ya que como cualquier otro parásito intracelular obligado el reconocimiento y la penetración a la célula es la condición esencial para continuar con su ciclo de vida ⁽¹⁶⁾. El anclaje del fago a su bacteria huésped

implica la interacción específica entre la proteína de unión al receptor del fago (Receptor Binding Protein; RBP) y su receptor de superficie en la bacteria huésped (Figura 8) ⁽²⁴⁾.

1.4.2 Eyección del DNA.

La liberación del DNA de doble cadena de la cápside, está basado en consideraciones energéticas donde una alta densidad por el empaquetamiento del DNA produce una presurización de la cápside conduciendo a la eyección ⁽²⁴⁾.

Una vez que ocurre la etapa de adsorción y para el caso específico del fago T4, la cola se contrae acercando la cápside hacia la superficie de la célula, por lo que se ejerce cierta presión directamente a la superficie de la célula. Esta fuerza es transmitida a través de la proteína gp27 y el dominio N-terminal de la proteína gp5 causando la ruptura de la membrana externa de la célula; la contracción sigue progresando de tal forma que se produce un orificio de 40Å de ancho, subsecuentemente cuando la hélice β de gp5 entra en contacto con la capa de peptidoglicanos del periplasma, se disocia la punta del tubo activando su dominio de lisozima. Después se digiere la pared celular permitiendo la penetración de la cola a la membrana interna y el trímero gp27 interactúa con el receptor de la membrana interna para iniciar la liberación del DNA del fago (Figura 8) ⁽⁹⁾.

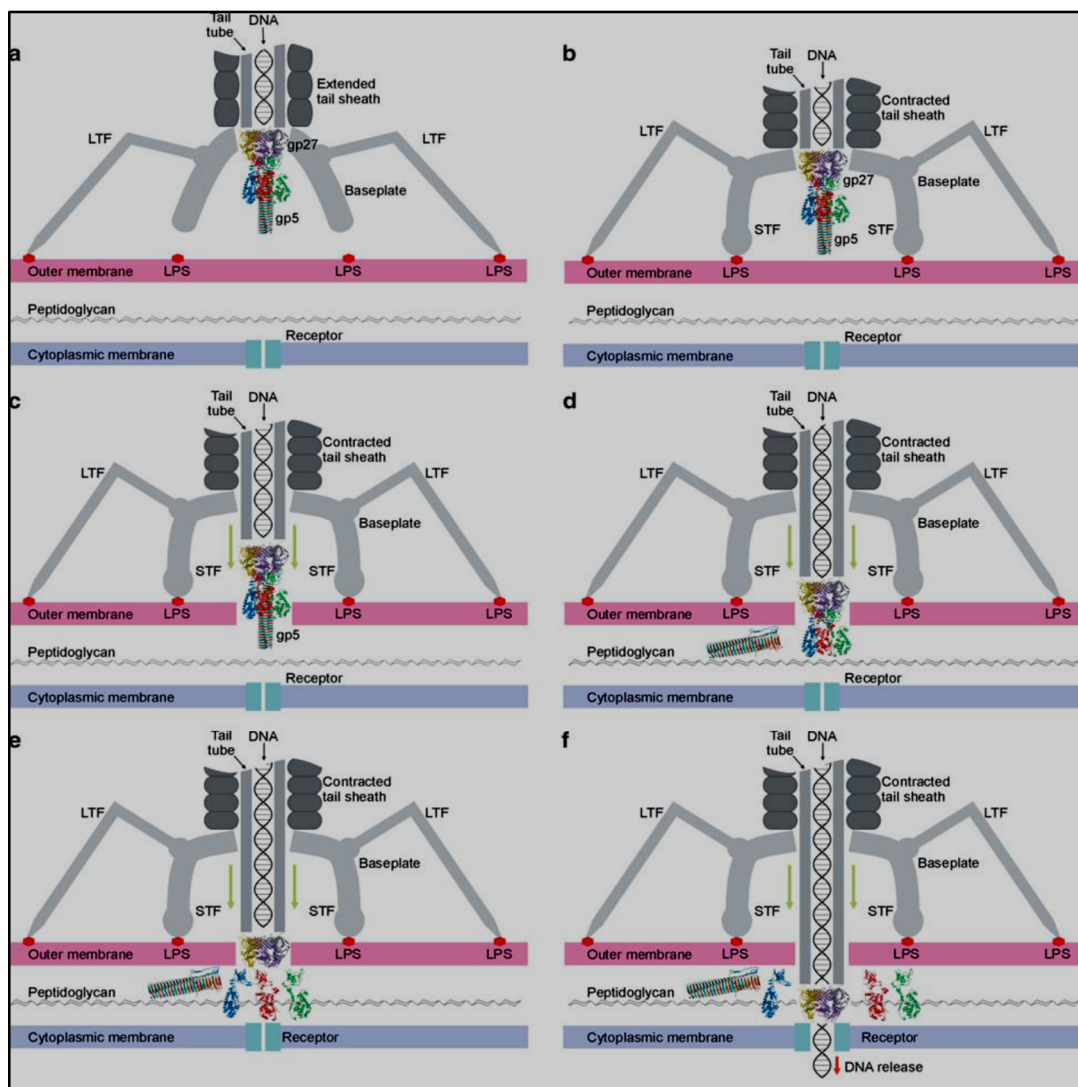


Figura 8. Proceso de infección del fago T4. (a) Adsorción del fago T4. (b) El fago se ancla a la superficie celular iniciando la contracción de la cola. (c) La contracción de la cola causa que la proteína gp5 puncione la membrana externa. (d) gp5 se disocia de la cola y se activan los tres dominios lisozima. (e) Los dominios lisozima crean un orificio en la capa de peptidoglicanos. (f) La proteína gp27 se asocia con el receptor de la membrana interna y se inicia la liberación del DNA al citoplasma. (Tomado de Leiman *et al.* 2003) ⁽⁹⁾

1.5 Exclusión de fagos.

En el medio ambiente los fagos y sus huéspedes coexisten, o sea, están implicados en ciclos continuos de co-evolución, los cuales, las bacterias se vuelven resistentes a los fagos y ayudan a la preservación del linaje bacteriano. Así, los mecanismos de resistencia a los fagos mantienen las poblaciones bacterianas ⁽⁶⁾.

1.5.1 Mecanismos de exclusión de fagos.

Labrie y cols. (2010) reportan al menos tres niveles de exclusión a fagos: El primero es evitando su adsorción, el segundo es evitando la eyección del DNA y el tercero es el sistema de infección abortiva ⁽⁶⁾.

1.5.1.1 Evitando la adsorción del fago.

Como se ha mencionado, la etapa de adsorción es crítica para que el fago pueda infectar a la bacteria. Desde la perspectiva del huésped la bacteria cuenta con al menos tres mecanismos para bloquear la adsorción: bloqueo a los receptores del fago, la producción de matriz extracelular y la producción de inhibidores competitivos (Figura 9) ⁽⁶⁾.

- a) Bloqueo de los receptores del fago. La bacteria puede alterar la estructura de los receptores de la membrana externa o cambiando su conformación. En el caso de la *E. coli*, una vez que ha sido infectada por T4, esta produce una lipoproteína (Llp) que bloquea su propio receptor (FhuA). La lipoproteína se expresa al inicio de la infección por lo que previene la superinfección, a su vez protege a la *E. coli* de la infección de otros fagos como el T5. Por otro lado, la proteína TraT codificada por el plásmido F modifica la conformación de OmpA que

funciona como receptor de fagos T-like ⁽⁶⁾.

- b) Producción de matriz extracelular. La producción de polímeros extracelulares puede promover la sobrevivencia de la bacteria al protegerla de condiciones ambientales adversas y también funciona como barrera entre los fagos y sus receptores; sin embargo, hay fagos que pueden reconocer estos polímeros y degradarlos ⁽⁶⁾.
- c) Producción de inhibidores competitivos. Son moléculas provenientes de la bacteria de manera natural y que pueden unirse específicamente a los receptores de fagos. En el caso de la *E. coli*, donde FhuA es un transportador de hierro y funciona como receptor de fagos (T1, T5 y Φ 80), la molécula antimicrobiana como la microcina J25 reconoce a FhuA como receptor y puede competir por FhuA con el fago ⁽⁶⁾.

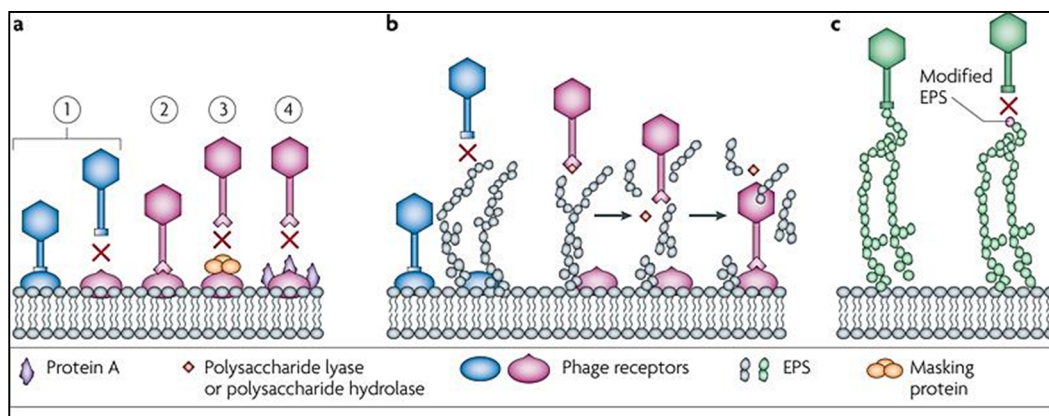


Figura 9. Mecanismos para evitar la adsorción del fago. a) Bloqueo de los receptores del fago. b) Producción de matriz extracelular. c) Producción de inhibidores competitivos. (Tomado de Labrie *et al.* 2010) ⁽⁶⁾

1.5.1.2 Evitando la eyección del DNA.

Los sistemas de exclusión de la superinfección (Sie) son proteínas que bloquean la entrada (eyección) del DNA del fago en las bacterias, por lo tanto les confieren inmunidad contra los fagos. Dichas proteínas están ancladas a la membrana externa o están asociadas a los componentes de la membrana ⁽⁶⁾.

El sistema Sie está formado por las proteínas Imm y Sp del fago T4; este sistema causa la inhibición rápida de la eyección del DNA, previniendo la infección subsecuente de otros fagos. La proteína Imm previene la transferencia del DNA del fago debido a que altera la conformación del sitio de eyección, pero Imm solo no confiere la inmunidad ya que debe estar asociado con otra proteína de membrana para ejercer su función y producir la exclusión. La proteína Sp inhibe la actividad de la lisozima T4 por lo que previene la degradación del peptidoglicano y en consecuencia la entrada del DNA del fago (Figura 10) ⁽⁶⁾.

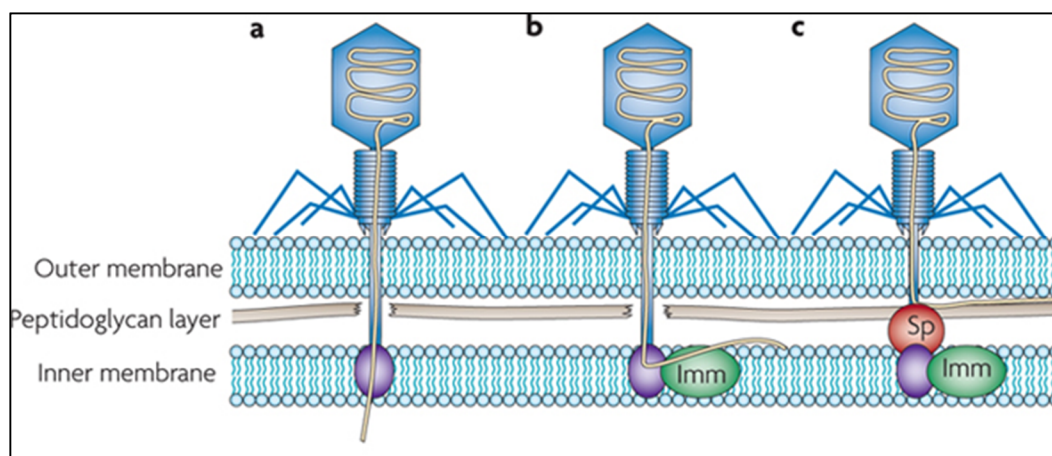


Figura 10. Sistema de exclusión de la superinfección. a) Infección normal del fago T4 a *E. coli*. b) Proteína Imm codificada por el fago T4 bloquea la translocación del ADN al citoplasma. c) Proteína Sp bloquea la degradación del peptidoglicano, deteniendo el DNA entre la capa de peptidoglicano y la membrana externa. (Tomado de Labrie *et al.* 2010) ⁽⁶⁾

1.5.1.3 Sistema de infección abortiva.

Los sistemas de infección abortiva (Abi) inhabilitan a la bacteria infectada, ya que inhiben la replicación, transcripción y traducción del fago infectante. Actualmente el sistema Rex reportado para el fago λ es el mejor caracterizado; este sistema requiere de dos proteínas RexA y RexB. Cuando se lleva a cabo la infección del fago T4 se produce un complejo DNA-proteína como intermediario de la replicación y se activa RexA, que es un sensor intracelular y que a su vez activa a RexB, el cual está anclado a la membrana; se requieren de al menos dos proteínas RexA para activar a una proteína RexB, lo que significa que la proporción de RexA es importante para el sistema Abi. RexB es un canal iónico que reduce el potencial de membrana ocasionando una disminución del nivel de ATP y en consecuencia disminuye la síntesis de macromoléculas y se detienen las funciones básicas de la célula; afectando a su vez el proceso de infección del fago (Figura 11) (6).

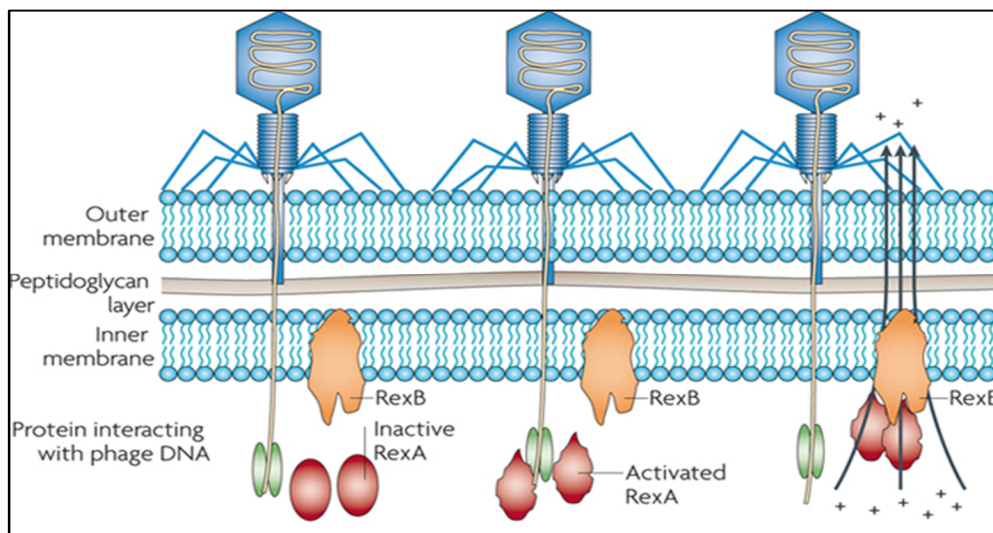


Figura 11. Sistema Rex como sistema de infección abortiva en *E. coli*. (Tomado de Labrie *et al.* 2010) (6)

1.6 Proteína cor del fago mEp167.

En 1982 Kozyrev y cols., observaron y describieron el fenómeno de exclusión de fagos o conversión lisogénica en el fago $\Phi 80$ ⁽²⁵⁾, posteriormente clonaron y mapearon el gen responsable de esta conversión al cual llamaron **cor** ^(26, 27). El fenotipo de exclusión fue conferido por este gen y la secuencia de nucleótidos fue determinada por Matsumoto y cols. en 1985 ⁽²⁸⁾; así mismo, fue clonado y mapeado el gen *cor* del fago N15, el cual tiene una masa molecular de 8 kDa ^{(29) (30)}. Se sugirió que el fenómeno de exclusión de los fagos FhuA⁻ dependientes N15 y $\Phi 80$ por cualquiera de sus lisogénicas era debido a la proteína del fago Cor.

Posteriormente Uc-Mass y cols. (2004) ⁽²⁾, encontraron un gen ortólogo a Cor en el fago mEp167 de 234 nucleótidos que codifica para una proteína de 77 aminoácidos, la cual tiene un 91% (70/77) de identidad con la proteína Cor (putativa) del fago HK022 así como un 61% (47/77) con la proteína Cor del fago N15 y un 74% (57/77) con la proteína Cor del fago $\Phi 80$ (Figura 12).

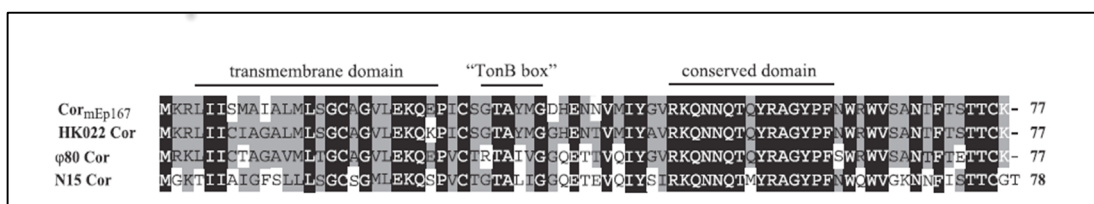


Figura 12. Alineamiento de la secuencia de la proteína Cor del fago mEp167. Se alineó Cor del fago mEp167 con la proteína Cor de los fagos HK022, $\Phi 80$ y N15. los aminoácidos idénticos están en color negro y los aminoácidos semejantes están sombreados en gris. Se indica el dominio transmembranal, la TonB box y el dominio conservado. (Tomado de Uc-Mass *et al.* 2004) ⁽²⁾

Debido a esta alta similitud entre secuencias este gen ortólogo fue clonado en el plásmido pT41 originando el plásmido pKINAM, para sobreexpresar a la proteína Cor. En células (Cor⁺) al infectarlas con fagos de la familia mEp de diferentes grupos de inmunidad ⁽³¹⁾, 13 de 20 fagos, incluyendo $\Phi 80$, HK022

y mEp167 fueron excluidos; por lo que se determinó que el gen Cor del fago mEp167 fue el responsable de la exclusión. Así mismo, se demostró que el producto de este gen inactiva las funciones del receptor FhuA, ya que inhibió la captación de ferricromo- Fe^{+3} .

Más tarde Hernández-Sánchez y cols. (2008)⁽³²⁾ al caracterizar fenotípicamente a los fagos lamboides de la familia mEp y evaluar su relación con el fago λ encontraron que un 85% de estos fagos (37 de 43) no crecen en la cepa C600 (*fhuA*⁻) por lo que se sugirió que requieren del receptor FhuA para infectar; además se encontró que el 58% (25 de 43) amplificaron para el gen *cor*; por lo que está en una alta frecuencia.

2. Antecedentes

En el laboratorio se han realizado varios trabajos que sugieren que la proteína **Cor** está involucrada en el fenómeno de exclusión de los fagos lamboides dependientes del receptor FhuA de *E. coli*.

En trabajos previos se encontró que ciertos fagos lamboides de la colección mEp y previamente clasificados en 19 grupos de diferente inmunidad ⁽²¹⁾, no fueron capaces de crecer en la bacteria lisógena mEp167, sugiriendo que la exclusión era por el gen *cor* del fago mEp167. Este gen también mostró tener una alta homología con la proteína Cor de los fagos HK022, Φ 80 y N15. El fenómeno de exclusión fue observado tanto para bacterias *tonB⁻* y *tonB⁺*, sugiriendo que el sistema de aporte energético TonB, para ciertos fagos no está involucrado. Por otro lado, estos fagos no fueron capaces de infectar bacterias deficientes del receptor FhuA (*fhuA⁻*, como en la cepa C600). En bacterias con fenotipo FhuA⁺ se puede observar el fenómeno de exclusión por Cor y adicionalmente se observó que la captación de ferricromo fue afectada en estas bacterias; por lo que la actividad de transporte del ferricromo y la infección por fagos vía FhuA es inhibida por Cor ⁽²⁾.

En un tercer trabajo, usando los mismos fagos lamboides mEp se encontró que 37 de 43 fagos (85%) requieren del receptor FhuA de la bacteria para poder infectarla, y que el fenómeno de exclusión en los fagos FhuA dependientes es debido al producto del gen *cor* ⁽³²⁾.

Otro trabajo realizado en el laboratorio indicó que mutaciones a los dominios funcionales de la proteína Cor, permitieron la infección por los fagos FhuA-dependientes ⁽³³⁾.

Finalmente, en el trabajo de doctorado de la M. en C. Emma Socorro Arguijo Hernández, en el cual desarrolló un ensayo de purificación con perlas de HisPurNi-NTA con la proteína Cor-His6 y el extracto de proteínas de membrana externa, después de un corrimiento en gel se identificaron al menos cuatro bandas asociadas a Cor, las cuales se mandaron a analizar por medio de espectrometría de masas y correspondieron a los receptores OmpA, OmpC, OmpW, LamB. Interesantemente en las mutantes *ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompW*⁻, *lamB*⁻ con un fondo genético *fhuA*⁺ y *cor*⁺, permitieron la infección del fago mEp167, desconociendo por consiguiente la acción ejercida de Cor sobre FhuA.

3. Justificación.

La proteína Cor del fago mEp167 (FhuA dependiente) esta descrita como la responsable de inhibir la infección de este fago y a su vez se asume es la responsable de inactivar las funciones del receptor FhuA. La co-purificación de Cor con las proteínas de membrana externa: LamB, OmpA, OmpC, OmpW y Slp, y los ensayos de infección donde mEp167 puede infectar a las mutantes anteriores aún en presencia de Cor, nos lleva a plantear la posible interacción entre estas proteínas. Por lo que resulta importante conocer si Cor puede interactuar con éstas, para llevar a cabo el proceso de inhibición e inactivación.

4. Hipótesis.

Dada la infección exitosa del fago **mEp167** dependiente de FhuA en las cepas mutantes *lamB⁻*, *ompA⁻*, *ompC⁻* y *ompW⁻* y en presencia de Cor, sugiere una posible interacción de éstas proteínas con Cor y FhuA (posiblemente formando un complejo proteínico) en la inhibición de la infección del fago **mEp167**.

5. Objetivo general.

Evidenciar la posible interacción de la proteína Cor con ciertos receptores de membrana externa de *Escherichia coli*.

6. Objetivos específicos.

- 1) Corroborar si es necesaria la expresión de las proteínas de membrana externa: OmpA, OmpC, OmpW, LamB y Slp para que Cor excluya al fago mEp167 (FhuA-dependiente).
- 2) Analizar que proteínas interactúan con Cor para formar el complejo proteínico a partir de extractos de membrana en cepas mutantes *ompA⁻*, *ompC⁻*, *ompW⁻*, *lamB⁻*, *slp⁻*.
- 3) Clonar el gen *cor* en un plásmido compatible con los plásmidos que complementan a las mutantes (colección ASKA⁻).
- 4) Evidenciar la exclusión del fago mEp167 en las mutantes complementadas que sobre expresan Cor.

7. Metodología.

7.1 Resiembra de bacterias silvestres y mutantes.

Todas las bacterias silvestres se resembraron en cajas de medio LB partiendo de las suspensiones de bacteria almacenadas a -70°C (gliceroles). Las bacterias silvestres se resembraron en cajas de medio LB y las mutantes provenientes de la colección Keio, se resembraron en cajas de medio LB con Kanamicina a una concentración final de $50\mu\text{g/mL}$ y se incubaron toda la noche (O/N) a 37°C . Posteriormente se tomó una colonia de cada bacteria y se estrió nuevamente sobre una caja nueva de medio y se incubaron O/N a 37°C , este paso se repitió una vez más bajo las mismas condiciones para realizar los siguientes ensayos.

7.2 Propagación de fagos.

De la segunda resiembra se tomó una colonia aislada de la cepa silvestre W3110, se inoculó en 5mL de medio LB líquido y se incubó O/N, con agitación constante a 250rpm a 37°C . Por otro lado se colocaron $15\mu\text{L}$ del stock de fago en una caja de medio T Φ y se ladeo la caja para escurrir la gota a través de la caja dejándola secar, después en un tubo de ensaye (para preparar un tapiz de bacteria) se tomaron $300\mu\text{L}$ del cultivo O/N de la W3110 y se mezclaron con 3mL de medio T Φ líquido previamente fundido a una temperatura aproximada de 42°C y se vertió sobre la caja de T Φ dejándolo solidificar y la caja se incubó O/N a 37°C . Al día siguiente una vez obtenidas las placas, con una pipeta Pasteur estéril se tomó una placa lítica y se colocó en un matraz Erlenmeyer que contenía $300\mu\text{L}$ del cultivo O/N de la W3110, se dejó adsorber por 15 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 10mL de medio LB líquido, se incubó O/N, con agitación constante

a 37°C por 6 horas, se agregaron 600µL de cloroformo y se volvió a incubar 10 minutos más. Después el cultivo se transfirió con cuidado a un tubo cónico de polipropileno, sin el cloroformo y se centrifugó a 8000xg a 4°C por 10 minutos, el sobrenadante se decantó en un tubo de vidrio estéril y se almacenó a 4°C.

7.3 Titulación de fagos.

Se realizó un tapiz con la bacteria W3110, vertiendo está, con el TΦ suave y la bacteria sobre una caja de medio TΦ y se dejó solidificar. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} en tubos estériles. Se ponen 100µL del stock de fago con 900µL de solución TMG y se mezclaron uniformemente con vortex, de ahí se tomaron 100µL y se mezclaron con 900µL de TMG y así sucesivamente se realizan las diluciones, después se colocaron 10µL de cada dilución sobre el tapiz, se dejaron secar y la caja se incubó O/N a 37°C. Al día siguiente se contaron las placas líticas que se formaron en la dilución donde aparezcan, generalmente en la 10^{-8} y se calcularon las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL).

7.4 Extracción de plásmidos.

Se inoculó la bacteria en 10mL de medio LB líquido y se adicionó 10µL de ampicilina de una concentración de 100mg/mL, se incubó O/N a 37°C con agitación constante a 250rpm. Después el cultivo se enpastilló centrifugando a 6000xg y se transfirió a un tubo de 1.5mL, para la extracción del plásmido siguiendo las instrucciones del fabricante (High Pure Isolation Plasmid, “Roche”).

7.5 Preparación de bacterias electrocompetentes.

Se tomó una colonia aislada de la cepa silvestre W3110, se inoculó en 5mL de medio LB líquido y se incubó O/N, con agitación constante a 37°C, de este cultivo se tomaron 500µL y se inocularon en 50mL de medio SOB líquido, se incubó a 37°C con agitación constante a 250rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (O.D.= 0.4 a una longitud de onda de 600nm). El cultivo se transfirió a un tubo de 50mL y se colocó en hielo por 10 minutos después se enpastilló centrifugando a 6000xg por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y con el líquido remanente se resuspendió la pastilla e inmediatamente se colocó en hielo, posteriormente se agregaron 20mL de glicerol al 10% estéril a 4°C, se mezcló suavemente y se volvió a centrifugar para enpastillar, se decantó el sobrenadante cuidando no desechar las bacterias, esto se repitió dos veces y después la pastilla se resuspendió en aproximadamente 1mL de glicerol al 10% a 4°C. Se hicieron alícuotas de 40µL y se incubaron en hielo seco por 15 minutos, posteriormente se almacenaron a -70°C hasta su uso.

7.6 Electroporación y selección de bacterias transformadas.

Una alícuota de las bacterias electrocompetentes se colocó en hielo, después se colocaron 20µL en cada celda estéril y fría, en una de ellas se agregaron 2µL (100ng ADN plasmidico) del plásmido, la otra fue el control negativo, sólo se agregó la bacteria y se electroporaron en el electroporador CELL-PORATOR® Electroporation (“LIFE TECHNOLOGIES™”) con un voltaje de 220Volts, una capacitancia de 1180 µF y una resistencia de 16 kΩ. Posteriormente se colectaron cada una de las alícuotas electroporadas y se colocaron en tubos de 1.5mL e inmediatamente se agregaron 300µL de

medio LB líquido y se incubaron por 1 hr a 37°C con agitación constante a 150rpm. Se depositaron 100µL del cultivo en cajas de medio LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL, luego se espatularon y se dejaron secar. Las cajas se incubaron O/N a 37°C y al día siguiente se tomó una colonia aislada y se resembró en cajas nuevas de medio LB con el respectivo antibiótico a 37°C. Se tomó una colonia y se inoculó en un frasco de vidrio con medio “nutrient broth” (stab), para almacenar la transformante a temperatura ambiente. Se realizaron cultivos en medio LB líquido O/N a 37°C de las transformantes y se tomó una alícuota de 500µL que se mezcló con 500µL de glicerol estéril al 65% para su almacenamiento a -70°C.

7.7 Ensayo de infección

Se realizó un cultivo líquido (5mL de medio LB incubado O.N. con agitación constante a 250rpm a 37°C), de las cepas silvestres y las mutantes. A los cultivos de las mutantes se les adicionó 5µL de Kanamicina de un stock de 50mg/mL, para tener una concentración final de 50µg/mL. Se preparó un tapiz usando los cultivos antes mencionados con TΦ suave y se vació en cajas de medio TΦ para las cepas silvestres. Mientras que para las mutantes se usaron cajas de medio TΦ con Kanamicina a una concentración final de 50µg/mL. Después se prepararon diluciones de los fagos de 10⁻¹ a 10⁻⁸ y se gotearon 10µL de cada una sobre el tapiz y las cajas se incubaron O/N a 37°C. Finalmente se observaron la formación de placas líticas o la ausencia de éstas.

7.8 Obtención de las proteínas de membrana externa.

Un cultivo líquido de 5mL de medio SB fue incubado O/N con agitación constante a 250rpm a 37°C (a los cultivos de las mutantes se les adicionó

Kanamicina 5µL de un stock de 50mg/mL, a los cultivos de las mutantes transformadas con los plásmidos además de la Kanamicina se les adicionó Ampicilina, 5µL de un stock de 100mg/mL). En un matraz Erlenmeyer de 250mL se colocaron 30mL de medio SOB y se adicionaron 30µL de los antibióticos, como previamente se hizo mención, después se agregaron 300µL del cultivo líquido y se incubaron a 37°C con agitación constante a 250rpm hasta alcanzar una O.D. de 0.4 a 600nm e inmediatamente se agregó el inductor de Cor, 30µL de IPTG al (100mM) ó 600µL de arabinosa al 2.5%, dependiendo del plásmido en cuestión y se volvieron a incubar por 3 hr, después el cultivo se transfirió a un tubo para centrifuga de 50mL y se centrifugó a 6000xg por 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con el remanente del líquido que queda en el tubo, luego se agregaron 12mL de buffer NTI-10-G y 1mL de lisozima (10mg/mL) y se mezcló por inversión. Para lisar las bacterias se sonicó, por medio de 6 pulsos de 1 minuto cada uno (el lisado debe mantenerse en hielo, para no dañar las proteínas), después se centrifugó a 8500xg por 10 minutos a 4°C. Para obtener las membranas celulares, el clarificado obtenido se transfirió a un tubo para ultracentrifuga y se centrifugó a 32000xg a 4°C por 1 hora 15 minutos, el sobrenadante (fracción citoplasmática) se decantó en un tubo y se almacenó a -70°C, después a la pastilla se le agregaron 600µL del buffer NTI-10-G más 119µL del detergente (100mM) n-Dodecil-β-D-maltósido (nDβDm, "SIGMA-ALDRICH") y se resuspendió utilizando la misma punta; ya resuspendida se transfirió a un tubo de 1.5mL, posteriormente el tubo se incubó O/N a 4°C con agitación constante. Después se centrifugó a 14000xg a 4°C por 30 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1.5mL nuevo (Método modificado de QIAGEN® Ni-NTA Membrane Protein Kit Handbook).

7.9 Cuantificación de proteínas.

Se preparó una curva estándar por duplicado: En la columna A y B de una placa de 96 pozos (para ELISA) se depositaron por pozo 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ L de una solución estándar de albúmina de 2mg/mL (Bio-rad *DC*TM Protein Assay “*BIO-RAD*”), después se agregó 20, 18, 16, 14, 12 y 10 μ L de buffer NTI-10-G. En la columna C se depositaron 2 μ L por pozo de cada muestra y se agregó 18 μ L de buffer NTI-10-G a todas las muestras. Posteriormente en un tubo de 1.5mL se mezcló 20 μ L del reactivo S (Bio-rad *DC*TM Protein Assay Reagent S “*BIO-RAD*”) más 1mL del reactivo A (Bio-rad *DC*TM Protein Assay Reagent A “*BIO-RAD*”) y se agregó 25 μ L de esta mezcla a cada pozo. Después se agregó 200 μ L del reactivo B (Bio-rad *DC*TM Protein Assay Reagent B “*BIO-RAD*”) a cada pozo y se incubó protegido de la luz por 15 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente se cuantificó a 750nm en el espectrofotómetro Microplate Reader modelo 680 (*Bio-Rad* Laboratories). Posteriormente se ajustó el volumen correspondiente a 400 μ g de proteína y este se depositó en un tubo de 1.5mL e inmediatamente se almacenaron a -70°C.

7.10 Ensayo de “pull-down”.

En un tubo de 1.5mL se depositaron 50 μ L de perlas magnéticas de níquel “Ni-NTA Magnetic, Agarose beads”; (QIAGEN) y se agregó 500 μ L de buffer NTI-10-G, se enjuagaron tres veces con el mismo volumen de 500 μ L de buffer NTI-10-G y se incubaron 15 minutos cada una a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente los tubos se colocaron en la gradilla magnética “12-Tube Magnet” (QIAGEN) para concentrar las perlas magnéticas y el sobrenadante se extrajo con una punta, el cual se desechó. Posteriormente, se agregó buffer NTI-10-G y 25 μ L de Tween al 1%, se

incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación constante, después se le agregó el volumen correspondiente a 400µg de proteína y se incubaron por 2 hr más a temperatura ambiente con agitación constante. Los tubos se volvieron a colocar en la gradilla magnética y el sobrenadante se extrajo con una punta y se le desechó. Luego se agregó 200µL de buffer NTI-10-G más 10µL de Tween al 1%, se incubó O/N a 4°C con agitación constante. Al día siguiente los tubos se colocaron en la gradilla magnética y el sobrenadante se le extrajo con una punta y se le desechó. Después se realizaron 4 lavados de 1 hr a 4°C con agitación constante usando 500µL de buffer NTI-25-G más 25µL de Tween al 1% en cada uno, luego los tubos se colocaron en la gradilla magnética y el sobrenadante se le extrajo con una punta y se le desechó. Finalmente se agregaron 15µL de buffer NTI-500-G, se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos con agitación constante y se le adicionó 10µL de buffer de carga para proteínas, se hirvió por 10 minutos, e inmediatamente se almacenaron a 4°C.

7.11 SDS-PAGE.

Se preparó un gel separador de acrilamida al 13%, se mezcló 1.3g de glicerol con 5.2mL de (acrilamida/bisacrilamida; 29:1), 4mL buffer Tris-HCl/SDS; pH= 8, se mezcló hasta disolver el glicerol, después se agregó 60µL de persulfato de amonio (APS) al 10%, 12µL de TEMED y 1.5mL H₂O destilada, e inmediatamente se vertió entre las placas de vidrio previamente acopladas al soporte para los vidrios y se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 15 minutos. Después se preparó el gel concentrador mezclando 300µL de acrilamida/bisacrilamida, 750µL buffer Tris-HCl; pH= 8, 30µL de persulfato de amonio (APS) al 10%, 5µL de TEMED y 2mL H₂O destilada, e inmediatamente se vertió sobre el gel separador y se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se vació el buffer al

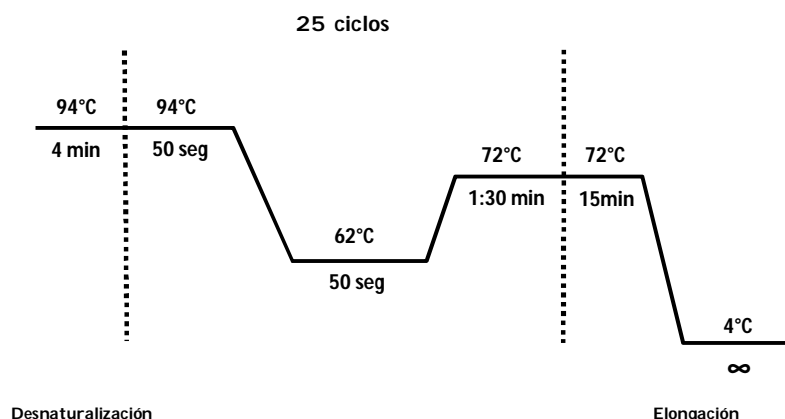
reservorio interno de la cámara de electroforesis para el cátodo y después se depositaron 15µL de cada muestra en los pozos, se usaron 2µL de marcador de proteínas “Precision Plus Protein Dual Xtra Standards” (*BIO-RAD*), posteriormente se vaciaron 400mL de buffer para el ánodo a la cámara para electroforesis. Las condiciones para las electroforesis fueron 0.4mA por aproximadamente 6 hr (hasta ver la separación de las bandas del marcador).

7.12 Tinción con nitrato de plata.

Una vez terminada la electroforesis el gel se colocó en un recipiente de vidrio y se enjuagó con 30mL de H₂O desionizada (milliQ), el agua se desechó y se agregaron 30mL de solución de fijación y se incubó O/N a temperatura ambiente con agitación constante, esta solución se desechó, después se agregó etanol al 20% para hidratar el gel y se incubó O/N a temperatura ambiente con agitación constante, se desechó esta solución y se enjuagó con 30mL de H₂O milliQ por 10 minutos, después se agregó la solución de tiosulfato de sodio a 20ppm y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto con agitación constante, se desechó la solución y se enjuagó con 30mL de H₂O milliQ por 10 minutos, después se agregó 50mL de la solución de nitrato de plata 0.01M, se cubrió con aluminio (protegido de la luz) y se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos con agitación constante, se desechó la solución y se enjuagó dos veces con 30mL de H₂O milliQ por 10 minutos, la solución se desechó y el gel se reveló con 50mL de una solución de carbonato de sodio 0.3M más 16µL de tiosulfato de sodio previamente usado más 33µL de formaldehído y se incubó a temperatura ambiente con agitación constante hasta la aparición de las bandas e inmediatamente se agregó 5mL de ácido acético, después se desechó la solución y se agregó 30mL de ácido acético al 5% para conservar el gel por 3 días. Posteriormente el gel se escaneó y secó.

7.13 Amplificación de *cor* a partir de pPHCCor.

Se amplificó el gen *Cor* a partir del plásmido pPHCCor usando un volumen de reacción de 100µL, la mezcla (master mix) fue: 10µL de buffer (10X), 3µL de MgCl₂ (50mM), 2µL de dNTP's, (10mM), 1µL de cada oligonucleótido (4pM/µL) ("SIGMA", Ver Tabla 4, anexo 1), 50ng de ADN (pPHCCor), 0.5µL de "Taq DNA polimerasa" (5000U/mL) (*NewEngland Biolabs*[®]) y 81.5µL de H₂O inyectable. Las condiciones de amplificación fueron:



Se usó el termociclador "*Applied Biosystems*" Modelo 9700.

7.14 Clonación del producto de PCR de *cor* en pJET1.2.

Se siguieron las instrucciones del fabricante "CloneJET PCR Cloning kit" (Thermo Scientific).

7.15 Transformación del producto de ligación de pJET1.2

A una alícuota de 100µL de la cepa W3110 químico-competente se le agregaron los 20µL del producto de ligación y se incubó por 30 minutos en hielo, después se incubaron por 2 minutos a 37°C e inmediatamente se

colocó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 300µL de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación constante a 250rpm por 1.5 hr. Después se depositaron 100µL del cultivo en una caja de medio LB con Ampicilina a una concentración final de 100µg/mL, se espatularon con una varilla codeada estéril y se dejó secar, en seguida la caja se incubó O/N a 37°C. Por estría en cuadrantes se aislaron 10 colonias en una caja nueva de medio LB con Ampicilina a una concentración final de 100µg/mL y se incubó O/N a 37°C.

7.16 PCR de colonia.

Se usó un volumen de reacción de 25µL para cada colonia previamente aislada y la master mix que se utilizó fue: 5µL de buffer (10X), 0.6µL de MgCl₂ (50mM), 0.4µL de dNTP's, (10mM), 1uL de cada oligonucleótido (4pM/µL; "SIGMA"; Ver Tabla 4, anexo 1), 0.25µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL; "NEW ENGLAND Biolabs[®]") y 18.25µL de H₂O inyectable; después con una asa bacteriológica se tomó una colonia y se disolvió en el tubo de reacción. Las condiciones de amplificación fueron las mismas del apartado 7.13.

7.17 Electroforesis.

Se preparó un gel de agarosa (HMP, High Melting Point; "SIGMA-ALDRICH") al 1% (1g de agarosa disuelta en 100mL de buffer TAE 1X), teñido con Bromuro de Etido (BrEt) ("SIGMA-ALDRICH"). Los productos de amplificación (amplicones) se depositaron en los respectivos pozos y como marcador de peso molecular se usó 1µL de 1Kb plus DNA ladder ("invitrogenTM"). Las condiciones para la electroforesis fue 1 hr a 80 volts, posteriormente el gel se visualizó con luz ultravioleta en el foto documentador.

7.18 Restricción de pJET1.2_cor y pBAD28.

Se realizó la extracción de los plásmidos pJET1.2 y pBAD28 con el método descrito en el apartado 7.4 y después se realizó una doble restricción usando las enzimas *NheI* y *HindIII* (“*NEW ENGLAND, Biolabs*®”). En un volumen de reacción de 30µL se mezclaron: 3µL de buffer 2.1 (10X), 1µL de cada enzima, 20µL de ADN (600ng) y 4µL de H₂O inyectable, después se incubó O/N a 37°C. Posteriormente se realizó una electroforesis de los 30µL de reacción en un gel de agarosa de LMP (Low Melting Point; “*SIGAMA-ALDRICH*”) al 1% teñido con BrEt a 80Volts y la banda de ~378pb se recuperó con columnas GENELUTE AGAROSE SPIN COLUMNS “*SIGMA*®”) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.19 Ligación.

Una vez restringidos pJET1.2_cor de donde se liberó un fragmento de ~378pb así como pBAD28 (vector de clonación) se realizó la reacción de ligación en un volumen de 20µL, se mezcló 2µL de buffer T4 ligasa 10X, 5µL de ADN del inserto (100ng; “*cor*”), 10µL de ADN del vector pBAD28 (200ng), 1µL de T4 DNA ligase (“*NEW ENGLAND Biolabs*®”) y 2µL de H₂O inyectable; como control de ligación se usó ADN del fago λ cortado con *HindIII*, después se incubó O/N a 15°C.

7.20 Electroporación del producto de ligación pBAD28_cor y selección de las clonas.

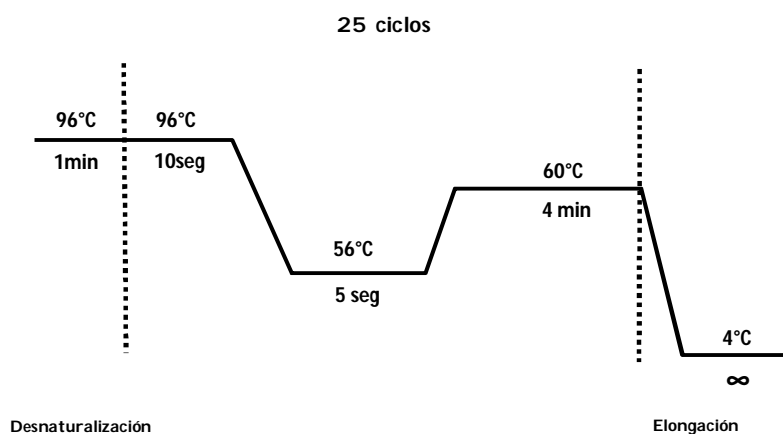
La electroporación y la selección de las clonas se realizó de la forma ya descrita en el apartado 7.6, usando 2µL del producto de ligación.

7.21 PCR de las clonas y electroforesis.

La PCR de las clonas se realizó conforme al apartado 7.16 y la electroforesis conforme al apartado 7.17.

7.22 Secuenciación de las clonas.

En un tubo para PCR se mezcló 4µL de buffer 5X, 8µL de MMx (“BigDye® v3.1 Terminator Cycle Sequencing kit”), 1µL de oligonucléotido (4pM/µL; “SIGMA”; Ver Tabla 4, anexo 1), 2µL de H₂O milliQ y 5µL del amplicon purificado. Las condiciones de secuenciación fueron:



Se usó el termociclador “Applied Biosystems” Modelo 9700.

7.23 Purificación de la reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación (20µL) se transfirió a un tubo de 1.5mL y se agregó 80µL de isopropanol al 80%, después se centrifugó a 3700xg por 1 hr, se decantó el sobrenadante y se agregó 80µL de etanol al 70%, se

centrifugó a 3700xg por 20 minutos y se decantó el sobrenadante, se dejó secar el etanol e inmediatamente se agregó 14µL de formamida y se resuspendió, después se centrifugó a 3700xg por 1 minuto y el tubo se almacenó a -20°C hasta meterlo al secuenciador.

7.24 Western blot.

Se realizó un SDS-PAGE como ya se describió en el apartado 7.11, después este gel se transfirió a la membrana de nitrocelulosa (“Amersham”) a 30Volts por 3 hr, después la membrana se colocó en un recipiente y se agregó 30mL de solución de bloqueo (leche “svelty” al 5% disuelta en buffer PBS), se incubó a temperatura ambiente por 2 hr con agitación constante, después se enjuagó con buffer PBS y se agregó 30mL del anticuerpo primario (anti-tag-Histidinas), se incubó a temperatura ambiente por 2 hr con agitación constante, después se enjuagó tres veces con buffer PBS y se agregó 30mL del anticuerpo secundario (anti-mouse), se incubó a temperatura ambiente por 1 hr con agitación constante y se enjuagó tres veces con buffer PBS. Posteriormente se reveló la membrana usando el kit “Supersignal[®]West Femto Maximum Sensitivity Substrate” (Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7.25 Ensayo de complementación de la mutante *ompA⁻*.

Una vez que se obtuvo la resiembra de la mutante *ompA⁻* como se describe en el apartado 7.1; de esta se prepararon células electrocompetentes como se describe en el apartado 7.5 y se electroporaron 2µL de ADN del plásmido pBAD28_cor (pC8; candidata número 8) de acuerdo al apartado 7.6, se usaron cajas de medio LB con Ampicilina a una concentración final de 100µg/mL más Kanamicina a una concentración final de 50µg/mL, para la selección de las transformantes. Posteriormente de estas transformantes se

prepararon electrocompetentes y se electroporaron 2µL de ADN del plásmido pOmpA, se usaron cajas de medio LB con Ampicilina a 100µg/mL, Kanamicina a 50µg/mL y Cloranfenicol a 10µg/mL para la selección de las transformantes.

7.26 Ensayo de infección en la mutante *ompA⁻* y en la complementada con pOmpA.

Se realizó un cultivo líquido (5mL de medio LB incubado O/N con agitación constante a 250rpm a 37°C) de las cepas silvestres, de las mutantes y las mutantes complementadas. Al cultivo de las mutantes transformada además de la Kanamicina (5µL de un stock de 50mg/mL), se le adicionó Ampicilina (5µL de un stock de 100mg/mL); para la mutante transformada y complementada además de la Kanamicina y la Ampicilina se le adicionó Cloranfenicol (1.5µL de un stock de 34mg/mL). Se preparó un tapiz usando los cultivos anteriores y se vaciaron en cajas de medio TΦ para las cepas silvestres mientras que para las mutante se usaron cajas de medio TΦ con Kanamicina a 50µg/mL más Ampicilina a 100µg/mL y para las mutante complementada se usaron cajas de medio TΦ con Kanamicina a 50µg/mL, Ampicilina a 100µg/mL y Cloranfenicol a 10µg/mL. Posteriormente, del cultivo O/N de la mutante complementada se tomó 300µL y se agregó 3µL de IPTG (10mM) más 6µL de arabinosa al 2.5%, se incubó a 37°C por 3 hr con agitación constante a 250rpm, después se preparó un tapiz y se vació en una caja de medio TΦ con Kanamicina a 50µg/mL, Ampicilina a 100µg/mL y Cloranfenicol a 10µg/mL. Después se realizaron diluciones del fago mEp167 de 10⁻¹ a 10⁻⁸ y se depositaron 10µL de cada una sobre el tapiz y las cajas se incubaron O/N a 37°C. Finalmente se observa la formación de placas líticas o la ausencia de éstas.

8. Resultados

8.1 La expresión de las proteínas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpF, OmpW, LamB y FhuE es necesaria para que Cor excluya al fago mEp167, FhuA-dependiente.

Para corroborar si es necesaria la expresión de las proteínas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpF, OmpW, LamB y FhuE para que Cor excluya al fago mEp167, FhuA-dependiente; se realizaron dos ensayos de infección, en el primero se usaron cepas silvestres y cepas mutantes que tenían deletado el gen que codifica para la proteína de membrana externa (provenientes de la colección *Keio*), en el segundo se usaron las mismas cepas pero se les sobre expresó la proteína Cor. Ambos ensayos fueron realizados previamente por la M. en C. Emma Socorro Arguijo-Hernández (datos no publicados).

El resultado del primer ensayo de infección se muestra en la Tabla 1, en la cual los fagos mEp332, λ , Φ 80 y mEp167 crecen en las dos cepas silvestres porque éstas tienen sus receptores completos y la cepa C600 que tiene fondo genético *fhuA*⁻ se usó como control para los fagos FhuA dependientes por lo que se observó la no infección de estos fagos. Mientras que en las cepas mutadas, los cuatro fagos crecen en cada una, excepto aquellas que carecen del receptor para los respectivos fagos. Es decir, mEp332 requiere de OmpC, por lo que no creció en la BW25113 *ompC*::Tn10; lambda requiere de LamB, así que no creció en la BW25113 *lamB*::Tn10, mientras que Φ 80 y mEp167 requieren de FhuA y por lo tanto no crecieron en BW25113 *fhuA*::Tn10.

Tabla 1. Ensayo de Infección en cepas mutantes de *E. coli* con los fagos mEp332, λ, Φ80 y mEp167.

CEPAS DE <i>E. coli</i>		FAGOS			
		mEp332 ^ψ	λ [¥]	Φ80 [§]	mEp167 [§]
CEPAS SILVESTRES	BW25113	+++	+++	+++	+++
	W3110	+++	+++	+++	+++
CEPA CONTROL	C600 (<i>fhuA</i> ⁻)	+++	+++	-	-
CEPAS MUTADAS (gen deletado por inserción del transposón)	BW25113 <i>ompC</i> ::Tn10	-	+++	+++	+++
	BW25113 <i>fhuA</i> ::Tn10	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>fhuD</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>fhuE</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>fhuB</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>toB</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>btuB</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>ompW</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>ompF</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>lamB</i> ::Tn10	+++	-	+++	+++
	BW25113 <i>ompA</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>slp</i> ::Tn10	+++	+++	+++	+++

(+++) Lisis total, (++) Lisis parcial, (-) No infección. ^ψ OmpC dependiente, [¥] Lamb dependiente, [§] FhuA dependiente.

El resultado del segundo ensayo de infección se muestra en la Tabla 2, en el que se sobre expresó la proteína Cor e interesantemente los fagos Φ80 y mEp167 (FhuA dependientes) crecieron en las mutantes: *ompC*⁻, *fhuE*⁻, *ompW*⁻, *ompF*⁻, *lamB*⁻, *ompA*⁻ no obstante que presentaban un fondo genético *fhuA*⁺.

Tabla 2. Ensayo de infección de las cepas mutantes de *E. coli* con pPHCCor con los fagos mEp332, λ, Φ80 y mEp167.

CEPAS DE <i>E. coli</i>		FAGOS			
		mEp332 ^ψ	λ [¥]	Φ80 [§]	mEp167 [§]
CEPAS SILVESTRES	BW25113	+++	+++	+++	+++
	W3110	+++	+++	+++	+++
CEPAS CONTROL	C600 (<i>fhuA</i> ⁻)	+++	+++	-	-
	BW25113/pPHCCor	+++	+++	-	-
	W3110/pPHCCor	+++	+++	-	-
CEPAS MUTADAS (gen deletado por inserción del transposón)	BW25113 <i>ompC</i> ::Tn10/pPHCCor	-	+++	+++	+++
	BW25113 <i>fhuA</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>fhuD</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>fhuE</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>fhuB</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>tolB</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>btuB</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-
	BW25113 <i>ompW</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>ompF</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>lamB</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	-	+++	+++
	BW25113 <i>ompA</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	+++	+++
	BW25113 <i>slp</i> ::Tn10/pPHCCor	+++	+++	-	-

(+++) Lisis total, (++) Lisis parcial, (-) No infección. ^ψ OmpC dependiente, [¥] LamB dependiente, [§] FhuA dependiente.

Los resultados de los dos ensayos de infección sugieren que las proteínas OmpA, OmpC, OmpW, OmpF, LamB y FhuE son necesarias para que Cor excluya al fago mEp167 FhuA dependiente.

8.2 La falta de expresión de OmpA y OmpW afecta la presencia de Cor sobre la membrana externa.

Después de obtener las proteínas de membrana de cada mutante transformada con el plásmido que expresa Cor (pPHCCor) y purificar éstas junto con la proteína Cor a través del tag de histidinas acopladas a las perlas magnéticas de níquel (pull-down), se corrió el gel SDS-PAGE al 13% para identificar a Cor, Figura 13.

Interesantemente se observó una gran disminución de Cor en la mutante *ompA*⁻, mientras que en la mutante *ompW*⁻ también se notó cierta disminución y en el resto de las mutantes Cor se observó intensamente.

Por lo que este resultado sugiere que la proteína Cor de alguna forma interactúa directamente con OmpA para que Cor pueda ser localizado en la membrana externa.

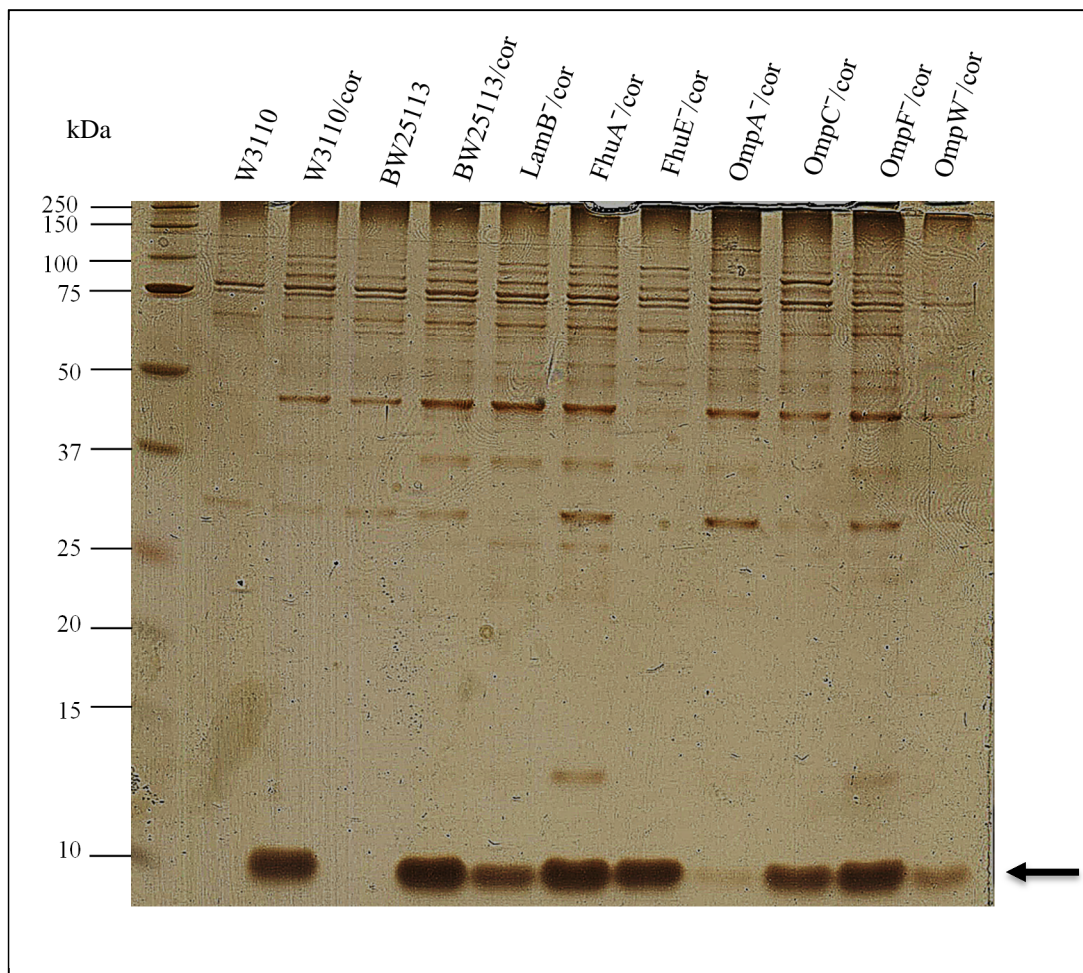


Figura 13. Ensayo de "pull-down" de Cor en las diferentes mutantes. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína Cor de 8kDa. Controles negativos: W3110 y BW25113. Controles positivos: W3110/pPHCCor y BW25113/pPHCCor. SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata. Se usaron 15µL de cada muestra.

8.3 Clonación del gen *cor* en pBAD28.

Debido a que el plásmido pPHCCor no era compatible por tener el mismo origen de replicación (origen de replicación de pBR322) con los plásmidos que complementan a las mutantes (plásmidos de la colección ASKA⁻) para poder realizar el ensayo de complementación en presencia de Cor, fue necesario amplificar a Cor a partir de pPHCCor y clonarlo en otro vector, en

este caso pBAD28 (origen de replicación de pACyC184). Primero se amplificó *cor* usando como molde el pPHCCor y los oligonucleótidos (Ver Tabla 4; anexo 1) que tienen la secuencia de reconocimiento para las enzimas *NheI* en sentido y *HindIII* para el antisentido, se clonó en pJET1.2/blunt y se transformó en la bacteria W3110, obteniéndose 10 colonias, a las cuales se les realizó una PCR para amplificar el fragmento de 378pb, correspondiente al gen *cor*. El producto de PCR se muestra en el gel de la Figura 14.

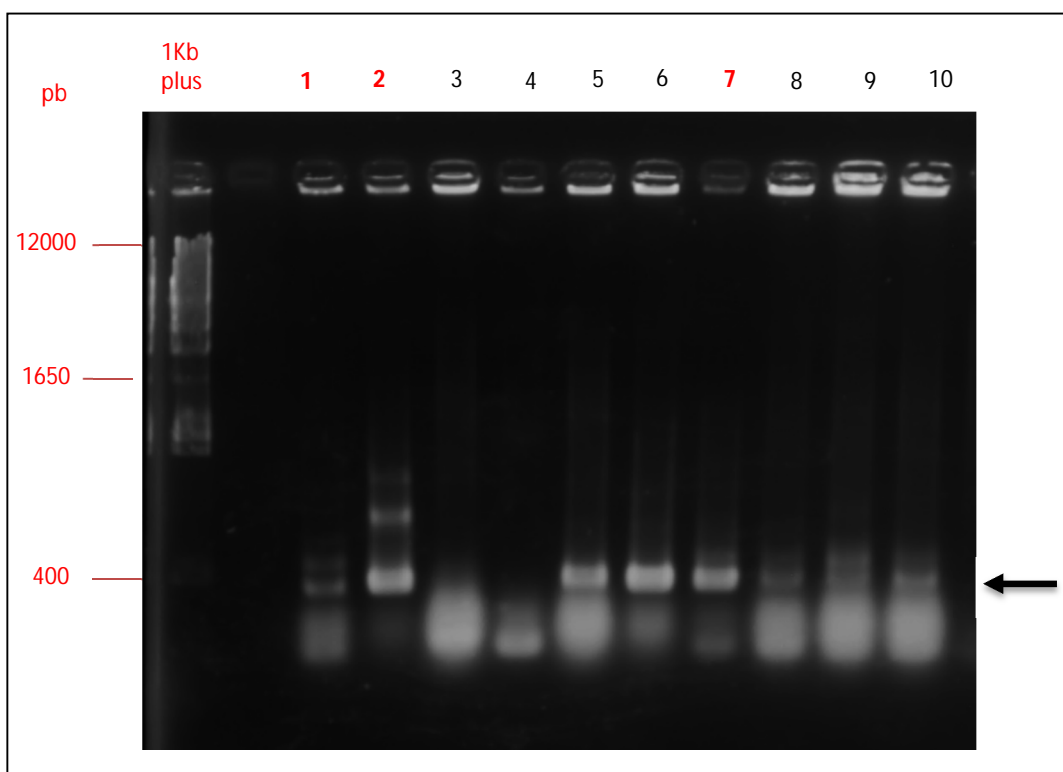


Figura 14. Amplificación del gen *cor* en las 10 clonas de pJET1.2/blunt. La flecha señala el amplicón de 378 pb que corresponde al gen *cor*. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Se usarón 5µL de cada amplicón.

De las 10 colonias obtenidas, se aislaron la 1, 2 y 7, siendo la 7 la usada para realizar la doble restricción y liberar el fragmento de 378pb, a su vez se restringió el plásmido pBAD28 con las enzimas *NheI* y *HindIII*, y se corrió en un gel como se muestra en la Figura 15.

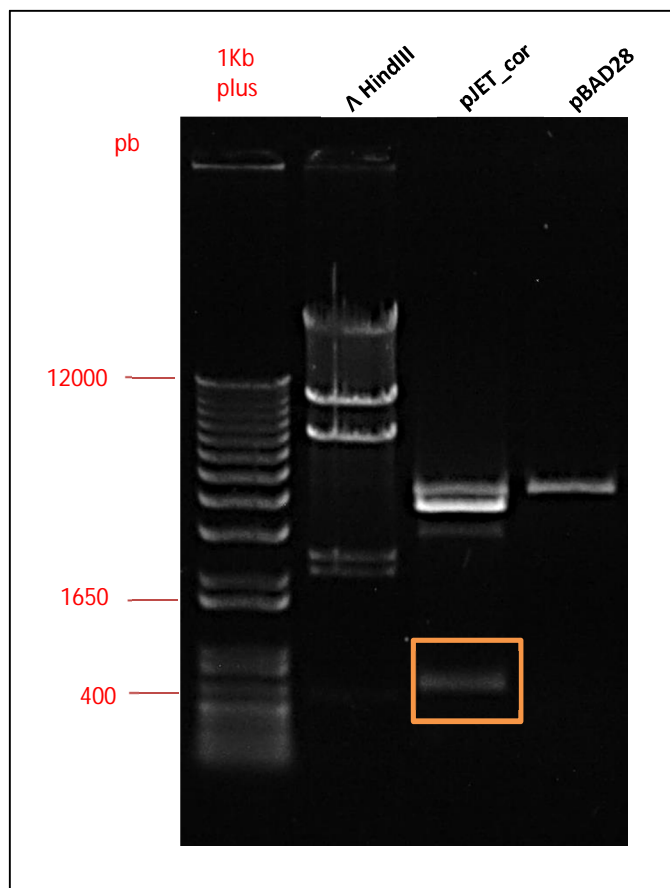


Figura 15. Doble restricción de pJET_cor y pBAD28 con *NheI* y *HindIII*. Se liberó el fragmento de 378pb, el cual se muestra en el recuadro y se observa la forma lineal de pBAD28. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Se usaron 5µL de cada restricción

Posteriormente se realizó la ligación y el producto de ligación se electroporó en la bacteria W3110 obteniéndose nuevamente 10 candidatas, las cuales se aislaron. Para saber si tenían el inserto se realizó una PCR de colonia con los mismos oligonucleótidos del apartado 8.3 y el resultado se muestra en la Figura 16, donde se observó la amplificación de *cor* sólo en las colonias 2,5 y 8; como control positivo se usó la W3110 transformada con pPHCCor.

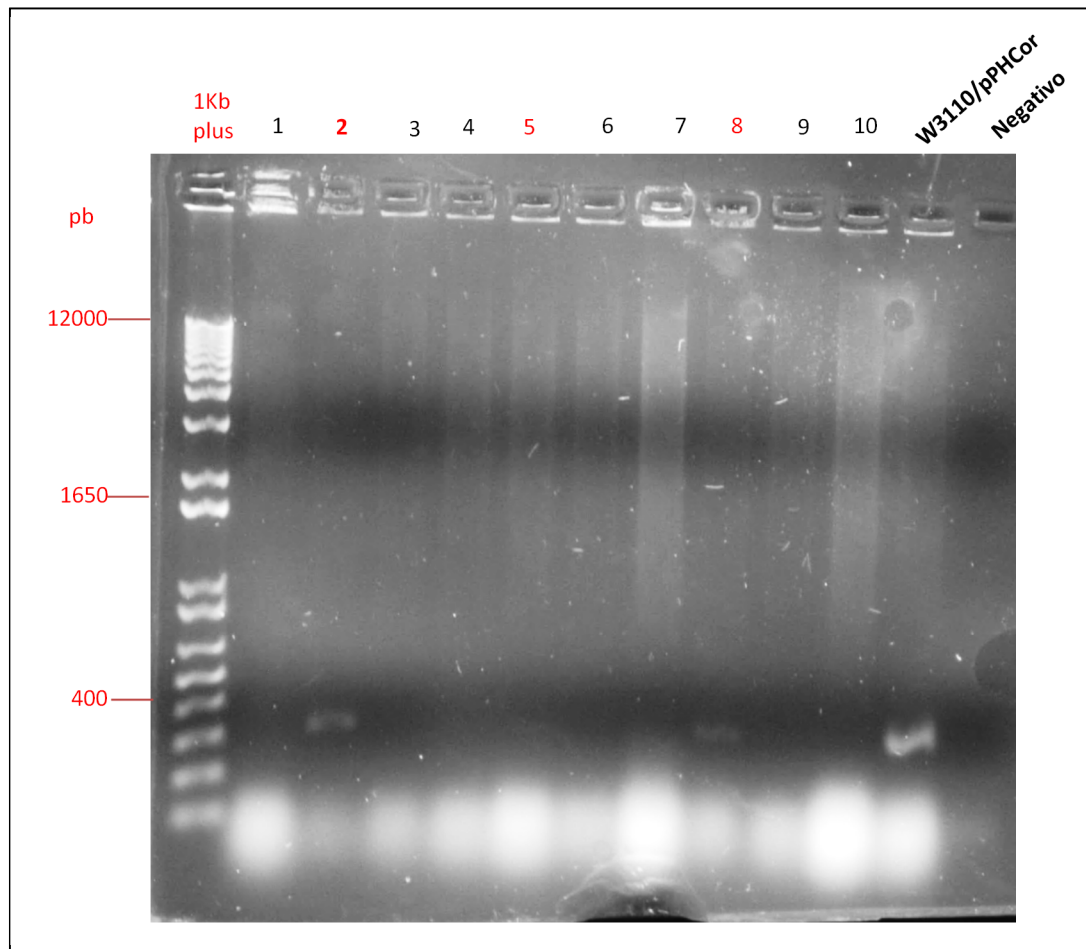


Figura 16. Amplificación de *cor* en las clonas pBAD28_*cor*. Las colonias 2,5 y 8 amplificaron el fragmento de 378pb. Control positivo W3110/pPHCCor. Gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de etidio. Se usaron 5µL de cada amplicón.

Dado que no todas las candidatas amplificaron, posiblemente por la falta de número de ciclos en la PCR; se realizó la extracción de plásmido de cada una y se transformaron en la bacteria W3110. Posteriormente se realizó el ensayo de infección con el fago mEp167 y se pudo comprobar cuales presentaban la exclusión por Cor, como control positivo se usó la W3110/pPHCCor. El resultado fue que las 10 candidatas excluyeron al fago. Sólo se muestra el goteo en 3 de ellas, en la Figura 17. Por lo que las 10

candidatas se almacenaron en “stabs” y en gliceroles. Sólo se seleccionó la candidata 8 y su plásmido para los ensayos siguientes.

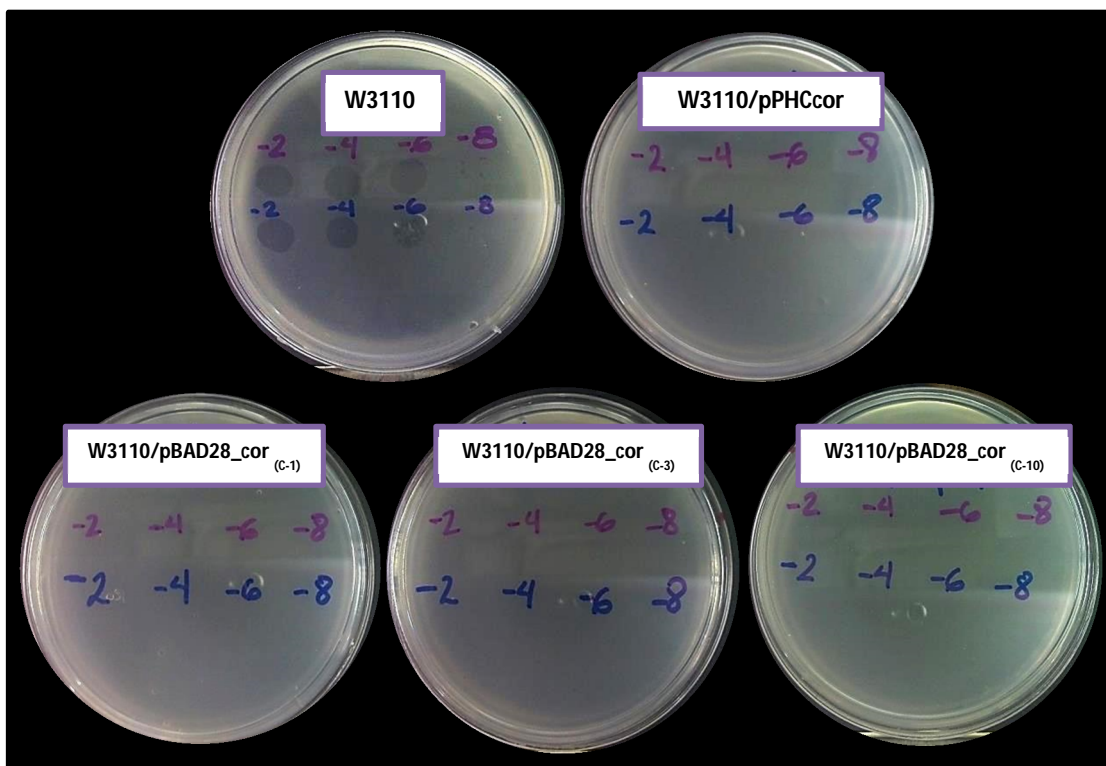


Figura 17. Ensayo de infección de las candidatas pBAD28_cor. Exclusión del fago mEp167 en las candidatas 1, 3 y 10. Control positivo: W3110/pPHCCor. Control negativo: W3110. Se gotearon por duplicado 10 μ L de las diluciones -2 a la -8.

Para determinar cuál era la concentración idónea de arabinosa para inducir la expresión Cor, se realizó una curva a concentraciones crecientes de arabinosa, tanto para la cepa W3110 como para la BW25113 y se corrió un SDS-PAGE, el cual se muestra en la Figura 18, en el cual a la 3^{er} hora se apreció una banda de más de 10 kDa que se va haciendo “más intensa” conforme aumenta la concentración de arabinosa, pero esto sólo se observó para la cepa BW25113; por lo que se procedió a detectar a Cor por Western blot.

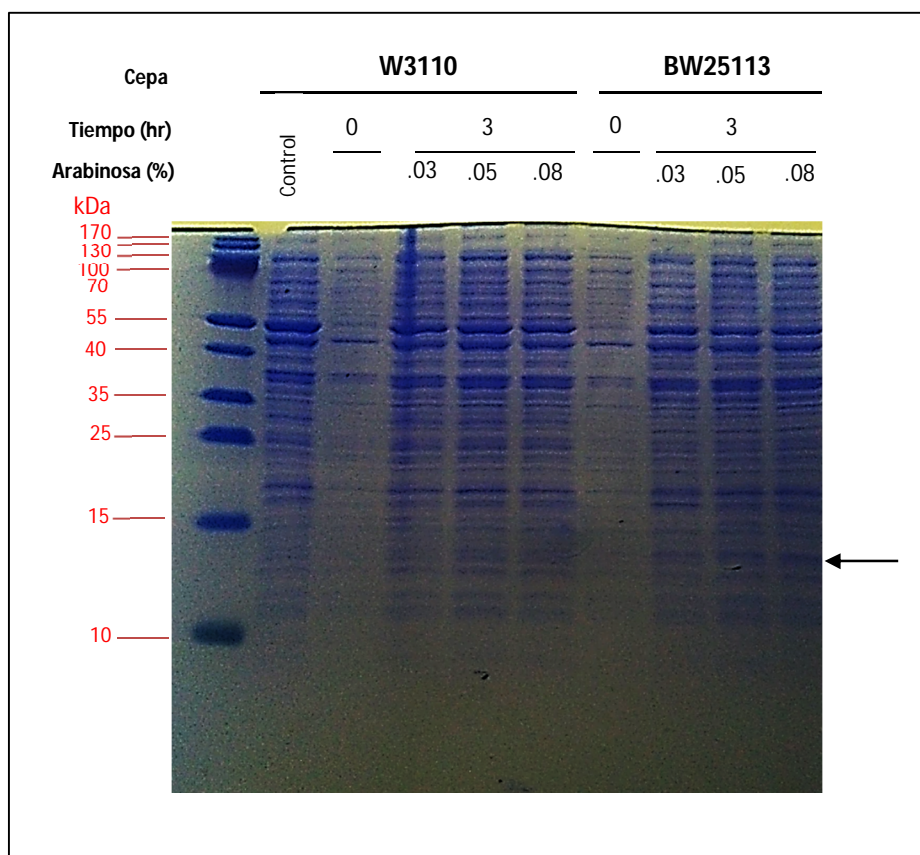


Figura 18. Inducción de Cor con arabinosa usando el plásmido de la candidata 8. La flecha señala la proteína mayor a 10 kDa. Control: W3110/pBAD28. SDS-PAGE al 13%, teñido con azul de coomassie; se usaron 15µL de muestra.

El Western blot se realizó usando un gel diferente al anterior con las mismas concentraciones de arabinosa pero a diferentes tiempos, el cual se presenta en la Figura 19. En este resultado se observó que 4 horas con 0.03% de arabinosa es suficiente para inducir Cor (pBAD28_Cor).

Sin embargo, desconocemos porque a 0.05 y 0.08% de arabinosa la señal es más débil, contrario a lo esperado, por lo que quedará pendiente repetir el ensayo.

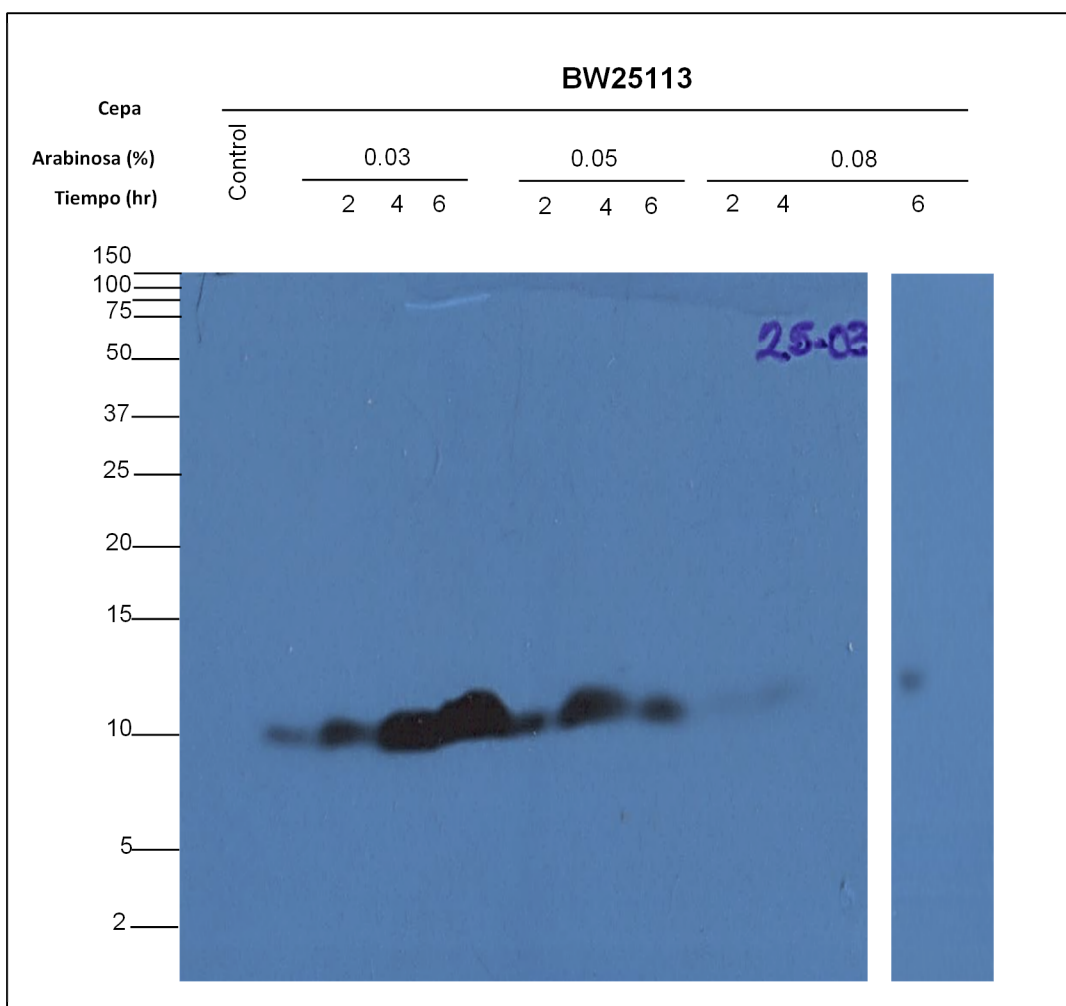


Figura 19. Western blot de la inducción de Cor con arabinosa. Expresión de Cor con diferentes concentraciones de arabinosa y a diferentes tiempos. SDS-PAGE al 13%, se usaron 15µL de muestra.

Finalmente, se repitió el ensayo de “pull-down” de Cor en las mutantes, pero transformadas con el plásmido de la candidata 8 (pBAD28_cor = pC8), esperando observar un resultado equivalente que en la Figura 13, ya que de acuerdo al resultado del Western blot, Cor sí se expresa. El SDS-PAGE de proteínas de membrana se muestra en la Figura 20, en donde el resultado de la mutante *ompA*⁻ correlaciona con lo que se obtuvo, cuando se usó el plásmido pPHCCor.

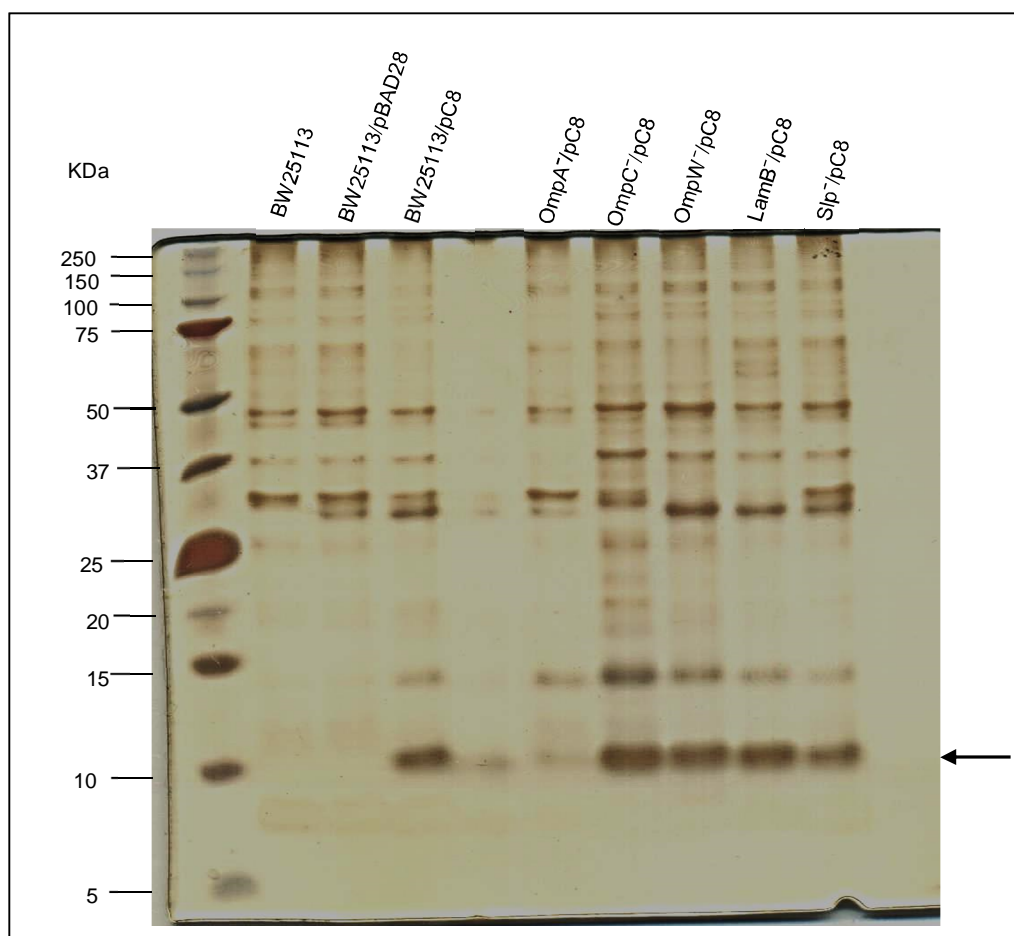


Figura 20. Ensayo de “pull-down” de Cor en las diferentes mutantes usando el plásmido pC8. La flecha señala la proteína Cor de aproximadamente 8kDa. Controles negativos: BW25113 y BW25113/pBAD28. Control positivo: BW25113/pC8. SDS-PAGE al 13% teñido con nitrato de plata. Se usaron 15µL de cada muestra.

8.4 La cantidad de la proteína OmpA y Cor es importante para la exclusión del fago mEp167.

Una vez que se transformó la mutante *ompA*⁻ con el pBAD28_cor, tanto con la candidata 2 (C-2) como con la candidata 8 (C-8), Figura 21. Se realizó la transformación con el plásmido pOmpA (colección ASKA⁻) que complementa a esta mutante y que tiene resistencia a Cloranfenicol, las transformantes obtenidas se muestran en la Figura 22.

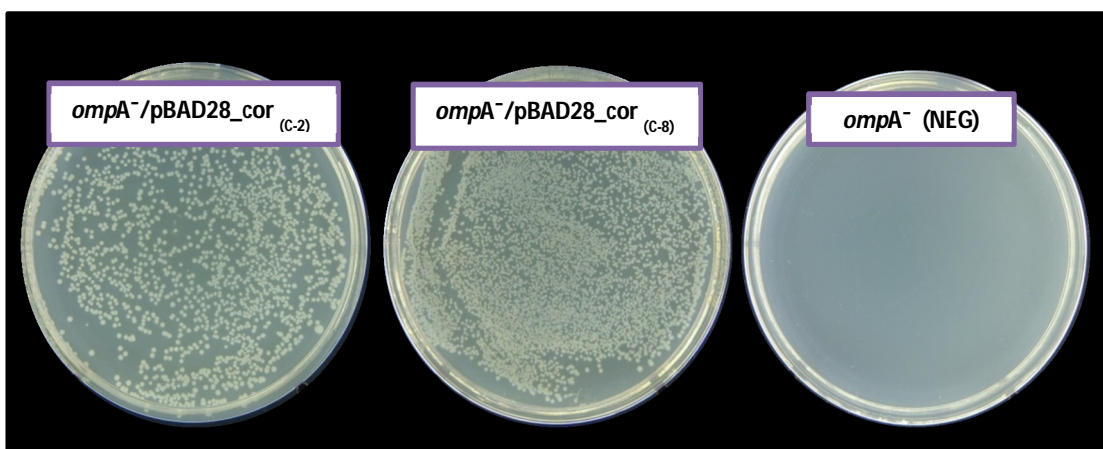


Figura 21. Transformación de la mutante *ompA*⁻ con los plásmidos de las candidatas pC2 y pC8. Cajas con medio LB más Kanamicina (50µg/mL) y para seleccionar las transformantes se usó Ampicilina (100µg/mL). Se espatularon 100µL de cultivo.

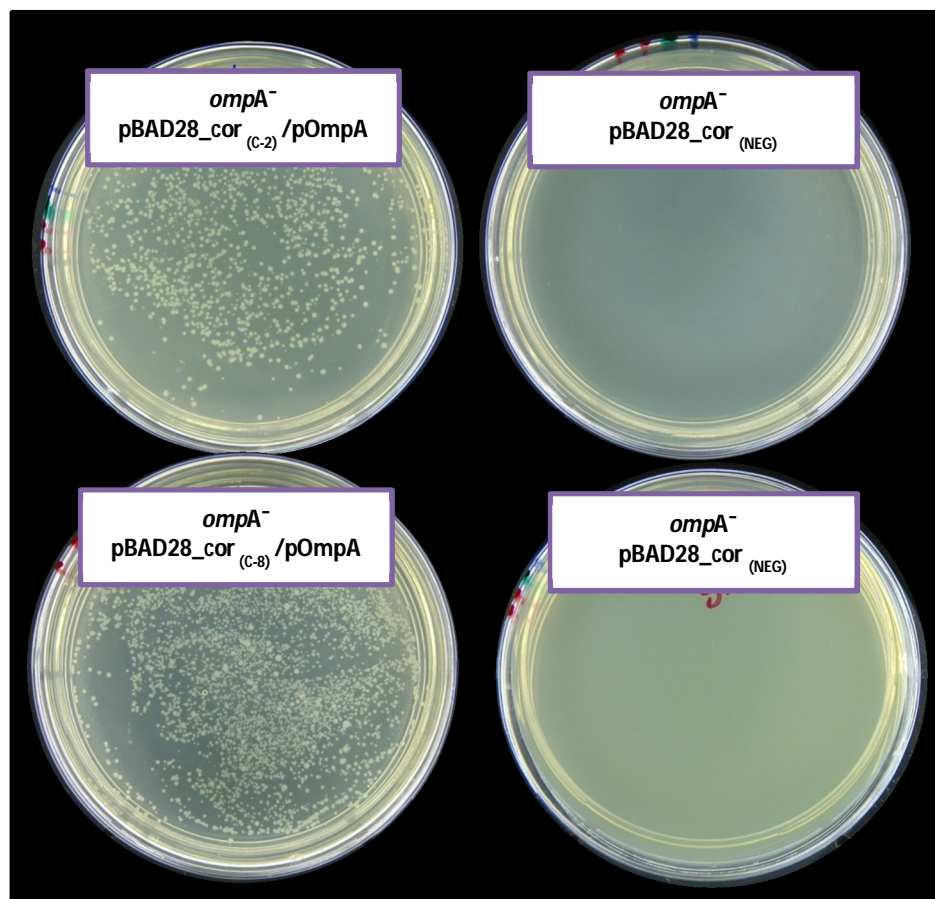


Figura 22. Complementación de *ompA*⁻/pC2 y *ompA*⁻/pC8 con el plásmido pOmpA. Cajas con medio LB más Kanamicina (50µg/mL) y Ampicilina (100µg/mL), para seleccionar las transformantes se usó Cloranfenicol (10µg/mL). Se espatularon 100µL de cultivo.

Una vez obtenidas las transformantes, se realizó el ensayo de infección con el fago mEp167 y así determinar si OmpA es necesaria para la exclusión del fago. Los resultados se muestran en la Figura 23, en la cual se observó que en la mutante *ompA*⁻ complementada con pOmpA sin inducción hay infección. Por lo que se realizó la inducción del plásmido pOmpA con IPTG en concentraciones crecientes como se muestra en la Figura 23 y la inducción de Cor (pC8) se mantuvo constante con 0.05% arabinosa. Sin embargo sólo se observó una disminución en la intensidad del halo de goteo de fago, sugiriendo una posible disminución en la infección.

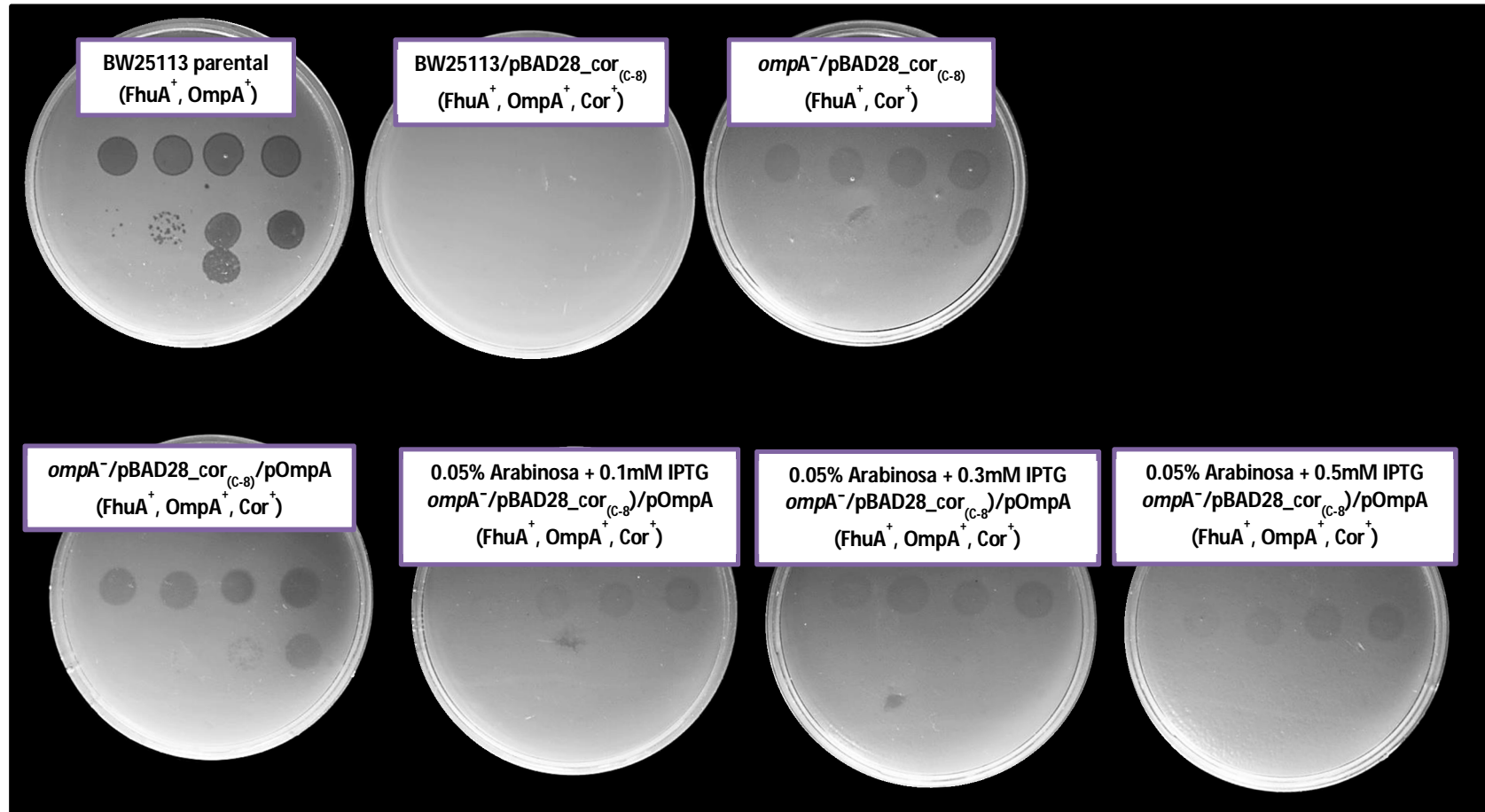


Figura 23. Ensayo de infección de *ompA*⁻/pC8 complementada con el plásmido pOmpA. Control negativo: BW25113 y *ompA*⁻/pBAD28_cor. Control positivo: BW25113/pBAD28_cor. Se gotearon 10 μ L de la dilución 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ del fago mEp167.

9. Discusión

En este trabajo, encontramos que las proteínas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpW, LamB son necesarias para que Cor pueda excluir al fago FhuA-dependiente mEp167; este comportamiento ya había sido observado por la M. en C. Emma Socorro Arguijo Hernández (datos no publicados) y correlaciona con lo que Uc-Mass *et al.*, (2004), observó en su trabajo y quien propuso que debido a la localización transmembranal de Cor y a sus posibles residuos de aminoácidos que quedan libres en el periplasma pudieran facilitar su interacción con FhuA, de tal manera que Cor actuaría a nivel de membrana bloqueando la eyección del DNA del fago. Este tipo de sistema de exclusión de fagos ya ha sido reportado por ejemplo; la proteína SieA del fago P22 de *Salmonella typhimurium*^{(34) (35) (36)}, asimismo en la conversión lítica del fago T5 de *E. coli* la lipoproteína Llp inactiva al receptor FhuA⁽³⁷⁾.

Por otro lado, cuando las diferentes mutantes que tienen fondo genético *fhuA*⁺ se transformaron con el plásmido pPHCCor y se gotearon los fagos Φ 80 y mEp167 (FhuA-dependientes) se esperaba observar exclusión de estos fagos, pues como ya se hizo mención Cor actúa sobre FhuA para inhibir a los fagos FhuA dependientes, sin embargo, no fue así para algunas mutantes, ya que la *ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompF*⁻, *ompW*⁻, *lamB*⁻ y *fhuE*⁻ presentaron infección positiva, además, este resultado coincidió con las proteínas que co-purificaron en el ensayo de “pull-down” de Cor a partir de la cepa silvestre W3110, las cuales se identificaron como LamB, OmpC, OmpA, Slp y OmpW. Por lo que para tratar de determinar el posible orden en caso de que hubiese, el hipotético complejo proteínico, se realizó nuevamente el ensayo de “pull-down” de Cor pero ahora con cada una de las mutantes.

Se encontró que la proteína Cor de 8kDa aparece en todas las mutantes *lamB*⁻, *fhuA*⁻, *fhuE*⁻, *ompC*⁻, *ompF*⁻ y *ompW*⁻, pero interesantemente en la *ompA*⁻ la expresión de Cor mostró una notable disminución aún cuando la concentración de proteína que se usó en el gel fue la misma para todas las muestras. Esto nos condujo a otro planteamiento sobre la proteína OmpA, en el cual al no estar presente OmpA, Cor pudiera no mantenerse en la membrana por alguna inestabilidad (se explicara más adelante) o Cor pudiera no anclarse a OmpA y así a la membrana externa. Por lo que una posible explicación es la evidencia que se tiene sobre el dominio C-terminal de lipoproteínas PAL (Peptidoglycan-associated lipoproteins), que comparten cierta homología con el dominio C-terminal de OmpA, de tal forma que ambos se asocian en el periplasma de manera no covalente con los peptidoglicanos y por ende asociados a la membrana externa ^{(38) (39)}; incluso a los PAL se les ha nombrado proteínas OmpA_C-like; por lo que ambos dominios C-terminal pueden estar anclados a la membrana externa ⁽⁴⁰⁾. Entonces ya que se sugiere que Cor es una lipoproteína, puede ser que su dominio C-terminal pudiera tener cierta homología al de OmpA y por lo tanto ambos estén anclados a los peptidoglicanos y por ende asociados a la membrana externa. En adición, la proteína OmpA es una de las proteínas más abundantes sobre la membrana externa de *E. coli* ⁽⁴¹⁾, ya que existen aproximadamente 100,000 moléculas por célula, por lo que es importante para la estructura y estabilidad de la membrana externa ^{(42) (43)}. Este argumento fue demostrado por Wang ⁽⁴⁴⁾ al analizar la función estructural de OmpA usando una mutante *ompA*⁻ (E98) y una mutante en el C-terminal (E58), en donde la mutante E58 fue más sensible al SDS (Dodecil sulfato de sodio) que la mutante E98. Por lo tanto aunque Cor se está sobreexpresando no todas las moléculas pudieran estar anclándose a la membrana externa de la mutante *OmpA*⁻. Esta inestabilidad de la OM debida a la falta de OmpA pudiera ser la explicación de la observación difusa de la banda de Cor en el

“pull-down”; mientras que en el resto de la mutantes sí se observó a Cor ya que éstas son *ompA*⁺ y en ellas la membrana externa sería más estable, de tal forma que en éstas las moléculas de Cor quedarían ancladas exitosamente a la membrana.

Finalmente encontramos que es las cantidades de las proteínas OmpA y Cor son importantes para la exclusión del fago mEp167 ya que, sí se complementó la mutante *ompA*⁻ y además está expresando Cor (*ompA*⁺ y *cor*⁺), entonces debería comportarse como la cepa control BW25113; pero no fue así, pues se observaron halos de infección. Esto nos llevó a plantear la posibilidad de que no se estaban produciendo suficientes moléculas de OmpA, de tal forma que fue por eso que se fue aumentando la concentración de IPTG para lograr producir más OmpA, manteniendo constante la concentración Cor usando la arabinosa al 0.05% (esto porque de acuerdo al Western blot (Figura 19), con esta concentración se sobre expresa Cor); sin embargo se observa que conforme se aumentó la IPTG sólo se disminuyó la intensidad del halo de infección aún y cuando se usó 0.5mM de IPTG; cuando lo que esperábamos era observar la inhibición completa del halo de infección. Así que otra vez esto nos lleva a plantear que el número de moléculas de OmpA que se están produciendo aún no son suficientes para la interacción con Cor para que se excluya al fago. Por lo que sí se retoma lo antes mencionado acerca de que OmpA es de las proteínas más abundantes (100, 000 copias por célula), sobre la membrana externa y por ende su función estructural. Entonces la posible explicación es que aunque se está sobrepresando OmpA en la mutante aún no se alcanzaría el número de copias para mantener integra a la membrana y con ello darle estabilidad para que Cor quede anclado a la membrana externa, de tal manera que la membrana continúa en un estado laxo y sólo algunas moléculas de Cor quedarían ancladas permitiendo la entrada del fago.

De acuerdo a los objetivos, resultados y lo ya mencionado, las conclusiones a las que llegamos son las siguientes.

10. Conclusiones

1. La expresión de las proteínas OmpA, OmpC, OmpW, LamB y Slp es necesaria para que Cor excluya al fago mEp167 (FhuA-dependiente).
2. La proteína OmpA es necesaria para identificar la presencia de Cor en la membrana externa de *E. coli*.
3. Se clonó la proteína Cor en un vector inducible con arabinosa compatible con el plásmido (colección ASKA⁻) que complementa a la mutante OmpA.
4. La relación estequiométrica de las proteínas OmpA y Cor sobre la membrana externa es importante para la exclusión del fago mEp167.

11. Conjetura

Con base en la literatura se plantea como perspectiva otra forma en que Cor y OmpA probablemente interaccionan. Pudiera ser a través de TonB, ya que se ha encontrado que el C-terminal de TonB interactúa de manera no específica con otras proteínas de membrana externa independientes de TonB, incluyendo a OmpA ⁽⁴⁵⁾ ⁽⁴⁶⁾. Aunado a esto se ha encontrado que el mismo C-terminal forma un “motif” $\beta\beta\alpha\beta$ que se dimeriza ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁸⁾ y recluta otros polipéptidos dentro de su lámina β ⁽⁴⁹⁾ ⁽⁵⁰⁾, de tal forma que Kaserer et al. (2008), descubrió que la sobreexpresión de polipéptidos en un fondo genético *tonB*⁺, inhibe la captación de sideroforos ⁽⁴⁶⁾. Por lo que cuando Cor se transloca hacia la membrana externa posiblemente pudiera unirse al dímero del C-terminal de TonB y este a su vez estuviera interactuando ya sea con OmpA (TonB-independiente) o con FhuA (TonB-dependiente). Esta posible interacción del C-terminal de TonB con FhuA coincide con lo observado por Uc-Mass et al. (2004), ya que en una mutante *fhuA*⁻ a la cual se le delete la TonB box, las funciones de TonB no se alteraron, por lo que sugirió que TonB y FhuA podían interactuar por medio de otras regiones además de la TonB box ⁽²⁾. Así que esta observación y sugerencia fue demostrada por Kaserer et al. (2008), quien purificó el dominio C-terminal de TonB y realizó ensayos de adsorción en los que este se adsorbió a FepA (TonB dependiente), a OmpA (TonB-independiente) y a una mutante en TonB box de FepA, de tal forma que comprueba que la TonB box no es indispensable para la interacción de TonB con las proteínas de membrana externa ⁽⁴⁶⁾. Por lo que quedaría pendiente realizar experimentos para comprobar si realmente TonB, Cor y OmpA, pueden estar relacionados.

12. Bibliografía

1. Hahn E, Wild P, Hermanns U, Sebbel P, Glockshuber R, Haner M, et al. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *Journal of molecular biology*. 2002 Nov 8;323(5):845-57. PubMed PMID: 12417198. Epub 2002/11/06. eng.
2. Uc-Mass A, Loeza EJ, de la Garza M, Guarneros G, Hernandez-Sanchez J, Kameyama L. An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology*. 2004 Nov 24;329(2):425-33. PubMed PMID: 15518820.
3. Tortora Gerard J. BRFaCLC. *Microbiology: An Introduction*. San Francisco. USA: Pearson Education Inc.; 2004.
4. Chng SS, Ruiz N, Chimalakonda G, Silhavy TJ, Kahne D. Characterization of the two-protein complex in *Escherichia coli* responsible for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010 Mar 23;107(12):5363-8. PubMed PMID: 20203010. Pubmed Central PMCID: PMC2851745. Epub 2010/03/06. eng.
5. Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nature reviews Microbiology*. 2006 Jan;4(1):57-66. PubMed PMID: 16357861. Epub 2005/12/17. eng.
6. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature reviews Microbiology*. 2010 May;8(5):317-27. PubMed PMID: 20348932.
7. Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, et al. Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nature structural biology*. 1999 Jan;6(1):56-63. PubMed PMID: 9886293. Epub 1999/01/14. eng.
8. Burgess NK, Dao TP, Stanley AM, Fleming KG. β -Barrel Proteins That Reside in the *Escherichia coli* Outer. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008 Sep 26;283(39):26748-58. PubMed PMID: 18641391.
9. Leiman PG, Kanamaru S, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003 Nov;60(11):2356-70. PubMed PMID: 14625682. Epub 2003/11/20. eng.
10. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985 Jan;21(1):46-76. PubMed PMID: 3881471.

11. Vollmer W, Holtje JV. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Current opinion in microbiology*. 2001 Dec;4(6):625-33. PubMed PMID: 11731312. Epub 2001/12/04. eng.
12. Nanninga N. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 1998 Mar;62(1):110-29. PubMed PMID: 9529889.
13. Goodsell DS. *Escherichia coli*. *Biochemistry and molecular biology education : a bimonthly publication of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. 2009 Nov;37(6):325-32. PubMed PMID: 21567766. Epub 2009/11/01. eng.
14. Tokuda H. Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2009 Mar 23;73(3):465-73. PubMed PMID: 19270402. Epub 2009/03/10. eng.
15. Fairman JW, Noinaj N, Buchanan SK. The structural biology of beta-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Current opinion in structural biology*. 2011 Aug;21(4):523-31. PubMed PMID: 21719274. Pubmed Central PMCID: 3164749.
16. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologow = The Polish Society of Microbiologists*. 2010;59(3):145-55. PubMed PMID: 21033576. Epub 2010/11/03. eng.
17. Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochimica et biophysica acta*. 2002 Oct 11;1565(2):308-17. PubMed PMID: 12409203. Epub 2002/11/01. eng.
18. Samson JE, Magadan AH, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature reviews Microbiology*. 2013 Oct;11(10):675-87. PubMed PMID: 23979432. Epub 2013/08/28. eng.
19. Ebrahimzadeh W, Rajabibazl M. Bacteriophage vehicles for phage display: biology, mechanism, and application. *Current microbiology*. 2014 Aug;69(2):109-20. PubMed PMID: 24638925. Epub 2014/03/19. eng.
20. Campbell A. Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annual review of microbiology*. 1994;48:193-222. PubMed PMID: 7826005. Epub 1994/01/01. eng.
21. Kameyama L, Fernandez L, Calderon J, Ortiz-Rojas A, Patterson TA. Characterization of wild lambdoid bacteriophages: detection of a wide distribution of phage immunity groups and identification of a nus-dependent, nonlambdoid phage group. *Virology*. 1999 Oct 10;263(1):100-11. PubMed PMID: 10544086. Epub 1999/11/02. eng.
22. De Paepe M, Leclerc M, Tinsley CR, Petit M. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014;4. PubMed PMID: 24734220.
23. Lewin B. *Genes IX*. 9a ed. México: Mc-Graw Hill; 2008.

24. Bertin A, de Frutos M, Letellier L. Bacteriophage-host interactions leading to genome internalization. *Current opinion in microbiology*. 2011 Aug;14(4):492-6. PubMed PMID: 21783404. Epub 2011/07/26. eng.
25. Kozyrev DP, Svarchevskii AN, Zaitsev EN, Rybchin VN. [Lysogenic conversion induced by phages phi 80. I. A description of the phenomenon and the cloning of the conversion gene]. *Genetika*. 1982 Apr;18(4):555-60. PubMed PMID: 7044889. Epub 1982/04/01. Lizogennaia konversiia, vyzyvaemaia fagom phi 80. Soobshchenie I. Opisanie iavleniia i klonirovanie gena konversii. rus.
26. Kozyrev DP, Dzhus MG, Rybchin VN. [Lysogenic conversion induced by phage phi 80. II. Mapping of the cor locus]. *Genetika*. 1983 Jun;19(6):940-4. PubMed PMID: 6576963. Epub 1983/06/01. Lizogennaia konversiia, vyzyvaemaia fagom phi 80. Soobshchenie II. Kartirovanie lokusa cor. rus.
27. Kozyrev DP, Rybchin VN. [Lysogenic conversion caused by phage phi 80. III. The mapping of the conversion gene and additional characterization of the phenomenon]. *Genetika*. 1987 May;23(5):793-801. PubMed PMID: 3040526. Epub 1987/05/01. Lizogennaia konversiia, vyzyvaemaia fagom phi 80. Soobshchenie III. Utochnenie lokalizatsii gena konversii i dopolnitel'naia kharakteristika iavleniia. rus.
28. Matsumoto M, N., Ichikawa, S. Tanaka, T. Morita, and A. Matsushiro. Molecular cloning of Phi80 adsorption-inhibiting cor gene. *Jpn J Genet*. 1985;60(5):475-83.
29. Malinin A, Vostrov AA, Vasil'ev AL, Rybchin VN. [Characteristics of the bacteriophage N15 lysogenic conversion gene and identification of its product]. *Genetika*. 1993 Feb;29(2):257-65. PubMed PMID: 8486255. Epub 1993/02/01. Kharakteristika gena lizogennoi konversii bakteriofaga N15 i identifikatsiia ego produkta. rus.
30. Vostrov AA, Vostrukhina OA, Svarchevsky AN, Rybchin VN. Proteins responsible for lysogenic conversion caused by coliphages N15 and phi80 are highly homologous. *Journal of bacteriology*. 1996 Mar;178(5):1484-6. PubMed PMID: 8631731. Pubmed Central PMCID: PMC177828. Epub 1996/03/01. eng.
31. Kameyama L. <Characterization of wild lamboid Bacteriophage detection.pdf>. *Virology*. 1999;263(1):100-11.
32. Hernandez-Sanchez J, Bautista-Santos A, Fernandez L, Bermudez-Cruz RM, Uc-Mass A, Martinez-Penafiel E, et al. Analysis of some phenotypic traits of feces-borne temperate lambdoid bacteriophages from different immunity groups: a high incidence of cor+, FhuA-dependent phages. *Archives of virology*. 2008;153(7):1271-80. PubMed PMID: 18516490. Epub 2008/06/03. eng.
33. Socorro A-HE. Identificación del dominio funcional de la proteína cor del profago mEp167 de Escherichia coli. In: Zacatenco CU, editor. México2009.

34. Susskind MM, Wright A, Botstein D. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*: II. Genetic evidence for two exclusion systems. *Virology*. 1971 9//;45(3):638-52.
35. Susskind MM, Botstein D, Wright A. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter sieA+ lysogens. *Virology*. 1974 Dec;62(2):350-66. PubMed PMID: 4610992. Epub 1974/12/01. eng.
36. Hofer B, Ruge M, Dreiseikelmann B. The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. *Journal of bacteriology*. 1995 Jun;177(11):3080-6. PubMed PMID: 7768804. Pubmed Central PMCID: PMC176996. Epub 1995/06/01. eng.
37. Decker K, Krauel V, Meesmann A, Heller KJ. Lytic conversion of *Escherichia coli* by bacteriophage T5: blocking of the FhuA receptor protein by a lipoprotein expressed early during infection. *Molecular microbiology*. 1994 Apr;12(2):321-32. PubMed PMID: 8057856. Epub 1994/04/01. eng.
38. De Mot R, Vanderleyden J. The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram-positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan. *Molecular microbiology*. 1994 Apr;12(2):333-4. PubMed PMID: 8057857. Epub 1994/04/01. eng.
39. Koebnik R. Proposal for a peptidoglycan-associating alpha-helical motif in the C-terminal regions of some bacterial cell-surface proteins. *Molecular microbiology*. 1995 Jun;16(6):1269-70. PubMed PMID: 8577259. Epub 1995/06/01. eng.
40. Bouveret E, Benedetti H, Rigal A, Loret E, Lazdunski C. In vitro characterization of peptidoglycan-associated lipoprotein (PAL)-peptidoglycan and PAL-TolB interactions. *Journal of bacteriology*. 1999 Oct;181(20):6306-11. PubMed PMID: 10515919. Pubmed Central PMCID: PMC103764. Epub 1999/10/09. eng.
41. Chai T-j, Foulds J. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 1977 7/22;493(1):210-5.
42. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology*. 2000 Jul;37(2):239-53. PubMed PMID: 10931321. Epub 2000/08/10. eng.
43. Smith SG, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters*. 2007 Aug;273(1):1-11. PubMed PMID: 17559395. Epub 2007/06/15. eng.
44. Wang Y. The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Mar 29;292(2):396-401. PubMed PMID: 11906175. Epub 2002/03/22. eng.

45. Higgs PI, Letain TE, Merriam KK, Burke NS, Park H, Kang C, et al. TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2002 Mar;184(6):1640-8. PubMed PMID: 11872715. Pubmed Central PMCID: PMC134908. Epub 2002/03/02. eng.
46. Kaserer WA, Jiang X, Xiao Q, Scott DC, Bauler M, Copeland D, et al. Insight from TonB hybrid proteins into the mechanism of iron transport through the outer membrane. *Journal of bacteriology*. 2008 Jun;190(11):4001-16. PubMed PMID: 18390658. Pubmed Central PMCID: PMC2395051. Epub 2008/04/09. eng.
47. Chang C, Mooser A, Pluckthun A, Wlodawer A. Crystal structure of the dimeric C-terminal domain of TonB reveals a novel fold. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul 20;276(29):27535-40. PubMed PMID: 11328822. Epub 2001/05/01. eng.
48. Kodding J, Killig F, Polzer P, Howard SP, Diederichs K, Welte W. Crystal structure of a 92-residue C-terminal fragment of TonB from *Escherichia coli* reveals significant conformational changes compared to structures of smaller TonB fragments. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005 Jan 28;280(4):3022-8. PubMed PMID: 15522863. Epub 2004/11/04. eng.
49. Pawelek PD, Croteau N, Ng-Thow-Hing C, Khursigara CM, Moiseeva N, Allaire M, et al. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1399-402. PubMed PMID: 16741125. Epub 2006/06/03. eng.
50. Shultis DD, Purdy MD, Banchs CN, Wiener MC. Outer membrane active transport: structure of the BtuB:TonB complex. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1396-9. PubMed PMID: 16741124. Epub 2006/06/03. eng.
51. Bachmann BJ. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*. 1972;36(4):525-57. PubMed PMID: PMC408331.
52. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Jun 6;97(12):6640-5. PubMed PMID: 10829079. Pubmed Central PMCID: PMC18686. Epub 2000/06/01. eng.
53. Appleyard RK. Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from *Escherichia Coli* K12. *Genetics*. 1954 11/22/received;39(4):440-52. PubMed PMID: PMC1209664.
54. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*. 2006;2:2006 0008. PubMed PMID: 16738554. Pubmed Central PMCID: PMC1681482. Epub 2006/06/02. eng.

55. Matsushiro A. Specialized transduction of tryptophan markers in *Escherichia coli* K12 by bacteriophage ϕ 80. *Virology*. 1963 4//;19(4):475-82.
56. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *Journal of bacteriology*. 1995 Jul;177(14):4121-30. PubMed PMID: 7608087. Pubmed Central PMCID: PMC177145. Epub 1995/07/01. eng.
57. Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, et al. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2005;12(5):291-9. PubMed PMID: 16769691. Epub 2006/06/14. eng.

ANEXO 1.

Cepas, bacteriófagos y plásmidos.

Tabla 3. Cepas de *E. coli* K-12, bacteriófagos y plásmidos

Cepas, bacteriófagos y plásmidos	Genotipo o marcador relevante	Referencia
Cepas		
W3110	F ⁻ λ ⁻ rph ⁻	(51)
BW25113	<i>rrnB3</i> , Δ <i>lacZ4787</i> , <i>hsdR514</i> Δ(<i>araBAD</i>)567, Δ(<i>rhaBAD</i>)568, <i>rph-1</i>	(52)
C600	<i>leuB6 thi-1 lacY1 supE44</i> <i>thr-1 rfbD1 fhuA21</i>	(53)
BW25113 <i>ompC</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>ompC768</i> :: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(54)
BW25113 <i>fhuA</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>fhuA766</i> :: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(54)
BW25113 <i>fhuC</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>fhuC767</i> :: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(54)
BW25113 <i>fhuD</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>fhuD768</i> :: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(54)
BW25113 <i>fhuE</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ(<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (:: <i>rrnB-3</i>), λ ⁻ , Δ <i>fhuE764</i> :: <i>kan</i> , <i>rph-1</i> , Δ(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	(54)

Determinación de la interacción de la proteína Cor del fago mEp167

con posibles receptores de membrana externa de *Escherichia coli*.

BW25113 <i>fhuB</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>fhuB</i> 769:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>tolB</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>tolB</i> 789:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>btuB</i> ::Tn10		(54)
BW25113 <i>ompW</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>ompW</i> 764:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>ompF</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>ompF</i> 746:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>lamB</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>lamB</i> 732:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>ompA</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>ompA</i> 772:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
BW25113 <i>slp</i> ::Tn10	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), λ ⁻ , Δ <i>slp</i> 761:: <i>kan</i> , <i>rph</i> -1, Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR</i> 514	(54)
Bacteriófagos		
λ	<i>imm</i> λ	CSH Collection
Φ 80	<i>imm</i> Φ 80	(55)
mEp167	<i>imm</i> _{VI} <i>cor</i> _{mEp167}	(21)
mEp332	<i>imm</i> _{XVIII} (λ)	(21)

Determinación de la interacción de la proteína Cor del fago mEp167

con posibles receptores de membrana externa de *Escherichia coli*.

Plásmidos		
pPHCCor	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167}</i>	Arguijo-Hernández., 2010.
pBAD28	<i>bla rrnB pBAD</i>	(56)
pBAD28_cor	<i>bla rrnB pBAD cor_{mEp167}</i>	En este trabajo.
pOmpA	<i>cat lacI^Q pT5-lac</i>	(57)

Oligonucleótidos.

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la Amplificación de <i>cor</i> a partir de pPHCCor
Sentido_ <i>NheI</i> 5' CTA GCT AGC TAG CAC ACA GGA AAC AGA CC 3'
Antisentido_ <i>HindIII</i> 5' CAA AGC TTT TAT TTA CAT GTC GTG CTT GTG 3'

ANEXO 2.

Medios de Cultivo.

Medios Líquidos

1. Medio Luria Bertani (LB).

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi.

10g de Triptona
5g de Extracto de levadura
5g de Cloruro de sodio (NaCl)
1L de Agua destilada

2. Medio Super Optimal Broth (SOB).

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L, e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi, se dejó temperar aproximadamente a 40°C y se adicionaron las soluciones de KCl y MgSO₄ y se mezcló.

20g de Triptona
5g de Extracto de levadura
0.5g de Cloruro de sodio (NaCl)
2.5mL de Cloruro de potasio (KCl) al 1M; estéril.
10mL de Sulfato de magnesio (MgSO₄) al 1M; estéril.
1L de Agua destilada

3. Medio TΦ suave.

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi, se dejó temperar aproximadamente a 40°C y se adicionaron las soluciones de NaOH y MgSO₄ y se mezcló.

10g de Triptona
2.5g de Cloruro de sodio (NaCl)
2mL de Hidróxido de sodio (NaOH) al 2M; estéril.
10mL de Sulfato de magnesio MgSO₄ al 1M; estéril.

4. Medio Super Broth (SB).

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi.

32g de Peptona
20g de Extracto de levadura
5g de Cloruro de sodio (NaCl)
1L de Agua destilada

Medios sólidos

1. Cajas con medio LB

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una

presión de 15 Psi, se dejó temperar aproximadamente a 45°C y se vaciaron 30mL en cada caja Petri.

10g de Triptona
5g de Extracto de levadura
5g de Cloruro de sodio (NaCl)
15g de Agar
1L de Agua destilada

2. Cajas con medio LB más antibiótico.

Las cajas se prepararon de la misma forma que la ya mencionada y los antibióticos se agregaron una vez que el medio se tempero. Las concentraciones finales de los antibióticos usados en 1L de medio, se muestran abajo.

Antibiótico	Concentración del stock	Volumen del stock	Concentración final
Ampicilina	100mg/mL	1mL	100µg/mL
Kanamicina	50mg/mL	1mL	50µg/mL
Cloranfenicol	34mg/mL	900µL	10µg/mL

3. Cajas de medio TΦ suave.

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L e inmediatamente se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi, se dejó temperar aproximadamente a 40°C y se adicionó la solución de NaOH, se mezcló y se vaciaron 30mL de cada caja Petri.

10g de Triptona
2.5g de Cloruro de sodio (NaCl)
10g de Agar
2mL de Hidróxido de sodio (NaOH) al 2M; estéril.
1L de Agua destilada

4. Frascos con medio Nutrient Broth (stabs).

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L, se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi, se dejó temperar aproximadamente a 40°C y se depositaron aproximadamente 3mL cada frasco.

10g de Nutrient Broth
8g de Cloruro de sodio (NaCl)
6g de Agar
1L de Agua destilada

Soluciones

1. Buffer TMG (Tris-base, Magnesio, Gelatina) pH 7.4

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó el agua destilada ~300mL, se agitó hasta disolución total y se llevó al volumen final de 1L, después se adicionaron las soluciones de Tris-HCl y MgSO₄ y se ajustó el pH a 7.4 con KOH. Posteriormente se vaciaron 100mL en botellas con tapa de baquelita y se esterizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos y una presión de 15 Psi.

11.7g de Cloruro de sodio (NaCl)
1g de Gelatina
1mL de Tris-HCl al 1M pH 8.0; estéril.
0.5mL de Sulfato de magnesio MgSO₄ al 1M; estéril.
1L de Agua destilada

2. Buffer para electroforesis Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X.

Se pesó el Tris y se colocó en un vaso de precipitados de 1L se agregó 500mL de agua destilada, se disolvió y se agregó el ácido acético, se mezcló y se adicionó la solución de EDTA pH 8.0. De esta solución se tomaron 20mL y se llevó a un volumen final de 1L para obtener una concentración final de 1X para la electroforesis.

242g de Tris-base
57.1mL de Ácido acético glacial
100mL de EDTA al 5M pH 8.0

3. Solución Acrilamida/Bisacrilamida 29:1.

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un vaso de precipitados de 500mL y se le agregó el agua destilada ~50mL, se agitó hasta disolución y se llevó al volumen final de 100mL, después se filtró aplicando vacío.

29g de Acrilamida
1g de Bisacrilamida
100mL de Agua desionizada (MilliQ)

4. Buffer Tris-HCl/SDS PAGE.

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un vaso de precipitados de 500mL y se le agregó el agua destilada ~50mL, se agitó hasta disolución y se llevó al volumen final de 100mL y se almacenó en una botella con tapa de baquelita.

36.4g de Tris-HCl
0.3g de SDS
100mL de Agua desionizada (MilliQ)

5. Buffer para SDS-PAGE ánodo.

Se pesó 12.1g de Tris-base, se colocó en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 800mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y ajustó el pH a 8.9 con HCl, se llevó al volumen final de 1L y se almacenó en frasco de 1L.

6. Buffer para SDS-PAGE cátodo.

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 800mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y se ajustó el pH a 8.2 con KOH, se llevó al volumen final de 1L y se almacenó en un frasco de 1L.

12.1g de Tris-base
17.1g de Tricina
1.0g de SDS
1L de Agua destilada

7. Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X

Se pesaron cada uno de los siguientes reactivos (ver abajo), después se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 800mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y se ajustó el pH a 7.4, se llevó al volumen final de 1L y se almacenó en un frasco de 1L.

8.06g de NaCl
0.22g de KCl
1.15g de Na₂HPO₄

0.20g de KH_2PO_4

1L de Agua MilliQ

8. Buffer NTI-10-G

Se pesaron el Tris-base, NaCl y el Imidazol y se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 500mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y se ajustó el pH a 7.5 con HCl, después se agregó la Azida de sodio y el glicerol, se mezcló y se llevó al volumen final de 1L. Posteriormente se filtró aplicando vacío y se almacenó en un frasco de 1L.

2.5g de Tris-base

29.2g de NaCl

0.7g de Imidazol

0.4g de Azida de sodio

126g de Glicerol

1L de Agua desionizada (MilliQ)

9. Buffer NTI-25-G

Se pesaron el Tris-base, NaCl y el Imidazol y se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 500mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y se ajustó el pH a 7.5 con HCl, después se agregó la Azida de sodio y el glicerol, se mezcló y se llevó al volumen final de 1L. Posteriormente se filtró aplicando vacío y se almacenó en un frasco de 1L.

2.5g de Tris-base

29.2g de NaCl

1.7g de Imidazol

0.4g de Azida de sodio

126g de Glicerol

1L de Agua desionizada (MilliQ)

10. Buffer NTI-500-G

Se pesaron el Tris-base, NaCl y el Imidazol y se colocaron en un vaso de precipitados de 1L y se le agregó 500mL de agua destilada, se agitó hasta disolución total y se ajustó el pH a 7.5 con HCl, después se agregó la Azida de sodio y el glicerol y se llevó al volumen final de 1L. Posteriormente se filtró aplicando vacío y se almacenó en un frasco de 1L.

2.5g de Tris-base

29.2g de NaCl

34.0g de Imidazol

0.4g de Azida de sodio

126g de Glicerol

1L de Agua desionizada (MilliQ)