



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Clonación y sobreexpresión de regiones codificantes de transcripción
temprana del fago PaMx41.”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. IRAIS RAMÍREZ SÁNCHEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la tesis: Dr. Gabriel Guarneros Peña

Ciudad de México

Agosto, 2016

ASESORES

Dra. Rosa Ma. del Refugio Bermúdez Cruz

Departamento de Genética y Biología Molecular

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular

Dr. Jaime Ortega López

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular a cargo del Dr. Gabriel Guarneros Peña, en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Zacatenco.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de septiembre de 2014 a agosto de 2016 (CVU: 625007).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña, por aceptarme en su equipo de trabajo, y por todas las preguntas, observaciones y consejos, que enriquecen día con día mi conocimiento.

A mis asesores, la Dra. Rosa Ma. Bermúdez, al Dr. Luis Y. Kameyama y al Dr. Jaime Ortega, por los consejos, sugerencias y el tiempo que le han dedicado a este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres, por el apoyo que siempre me han brindado.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, (Enith, Paco, Ricardo, Sandy, Lupita, Rodo, Marco C., Anita, Yuri, Nelby, Elisa, Rox y Gera) que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

A mis mejores amigos, Yess, Aza, y Lalo, que siempre me han acompañado y ayudado cuando más los necesito.

A los investigadores auxiliares del laboratorio: el M. en C. Marco Magos C., la Dr. Eva Jacinto L. y el Dr. José Bueno, por ayudarme en la parte técnica de éste proyecto.

A Flor y a Gaby porque son personas que aman su trabajo y siempre se muestran amables y dispuestas ayudar en lo posible.

DEDICATORIAS

A mis papás, porque siempre serán mi ejemplo de vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ANEXOS.....	III
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Fagos líticos de <i>P. aeruginosa</i>	8
III. JUSTIFICACIÓN	11
IV. HIPÓTESIS.....	12
V. OBJETIVOS.....	13
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 MATERIAL.....	14
6.1.1 Cepas bacterianas	14
6.1.2 Bacteriófagos	14
6.1.3 Plásmidos	14
6.1.4 Oligonucleótidos	15
6.2 MÉTODOS	15
6.2.1 Tapiz bacteriano.....	15
6.2.2 Propagación del fago.....	15
6.2.3 Obtención del título del fago.....	16
6.2.4 Extracción de DNA fágico	17
6.2.5 Extracción de plásmido.	18
6.2.6 Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i>	18
6.2.7 Transformación química en <i>E. coli</i>	19
6.2.8 Geles de agarosa y electroforesis.	19
6.2.9 Purificación de bandas de gel de agarosa.	20

6.2.10	Diseño de <i>primers</i>	20
6.2.11	Amplificación por PCR del ORF2 y el ORF3	21
6.2.12	Clonación del ORF2 y ORF3 en pJET1.2/blunt.	22
6.2.13	Clonación del ORF2 en el vector de expresión pPROEX-1	23
6.2.14	Secuenciación de DNA.	25
6.2.15	Curva de crecimiento bacteriano	27
6.2.16	Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas.....	27
6.2.17	Cultivo bacteriano.....	27
6.2.18	Lisis celular.....	28
6.2.19	Clarificado del extracto celular.	28
6.2.20	Purificación en columnas de Níquel.	28
6.2.21	SDS-PAGE.....	29
6.2.22	Tinción con Coomassie.....	30
6.2.23	Tinción con Nitrato de Plata.....	30
6.2.24	Western blot.	31
VII.	RESULTADOS	33
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
IX.	CONCLUSIONES.....	52
X.	PERSPECTIVAS.....	53
XI.	REFERENCIAS.....	54
XII.	ANEXOS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos de infección de los fagos.....	2
Figura 2. Patrón de transcripción y elementos reguladores de PaMx41.....	9
Figura 3. Temporalidad de la infección de la región temprana de los genes de PaMx41..	10
Figura 4. Dispositivo de transferencia.....	31
Figura 5. Caracterización del fago PaMx41. .	33
Figura 6. Mapa pJET1.2/blunt.....	34
Figura 7. Estandarización de PCR para clonar en pJET1.2/blunt.	35
Figura 8. Análisis de candidatas pJET1.2_ORF3pproex mediante PCR de colonia	36
Figura 9. Clonación pJET1.2_ORF3pproex.	37
Figura 10. Mecanismo de inducción de la expresión de proteínas en vectores regulados por el promtor T7 en BL21Star.	38
Figura 11. Curvas de crecimiento de las construcciones en BL21Star.	39
Figura 12. Análisis de colonias candidatas mediante PCR.	40
Figura 13. Secuencia de la construcción pJET1.2_ORF3pproex.	40
Figura 14. Vector pPROEX-1.....	41
Figura 15. Clonación del ORF2 en pPROEX-1.	42
Figura 16. Análisis de la candidata 8 para pPROEX_ORF2.....	43
Figura 17. Curva de crecimiento de la construcción pPROEX_ORF2.	44
Figura 18. Sobreexpresión del ORF2_6xHis.....	45
Figura 19. Purificación de la proteína ORF2_6xHis.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos.	15
Tabla 2. Secuencia de los oligos diseñados.	21
Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación de los ORF's 2 y 3 de PaMx41.	22
Tabla 4. Condiciones de la reacción de ligación con pJET1.2/blunt.....	22
Tabla 5. Condiciones de la PCR para clonar en pPROEX-1	24
Tabla 6. Condiciones de la reacción de restricción con SacI.	24
Tabla 7. Condiciones de la reacción de restricción con BamHI.....	25
Tabla 8. Condiciones de ligación.	25
Tabla 9. Condiciones de la reacción de secuenciación	26
Tabla 10. Condiciones para el gel de acrilamida.....	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Medios y soluciones.	56
Anexo 2. Electroferogramas de la construcción pJETORF3pproex.....	59
Anexo 3. Electroferogramas de la construcción pJETORF2pproex.....	60
Anexo 4. Electroferogramas de la construcción pPROEXORF2.....	61

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina sérica bovina
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
D.O.	Densidad óptica
DNAP	DNAPolimerasa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
SMC	Sitio múltiple de clonación
Ni-NTA	Níquel-ácido nitrilo acético
ORF	Marco de lectura abierta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPIs	Interacciones proteína-proteína
Pth	Peptidil-tRNA hidrolasa
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RBS	Sitio de unión a ribosoma
RNAP	RNAPolimerasa
pb	Pares de bases
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
UFP	Unidades formadoras de placa

RESUMEN

Un reto importante en la era post-genómica en la investigación de los bacteriófagos, es el estudio funcional de las cantidades crecientes de los genes hipotéticos, abundantes en los genomas de fagos recientemente secuenciados. Los genes que se expresan en los primeros minutos de la infección por fagos, están asociadas con el secuestro de la maquinaria molecular del hospedero, para crear el entorno adecuado para la propagación del fago. Estos genes se encuentran entre los menos conservados en fagos, ya que por lo general, no tienen homología en bases de datos. El podofago PaMx41 se ha estudiado en nuestro grupo a nivel genómico y transcripcional. Interesantemente, el genoma de éste bacteriófago se caracteriza por presentar secuencias repetidas en sus extremos, y los cuatro ORF's identificados como tempranos se localizan dentro de ésta región de redundancia terminal. Estos ORFs, carecen de homología a nivel nucleotídico, aminoacídico y estructural, con cualquier otra proteína ya caracterizada. Los ORF's 2 y 3 son dos de los primeros ORFs cuyos mRNAs se observan transitoriamente durante los primeros 15 minutos de la infección, a diferencia de la mayoría de los mRNAs del fago, presentes a partir de los primeros 15 y hasta el final de la infección.

Con el fin de investigar la función de estos dos ORF's, se intentó clonar en el vector de expresión pPROEX-1, que añade un 6xHis-*tag* a la proteína esperada. La sobreexpresión de ORF2 no tuvo efecto sobre el crecimiento de *E. coli*, la expresión heteróloga de la proteína recombinante se observó por SDS-PAGE y *Western blot*. Sin embargo, no fue posible clonar el ORF3 en pPROEX-1, probablemente por un efecto tóxico putativo en *E. coli*.

ABSTRACT

An important challenge in the post-genomic era in bacteriophages research is the functional study of the increasing amounts of hypothetical genes that are abundant in newly sequenced genomes of phages. Genes expressed at early times of phage infection are associated with hijacking the host molecular machinery to create the right environment for the phage propagation. These genes are among the less conserved in phages as they usually have no match in data bases. The podophage PaMx41 has been studied in our group at the genomic and transcriptional level. Interestingly, the genome of this bacteriophage contains terminal repeats, and the four ORF's identified as early are inside this region of terminal redundancy. The early ORFs lack homology, at the nucleotide, amino acid and structural levels, to any other characterised protein. ORF2 and ORF3 are two of the early ORFs whose mRNA was observed transiently during the first 15 minutes of infection, unlike most of the phage mRNAs present from 15 minutes-on and remained until the end of infection.

In order to investigate the function of these two ORF's, we attempted to clone them in the expression vector pPROEX-1, which adds a 6xHis-tag to the expected protein. Overexpression of ORF2 had no effect on the growth of *E. coli*, the heterologous expression of the recombinant protein was observed by SDS-PAGE and Western blot and was purified on Ni-Agarose columns. Unfortunately, we weren't able to clone the ORF3 in pPROEX-1, probably for a putative toxic effect in *E. coli*.

I. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos (fagos) son virus, parásitos intracelulares obligados, que infectan a las bacterias, y no pueden multiplicarse sin determinadas funciones biosintéticas, las cuales son provistas por las células hospederas (Ainsworth, et al., 2013). Cada bacteriófago consiste en una molécula de ADN o ARN de cadena sencilla o doble, encapsulada dentro de una capa proteica o lipoproteica (Ceyssens, 2010).

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes en la tierra, y se ha estimado que el número de fagos es mucho mayor que el de las bacterias hospederas, aproximadamente 10 veces más. Sin embargo, ambas poblaciones, bacterias hospederas y su predador, coexisten en el medio ambiente gracias a una constante coevolución que permite mantener ambas poblaciones en un aparente equilibrio (Samson, et al., 2013).

Los fagos pueden tener un ciclo de infección lisogénico o lítico, para infectar a la bacteria hospedera. En el primer paso, la adsorción, el fago interactúa con receptores de la envoltura celular, para posteriormente inyectar su genoma, la estrategia de replicación subsiguiente depende de si el fago es virulento o temperado.

Los fagos temperados pueden entrar, ya sea al ciclo lítico o formar un estado de asociación estable con la bacteria hospedera, denominado lisogenia, durante la cual el genoma viral es denominado profago, y se replica conforme lo hace el DNA de la bacteria, el profago se encuentra, ya sea en un estado libre o *plasmid-like*, o integrado en el cromosoma bacteriano. Bajo condiciones de estrés los profagos pueden salir del estado de lisógena y producir más viriones, normalmente la liberación de la progenie del fago resulta en la muerte celular por lisis (Salmond & Fineran, 2015).

A diferencia de los fagos temperados, los virulentos sólo pueden replicarse mediante el ciclo lítico, el cual involucra varios procesos cruciales que se desarrollan de una forma ordenada:

1. Adsorción. El fago se adhiere a la célula hospedera, en un proceso altamente específico que involucra receptores complementarios entre la superficie de una célula bacteriana susceptible y un virus infectante.
2. Inyección del ADN. El ADN de los fagos líticos se transfiere a la célula usualmente después de la degradación del peptidoglicano y la formación del poro en la pared de la célula bacteriana.
3. Replicación, transcripción y traducción del genoma del fago.
4. Redireccionamiento del metabolismo de la célula hospedera hacia el del fago. Después de que el ADN ha llegado al citoplasma bacteriano, la expresión de los genes del fago hacen que la maquinaria de síntesis de la célula se encargue de la replicación de los ácidos nucleicos virales.
5. Ensamble y empaquetamiento de las partículas virales
6. Lisis de la célula bacteriana y liberación de la progenie del fago. Las proteínas tardías del fago como las lisinas, holinas o los inhibidores de la síntesis de mureína son responsables de la lisis de la célula hospedera y la liberación de los viriones al medio (Drulis-Kawa, et al., 2012).

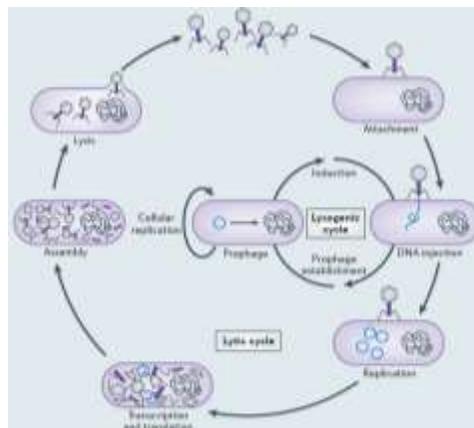


Figura 1. Ciclos de infección de los fagos (Salmond & Fineran, 2015).

A nivel molecular, el ciclo lítico es una serie de interacciones entre componentes bacterianos y virales. Conocer dichas interacciones es de interés por diversas razones. Por ejemplo, en la industria alimenticia y biotecnológica, se requiere de poblaciones bacterias resistentes a fagos con el fin de maximizar el rendimiento y calidad de los productos biotecnológicos. Por otra parte, el renovado interés en la terapia fágica y el uso de los fagos como agentes de biocontrol requiere de un mejor entendimiento de la co-evolución fago-bacteria con el fin de predecir y por lo tanto limitar la selección no deseada de bacterias fagoresistentes. De igual importancia es la investigación de estas interacciones para entender el impacto que tiene en el ambiente, ya que los fagos tiene roles cruciales en los procesos ambientales, como en las comunidades microbianas involucradas en los ciclos biogeoquímicos (Samson, et al., 2013).

Una herramienta clave para elucidar la función de proteínas individuales, es la búsqueda de interacciones proteína-proteína, ya que su función biológica es el resultado de estas asociaciones. Gracias al desarrollo de la proteómica, el etiquetado de proteínas y el análisis espectrometría de masas se han convertido en el método de elección para el estudio de interacciones. El uso combinado de dichas técnicas ha permitido determinar redes de interacciones de proteínas en organismos completos (Van den Bossche, et al., 2014).

II. ANTECEDENTES

Un reto importante en la investigación de bacteriófagos en la era post-genómica, es el estudio funcional de las crecientes cantidades de genes hipotéticos que están presentes, de manera abundante, en los genomas de fagos secuenciados. Un excelente ejemplo de genes que no tienen una función asignada son, los poco conservados, genes de expresión temprana de los fagos líticos (Van den Bossche, et al., 2014).

Los bacteriófagos líticos dependen del metabolismo bacteriano para su replicación, por lo que inmediatamente después de la infección, los fagos secuestran la maquinaria molecular de la bacteria para crear las condiciones adecuadas para su propagación. Para la gran mayoría de los fagos, no es totalmente conocido cuales son las funciones bacterianas que se inhiben y cuales son usadas (Wagemans, et al., 2014).

Como en todos los organismos, las interacciones proteína-proteína (PPIs) juegan un papel fundamental en la biología del fago. Las PPIs son importantes en todos los procesos víricos, incluidos la infección del huésped, la regulación de la transcripción, la replicación del ADN, el ensamble del virión y la lisis (Haüser, et al., 2012).

Sin embargo, resaltan dos problemas principales, el primero es que la mayoría de las proteínas codificadas en el fago permanecen sin ser caracterizadas y no muestran homología con otras proteínas en bases de datos, evitando que se pueda predecir su función y sus blancos bacterianos *in silico*. Segundo, frecuentemente no es posible saber claramente cual parte del genoma del fago está involucrada durante la etapa temprana para secuestrar la maquinaria de la bacteria, por lo que los patrones de expresión temporales no pueden ser totalmente deducidos a partir de la secuencia genómica del fago por sí sola (Wagemans, et al., 2014).

Algunas proteínas tempranas, han sido estudiadas y se ha comprobado que participan en la inhibición, activación o redireccionamiento de los procesos intracelulares de la célula hospedera para poder generar la progenie del fago. Sin embargo, el conocimiento actual que se tiene del impacto de la infección del fago en la fisiología de la bacteria está limitada a un número selecto de fagos.

Principalmente, se han estudiado las interacciones de fagos de *E. coli* (Lavigne, et al., 2013). Por ejemplo, la participación de la proteína Alc del fago T4 en el apagado de la transcripción de *E. coli* después de haberla infectado, esta proteína funciona como un factor de terminación sitio específico, que genera un cese de la elongación y paros temporales de la RNA Polimerasa (Kashlev, et al., 1993). Además, la proteína AsiA de mismo fago, es un factor anti- σ^{70} , de la cual se conoce tiene un efecto inhibitorio en el inicio de la transcripción por la RNA Polimerasa de *E. coli* (Orsini, et al., 2013). Otra proteína es la Gp2 del fago T7, que se une a la subunidad β' de la RNA Polimerasa de *E. coli* e inhibe la transcripción, esta proteína se une a la holoenzima de la σ^{70} , ocasionando que no pueda reconocer a los promotores (Nechaev & Severinov, 1999).

Los fagos de *E. coli* fueron de gran relevancia en el desarrollo de la biología molecular, por lo cual mucha información sobre fagos está asociada a este grupo. Actualmente, ha surgido el interés en otros grupos de fagos, especialmente aquellos que infectan bacterias patógenas.

Un grupo importante de patógenos de interés clínico, son aquellas bacterias responsables de infecciones nosocomiales, entre estas, *Staphylococcus aureus*, es causante de infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos de la cual se han aislado clones multiresistentes a antibióticos. Por tal motivo, *Lui et al.* buscaron e identificaron 31 polipéptidos de origen fágico que inhiben el crecimiento de *S. aureus*, y cuyos blancos en

la célula hospedera están involucrados en las maquinarias de replicación y transcripción de la bacteria. Entre estos se describió la interacción de la proteína Gp104 del fago 77, con la Dnal, proteína involucrada en la replicación del ADN de *S. aureus* (Liu, et al., 2004).

Pseudomonas aeruginosa es otro de los patógenos oportunistas más comunes, que causan infecciones respiratorias en pacientes hospitalizados, así como, otras infecciones nosocomiales y además estas bacterias son capaces de resistir múltiples antibióticos. A pesar de esto, hasta ahora, no existen estudios que describan las interacciones proteicas para esta bacteria, permaneciendo un tanto desconocido. Sin embargo, si se han estudiado algunas interacciones entre proteínas virales y bacterianas, así como el efecto que éstas tienen en el crecimiento de su hospedero.

Wagemans, et al. determinaron sistemáticamente la habilidad individual de ORFs de fagos N4-like que infectan *Pseudomonas aeruginosa*, para inhibir el crecimiento de la bacteria hospedera. Basándose en genes de expresión temprana, investigaron los eventos moleculares que generaban este efecto negativo de las proteínas inhibitorias encontradas, mediante ensayos de interacción proteína-proteína, como doble híbrido y ensayos de *Pull-Down*, por los cuales fueron identificadas varias proteínas del fago que interactúan con componentes de la maquinaria de replicación, transcripción y metabolismo de la bacteria. Entre las cuales están la proteína gp8 del fago y la RibB, esta última es una enzima involucrada en el metabolismo de las riboflavinas, que tienen un impacto en el estrés oxidativo. Otro hallazgo es el de la interacción entre gp7 y el regulador transcripcional bacteriano PAO120. También describieron las interacciones entre la proteína fágica gp18 y PAO657, una probable ATPasa de la bacteria; y la interacción entre gp30 y PA4114, una de spermidin acetiltransferasa (Wagemans, et al., 2014).

En otro estudio similar, pero con un grupo de fagos pertenecientes a 3 familias diferentes (*Myoviridae*, *Pdoviridae* y *Siphoviridae*), y por ende una mayor cantidad de proteínas; haciendo uso de AP-MS (Purificación por afinidad acoplado a espectrometría de masa) y analizando la composición de algunos complejos bacterianos, en las etapas tempranas del ciclo infeccioso del fago; los autores encontraron 37 proteínas de fagos no relacionados entre sí, pero que infectan a *P. aeruginosa*, con lo que aportaron información novedosa acerca de las interacciones proteicas. Entre los hallazgos que resaltan son la identificación de 5 proteínas de fagos diferentes, que interactúan con la RNA Polimerasa, entre ellas 2 proteínas son de fagos que no codifican una RNAP viral (Van den Bossche, et al., 2014).

Recientemente, Wagemans et al., se dedicaron a investigar el posible efecto inhibitorio de 13 genes de expresión temprana del fago LUZ24, encontrando, que sólo 4 de estos ORF's, podían inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*, sin embargo, ninguna de éstas tenía el mismo efecto tóxico en *E.coli*. Posteriormente analizaron las interacciones proteicas de éstos 4 ORF's, con las proteínas bacterianas, y encontraron que gp4 interactúa con el regulador transcripcional MvaT, molécula que permite el silenciamiento de genes de DNA foráneo, por lo que gp4 estaría funcionando como una proteína inhibitoria de MvaT (Mip), y esto le daría al fago LUZ24 una ventaja, ya que una vez que inyecte su DNA, gp4 evitaría que MvaT bloqueara el DNA del fago, y así permitir la transcripción del genoma del fago (Wagemans, et al., 2015).

Una conclusión interesante de estos estudios es el hecho de que algunas interacciones son conservadas entre diferentes fagos, por ejemplo con la RNAP y la DNAP; pero otras son relativamente específicas de cada fago. Avalando la observación de que la enorme población y antigüedad de los fagos ha permitido el desarrollo de numerosas y variables estrategias para llevar a cabo una función, infectar y usar las bacterias como una fábrica de nuevas partículas virales.

2.1 Fagos líticos de *P. aeruginosa*

Los fagos líticos que infectan a *P. aeruginosa* han sido estudiados por un largo periodo de tiempo, y de acuerdo a la clasificación actual del ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) se pueden distinguir 6 géneros de fagos líticos no relacionados en secuencia ni en contenido de genes. La diversidad que existe entre los genomas de fagos es un indicativo de que cada fago usa estrategias substancialmente diferente para tomar el control de la célula hospedera y depende de diversas funciones celulares para completar su ciclo lítico. Sin embargo, casi ninguno de los genes tempranos que expresan están conservados o tienen una función conocida; y es posible deducir que una parte de las proteínas aún no caracterizadas, estén involucradas en la interacción bacteria-fago, y se encarguen de reorientar las rutas metabólicas de *Pseudomonas aeruginosa* (Van den Bossche, et al., 2014).

Recientemente el grupo de trabajo reportó una colección de 12 grupos de fagos distintos, y sus patrones de infección fueron probados en aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Algunos de los grupos identificados tienen la característica de ser muy numerosos, mientras que otros solo representan uno o dos aislados. También se observó que el rango de hospedero varía entre cada grupo, algunos presentan rangos amplios, mientras que otros solo pueden infectar pocas cepas.

El grupo más numeroso pertenece a la familia *Podoviridae*, morfotipo C1 (Sepúlveda-Robles, et al., 2012). Este grupo de fagos se define por tener rangos de hospederos muy amplios, razón por la cual su caracterización es relevante, sin embargo el análisis bioinformático no ha permitido asignar funciones a todos los genes, por lo que es necesario llevar a cabo las estrategias moleculares que lo permitan.

De este grupo de fagos ha sido determinada la secuencia genómica de algunos de ellos, lo que ha permitido observar una gran similitud entre los pertenecientes a este grupo, además de que el análisis bioinformático de las secuencias ha permitido asignar funciones putativas a algunos de los ORFs, a partir de la búsqueda de similitud con bases de datos.

El fago PaMx41, pertenece a este grupo de podofagos, y ha sido estudiado a nivel de secuencia genómica y contenido génico, permitiendo obtener un mapa genómico completo (Figura 2).

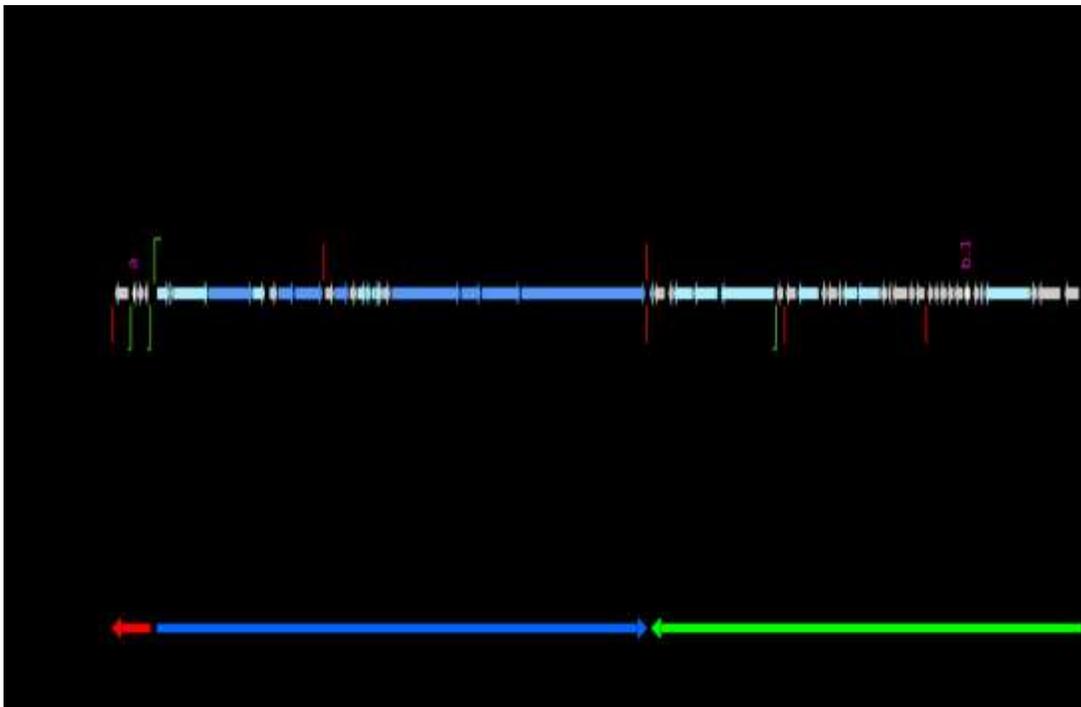


Figura 2. Patrón de transcripción y elementos reguladores de PaMx41. A. Mapa genómico de PaMx41 indicando los elementos reguladores de la transcripción. Los promotores y terminadores transcripcionales se representan con líneas verdes y rojas respectivamente. B. Tamaño y posición de las sondas utilizadas para evaluar la temporalidad de la transcripción de cada región genómica. C. Las flechas representan la dirección de transcripción y se indica el tiempo a partir del cual los transcritos de dicha región son observados (Cruz-Plancarte, sometido a publicación).

La mayoría de genes que carecen de homología con genes reportados en bases de datos se encuentran en las regiones de expresión temprana y media, y no se les ha asignado una función.

Posteriormente, se analizó la temporalidad de la expresión de las regiones genómicas de este fago. Encontrándose que la región temprana consta de 4 genes, los cuales se expresan en bloques, el primero corresponde a la expresión del transcrito e2 que contiene a los ORF's 3, 2 y a, mientras que el segundo corresponde a la expresión del transcrito e1 que contiene al ORF1. Figura 3. De manera interesante estos genes se encuentran en la región del genoma que presenta redundancia terminal. (Cruz-Plancarte, sometido a publicación).

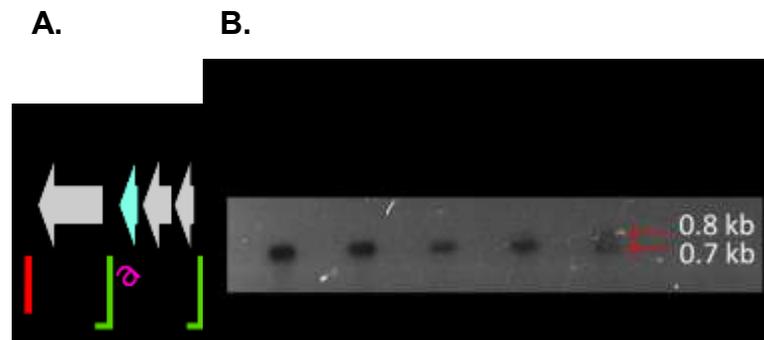


Figura 3. Temporalidad de la infección de la región temprana de los genes de PaMx41. A. Mapa de la región de genes tempranos de PaMx41. (B). Northern blot, donde se señalan con una flecha los dos mensajeros que se expresan a partir de los primeros minutos de la infección de PaMx41 (Cruz-Plancarte, sometido a publicación).

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe una amplia gama de genomas de bacteriófagos descritos, y poco a poco se ha ido expandiendo el conocimiento entre el gen y su función correspondiente, sin embargo existe una diversidad enorme entre los bacteriófagos por lo que la información de la función de todos los genes de estos no está totalmente caracterizada, además de que hay una escasez de similitud en los productos de los genes, en bases de datos, lo que complica la asignación de funciones.

Los genes de los fagos expresados inmediatamente después de la infección se han visto involucrados en la transición del metabolismo bacteriano al del fago, y un número limitado de proteínas tempranas del fago suelen ser letales o muy dañinas para la bacteria hospedera. Por lo que la interacción de estas proteínas del fago con proteínas bacterianas y su efecto inhibitorio ha retomado importancia ya que puede ser una opción para la búsqueda y diseño racional de pequeñas moléculas que simulen el efecto de la proteína del fago, por lo que elucidar las funciones de estas proteínas fágicas puede ser una fuente para identificar polipéptidos antimicrobianos, con un potencial uso farmacológico.

IV. HIPÓTESIS

Los genes de expresión temprana de PaMx41: ORF2 y ORF3, codifican para proteínas fágicas, que pueden alterar el metabolismo bacteriano para favorecer el del fago, por lo que su sobreexpresión permitiría buscar un efecto en el crecimiento celular.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Clonar el ORF2 y el ORF3 del fago PaMx41 en un vector de expresión, y evaluar el efecto de su sobreexpresión en el crecimiento de *E.coli*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clonar el ORF2 y el ORF3, en el vector de transición pJET1.2/blunt.
2. Clonar el ORF2 y el ORF3, en el vector de expresión pPROEX-1.
3. Analizar el efecto de la sobreexpresión del ORF2 y ORF3 del fago PaMx41, en *E.coli*.
4. Purificar las dos proteínas tempranas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL

6.1.1 Cepas bacterianas

La cepa de *P. aeruginosa* Ps26 (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012), pertenece a la colección del Laboratorio 3 del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco. También se usaron las cepas de *E. coli*, DH5 α , XL1-Blue y BL21Star.

6.1.2 Bacteriófagos

El fago PaMx41 proviene de una muestra de agua (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012) y pertenece a la colección del Laboratorio 3 del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

6.1.3 Plásmidos

El plásmido pPROEX-1 fue proporcionado por el M. en C. Marco Antonio Magos Castro. La construcción p6H5'-pth fue proporcionada por la Dra. Eva Jacinto Loeza, ambos del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

6.1.4 Oligonucleótidos

En la Tabla 1 se muestra el nombre de cada oligo utilizado con su respectiva secuencia.

PRIMER	SECUENCIA 5'→3'
ORF2PPROEX_FW	GAGCTCGATGGAGTTTAATCTAATGGC
ORF2PPROEX_RV	GGATCCCTAGAATCCGCCCTTGAG
ORF3PPROEX_FW	GAGCTCGATGGAAATTATGAATGTATTGG
ORF3PPROEX_RV	GGATCCAGATTAAACTCCATTGAAGC
PJET1.2 FORWARD	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
PJET1.2 REVERSE	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos. *Primers* utilizados para la clonación de los ORF's 2 y 3 del fago PaMx41 en los diferentes vectores usados.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Tapiz bacteriano.

Se mezclaron con vórtex 3.5 ml TΦ agar suave (ver ANEXO 1), previamente derretido y atemperado, con 150 µl de un cultivo bacteriano líquido *overnight*. La mezcla se vertió en una caja con medio TΦ (ver ANEXO 1) cuidando que la distribución fuera uniforme. La caja se dejó secar y después se incubó toda la noche a 37°C.

6.2.2 Propagación del fago

Se realizó un cultivo líquido *overnight* de la cepa bacteriana hospedera crecida en agitación (250rpm) en medio LB a 37°C, y el fago empleado se propagó en tapices bacterianos. Posteriormente se colocaron 10 µL del fago de interés procedente del stock original de la colección y se extendió la gota sobre el tapiz

previamente realizado de su respectiva cepa bacteriana hospedera y se incubó 12 h a 37°C. De las placas de lisis formadas se picó con un palillo estéril una de ellas y se hizo pasar en línea recta sobre la superficie de medio Tφ en otra caja de Petri a la que posteriormente se vierte un tapiz bacteriano. Y se incubó en las condiciones previamente mencionadas. De las placas formadas se picó una nuevamente y se repitió el pasaje tres veces. Del último pasaje se tomaron 10 placas con ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se depositaron en un tubo EPPENDORF de 1.5mL con 1 mL de medio TMG-SM (ver anexo). El tubo se dejó en agitación (250rpm) durante 12 h a 4°C, después se centrifugó a 11 000 g por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en otro tubo EPPENDORF de 1.5mL estéril a 4°C. Mediante este procedimiento se generó un stock del fago utilizado en este trabajo.

Para aumentar la concentración fágica del stock para su posterior uso, se mezclaron 75μL del stock de interés con 300μL de la cepa bacteriana hospedera correspondiente y 3mL de medio TΦ caliente. La mezcla se vertió sobre una caja Petri con LB se dejó solidificar y se incubó 12 h a 37°C. Después del tiempo de incubación se recuperó el tapiz completo con ayuda de una espátula previamente flameada y se depositó en un tubo cónico de 50mL. Así mismo se adicionaron 5mL de medio TMG-SM de la caja que se le extrajo el tapiz y se dejó en agitación (250rpm) durante 30 min. Posteriormente se recuperó este volumen de TMG-SM de la placa y se vertió al tubo cónico con el resto del tapiz. El tubo se dejó en agitación (250rpm) 12 h a 4°C. Después se centrifugó a 11,000 g durante 10min y se recuperó el mayor volumen posible del sobrenadante y se guardó en un tubo de 50mL estéril a 4°C.

6.2.3 Obtención del título del fago.

Para conocer el título de fagos o unidades formadoras de placas (UFP) en el stock obtenido anteriormente, se hicieron diluciones del *stock* de fagos empezando con una dilución 1:100 (factor de dilución 10²) de la siguiente

manera: 990 µl de medio TMG (ver ANEXO 1) más 10 µl del stock de fago. Después se siguieron con los factores de dilución de 10⁴, 10⁶, 10⁸ y 10⁹. Se gotearon 5 µl de cada una de las diluciones sobre un tapiz bacteriano, se dejaron secar y se incubó toda la noche a 37°C. Al siguiente día se contaron las placas de la dilución y se determinó el título con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{(No. de placas en una gota \times Factor de dilución)}{Volumengoteado (ml)}$$

6.2.4 Extracción de DNA fágico

Se utilizó un *stock* de partículas fágicas purificadas por gradientes de cloruro de Cesio (CsCl), para extraer DNA utilizando la técnica modificada de fenol-cloroformo (Maniatis, 1982).

A 500 µL de partículas fágicas purificadas, se agregó un volumen equivalente de fenol-cloroformo (1:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 20,000 g por 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo EPPENDORF de 1.5mL y se repitió el tratamiento con fenol-cloroformo tres veces más, para garantizar la remoción total de proteínas virales.

Nuevamente se recuperó la fase acuosa en otro tubo, se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Esta mezcla se centrifugó a 20,000 g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 1mL de etanol al 70%. Finalmente se dejó secar la muestra y el DNA se resuspendió en agua estéril.

La calidad del DNA fágico extraído fue confirmada por electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TAE a 90 V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (1µg/mL) y se observaron con luz UV. El DNA se cuantificó por espectrofotometría usando el Nanodrop 2000 de ThermoScientific.

6.2.5 Extracción de plásmido.

Se utilizó el kit de extracción Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Se centrifugaron 7 ml de un cultivo de toda la noche a 11,000 g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 250 µl de *Cell Resuspension Solution*. Después se le agregaron 250 µl de *Cell Lysis Solution* y se mezcló por inversión. Se le adicionaron 10 µl de *Alkaline Protease Solution*, se mezcló por inversión y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Luego se le agregaron 350 µl de *Neutralization Solution* y se mezcló por inversión hasta que quedó homogénea la mezcla. Se centrifugó a 13,000 g durante 10 min. Se recuperó el lisado claro y se transfirió a una columna adaptada a un tubo colector, con cuidado de no llevar restos de la pastilla. Se centrifugó a 13,000 g durante 1 min y se desechó el filtrado. Se hizo un primer lavado con 750 µl de *Wash Solution* centrifugando a 13,000 g durante 1 min y después un segundo lavado con 250 µl de *Wash Solution* centrifugando a 13,000 g durante 2 min. Después se transfirió la columna a un tubo EPPENDORF de 1.5 ml y se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a 20,000 g durante 1 min y después se adicionaron otros 50 µl de agua libre de nucleasas repitiéndose la centrifugación. La muestra se guardó a -4°C.

6.2.6 Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*.

Se siguió el protocolo de Green & Rogers (2013). A partir de un cultivo *overnight* de *E. coli* usando medio LB, se hizo una dilución 1:100 en medio SOB (ver ANEXO 1). Se puso a incubar a 210 rpm a 37°C hasta que alcanzó una D.O. ($\lambda=600\text{nm}$) de 0.5-0.6. Se incubó 5 minutos en hielo. Después se centrifugó a 7,500 g durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente en 33 ml de solución Tfb1 (ver ANEXO 1). Se

incubó 10 min en hielo y se centrifugó otra vez a 3,000 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TfbII (ver ANEXO 1). Se hicieron alícuotas en tubos EPPENDORF y se congelaron con nitrógeno líquido. Finalmente, las alícuotas se guardaron a -70°C.

6.2.7 Transformación química en *E. coli*.

Se descongeló en hielo una alícuota de 100 µl de células quimiocompetentes y se mezcló con 5 µl de reacción de ligación o 1 µl (20 ng) de plásmido. Se incubó en hielo durante 30 min. Después se dio un choque térmico de 5 min a 42°C. Inmediatamente se incubó en hielo durante 3 min. Se agregó 1 ml de medio LB precalentado. Se dejó recuperando con movimiento durante 1 h a 37°C. Se centrifugó a 11,000 g durante 3 min. Por último, se plaqueó la reacción en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente.

6.2.8 Geles de agarosa y electroforesis.

Los geles de agarosa se hicieron al 1%. Para ello se pesó 1 g de agarosa de bajo punto de fusión de Invitrogen. Se le agregaron 100 ml de buffer TAE 1X (ver ANEXO 1) y se derritió en un horno de microondas. Se dejó enfriar un poco y se vertió en un molde de electroforesis sellado en ambos extremos con cinta adhesiva. Después se agregaron 3 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se distribuyó uniformemente. Se colocaron los peines y se dejó solidificar. Después se retiró la cinta adhesiva, se colocó el molde en una cámara de electroforesis. Se llenó la cámara con buffer TAE 1X hasta cubrir el gel y se retiró el peine. Se cargaron las muestras y se corrió el gel a 80 V durante ~1 hora.

6.2.9 Purificación de bandas de gel de agarosa.

Se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Se cortó con mucho cuidado la banda del tamaño deseado y se pesó. Por cada 10 mg de gel se añadieron 10 µl de Membrane Binding Solution. Se mezcló con vórtex y se incubó 10 min a 60°C mezclando con vórtex cada 5 minutos. Se colocó una minicolumna SV en un tubo colector y se transfirió el gel derretido. Se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000 g durante 1 min. Se desechó el filtrado y se hizo un primer lavado con 700 µl de Membrane Washing Solution. Se centrifugó a 13,000 g durante 1 min y se desechó el filtrado. Después se hizo otro lavado con 500 µl de la misma solución, centrifugando a 13,000 g durante 5 min y se desechó el filtrado. Se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas (precalentada a 40°C) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13,000 g durante 1 min. El DNA purificado se guardó a -20°C.

6.2.10 Diseño de *primers*

Se diseñaron *primers* específicos para la amplificación del ORF2 y el ORF3 del bacteriófago de *P. aeruginosa*: PaMx41. Para ser clonados en 2 vectores de expresión diferentes. Los *primers* fueron diseñados utilizando la plataforma OligoAnalyzer 3.1 (Oligoanalyzer). Los *primers* fueron flanqueados con secuencias que contemplan sitios de corte para las enzimas *SacI*, para el oligonucleótido *forward* (Fw), y la secuencia para *BamHI* en el oligonucleótido *reverse* (Rv), para la clonación en el vector pPROEX-1. Tabla 2.

Primer	Secuencia 5'→3'
ORF2pPROEX_Fw	GAGCTC GATGGAGTTTAATCTAATGGC
ORF2pPROEX_Rv	GGATCC CTAGAATCCGCCCTTGAG
ORF3pPROEX_Fw	GAGCTC GATGGAAATTATGAATGTATTGG
ORF3pPROEX_Rv	GGATCC AGATTAAACTCCATTGAAGC

Tabla 2. Secuencia de los oligos diseñados. GAGCTC: Secuencia de reconocimiento específica de la enzima *SacI*. GGATCC: Secuencia de reconocimiento específica de la enzima *BamHI*.

6.2.11 Amplificación por PCR del ORF2 y el ORF3

Para la amplificación del ORF2 y el ORF3 fágicos, se empleó una DNA polimerasa de alta fidelidad *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* de ThermoScientific. Las condiciones de amplificación fueron estandarizadas variando la temperatura de alineamiento y la concentración de iniciadores. En la tabla se muestran las condiciones finales de reacción.

REACTIVO	CANTIDAD
PHUSION HF BUFFER (5X)	2 µl
DNTPS (1MM)	2 µl
ORF2PPROEX_FW/ ORF3PPROEX_FW (10MM)	0.2 µl
ORF3PPROEX_RV/ORF3PPROEX_RV (10MM)	0.2 µl
DNA DE PAMX41 (50 NG/ µL)	1 µl
PHUSION DNA POLYMERASE (2 U/µL)	0.2 µl
AGUA	4.4 µl
VOLUMEN FINAL	10 µl

CONDICIÓN	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO		
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	97	5 min		
DESNATURALIZACIÓN	96	30 seg	30	
ALINEAMIENTO	53	30 seg	ciclos	
EXTENSIÓN	72	30 seg		
EXTENSIÓN FINAL	72	7 min		

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación de los ORF's 2 y 3 de PaMx41.

6.2.12 Clonación del ORF2 y ORF3 en pJET1.2/blunt.

Se utilizó el producto de PCR, para amplificar el ORF2 y ORF3, junto con el kit CloneJET PCR Cloning de ThermoScientific para clonar los fragmentos en el vector de transición pJET1.2/blunt, de acuerdo a las siguientes condiciones.

REACTIVO	CANTIDAD
PJET1.2/BLUNT CLONING VECTOR (50 NG/ μ L)	1 μ l
2X REACTION BUFFER	10 μ l
T4 DNA LIGASE (5 U/ μ L)	1 μ l
PRODUCTO DE PCR	1 μ l
AGUA	7 μ l
VOLUMEN FINAL	20 μ l

Tabla 4. Condiciones de la reacción de ligación con pJET1.2/blunt

Se incubó la mezcla de reacción 5 min a 22°C. Posteriormente se transformaron 200 μ L de células quimiocompetentes XL1-Blue con 5 μ L de la reacción anterior. Se incubó la mezcla de reacción 45 min en hielo, después 2 min a 42°C y nuevamente se incubó 5 min en hielo. Las células se recuperaron adicionando 1ml de medio LB y se incubaron a 37°C durante 90 min.

Posteriormente se centrifugó a 9,000 g por 2 minutos, después se eliminaron 900µL del sobrenadante, y la pastilla se resuspendió en los 100 µL restantes. Los 100 µL se plaquearon en placas de LB con ampicilina (100µg/mL) y se incubaron durante 12 h a 37°C. Finalmente se seleccionaron 10 clonas candidatas de la construcción para ser analizadas mediante PCR de colonia y ensayos de restricción.

6.2.13 Clonación del ORF2 en el vector de expresión pPROEX-1

Se hicieron dos reacciones de PCR de 50 µl usando como plantilla la construcción en pJET con los oligos que vienen en el kit de pJET.

REACTIVO	CANTIDAD
PHUSION HF BUFFER (5X)	10 µl
DNTPS (1MM)	10 µl
PJET1.2 FORWARD (10MM)	1 µl
PJET1.2 REVERSE (10MM)	1 µl
DNA DE PJET_ORF2 (50 NG/ µL)	1 µl
PHUSION DNA POLYMERASE (2 U/µL)	0.3 µl
AGUA	26.7 µl
VOLUMEN FINAL	50 µl

CONDICIÓN	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	97	5 min
DESNATURALIZACIÓN	96	30 seg
ALINEAMIENTO	60	30 seg
EXTENSIÓN	72	30 seg
EXTENSIÓN FINAL	72	7 min

Tabla 5. Condiciones de la PCR para clonar en pPROEX-1

El producto de PCR consta del ORF2 flanqueado de 63 y 65 pb pertenecientes a pJET y fue purificado mediante precipitación con etanol.

Las cantidades de 5 µg del producto de PCR purificado y 4 µg del vector pPROEX-1 fueron restringidos secuencialmente con las enzimas *SacI* de Thermo Scientific y *BamHI* de NEB de la siguiente manera:

REACTIVO	CANTIDAD (PRODUCTO DE PCR Y VECTOR)
BUFFER <i>SacI</i> (10X)	2 µl
<i>SacI</i> (10U/ML)	0.3 µl
DNA	4 µg
AGUA	Para 20 µl

Tabla 6. Condiciones de la reacción de restricción con *SacI*.

Se incubó 3 horas a 37°C, una vez concluido el tiempo de incubación de la reacción de restricción se tomó una alícuota de 5 µl y se corrió en un gel de agarosa, para que una vez verificado el corte se purificara mediante precipitación con etanol, para llevar a cabo la segunda restricción como a continuación se describe.

REACTIVO	CANTIDAD (PRODUCTO DE PCR Y VECTOR)
NEB BUFFER 3 (10X)	2 μ l
<i>Bam</i> HI (20,000U/ML)	0.3 μ l
BSA (10 MG/ML)	0.2 μ l
DNA	4 μ g
AGUA	Para 20 μ l

Tabla 7. Condiciones de la reacción de restricción con *Bam*HI.

La ligación se hizo con la enzima T4 DNA Ligasa de Thermo Scientific de la siguiente manera:

REACTIVO	CANTIDAD
BUFFER (10X)	2 μ l
VECTOR	300 ng
INSERTO	56 ng
LIGASA T4	1 μ l
AGUA	Para 20 μ l

Tabla 8. Condiciones de ligación.

Se incubó la reacción a 16°C durante 16 horas.

Después se utilizaron 5 μ l del producto de ligación para transformar químicamente a *E. coli* XL1-Blue. Las células recuperadas fueron plaqueadas en una caja con medio LB con Ampicilina [100 μ g/ml]. Se hizo PCR de colonia a 10 candidatas y se extrajo plásmido de una colonia que tenía el inserto.

6.2.14 Secuenciación de DNA.

Se extrajo el plásmido de las candidatas que dieron positivo en la PCR de colonia y se hizo la siguiente reacción para PCR con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Thermo Fisher Scientific:

REACTIVO	CANTIDAD
SEQUENCING BUFFER (5X)	4 μ l
READY REACTION MIX	4 μ l
DNA	1 μ g
OLIGO FW O RV (10 μ M)	2 μ l
AGUA	Para 20 μ l

CONDICIÓN	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
DESNATURALIZACIÓN INICIAL	94	5 min
DESNATURALIZACIÓN	94	30 seg 30 ciclos
ALINEAMIENTO	55	20 seg
EXTENSIÓN	60	4 min
EXTENSIÓN FINAL	60	7 min

Tabla 9. Condiciones de la reacción de secuenciación

Después se purificó este producto de PCR mediante columnas Centri-sep de Princeton Separations. Primero se bajó todo el contenido de la columna, se quitó la tapa superior para agregar 800 μ l de agua miliQ estéril y se mezcló con vórtex para hidratar el gel. Se quitaron las burbujas formadas golpeando ligeramente la columna, se dejó mínimo 2 h sin mover, a temperatura ambiente. Se quitó la tapa superior de la columna, luego la inferior y se colocó en un tubo colector. Se centrifugó a 2,500 g durante 2 min en una centrífuga EPPENDORF 5415C. Se transfirieron los 20 μ l de la reacción de PCR con cuidado de no tocar el gel y se centrifugó a 2,500 g durante 2 min. La muestra fue secada mediante vacío en Speed-vac y enviada al servicio de secuenciación del Departamento de Genética del CINVESTAV.

6.2.15 Curva de crecimiento bacteriano

A partir de un cultivo *overnight* se realizaron cultivos de 50 ml, con una dilución 1:100 con LB más Ampicilina (100µg/ml), para el caso de las construcciones en pJET1.2/blunt y en pPROEX-1. Se dejaron crecer y se monitorearon hasta obtener una D.O. de 0.3 ($\lambda=600\text{nm}$), en ese momento se agregó IPTG 1mM, y se fueron registrando las densidades ópticas cada hora, durante 6 horas.

6.2.16 Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue fue transformada con los plásmidos pPROEX-1, pPROEX_ORF2 y como control con el plásmidos p6H5'-pth, todos inducibles con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) para sobreexpresar la proteína correspondiente.

6.2.17 Cultivo bacteriano.

Se realizó una dilución 1:100 a partir de un cultivo *overnight*, con 250 ml de LB fresco suplementado con Ampicilina [100 µg/ml]. Las células fueron crecidas a 37°C con agitación vigorosa (200rpm) hasta alcanzar una D.O. de 0.3 ($\lambda=600\text{nm}$). Una vez alcanzada esta densidad óptica los cultivos fueron inducidos con IPTG (1 mM) durante tres horas. Una vez transcurrido este periodo, los cultivos fueron enfriados en agua-hielo durante 10 minutos para después centrifugarlos a 5,700 g durante 10 min a 4°C, la pastilla se lavó dos veces con 30 ml solución Tris 25 mM (pH. 8.0), centrifugando a 4,200 g durante 5 min, después se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -70°C.

6.2.18 Lisis celular.

Las pastillas se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis frío (ver ANEXO 1), se congelaron con nitrógeno líquido y se criopulverizaron en el criopulverizador Retsch modelo MM400, a 16 Hz por 3 minutos en seis ciclos, re-congelando en nitrógeno líquido entre cada ciclo, para evitar la descongelación de las células. Las células pulverizadas fueron transferidas a tubos Falcon de 15 ml y guardadas a -70°C.

6.2.19 Clarificado del extracto celular.

Las células criopulverizadas fueron descongeladas en hielo, se agregó 10 µl de DNasal (1U/ml) y se incubó durante una hora en hielo mezclando cada 2 min, para disminuir la viscosidad. Posteriormente se agregó el buffer de lisis frío necesario para equilibrar el peso de los tubos. Se centrifugó a 11,700 g durante 10 min a 4°C para retirar los restos celulares y en una segunda centrifugación se clarificó el extracto a 23,600 g durante 30 min a 4°C en el rotor Beckman JA-20.

6.2.20 Purificación en columnas de Níquel.

Se colocó 1 ml de Ni-NTA agarosa en suspensión al 50% de etanol (QIAGEN) en una columna de cromatografía de 25 ml (Glass Econo-Column de BIORAD), lo cual formó una cama de 0.5 ml que fue equilibrada con el buffer correspondiente (ver ANEXO 1), durante todo el proceso las soluciones fueron movilizadas por una bomba peristáltica.

El extracto celular clarificado fue pasado por la columna tres veces, después de lo cual la columna fue lavada dos veces incrementando la concentración del imidazol de 10 mM a 20 mM en el buffer de lavado (ver ANEXO 1), para

retirar las proteínas unidas inespecíficamente a la resina. Finalmente, las proteínas etiquetadas con histidinas fueron eluidas con 10 ml del buffer de elución (ver ANEXO 1), fraccionadas en alícuotas de 1 ml y guardadas a 4°C cubiertas con aluminio.

6.2.21 SDS-PAGE

Se colocaron vidrios para hacer geles (Mini-PROTEAN® Short Plates de Bio-rad) de 1.5 mm de grosor y se colocaron en un marco (Mini-PROTEAN® Casting Frame de Bio-rad) sobre una goma (Mini-PROTEAN® Casting Stand Gasket de Bio-rad) en el soporte para colocar los vidrios (Mini-PROTEAN® Casting Stand de Bio-rad).

Se verificó que no hubiera fuga de líquido y se preparó la mezcla del gel separador en un vaso de precipitados de 100 ml. Los reactivos se fueron añadiendo y mezclando en el orden en que aparecen en la Tabla 10.

REACTIVO	GEL SEPARADOR (15%)	GEL CONCENTRADOR
AGUA DESTILADA ESTÉRIL	2.5 ml	3.5 ml
<i>BUFFER 1 (PH 8.8)</i>	2.5 ml	--
<i>BUFFER 2 (PH 6.8)</i>	--	1.5 ml
MONÓMEROS	5 ml	1 ml
APS 10%	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Tabla 10. Condiciones para el gel de acrilamida.

Una vez adicionado el TEMED se mezcló todo y se vació inmediatamente en el interior de los vidrios, con una micropipeta de 1 ml. Rápidamente pero de manera suave se agregó 1 ml de isopropanol y se dejó solidificar por 10 min. Luego se retiró el isopropanol y se quitó el exceso en los vidrios con un papel filtro. Se preparó la mezcla para el gel concentrador y se vertió hasta el borde con ayuda de una micropipeta de 1 ml. Inmediatamente se colocó el peine con cuidado de no formar burbujas. Se dejó polimerizando durante 10 min y luego

se retiró el peine. Se hizo otro gel de la misma forma. Ambos fueron colocados en una cámara de electroforesis para proteínas Mini-PROTEAN® Tetra HandcastSystemsde Bio-rad. Se vació el buffer de corrida (ver ANEXO 1) en medio de los dos geles hasta que los cubrió y también en el espacio entre la cámara y los geles. Las muestras fueron mezcladas con 10 µl de buffer de lisis para proteínas y se hirvieron por 5 minutos para después centrifugarlas a 16,900 g por 10 minutos (ver ANEXO 1), excepto el marcador; se cargaron en el gel y se corrieron a 40 mA durante 1 hora a 4°C.

6.2.22 Tinción con Coomassie.

Una vez que terminó la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie (ver ANEXO 1) toda la noche en agitación. Para visualizar las bandas de proteínas fue necesario desteñir el exceso del colorante azul de Coomassie con la solución para desteñir (ver ANEXO 1) realizando tantos cambios de la solución como fueran necesarios, hasta que el gel quedó lo más transparente posible. Se cambió la solución de desteñir por agua destilada para permitir la rehidratar del gel a temperatura ambiente.

6.2.23 Tinción con Nitrato de Plata

El gel se incubó en solución Fijadora (ver ANEXO 1) por 1 hora, posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada, a continuación se sensibilizó el gel incubándolo en una solución de tiosulfato de sodio 0.005%, por una hora. Se incubó con nitrato de plata al 0.1%, por el mismo periodo de tiempo que se usó para fijar, se lavó con agua destilada, a la postre se incubó en la solución desarrolladora (ver ANEXO 1) por 5 minutos. Finalmente, para detener la reacción, se incubó el gel con EDTA 50 mM por una hora.

6.2.24 Western blot.

Transferencia húmeda.

Una vez concluida la electroforesis el segundo gel de poliacrilamida se sacó y se montó el dispositivo de transferencia (Figura 4), el cual fue dispuesto en la cámara Mini Trans-Blot® Cell de Biorad, cuidando de que el paso de corriente fuera del gel hacia la membrana, para así permitir que las proteínas se desplazaran hacia el polo positivo y quedaran atrapadas en la membrana. Se llenó la cámara con Buffer de transferencia (ver ANEXO 1) frío y se dejó toda la noche a 20 V a 4°C.

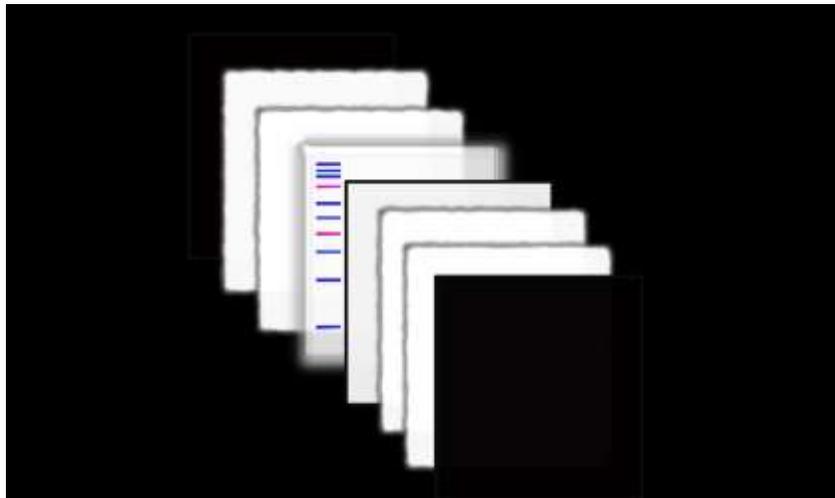


Figura 4. Dispositivo de transferencia.

Bloqueo de membrana e incubación con Anticuerpo

La membrana se lavó 2 veces con TBS-T 0.05% (ver ANEXO), en agitación. Posteriormente, para evitar inespecificidades de los anticuerpos, fue necesario bloquear la membrana, por lo que ésta se cubrió con caseína al 5% y se puso en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente.

Una vez concluido el tiempo de bloqueo, se realizaron 3 lavados con TBS-T 0.05% en agitación suave por 10 minutos. Consecutivamente se procedió a incubar con el anticuerpo primario (anti-MAT-*tag* de Sigma), el cual fue resuspendido en TBST-T-caseína5%, en una concentración de 1/10,000. La incubación se hizo toda la noche en agitación suave a 4°C. Después se realizó otra serie de 3 lavados con TBS-T 0.05% en agitación suave por 10 minutos.

Una vez terminada la segunda serie de lavados se procedió a incubar con el anticuerpo secundario (Rabbit anti-Mouse IgG de Invitrogen), el cual también fue resuspendido en TBST-T-caseína5%, en una dilución 1/25,000; y se incubó en agitación suave por toda la noche.

Finalmente, se hace una última serie de 3 lavados con TBS-T 0.05% por 15 minutos en agitación fuerte. Para revelar se usó el substrato quimioluminiscente SuperSignal™ West FemtoMaximumSensitivitySubstrate de Thermo Fisher Scientific. Se diluyeron 50 µl de Luminol/Enhancer en un volumen de agua inyectable, así mismo se hizo con el StablePeroxide Buffer. Se mezclaron las soluciones siendo el total de 200 µl, los cuales se agregaron a la membrana sobre una base de plástico. Enseguida se colocó la membrana en el escáner C-DiGit® Blot de LI-COR con la cara que recibió la solución hacia abajo. Se cerró el escáner y se eligió la sensibilidad Alta y de 12 min, la cantidad de luz colectada y el tiempo de escaneo (Acquire→Sensitivity→High, 12 min). Se guardaron las mejores imágenes (Selección de imagen deseada→menúprincipal→Export→Singleimageview→Currentimage→Selección características, nombrar y elegir la carpeta de destino→Save).

VII. RESULTADOS

Propagación y caracterización del fago PaMx41

A partir de un *stock* de partículas fágicas de PaMx41, se realizó la propagación del mismo en la cepa hospedera Ps26. En la Figura 5A se muestra un tapiz bacteriano goteado con las diluciones de PaMx41 (1/100 y 1/10) para cuantificar éste fago, el resultado mostró un título de 1.2×10^{12} UFP/mL. Título suficiente para purificarlo.

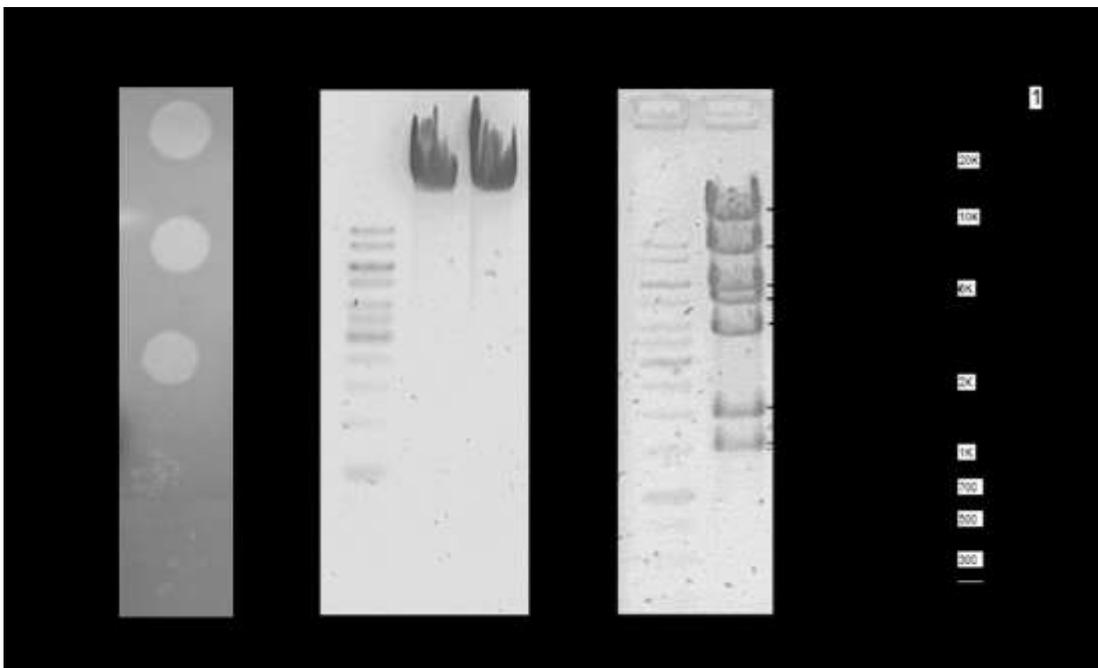


Figura 5. Caracterización del fago PaMx41. A. Tapiz bacteriano de Ps26 goteado con diluciones del fago PaMx41, título de 1.2×10^{12} UFP/ml. B. Después de la extracción de DNA, la concentración de PaMx41(a) fue de [500ng/ μ l] mientras que la de PaMx41(b) fue de [700ng/ μ l], se tomó una alícuota de cada una de ellas y se corrió en un gel de agarosa al 1%. C. Se restringieron 2 μ g del DNA fágico de PaMx41 con 4,000 U de enzima *Bam*HI (NEB) y se corrió una alícuota de 10 μ l en un gel de agarosa al 1%. D. Restricción in silico, obtenida mediante el software *Vector NTI*.

Con las partículas fágicas purificadas, se procedió a la extracción de DNA del fago PaMx41, y su integridad se verificó corriendo una alícuota en un gel de agarosa, posteriormente, para caracterizar el DNA fágico obtenido, se restringió el DNA genómico, usando la enzima de restricción *Bam*HI, y se comparó el patrón de restricción experimental, con el patrón de bandas

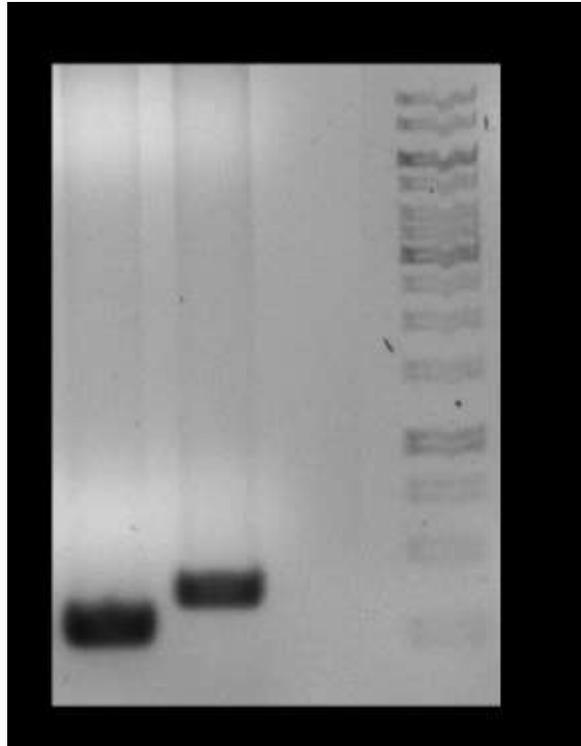


Figura 7. Estandarización de PCR para clonar en pJET1.2/blunt. Geles de agarosa al 1%. Productos de PCR para las construcciones pJET1.2_ORF2pproex y pJET1.2_ORF3pproex. Amplicones de 210 pb y 300 pb, correspondientes al ORF2 y ORF3 respectivamente.

El producto de PCR que se obtuvo se ligó al vector pJET1.2/blunt (Figura 7). Las reacciones de ligación fueron transformadas en las cepas de *E. coli*: XL-1 Blue y DH5 α .

Dado que el plásmido codifica para el gen letal *eco471R*, el cual se interrumpe cuando se liga un fragmento en el sitio múltiple de clonación, el resultado es que solo las clonas recombinantes serán capaces de propagarse y aparecen en la caja de cultivo, por lo que después de la transformación se analizaron de 5 a 10 colonias candidatas, mediante *colonyPCR*.

Clonación del ORF3 en pJET1.2/blunt

La reacción de ligación pJET1.2_ORF3pproex fue transformada en *E. coli* DH5 α ; sólo las colonias que contenían el inserto pudieron sobrevivir ya que el ORF3 clonado en el sitio múltiple de clonación interrumpe el gen letal del vector

pJET, sin embargo, tras varios ensayos, se obtenían pocas candidatas y éstas no tenían el fragmento esperado de aproximadamente 300 pb (210pb del ORF3 +120pb que adicionan los *primers* pJET). En la Figura 8 se muestran 18 candidatas analizadas, en donde ninguna de ellas tenía el amplicón del tamaño esperado.

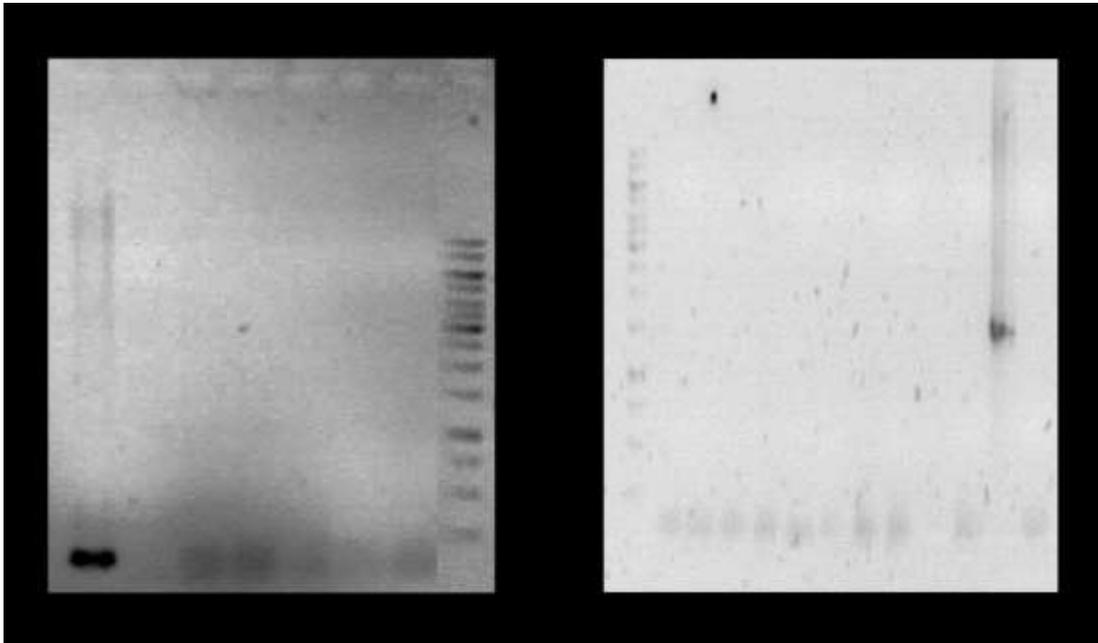


Figura 8. Análisis de candidatas pJET1.2_ORF3pproex mediante PCR de colonia. Se muestran dos geles de agarosa al 1%, de dos ensayos de ligación pJET1.2/ORF3 diferentes, y en donde no se observa el amplicón del tamaño esperado.

Por lo que se decidió cambiar de cepa de *E.coli* DH5 α , por la cepa XL-1 Blue, ya que esta última codifica para *lacI^q*. La razón de este cambio es que se quería reprimir de una mejor manera el promotor *placUV5* que se encuentra *upstream* del gen *eco471R* (ver Figura 6), por si éste estaba favoreciendo la expresión del ORF3. Así, la ligación pJET1.2pproex se transformó en *E.coli* XL-1Blue y se analizaron las candidatas.

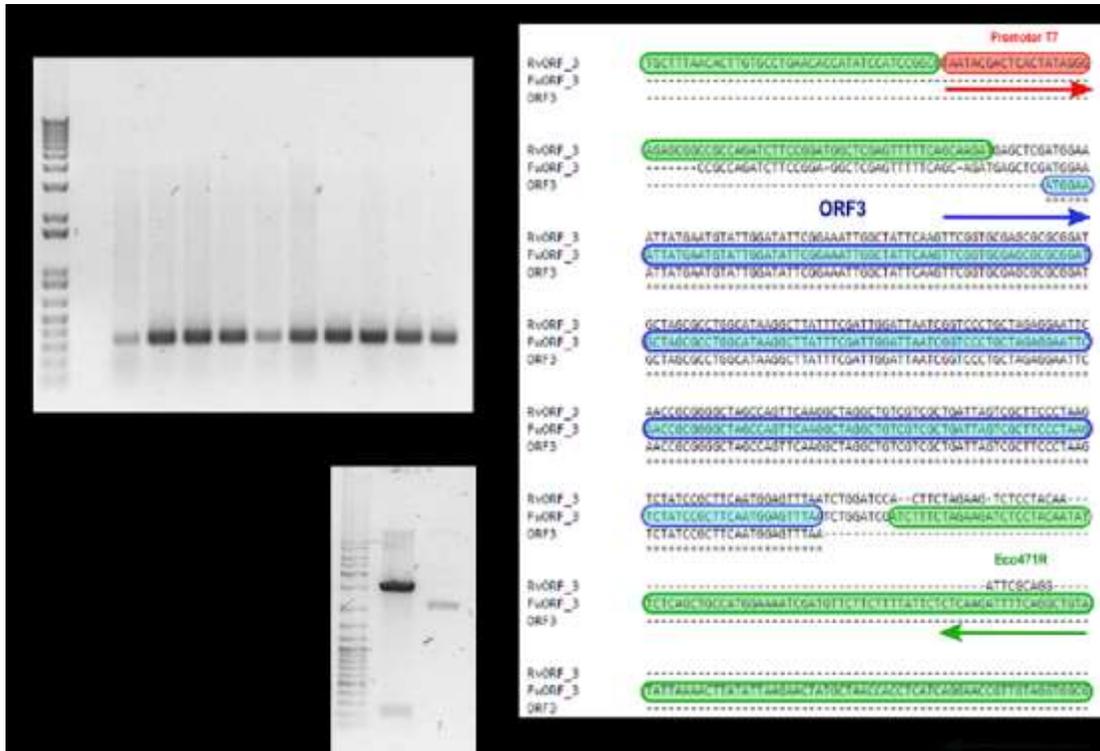


Figura 9. Clonación pJET1.2_ORF3pproex. A. Gel de agarosa (1%) donde se muestra el producto de la PCR de colonia de 10 candidatas (enumeradas del 1 al 10), con el amplicón esperado de 300pb. B. Secuencia de la construcción pJET1.2_ORF3pproex. En verde se muestra la secuencia del gen letal (eco471R) de pJET1.2/blunt, en azul la secuencia del ORF3 y en rojo la secuencia del promotor pT7, con una flecha negra se indica el *placUV5*. C. Doble restricción del DNA plasmídico de la candidata 5, con las enzimas *SacI* y *BamHI*.

Como se muestra en la Figura 9A se obtuvo el amplicón esperado de ~330pb (210pb provenientes del ORF3 y 120 pb de pJET1.2) en cada una de las 10 candidatas analizadas, de éstas se tomó la candidata c5, se extrajo su DNA plasmídico, se realizó una doble restricción enzimática para verificar que se liberara el fragmento de 210pb (Figura 9C), y se llevó a secuenciar, el resultado de la secuenciación, mostró que el ORF3 se había insertado de manera inversa con respecto al promotor *placUV5* (Figura 9B), pero en dirección correcta con respecto al promotor de T7. Por lo que se decidió analizar qué es lo que estaba sucediendo una vez que se expresaba el ORF3, para esto el

plásmido extraído de la candidata 5 se transformó en la cepa de *E.coli* BL21 Star, la cual expresa la polimerasa de T7, regulada por un promotor *lac*, el cual puede ser inducido con IPTG. Figura 10.

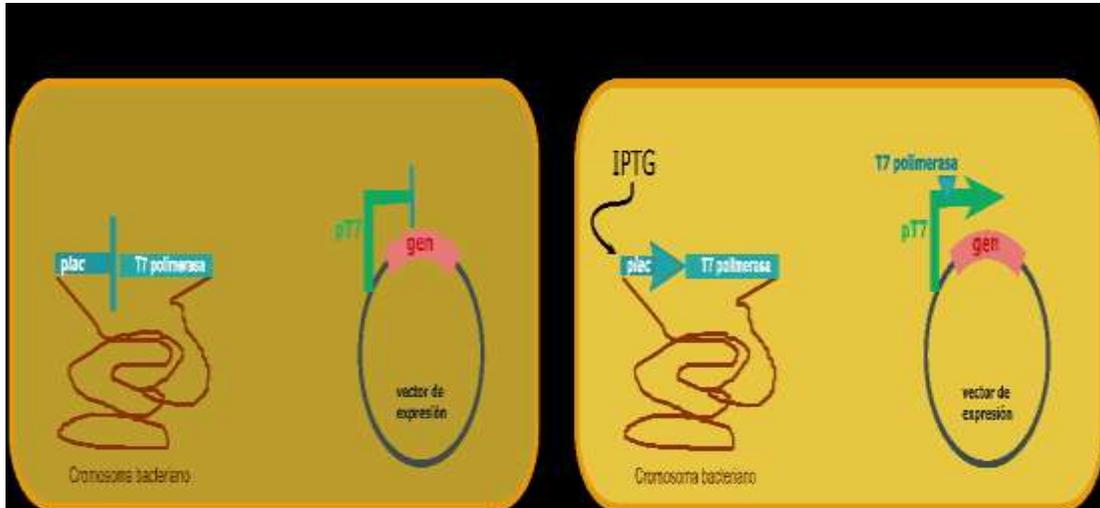
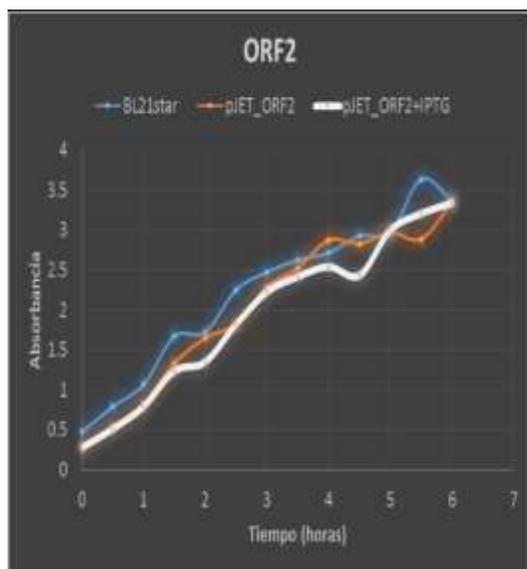


Figura 10. Mecanismo de inducción de la expresión de proteínas en vectores regulados por el promotor T7 en BL21Star. A. Cuando no hay inductor no se expresa la T7 polimerasa, codificada en el cromosoma bacteriano y regulada por un promotor *lac*. B. Cuando se adiciona IPTG, éste activa al promotor *lac*, lo que favorece la expresión de la T7 polimerasa, la cual activa al promotor de T7 en el vector, para expresar el gen de interés.

Se hizo una curva de crecimiento, cuando el cultivo logró una densidad óptica de 0.3, éste se indujo con IPTG, y se tomó una alícuota de 1ml para leer la absorbancia cada hora, y se obtuvieron las curvas de crecimiento para las construcciones pJET1.2_ORF3pproex y pJET1.2_ORF2pproex, comparados con el crecimiento de *E.coli* BL21 Star, y se vio un decremento en el crecimiento en las bacterias con el plásmido pJET1.2_ORF3pproex con respecto a las bacterias con la construcción pJET1.2_ORF2pproex y las bacterias *E.coli* BL21 Star (Figura11).

A



B

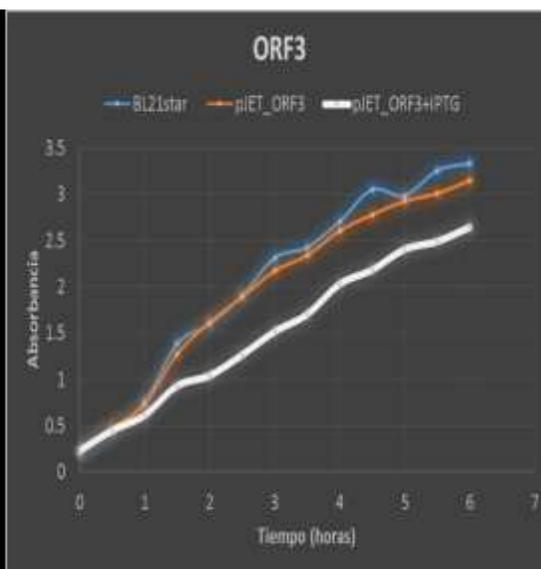


Figura 11. Curvas de crecimiento de las construcciones en BL21Star. A. Curvas de crecimiento para la construcción pJET1.2_ORF2pproex (rojo) y la construcción inducida con IPTG 1mM (blanco) y la bacteria sin plásmido (azul). B. Curvas de crecimiento para la construcción pJET1.2_ORF3pproex (rojo) y la construcción inducida con IPTG 1mM (blanco) y la bacteria sin plásmido.

El siguiente paso, una vez obtenida la construcción pJET1.2_ORF3 fue la subclonación en el vector de expresión pPROEX-1 sin embargo, esto no se ha conseguido.

Clonación del ORF2 en pJET1.2/blunt

La reacción de ligación pJET1.2_ORF2pproex fue transformada en *E. coli* DH5 α ; para verificar el inserto se realizó PCR de colonia para 10 candidatas de la construcción, en todas las candidatas se obtuvo un amplicón del tamaño esperado de aproximadamente 310 pb. Figura 12.

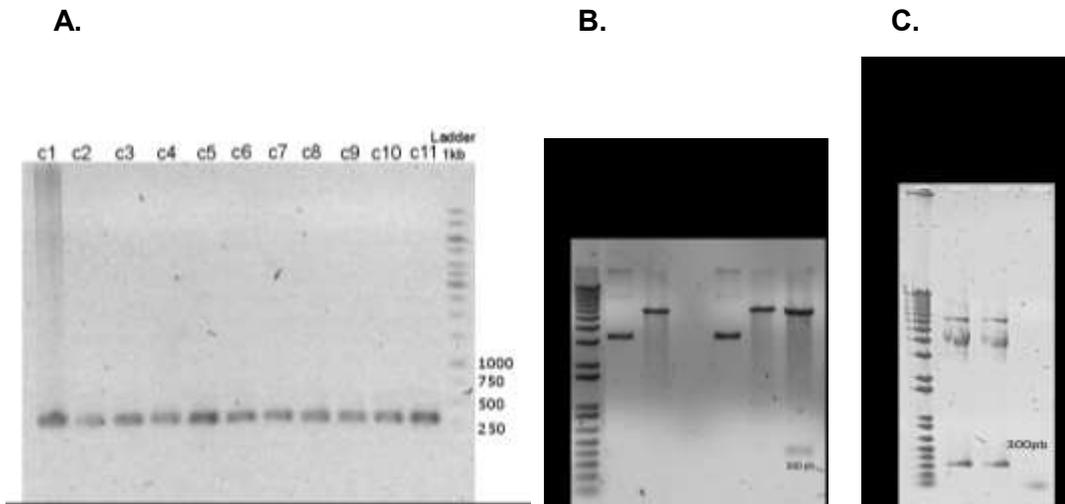


Figura 12. Análisis de colonias candidatas mediante PCR. Geles de Agarosa al 1%. A. Productos de PCR analizados por electroforesis para la construcción pJET1.2_ORF2pprpoex, usando los *primers* de pJET. B. DNA plasmídico restringido con *SacI* y *BamHI* de las candidatas 2 y 8. C. Productos de PCR usando los *primers* específicos para el ORF 2.

Para la construcción pJET1.2_ORF2pprpoex, se escogió la candidata 8, de la cual se hizo una extracción de plásmido, y usando los *primers forward* y *Reverse* del kit CloneJET PCR Cloning, se mandó secuenciar.

Al igual que la construcción pJET1.2_ORF3pprpoex, la del ORF2 también había entrado en sentido contrario con respecto al sentido del gen *eco471R*. Figura 13.

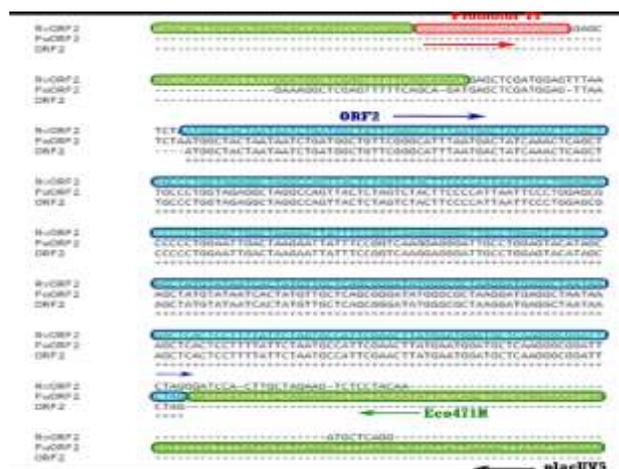


Figura 13. Secuencia de la construcción pJET1.2_ORF3pproex. En verde se muestra la secuencia del gen letal (*eco471R*) de pJET1.2/blunt, en azul la secuencia del ORF2 y en rojo la secuencia del promotor pT7, con una flecha negra se indica el *placUV5*.

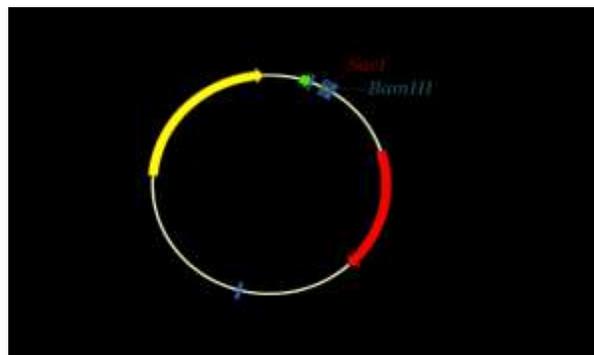
Debido a que se quería ver el efecto de la expresión de los ORF's 2y 3 en el crecimiento de *E.coli* la construcción pJET1.2_ORF2pprpoex, también se transformó en la cepa de *E.coli* BL21Star, y se realizó la curva de crecimiento inducida con IPTG 1mM (ver Figura 11), observándose un crecimiento similar a los controles que fueron la bacteria BL21Star sin plásmido y la construcción sin inducción.

Clonación del ORF2 en pPROEX-1

Una vez teniendo las construcciones en el vector pJET1.2 el paso a seguir fue subclonarlo en el vector de expresión correspondiente.

Se escogió el vector de expresión pPROEX-1 debido a que este vector es capaz de adicionar un *tag* de 6 histidinas a los fragmentos clonado en su sitio múltiple de clonación (Figura 14), y se requería que la proteína fuera etiquetada con histidinas para los posteriores ensayos de purificación e interacción.

A.



B.

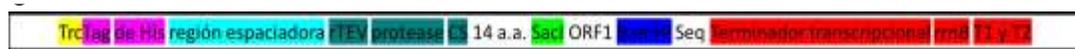


Figura 14. Vector pPROEX-1. A. Mapa de pPROEX-1, el cual contiene al gen de la β -lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina, cuenta con un sitio múltiple de clonación, en el cual se encuentran las enzimas *SacI* y *BamHI*. La transcripción de los fragmentos clonados está regulada por un promotor *Trc*. B. Después del promotor está la región que codifica para un *tag* de 6 histidinas, una región espaciadora, una proteasa y el fragmento clonado, y finalmente la región del terminador *rrmB*.

Para clonar el ORF2 en pPROEX-1, lo primero que se realizó fue una doble restricción de DNA plasmídico de la candidata 8, usando las enzimas *SacI* y *BamHI*, las cuales liberan un fragmento de 300pb, se corrió en un gel de agarosa al 1%, y el fragmento de 300pb fue cortado, para su posterior purificación (Figura 15A). Un proceso similar se llevó a cabo con el vector, el cual también se restringió con *SacI* y *BamHI*, se corrió en gel y se purificó. Ambos productos purificados se colocaron en una reacción de ligación, la cual se transformó en *E.coli* XL-1Blue, se escogió esta cepa ya que se pretendía tener una regulación más controlada del promotor *lac* bajo el cual se expresan los genes clonados en pPROEX-1.

De la transformación se eligieron 10 colonias candidatas, a las cuales se les realizó una PCR de colonia, en donde la mayoría de las candidatas presentaban el amplicón de 300pb (Figura 15C).

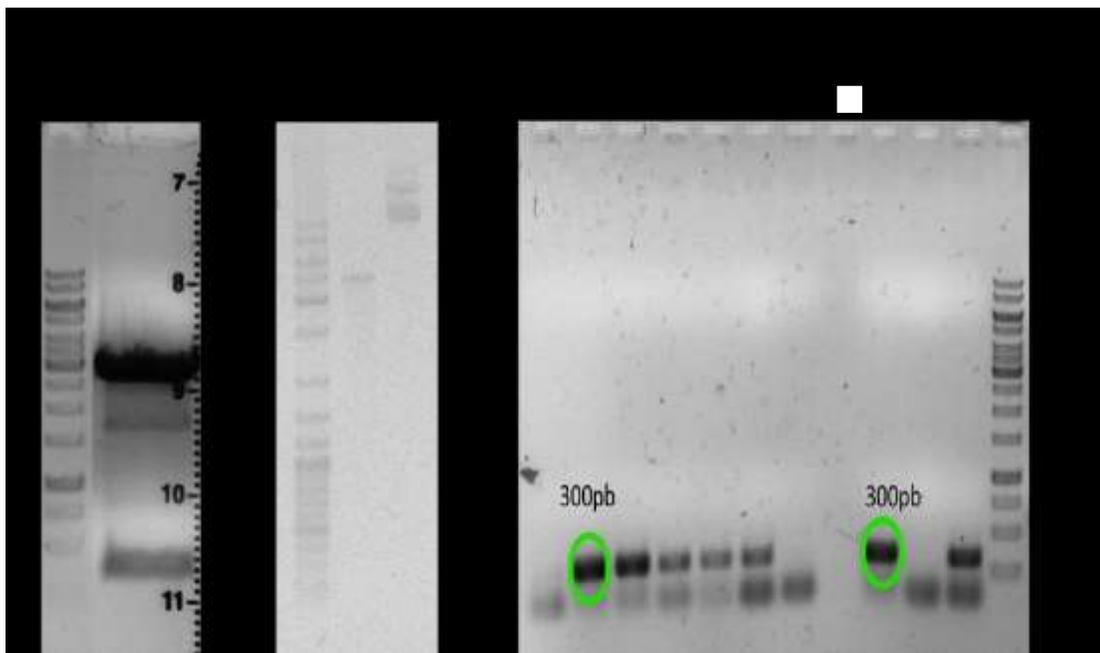


Figura 15. Clonación del ORF2 en pPROEX-1. A. Doble restricción de 5µg de DNA plasmídico con la construcción pJET1.2_ORF2, con las enzimas *SacI* y *BamHI*. B. Doble restricción de 5µg del vector pPROEX-1. C. Productos de PCR para buscar el amplicón de 300pb, usando los primers específicos del ORF2.

Se escogieron las candidatas 2 y 8, las cuales además fueron analizadas mediante restricción enzimática y mediante una PCR, finalmente se decidió

secuenciar la candidata 8, para ver la integridad de la secuencia desde el *tag* de histidinas hasta el codón de paro del ORF2 (Figura 16C).

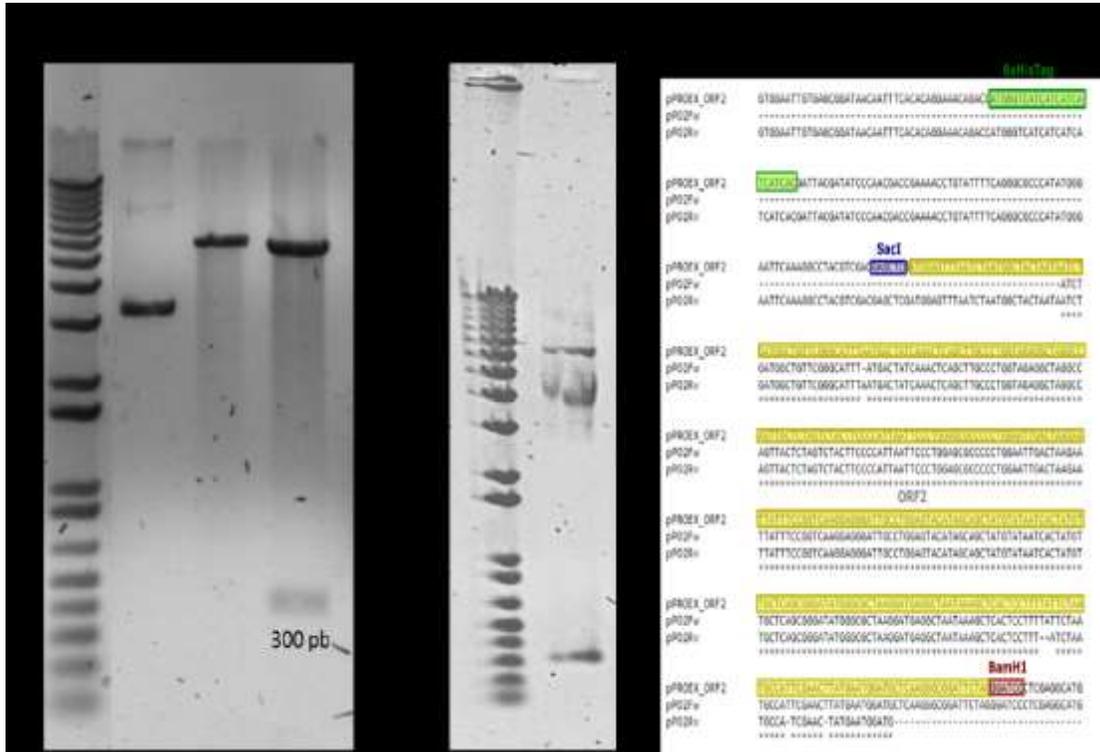


Figura 16. Análisis de la candidata 8 para pPROEX_ORF2. A. Restricción enzimática secuencial de 1µg de DNA plasmídico de la candidata 8, con 1U de *SacI* y 2 U de *BamHI*. B. Producto de PCR usando como molde 50 ng del DNA plasmídico de la candidata 8 y usando los *primers* específicos para amplificar el ORF2. C. Secuencia de la construcción pPROEX_ORF2, en verde la secuencia de as 6 Histidias, en azul y rojo los sitios para *SacI* y *BamHI* respectivamente y en amarillo la secuencia del ORF2.

Sobreexpresión de la proteína ORF2_6xHis

Ya confirmado que la secuencia estaba correcta, se procedió a sobreexpresar al ORF2_6xHis, para lo cual se realizó una curva de crecimiento para confirmar que la sobreexpresión no tenía algún efecto en el crecimiento de la bacteria (Figura 17).

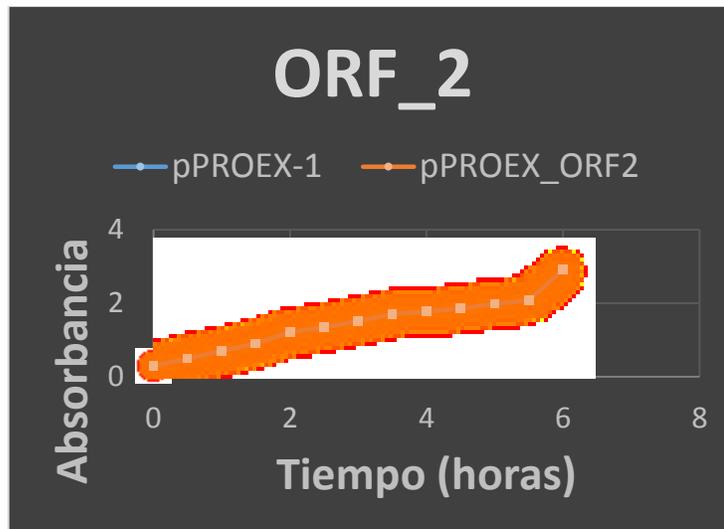


Figura 17. Curva de crecimiento de la construcción pPROEX_ORF2. En rojo se muestra el crecimiento de *E.coli* XL-1Blue con la construcción pPROEX_ORF2, y en azul la bacteria con el vector de expresión pPROEX-1.

Después se confirmó que la proteína ORF2_6xHis se estuviera sobreexpresando, por lo que la bacteria con la construcción pPROEX_ORF2 se creció hasta una densidad óptica de 0.3, momento en el cual se indujo con IPTG 1mM por 3 horas y se tomaron alícuotas cada media hora. Las alícuotas se corrieron en un gel de acrilamida al 15%, y se observó mediante tinción de azul de Coomassie (Figura 18A).

Para corroborar que era la proteína correcta, se realizó un *Western Blot*, para detectar el *tag* de Histidinas, y revelarlo en una placa, lo cual se logró y se muestra en la Figura 18B.

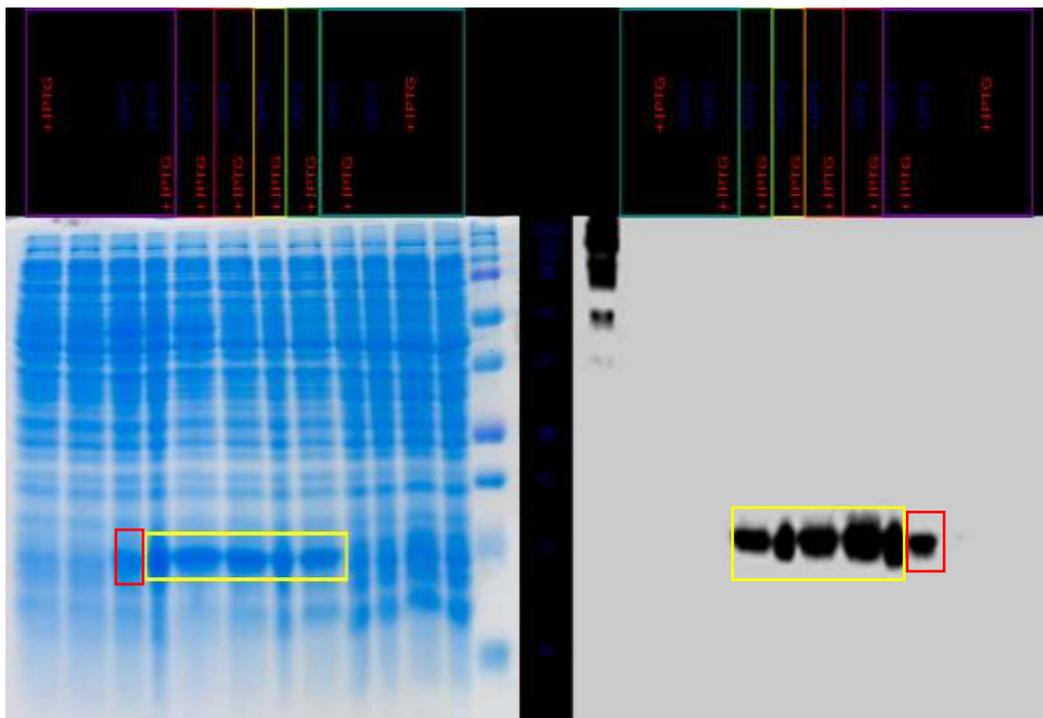
A.**B.**

Figura 18. Sobreexpresión del ORF2_6xHis. A. SDS-PAGE al 15% teñido con Azul de Coomassie. El tamaño esperado de la proteína es de 16254.33 D, determinado por la plataforma: *Compute pI/Mw ExPASy*. B. Western Blot, usando el anticuerpo que reconoce el tag de 6 Histidinas. Señalado en amarillo esta la sobreexpresión de la proteína durante 3 horas con IPTG, y en rojo la sobreexpresión de la proteína, a pesar de la ausencia del inductor, debido a la fuga transcripcional del promotor.

Purificación de la proteína ORF2_6xHis

La proteína se purificó mediante columnas usando Ni-NTA QIAGEN (Figura 20A).



Figura 19. Purificación de la proteína ORF2_6xHis. SDS-PAGE al 15% teñido con Nitrato de plata.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La gran diversidad de fagos se puede ilustrar con la alta frecuencia de nuevos genes encontrados en genomas fágicos recién caracterizados. Los genes que carecen de homología con otros genes o familia de genes ya descritos en otros organismos, se han denominado ORFans y representan un gran reto para el estudio de la biología molecular de los bacteriófagos (Tautz & Domazet-Lošo, 2011).

Desde el inicio de la infección los bacteriófagos deben de establecer un ambiente favorable para la producción de las partículas víricas, además de anticiparse y contraatacar los mecanismos de defensa de la bacteria (Labrie, et al., 2010).

Los fagos intervienen en una gran variedad de procesos globales de la célula hospedera, que involucran interacciones proteicas. Sin embargo, muchas de estas no tienen un efecto significativo en la bacteria hospedera, contrario a algunas otras que pueden llevar a arresto del ciclo celular e incluso a letalidad bacteriana.

Estudios previos han demostrado, que las proteínas de expresión temprana de los fagos líticos interactúan con proteínas de la bacteria para redireccionar el metabolismo de ésta hacia el del fago. Además de que muchas de estas proteínas fágicas tempranas, una vez sobreexpresadas, están relacionadas a una inhibición en el crecimiento de la bacteria hospedera (Kashlev, et al., 1993; Nechaev & Severinov, 1999; Orsini, et al., 2013; Lui et al., 2014; Wagemans, et al., 2014; Van den Bossche, 2014; Wagemans, et al., 2015).

Los 4 ORF's que corresponde a la región temprana del PaMx41, no tienen homólogos a nivel de secuencia nucleótidos, ni de aminoácidos ni estructural,

por lo que es interesante el estudio de éstos para tratar de dilucidar la función que cumplen durante la infección a la bacteria, ya que podría tratarse de una forma diferente de redireccionar el metabolismo bacteriano para favorecer al fago, a las ya reportadas.

La región temprana del fago PAMx41 contiene 4 genes, de los cuales se escogieron para trabajar solo los ORF's 3 y 2, ya que están contenidos en el transcrito que sólo se expresa durante los primeros 15 minutos de la infección, a diferencia del ORF1, que se sigue expresando durante toda la infección del fago. Dentro de los genes tempranos, también se encuentra el ORFa, sin embargo este ORF no está presente en todos los fagos del grupo al que pertenece PaMx41, por lo que si se pretende dilucidar el mecanismo de la infección temprana en general, éste gen accesorio se dejó a un lado, para solo estudiar a los primeros dos ORF's.

El primer ORF que se estaría expresando es el ORF3, por lo que se decidió clonarlo en el vector de transición pJET, sin embargo desde el inicio, este gen presentó dificultades para la clonación. Inicialmente se transformó la reacción de ligación entre pJET y el fragmento, y se analizaron las candidatas, sin embargo el número de candidatas que se obtenían siempre eran muy pocas (no más de 10 candidatas por caja), y las pocas que se obtenían no tenían el fragmento de interés, por lo que se analizó la secuencia de pJET1.2 (Figura 6), y se encontró que *upstream* del inicio del gen *eco471R*, hay un promotor *placUV5*, entonces si el ORF3 entraba en marco y en la dirección correcta, la presencia del promotor podría estar ocasionando que el ORF3 se expresara; y si de acuerdo a los antecedentes (Wagemans, et al., 2014; Van den Bossche, 2014), los genes tempranos pueden tener un efecto inhibitorio en la bacteria, ésta podría ser la razón principal de que no se obtuvieran las candidatas con la construcción pJET1.2_ORF3.

EL promotor de *lac* es uno de los más usados en biología molecular, sin embargo se sabe que tiene fuga transcripcional, es decir, que la transcripción se lleva a cabo incluso en ausencia del inductor (Penumetcha, et al., 2010). Tomando en cuenta lo anterior, se decidió cambiar la cepa de *E.coli* DH5 α , usada para transformar, por la cepa de *E.coli* XL-1Blue, la cual dentro de su genoma codifica para el represor *lacI^q*, y de esta forma tener un mejor control de la regulación del promotor.

El resultado fue que se obtuvieron un número mucho mayor de candidatas después de la transformación, aproximadamente 100 veces más; y además la mayoría de las colonias tenían el fragmento del tamaño de 210pb que se esperaba. Se analizó la liberación del fragmento mediante restricción enzimática con las enzimas *SacI* y *BamHI* en el DNA plasmídico de las candidatas, y se escogió una para enviarla a secuenciación, los resultados arrojaron que debido a que la clonación no es sitio dirigida, el ORF3, había entrado en dirección contraria con respecto al promotor *placUV5*, lo que reafirmaba la hipótesis de que solo las clonas que no expresan el ORF3 son las capaces de crecer.

Para reafirmar un tanto la teoría de que el ORF3 estaba afectando el crecimiento de *E. coli*, se decidió hacer uso del promotor pT7, que también está dentro de la secuencia de pJET1.2/blunt, pero que se encuentra en sentido inverso, con respecto al otro promotor *placUV5*, este promotor tiene una mejor represión, ya que de no haber la T7 RNA polimerasa no se enciende, para usar este promotor pT7, el plásmido con la construcción pJET1.2_ORF3, se transformó en la cepa de *E.coli* BL21Star, la cual, bajo un promotor *lac*, codifica y expresa la T7 polimerasa, una vez que se adiciona IPTG como inductor.

Con la construcción dentro de esta bacteria se realizó una curva de crecimiento, para ver qué es lo que pasaba cuando se inducía la expresión del

ORF3, y se vio que el crecimiento de la bacteria con la construcción pJET1.2/blunt, era más lento o se retrasaba en comparación con el de la bacteria sin esta construcción.

A pesar de que éste resultado, puede ser un indicio, de que el ORF3 es un gen relativamente tóxico para *E. coli*, sin ser esta bacteria la célula hospedera natural del fago, se requiere de un sistema más limpio que corrobore esta idea, porque, para empezar pJET1.2/blunt no es un sistema de expresión, además de que la inducción de la T7 polimerasa se hace con IPTG, mismo inductor que requiere el promotor *placUV5*, propio de pJET1.2, el cual pudiera estar generando un RNAm antisentido, que esté aminorando la toxicidad revelada en la curva de crecimiento.

Una vez con la construcción pJET1.2_ORF3, se prosiguió a subclonarlo en el vector de transición pPROEX-1, sin embargo este vector es inducido por un promotor pTrc, el cual es un híbrido entre los promotores Trp y *lacUV5*. A pesar de los intentos de clonación en *E. coli* XL-1 Blue, hasta la fecha no se ha logrado obtener candidatas. Buscando un vector de expresión con un mejor control de la represión, se intentó subclonarlo en pHERD30T, regulado por el promotor *pBAD*, el cual tiene menor fuga transcripcional, sin embargo, la única clona que se pudo obtener, tenía el fragmento del ORF3 insertado en una región fuera del sitio múltiple de clonación, por lo que no es funcional para los objetivos de este trabajo. Por lo que se sugiere la búsqueda de un sistema adecuado para la clonación y estudio de éste ORF aparentemente tóxico para la bacteria.

Por otro lado el ORF2, que es el segundo en expresarse, no presentó los problemas que mostró el ORF3, desde el inicio la clonación se pudo lograr en *E. coli* DH5 α , sin embargo se cambió a XL-1Blue, para trabajar con la misma cepa, y para tener una represión mejor controlada.

Cuando se analizó la secuencia del plásmido con la construcción pJET1.2_ORF2, se observó que también había entrado en sentido, con respecto al promotor pT7, por lo que también se transformó en BL21Star, y se indujo la expresión con IPTG, sin embargo a diferencia de la construcción con el ORF3, la bacteria con la construcción pJET1.2_ORF2, no tenía efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli*, una vez que se inducía su expresión por el promotor pT7.

Otra diferencia del ORF2, con respecto al ORF3, es que el ORF2, en el primer intento de subclonación en el vector de expresión pPROEX-1, se obtuvieron candidatas, de las cuales se analizó la candidata 8, y tras secuenciarla se conformó la integridad de la construcción pPROEX_ORF2, y se verificó que la secuencia desde el promotor, pasando por el *tag* de histidinas, el codón de inicio del ORF2 y el codón de paro, no tuviera alteraciones.

Ya que la secuencia era la correcta, se prosiguió a expresar el ORF2, y tras realizar una curva de crecimiento, se pudo observar que la sobreexpresión del ORF2_6xHis no tiene efecto en el crecimiento de *E. coli*.

Mediante geles de acrilamida y Western Blot se analizó la expresión de la proteína ORF2_6xHis, y ésta se purificó mediante el uso de columnas con Ni-NTA agarosa. Ya que la purificación no es lo más limpia posible, debido a que co-purifican otras proteínas, se debe mejorar o buscar otras técnicas que permitan eliminar las proteínas que no son de interés.

Finalmente, como ya otros autores han reportado (Wagemans, et al., 2014; Van den Bossche, 2014), el que la proteína no sea tóxica en *E. coli*, no implica necesariamente que tampoco lo vaya a ser en *P. aeruginosa*, para lo cual es necesario clonar el ORF2 en un vector que pueda ser transformado en *P. aeruginosa*. Sin embargo, las clonaciones en *P. aeruginosa* presentan inconvenientes con respecto a las de *E. coli*, no solo por la naturaleza y

complejidad propia de la bacteria, sino que además no se cuenta con los vectores suficientes para la clonación en esta bacteria, sobre todo tratándose de genes tóxicos, por lo que es importante seguir buscando un sistema adecuado para éste fin.

IX. CONCLUSIONES

- Se clonó el ORF2 en el vector pPROEX-1 y se observó que su sobreexpresión, no tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli*, lo que permite la sobreexpresión y purificación de la proteína heteróloga.
- El ORF3 se clonó en el vector pJET1.2/blunt, usando el promotor de la T7 RNA polimerasa para la transcripción del inserto, se observó un retraso en el crecimiento celular de *E. coli*.
- Las dificultades para clonar el ORF3 en los vectores de expresión sugiere que este gen podría ser tóxico inclusive para *E. coli*, que no es la célula hospedera natural del fago PaMx41.
- Se requiere de un sistema con una represión muy controlada para clonar el ORF3 del fago PaMx41, y poder analizar el efecto de su sobreexpresión, así como las interacciones que este tiene en con las moléculas de *P. aeruginosa*, para poder asignarle una función a este gen hasta ahora todavía considerado ORFan.
- El que la sobreexpresión del ORF2 no tenga efecto en el crecimiento de *E. coli*, no descarta la posibilidad de que si lo tenga en *P. aeruginosa*, ya que podría ser un mecanismo totalmente diferente y único para esta bacteria.
- Dado que solo se analizó el efecto de la sobreexpresión en el crecimiento, se requiere de más análisis para identificar la función putativa de la proteína del ORF2 en su célula hospedera *P. aeruginosa*.

X. PERSPECTIVAS

- Clonar el ORF3 en un vector con una represión mejor controlada.
- Sobreexpresar el ORF3 y analizar el efecto que tiene en el crecimiento de *P. aeruginosa*, y en *E. coli*.
- Buscar o diseñar un vector que permita la clonación de genes tóxicos en *P. aeruginosa*.
- Identificar y caracterizar las proteínas que interaccionan con el ORF2 y el ORF3, mediante ensayos de *Pull-Down*, para poder dilucidar la posible función de estas proteínas en el ciclo de infección del fago.

XI. REFERENCIAS

- Ainsworth, S., Zomer, A., Mahony, J. & van Sinderen, D., 2013. Lytic Infection of *Lactococcus lactis* by Bacteriophages Tuc2009 and c2 Triggers Alternative Transcriptional Host Responses. *Appl Environ Microbiol*, Aug, 79(16), pp. 4786-98.
- Ceyssens, P.-J. R. L., 2010. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future Microbiol*, Jul, 5(7), pp. 1041-55.
- Drulis-Kawa, Z. y otros, 2012. Learning from Bacteriophages - Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Applications. *Curr Protein Pept Sci*, Dec, 13(8), pp. 699-722.
- Haüser, R. y otros, 2012. Bacteriophage Protein–Protein Interactions. En: *Advances in Virus Research*. s.l.:s.n., pp. 219-276.
- Kashlev, M. y otros, 1993. Bacteriophage T4 Alc Protein: A Transcription Termination Factor Sensing Local Modification of DNA. *Cell*, 75(1), pp. 147-54.
- Labrie, S. J., Samson, J. E. & Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, May, 8(5), pp. 317-27.
- Lavigne, R. y otros, 2013. A Multifaceted Study of *Pseudomonas aeruginosa* Shutdown by Virulent Podovirus LUZ19. *MBio*, 4(2), pp. 1-8.
- Liu, J. y otros, 2004. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol.*, 22(2), pp. 185-91.
- Nechaev, S. & Severinov, K., 1999. Inhibition of *Escherichia coli* RNA Polymerase by Bacteriophage T7 Gene 2 Protein. *J. Mol. Biol.*, 289(4), pp. 815-826.
- Orsini, G., OUHAMMOUCH, M., LE CAER, J.-P. & BRODY, E. N., 2013. The *asiA* Gene of Bacteriophage T4 Codes for the Anti-sigma70 Protein. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 15(1), pp. 85-93.
- Penumetcha, P. y otros, 2010. Improving the Lac System for Synthetic Biology. *Bios*, 8(1), pp. 7-15.
- Salmond, G. P. & Fineran, P. C., 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol*, Dec, 13(12), pp. 777-86.
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Mourad, S. & Sylvain, M., 2013. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol.*, 11(10), pp. 675-87.

Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L. & Guarneros, G., 2012. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages.. *Appl Environ Microbiol*, Jun, 78(12), pp. 4510-5.

Tautz, D. & Domazet-Loso, T., 2011. The evolutionary origin of orphan genes. *Nat Rev Genet*, Oct, 12(10), pp. 692-702.

Van den Bossche, A. y otros, 2014. Systematic Identification of Hypothetical Bacteriophage Proteins Targeting Key Protein Complexes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Proteome Res*, 3 Oct, 13(10), pp. 4446-56.

Wagemans, J. y otros, 2014. Functional elucidation of antibacterial phage ORFans targeting *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Microbiol*, Dec, 16(12), pp. 1822-35.

Wagemans, J. y otros, 2015. Antibacterial phage ORFans of *Pseudomonas aeruginosa* phage LUZ24 reveal a novel MvaT inhibiting protein. *Front Microbiol*, Noviembre, 6(01242), p. 1242.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Medios y soluciones.

Medios

- Medio LB: 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl. Agregar 20 g agar cuando se preparan cajas. Llevar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.
- SOB: 20 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 10 ml KCl 250 mM. Esterilizar con autoclave.
- TMG: 11.7 g NaCl, 1 g gelatina, 1 ml tris HCl 1 M a pH 8.0, 0.5 ml MgSO₄ 1 M. Ajustar el pH a 7.4 con KOH. Esterilizar con autoclave.
- TØ suave: 10 g bacto-triptona, 10 g agar, 2.5 g NaCl, 2 ml NaOH 2 M. Agregar 1 ml MgSO₄ 1 M cuando se preparen cajas. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.

Preparación de células quimiocompetentes

- Solución TfbI: 3 ml KOAc 5 M, 6g RbCl₂, 5 ml CaCl₂ 1 M, 12.5 ml MnCl₂*4H₂O 2 M, 75 ml glicerol al 100%. Ajustar pH a 5.8 con ácido acético. Esterilizar por filtración.
- Solución TfbII: 1 g MOPS, 37.5 ml CaCl₂ 1 M, 10 ml RbCl₂ 0.5 M, 75 ml glicerol al 100%. Ajustar pH a 6.5-6.8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

Electroforesis

- Buffer stock TAE 50X: 242 g tris, 57.1 ml ácido acético, 100 ml EDTA 0.5 M pH 8.0. Llevar a un litro con agua destilada.

Enriquecimiento de proteínas

- Solución stock tris-HCl 1 M pH 8.0: 60.57 g tris pH 8.0. Llevar a 500 ml con agua milli Q (ajustar el pH a 8.0 con HCl). Esterilizar por filtración.

- Solución stock NaCl 5 M: 146.1 g NaCl. Llevar a 500 ml con agua milli Q. Esterilizar por filtración.

El volumen de las siguientes soluciones va a depender del número de muestras a tratar y se preparan al momento de usar a partir de los stocks arriba mencionados. Los siguientes cálculos están ajustados para el volumen requerido en este trabajo:

- Buffer de lisis: 1.5 ml tris-HCl 1M pH 8.0, 3 ml NaCl 5 M, 150 μ l Tritón X-100, 21.43 μ l β -mercaptoetanol, 1.5 ml glicerol 100%, 0.02 g imidazol. Llevar a 30 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de equilibrio: 2.5 ml tris-HCl 1 M pH 8.0, 5 ml NaCl 5 M, 25 μ l Tritón X-100, 2.5ml glicerol 100%. Llevar a 50 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de lavado: 25 ml tris-HCl 1 M pH 8.0, 50 ml NaCl 5 M. Llevar a 500 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de elución: 50 ml de buffer de lavado, 1.02 g imidazol.

Gel de proteínas

- Monómeros (49.5%T, 3%C): 48 g de acrilamida, 1.5 g de bis-acrilamida. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril. Filtrar y guardar a 4°C en frasco ámbar.
- Buffer gel: 36.4 g tris, 3 g SDS. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.45 con HCl). Filtrar y guardar a 4°C.
- Buffer cátodo: 12.22 g tris, 17.92 g tricina, 1 g SDS. Llevar a un litro con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.25 con NaOH).
- Buffer ánodo: 24.2 g tris. Llevar a un litro con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.9 con HCl).
- Buffer de lisis para proteínas: 2.5 ml tris-HCl 0.125 M pH 6.8, 4 ml SDS 10%, 2 ml glicerol, 1 ml β -mercaptoetanol. Llevar a 10 ml con agua destilada estéril.

- Solución de tinción: 0.125 g Coomassie Blue R-250, 200 ml metanol, 3.5 ml ácido acético. Mezclar antes el Coomassie Blue R-250 con el metanol durante 5 min. Llevar a 500 ml con agua destilada.
- Solución para desteñir: 50 ml metanol, 35 ml ácido acético. Llevar a 500 ml con agua destilada.

Tinción con Nitrato de Plata

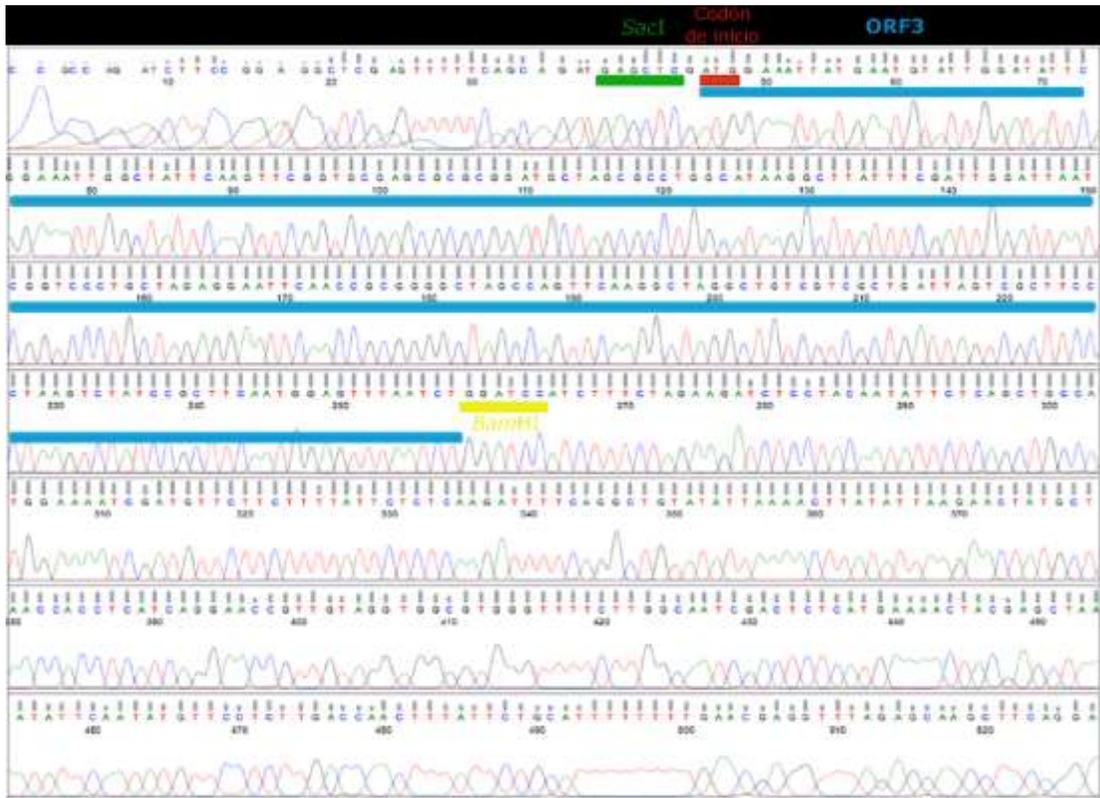
- Solución Fijadora: 50% metanol, 10% ácido acético, acetato de amonio 100 mM.
- Solución desarrolladora: 2% carbonato de sodio anhidro, 0.036% formaldehído.

Western blot

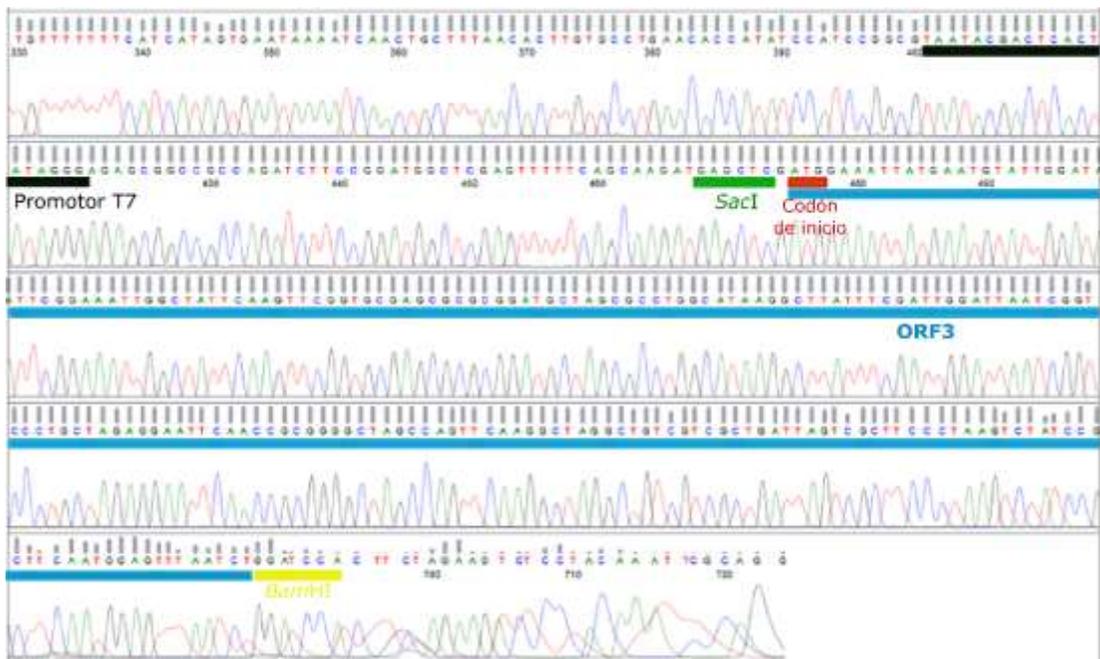
- Buffer de transferencia: 100 ml tank buffer, 200 ml metanol. Llevar a un litro con agua destilada.
- Tank buffer: 12 g tris, 57.6 g glicina, 40 ml de SDS al 10%. Llevar a un litro con agua destilada. No es necesario medir el pH.
- Stock TBS 10X: 6.05 g Tris, 8.76 g NaCl. Llevar a un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7.6 con HCl 1 M.
- TBS-T 0.05%: 50 ml stock TBS 10X, 1 ml Tween 20. Llevar a 500ml con agua destilada.

Anexo 2. Electroferogramas de la construcción pJETORF3pproex

pJETORF3pproex_PrimerForward (cadena complementaria)

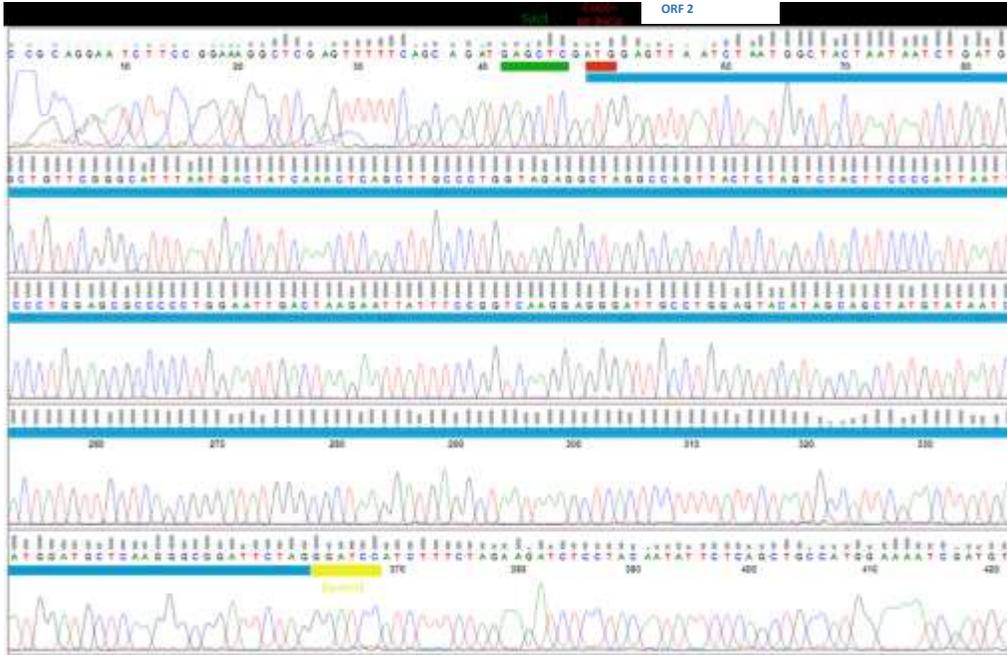


pJETORF3pproex_PrimerReverse

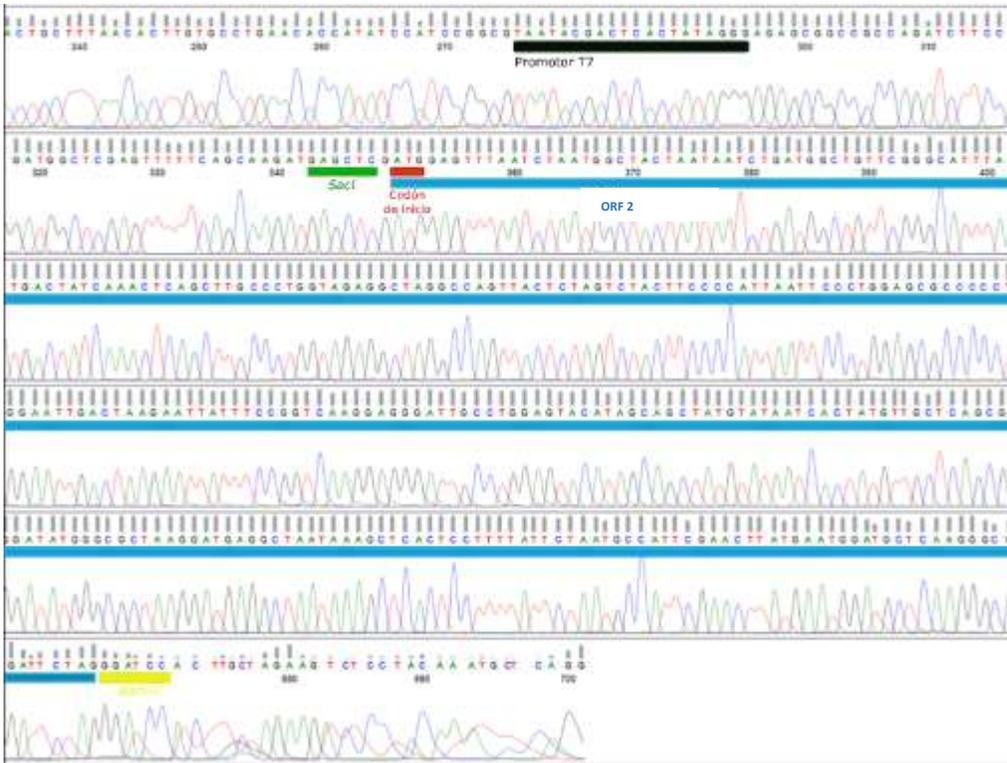


Anexo 3. Electroferogramas de la construcción pJETORF2pproex

pJETORF2pproex_PrimerForward (cadena complementaria)

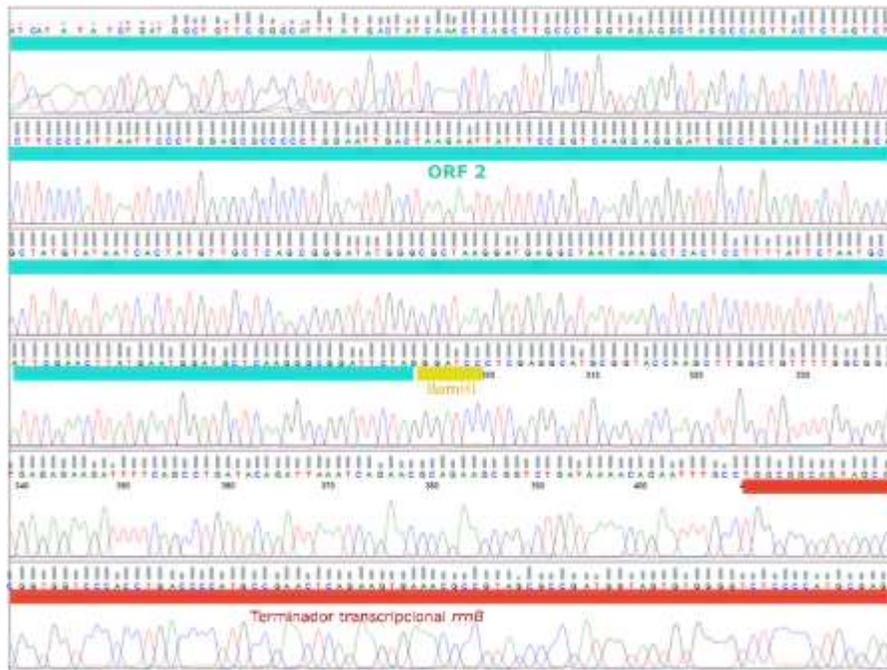


pJETORF2pproex_PrimerReverse



Anexo 4. Electroferogramas de la construcción pPROEXORF2

pPROEXORF2_PrimerForward



pPROEXORF2_PrimerReverse (Cadena complementaria)

