



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización del gen *g2* del fago H70 de *Pseudomonas aeruginosa*
como anti-CRISPR

TESIS

Que presenta

BIÓL. ANA ISABEL DE LA CRUZ CRUZ

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Director de la tesis: Dr. Gabriel Guarneros Peña

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

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 Estudio Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo de agosto de 2013 a septiembre de 2015 (número de becario 552832).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y ser mi tutor.

A la Dra. Rosa Ma. Bermúdez y al Dr. Luis Kameyama por sus valiosos consejos y brindarme su apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Eva Jacinto, al M. en C. Marco Magos y al Dr. José Bueno por compartirme su experiencia y conocimiento.

A todos mis compañeros y amigos (Sandy, Enith, Yuri, Iraís, Vero, Víctor, Marco, Adrián, Dany, Rodo, Gerardo, Rick, Paco) de laboratorio, muchas gracias por su apoyo, por siempre estar dispuestos a ayudarme, por los bonitos recuerdos que generamos.

A mis compañeros y amigos de generación. En especial agradezco a Alejandra, Saida, Nelby y Elías por ser muy buenos amigos, los quiero.

A la secretaria Gabriela Mora, por su apoyo a los alumnos del departamento.

A la Sra. Lidia y al Sr. Pablo por abrirme las puertas de su casa y cuidar bien de mí.

DEDICATORIAS

A mi Señor Jesucristo porque tú eres quien abre puertas. Te agradezco porque nunca me has abandonado y me has ayudado a sobrellevar lo difícil y solitario que es estar lejos de casa. Por tu infinito amor hacia mí, muchas gracias.

A mi familia, en especial a mi mamá Isabel Cruz Josefa. Gracias por creer siempre en mí y por ser mi mayor fuerza. Eres un gran ejemplo a seguir, por ti he llegado tan lejos. No me alcanzaría toda la vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Dios te bendiga siempre.

A mi persona favorita, Erick A. Castillo Terrés. Te conocí en esta etapa y ya te has convertido en alguien muy importante para mí. Tu alegría, positivismo y calidez me fueron de mucha ayuda cuando las cosas no salían bien. Estoy agradecida porque has llenado de tantos matices mi mundo. Eres lo mejor que me ha pasado en la vida. Te amo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
ÍNDICE DE ANEXOS.....	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT	V
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Bacteriófagos.....	1
1.2 Mecanismos de defensa bacteriana y contra-defensa de los fagos durante el proceso de infección fágica.	2
1.2.1 Inhibición de la adsorción.....	3
1.2.2 Inhibición de la entrada de DNA.	3
1.2.3 Inhibición del secuestro del hospedero.....	4
1.2.4 Inhibición de la maduración y lisis.	4
1.3 Sistema CRISPR/Cas.	5
II. ANTECEDENTES	10
2.1 Sistemas CRISPR/Cas de <i>P. aeruginosa</i>	10
2.1.1 Cepa PA14 de <i>P. aeruginosa</i>	11
2.2 Genes anti-CRISPR en fagos de <i>P. aeruginosa</i>	12
2.3 Mecanismos de las proteínas anti-CRISPR para inhibir el sistema CRISPR/Cas.	14
2.4 Fagos Mu- <i>like</i> del laboratorio GBM-L3.....	15
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Cepas.	20
6.2 Bacteriófagos.....	20
6.3 Plásmidos.....	20

6.4 Oligonucleótidos.	21
6.5 Tapiz bacteriano.	21
6.6 Obtención del título de un fago.....	22
6.7 Preparación de <i>stock</i> de fagos.	22
6.8 Construcción de lisógenas.	23
6.9 Extracción de DNA bacteriano.....	23
6.10 Extracción de plásmido.....	24
6.11 Preparación de células electrocompetentes de <i>P. aeruginosa</i>	25
6.12 Preparación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i>	25
6.13 Electroporación en <i>P. aeruginosa</i>	25
6.14 Transformación química en <i>E. coli</i>	26
6.15 Geles de agarosa y electroforesis.	26
6.16 Purificación de bandas de gel de agarosa.	26
6.17 Clonación de <i>g2</i> y <i>4HISg2</i> en pJET1.2/blunt.	27
6.18 Mutagénesis sitio-dirigida para la modificación del plásmido pUCP24.....	30
6.19 Clonación de <i>g2</i> y <i>4HISg2</i> en pUCP24 y pUCP24-L3.....	32
6.20 Secuenciación de DNA.....	34
6.21 Ensayos de eficiencia de plaqueo.	35
6.22 Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas.....	35
6.23 Concentración de muestras de proteína.....	37
6.24 Diálisis de las muestras.....	37
6.25 Gel de acrilamida Tris-tricina para proteínas.	38
6.26 Tinción con Coomassie.	39
6.27 Western blot.	39
VII. RESULTADOS.....	41
7.1 Análisis del fenotipo anti-CRISPR de los fagos H70 y PaMx73.....	41
7.2 Inhibición del sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 por el fago H70.....	42
7.2.1 Construcción de lisógenas en PA14.....	42
7.2.2 Ensayos de eficiencia de infección del fago JBD18.	44
7.3 Inhibición del sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 mediante el gen anti-CRISPR putativo (<i>g2</i>) del fago H70.....	45
7.3.1 Clonación del ORF <i>g2</i> en un vector de expresión.	45

7.3.2 Demostración de la expresión de la proteína g2.....	52
7.3.3 Ensayos de infección del fago JBD18.....	56
7.4 Análisis <i>in silico</i> de g2.....	57
VIII. DISCUSIÓN	60
IX. CONCLUSIONES.....	65
X. PERSPECTIVAS	66
REFERENCIAS	67
ANEXOS.....	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desarrollo lítico y los sistemas anti-fago de la bacteria.....	2
Figura 2. Modo de acción los sistemas CRISPR/Cas	8
Figura 3. Organización del sistema CRISPR/Cas subtipo I-F de <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 4. Formación del complejo Csy de <i>P. aeruginosa</i>	12
Figura 5. Comparación del <i>locus</i> anti-CRISPR de fagos <i>Mu-like</i> y clasificación de las proteínas anti-CRISPR	13
Figura 6. Modelo de los mecanismos anti-CRISPR.....	15
Figura 7. ORFs en la región anti-CRISPR de los fagos H70 y PaMx73	16
Figura 8. Comparación de genomas de fagos H70, PaMx73 y JBD30	42
Figura 9. Comprobación de lisógenas en PA14	43
Figura 10. Inhibición del sistema CRISPR/Cas de PA14 mediada por el profago H70	44
Figura 11. Clonación de <i>g2</i> en el vector pJET1.2	46Error! Bookmark not defined.
Figura 12. Secuencia de la construcción pJET/ <i>g2</i>	46
Figura 13. Clonación de <i>g2</i> en el vector plasmídico pUCP24.....	48
Figura 14. Secuencia de la construcción pUCP24/ <i>g2</i>	49
Figura 15. Modificación del plásmido pUCP24.....	50
Figura 16. Clonación de <i>g2</i> en pUCP24-L3	51
Figura 17. Secuencia de <i>g2</i> en pUCP24-L3.	52
Figura 18. Clonación de <i>4HISg2</i> en pJET1.2.....	53
Figura 19. Construcción del vector pUCP24-L3/4HISg2.....	54
Figura 20. Secuencia de la construcción pUCP24-L3/4HISg2.	54
Figura 21. Expresión de la proteína 4HISg2 en <i>E.coli</i>	55
Figura 22. Inhibición del sistema CRISPR/Cas de PA14 mediada por el gen <i>g2</i> del fago H70	56Error! Bookmark not defined.
Figura 23. . Comparación de la región río arriba del gen <i>g2</i> de H70 con las versiones más largas de <i>g2</i>	57
Figura 24. Comparación de proteínas anti-CRISPR I-F.....	58
Figura 25. Comparación de las proteínas <i>g2</i> y AcrF5.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de <i>primers</i> utilizados en este trabajo	21
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Medios y soluciones.....	73
ANEXO 2. Electroferograma de la construcción pJET/g2.....	77
ANEXO 3. Electroferogramas de la construcción pUCP24/g2	78
ANEXO 4. Electroferogramas de la construcción pUCP24-L3	79
ANEXO 5. Electroferogramas de la construcción pUCP24-L3/g2	80
ANEXO 6. Electroferogramas de la construcción pUCP24-L3/4HISg2	81
ANEXO 7. Alineamientos entre AcrFs con PRALINE	82

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ACR	Anti-CRISPR
AcrF	Familia anti-CRISPR
APS	Persulfato de amonio
A-T	Adenina-timina
BLAST	Herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales
Cas	Asociado a CRISPR
Cascade	Complejo asociado a CRISPR para la defensa antiviral
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas
CR/Cas	CRISPR/Cas
crRNA	RNA derivado de la región CRISPR
crRNP	Complejo ribonucleoproteico CRISPR
Csy	CRISPR subtipo <i>Yersinia</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
D.O.	Densidad óptica
dsDNA	DNA de doble cadena
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G-C	Guanina-citosina
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
PAM	Motivo adyacente al protoespaciador
PBS	Albúmina sérica bovina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pth	Peptidil-tRNA hidrolasa
PRALINE	Perfil de alineamiento
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RBS	Sitio de unión a ribosoma
pb	Pares de bases
R-M	Restricción-modificación
ssRNA	RNA de cadena sencilla
sp	espaciador
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamina
tracrRNA	RNA transactivador
UFP	Unidades formadoras de placa
Δ	Delección

RESUMEN

Muchas bacterias poseen un sistema que proporciona inmunidad contra la invasión de elementos genéticos móviles tales como virus y plásmidos. Este sistema consiste en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, por sus siglas en inglés) y proteínas asociadas a CRISPR (Cas, por sus siglas en inglés). Sin embargo, un mecanismo de los fagos para contrarrestar el sistema inmune bacteriano es a través de genes denominados anti-CRISPR, los cuales codifican inhibidores proteicos del sistema CRISPR/Cas. Todos los genes con actividad anti-CRISPR se han encontrado en el genoma de fagos Mu-like de *P. aeruginosa* en una región accesoria (*locus* anti-CRISPR). Estos elementos han sido identificados en números variables y en diferentes combinaciones pero siempre seguidos de un gen que no parece poseer actividad anti-CRISPR (*g9*). Cuando el genoma de H70, un fago Mu-like aislado en nuestro laboratorio a partir de una cepa clínica, fue comparado con los genomas de fagos similares de las bases de datos, se encontró que en un putativo *locus* anti-CRISPR porta al ORF *g2*. A pesar de no compartir identidad de secuencia de nucleótidos con otros genes anti-CRISPR, su posición sugirió que el ORF *g2* de H70 codifica una proteína con función anti-CRISPR. Este trabajo sustentó esta inferencia mediante tres observaciones: 1) H70 infectó a la cepa PA14 de *P. aeruginosa*, a pesar de presentar el sistema CRISPR/Cas que excluye fagos sensibles, 2) La lisógena PA14(H70) permitió la infección de JBD18, un fago sensible al sistema CRISPR/Cas de PA14, y 3) El gen *g2* clonado en el plásmido pUCP24-L3 es capaz de conferir el fenotipo anti-CRISPR. Adicionalmente, por búsquedas bioinformáticas homólogos de *g2* fueron identificados en un fago y cinco profagos de *P. aeruginosa*, y podrían existir versiones más largas de la proteína *g2*. Por otra parte, un análisis basado en la estructura secundaria de *g2* con otras proteínas anti-CRISPR demostró que hay cierta conservación en las posiciones de ciertos residuos de aminoácidos. Este trabajo demostró la presencia de un gen anti-CRISPR novedoso en el genoma de H70 cuyo mecanismo será interesante de elucidar.

Palabras clave: fago, profago, CRISPR/Cas, anti-CRISPR, cepa PA14.

ABSTRACT

Many species of bacteria have a system that provides immunity against invading mobile genetic elements such as viruses and plasmids. This system consists of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated (Cas) proteins. However, a phage mechanism to counteract the bacterial phage immune system is by genes called anti-CRISPR, which encode protein inhibitors of the CRISPR/Cas system. All genes with anti-CRISPR activity have been found in the genome of Mu-like phages of *Pseudomonas aeruginosa* in an accessory region (anti-CRISPR *locus*). These elements have been identified in several numbers and in different combinations but always followed by a gene that does not seem to possess anti-CRISPR activity (*g9*). When the genome of H70, a Mu-like phage isolated in our laboratory from a clinical strain, was compared to similar phage genomes from databases, it was found that their putative anti-CRISPR *locus* carries the ORF *g2*. Despite not sharing identity at nucleotide level with other anti-CRISPR genes, its position suggested that ORF *g2* encodes a protein with anti-CRISPR function. This work supported this inference by three observations, 1) H70 infected *P. aeruginosa* strain PA14 despite presenting the CRISPR/Cas system that excludes sensitive phages, 2) The lysogen PA14(H70) allowed the infection of JBD18, a PA14 CRISPR/Cas sensitive phage, and 3) The gene *g2* cloned into the plasmid pUCP24-L3 is capable of conferring the anti-CRISPR phenotype. Additionally, by bioinformatic searches, *g2* homologs were identified in phages and prophages of *P. aeruginosa* and there may be longer versions of the *g2* protein. Moreover, an analysis based on the secondary structure of *g2* with other anti-CRISPR proteins showed that there is some conservation in the positions of their residues. This work demonstrated the presence of a novel anti-CRISPR gene in the genome of H70 which mechanism will be interesting to elucidate.

Keywords: phage, prophage, CRISPR/Cas, anti-CRISPR, PA14 strain.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacteriófagos.

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan exclusivamente bacterias. Más del 96% de los fagos conocidos pertenecen al orden de los *Caudovirales*, cuyo material genético es DNA de doble cadena y se caracterizan por tener cola o cauda. Éstos a su vez pueden ser clasificados en tres familias: *Podoviridae* (fagos con cola corta), *Myoviridae* (fagos con cola larga y contráctil) y *Siphoviridae* (fagos con cola larga no contráctil) (Ackermann, 1998; Fokine & Rossman, 2014).

A nivel global, los fagos superan en número a las bacterias en una relación 1:10 (Brüssow & Hendrix, 2002; Ackermann, 2007). Dicha cifra supone una fuerte presión de selección por parte de los fagos sobre las bacterias, llevando a ambas partes a una constante carrera evolutiva (Stern & Sorek, 2011). En consecuencia, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de defensa contra la infección de los fagos, mientras que los fagos han evolucionado para contraatacar dichos mecanismos (Wiedenheft, 2013).

La importancia de las interacciones entre fagos y bacterias radica en el proceso de co-evolución subyacente, mismo que puede impactar la diversidad y abundancia de ambos desde el nivel genómico hasta el de comunidades (Bohannan & Lenski, 2000; Koskella & Brockhurst, 2014).

1.2 Mecanismos de defensa bacteriana y contra-defensa de los fagos durante el proceso de infección fágica.

En cada etapa del desarrollo lítico los fagos se enfrentan a mecanismos de defensa de su hospedero (Figura 1) los cuales se describen brevemente a continuación.

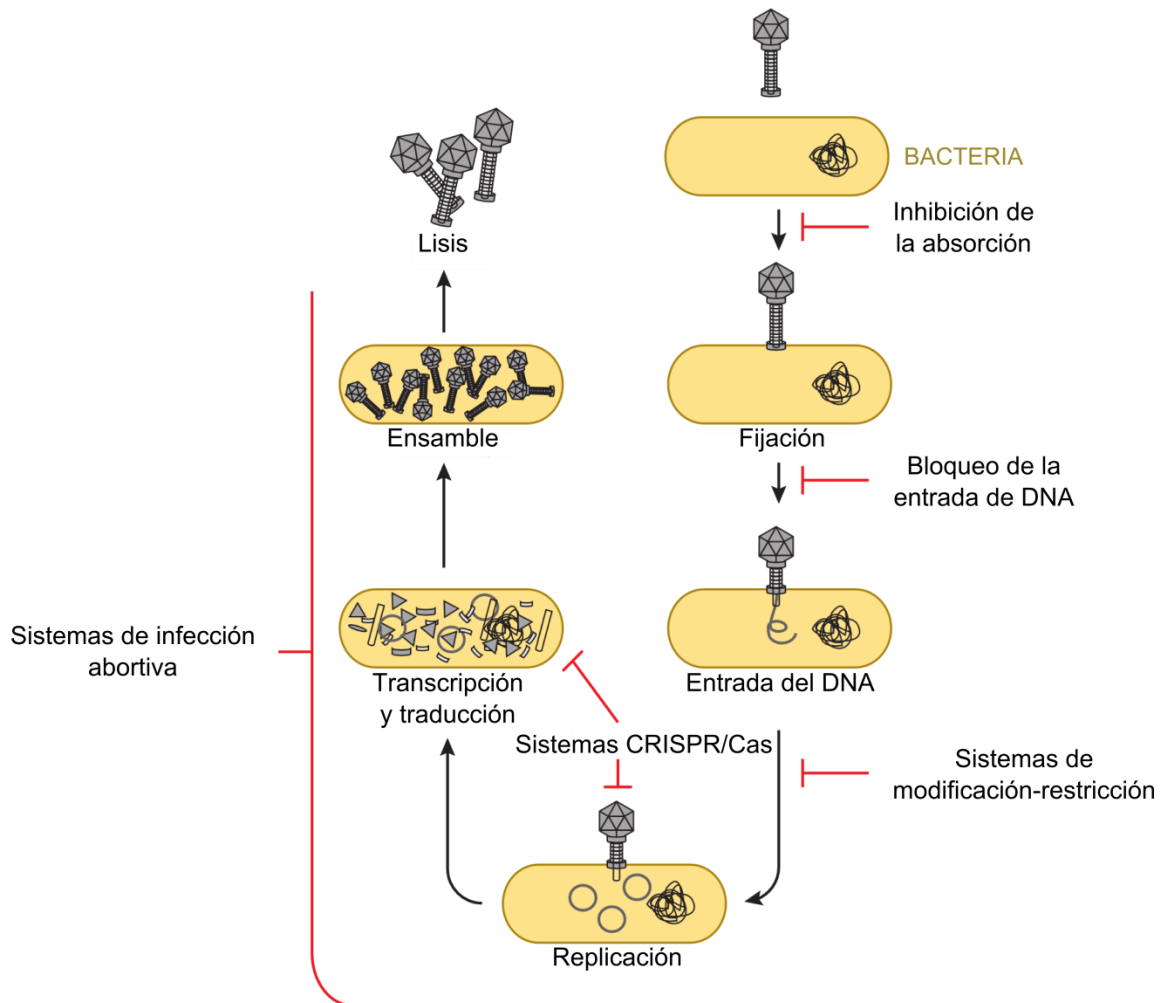


Figura 1. Ciclo de desarrollo lítico y los sistemas anti-fago de la bacteria. La imagen muestra los diferentes pasos del desarrollo lítico de un fago e indica los mecanismos por los cuales la bacteria puede defenderse de la infección en dichas etapas. Tomado y modificado de Dy *et al.*, 2014.

1.2.1 Inhibición de la adsorción.

Para que un fago infecte a una bacteria es necesario el reconocimiento de un receptor bacteriano sobre la membrana externa, en una etapa llamada adsorción (Hyman & Abedon, 2010). Una manera de impedir la adsorción es mediante la pérdida o inactivación del receptor que requiere el fago. Sin embargo, esto puede reducir el *fitness* de la bacteria, por lo que otra opción es modificar el receptor o las estructuras adyacentes en la membrana para ocultarlo. No obstante, existen fagos que tienen éxito aun cuando la bacteria ha modificado dicho receptor. Algunos fagos, mediante la modificación de sus proteínas de unión al receptor, tienen la habilidad de adquirir nuevamente afinidad al receptor de su hospedero. Otra alternativa para evitar la fijación del fago es la producción de una matriz extracelular (Buckling & Brockhurst, 2012). Si los receptores bacterianos están enmascarados por la cápsula u otro exopolisacárido, algunos fagos utilizan enzimas para hidrolizar tales materiales (Samson *et al.*, 2013).

Algunos receptores bacterianos requeridos por ciertos fagos no se expresan a menos que exista un estímulo o condición específica del medio, por ello, los fagos necesitan aumentar la probabilidad de infección y para lograrlo codifican distintas versiones de su proteína de unión a receptor las cuales tienen distintas especificidades (Samson *et al.*, 2013).

1.2.2 Inhibición de la entrada de DNA.

Cuando los fagos logran superar la etapa de adsorción introducen su genoma en el hospedero (Hyman & Abedon, 2010). Para contrarrestar este paso las bacterias impiden la liberación del genoma de fagos específicos. Esta función se realiza mediante proteínas ancladas en la membrana o asociadas a sus componentes, conformando los llamados sistemas de exclusión de superinfección (Labrie *et al.*, 2010). Es de notar que estas proteínas con frecuencia están

codificadas en profagos lo cual indica que este tipo de exclusión se debe a interacción fago-fago más que a una fago-bacteria (Labrie *et al.*, 2010).

1.2.3 Inhibición del secuestro del hospedero.

Una vez introducido el material genético del fago, la bacteria puede degradarlo para evitar la etapa de secuestro del hospedero. Una de las formas de lograrlo es mediante el uso de sistemas de modificación-restricción (R-M) conformados por una enzima que reconoce y restringe secuencias de DNA específicas de aproximadamente 8-10 pb y otro enzima que modifica el DNA del hospedero para protegerlo de la enzima de restricción (Stern & Sorek, 2011). Los fagos pueden tener éxito contra los sistemas R-M debido a que son capaces de modificar, enmascarar o disminuir la cantidad de sitios de restricción en su material genético. Al estimular la enzima de modificación también pueden proteger su DNA, o bien, pueden degradar algún cofactor requerido por las enzimas del sistema R-M (Samson *et al.*, 2013).

Otro sistema ejemplo de defensa bacteriana a este nivel de la infección es el sistema CRISPR/Cas, el cual se describe a detalle en la sección 1.3.

1.2.4 Inhibición de la maduración y lisis.

Durante la etapa de maduración del desarrollo lítico se ensamblan nuevos viriones, los cuales serán liberados al medio mediante la lisis del hospedero (Hyman & Abedon, 2010). Sin embargo, las bacterias poseen sistemas de infección abortiva que la conducen al “suicidio” o muerte celular para evitar el esparcimiento de la infección, resultando beneficiadas las bacterias de su entorno (Stern & Sorek, 2011). Para contrarrestar este sistema de defensa bacteriano los fagos pueden mutar sus genes que son blanco del sistema de infección abortiva. Además, pueden codificar antitoxinas que evitan la muerte de la célula hospedera (Samson *et al.*, 2013).

1.3 Sistema CRISPR/Cas.

El sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated proteins, por sus siglas en inglés) confiere inmunidad “adaptativa” a las bacterias, protegiéndolas contra elementos genéticos foráneos tales como los fagos y plásmidos (Horvath & Barrangou, 2010). Casi la mitad de las bacterias secuenciadas tienen este sistema en su genoma (Grissa *et al.*, 2007), cuyos componentes principales son los genes *cas* y el *locus* o arreglo CRISPR (Westra *et al.*, 2014).

Los genes *cas* codifican proteínas muy diversas que actúan en las etapas de acción del sistema CRISPR/Cas (van der Oost *et al.*, 2014), siendo los genes *cas1-cas6* los más abundantes y conservados en todos estos sistemas (Jansen *et al.*, 2002; Haft *et al.*, 2005). Gracias a la secuenciación de los genes *cas* y a su estudio filogenético, los sistemas CRISPR/Cas se han clasificado en tres tipos (I, II y III) y once subtipos (designados por letras para cada subtipo, IA-F, IIA-C y IIIA-B). La guía principal para dicha clasificación es la filogenia de la proteína más conservada Cas1, y la organización de los operones CRISPR/Cas (Marakova & Koonin, 2015). Cada tipo de sistema CRISPR/Cas tiene una proteína Cas característica: para los tipo I es la nucleasa-helicasa Cas3, para los tipo II es la nucleasa Cas9 y para los tipo III es Cas10, cuya función es aún desconocida (Marakova *et al.*, 2011).

El *locus* CRISPR consta de secuencias repetidas conservadas que se encuentran separadas por secuencias variables llamadas espaciadores. Estos últimos corresponden a pequeños fragmentos (26-72 pb) de DNA homólogos al material genético foráneo que anteriormente invadió a la célula bacteriana y que son denominados protoespaciadores (van der Oost *et al.*, 2014). En general, todos los sistemas CRISPR/Cas tienen tres etapas en común: adaptación, expresión/procesamiento e interferencia (Figura 2).

Durante la etapa de adaptación se adquieren los protoespaciadores para formar parte del *locus* CRISPR como espaciadores. Para ello, se requieren

proteínas Cas con actividad de nucleasa y/o recombinasa, sin embargo, sus funciones precisas en el proceso aún no están esclarecidas (Gasiunas & Sinkunas, 2014; van der Oost *et al.*, 2014). Las fases que se propone suceden durante la adquisición de nuevos espaciadores en el arreglo son: I) fragmentación del material genético invasor, II) selección del nuevo protoespaciador mediante el reconocimiento de una secuencia PAM (Protospacer Adjacent Motif, por sus siglas en inglés), III) procesamiento del pre-espaciador, IV) corte del repetido líder terminal, V) integración del nuevo espaciador y duplicación del primer repetido del arreglo que lo flanquea (van der Oost *et al.*, 2014). El proceso de adquisición requiere de las proteínas Cas1 y Cas2, pudiendo estar involucradas proteínas Cas adicionales en algunos sistemas (Westra *et al.*, 2014).

La etapa de expresión y procesamiento del *locus* CRISPR se presenta cuando un fago infecta a una bacteria en una segunda ocasión. Los *loci* CRISPR son transcritos desde un promotor río arriba en la secuencia líder rica en A-T produciendo un transcrito primario largo denominado pre-crRNA. El transcrito es escindido en sus repetidos, generando pequeños crRNAs que contienen la secuencia espaciadora variable flanqueada por fragmentos repetidos conservados (Gasiunas & Sinkunas, 2014).

En los sistemas I y III, la escisión del pre-crRNA es llevada a cabo por las endoribonucleasas Cas5 y Cas6 (Westra *et al.*, 2014). En los sistemas tipo II, el proceso de escisión involucra la expresión de un crRNA transactivador (tracrRNA), el cual tiene apareamiento de bases con los repetidos en el transcrito pre-crRNA (Deltcheva *et al.*, 2011). Los dúplex resultantes son cortados en las secuencias repetidas por la RNasa III, en una reacción dependiente de la proteína Cas9. El tracrRNA permanece unido al crRNA y los dúplex crRNA-tracrRNA maduros forman un complejo con Cas9 (Deltcheva *et al.*, 2011). En algunos sistemas, los crRNAs experimentan un segundo procesamiento (Westra *et al.*, 2014).

Durante la etapa de interferencia los crRNAs se unen con proteínas Cas para formar un complejo ribonucleoproteico efector o de vigilancia (crRNP) que se guía hacia el DNA o RNA del fago invasor a una región complementaria al crRNA

(protoespaciador) y lo corta impidiendo así la infección (Marakova *et al.*, 2011; Gasiunas & Sinkunas, 2014). En sistemas tipo I, II y III-A, el protoespaciador es usualmente DNA de doble cadena (dsDNA) mientras que en el sistema tipo III-B es RNA complementario de cadena sencilla (ssRNA). La escisión del DNA blanco puede ser llevada a cabo por el propio complejo ribonucleoproteico Cas-crRNA (en sistemas tipo II y III-B) o mediante el reclutamiento de nucleasas (sistemas tipo I y III-A) (Westra *et al.*, 2014).

Los complejos ribonucleoproteicos de los sistemas tipo I, conocidos como “Cascade” (CRISPR-associated complex for antiviral defense, por sus siglas en inglés), primero se unen al DNA blanco y después reclutan a la nucleasa Cas3 para degradar el DNA. En el sistema tipo II, la degradación del DNA blanco es llevada a cabo por la nucleasa Cas9. En los sistemas tipo III-A, el complejo de vigilancia llamado Csm se une al DNA invasor, degradándolo posiblemente mediante el reclutamiento de Csm6. En el caso del sistema tipo III-B, este complejo se denomina Cmr y porta a la nucleasa Cmr4 para escindir el RNA invasor (Westra *et al.*, 2014).

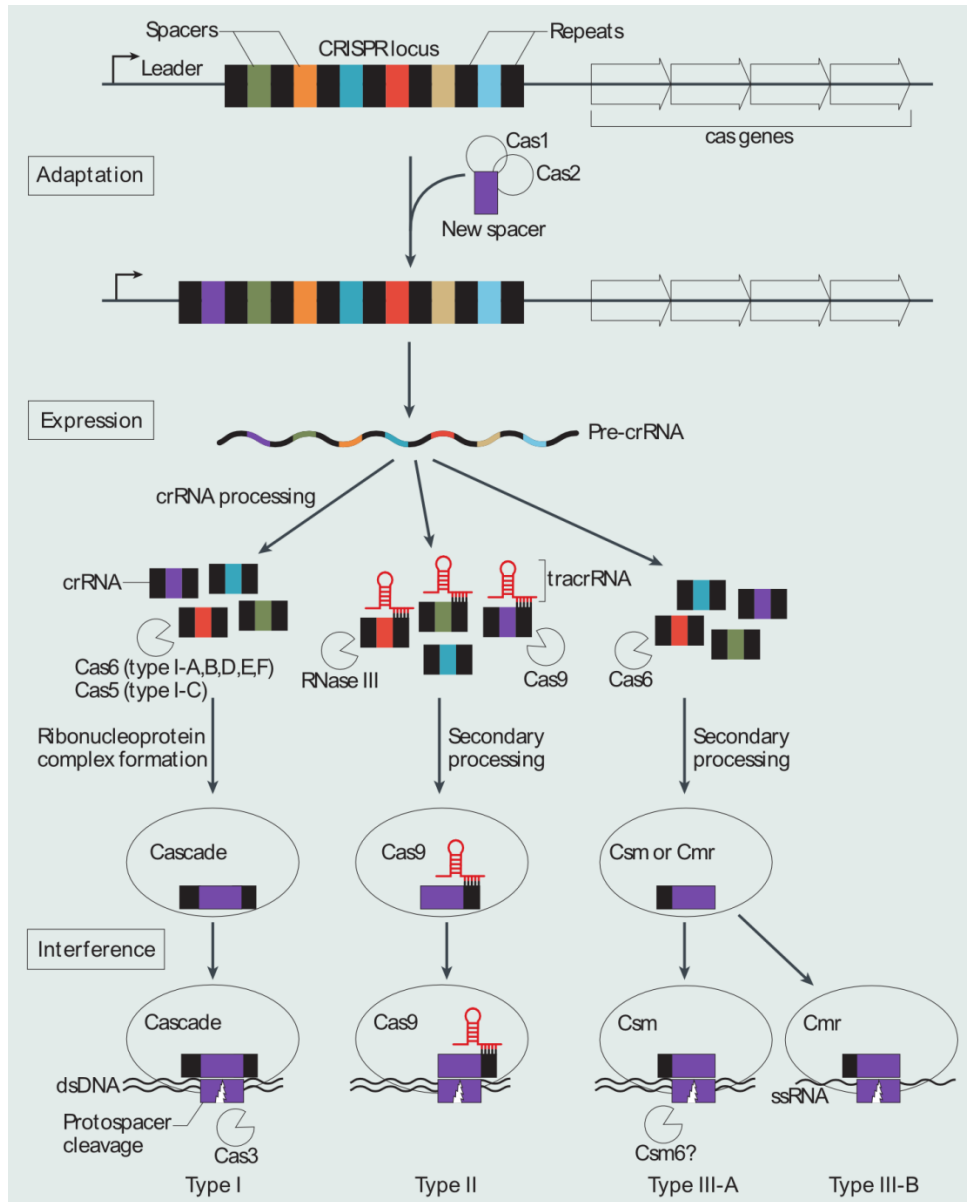


Figura 2. Modo de acción los sistemas CRISPR/Cas. El sistema CRISPR/Cas está formado por genes *cas* y el arreglo CRISPR que contiene secuencias espaciadoras (recuadros de colores) intercaladas por repetidos (recuadros negros). La primera etapa del sistema, conocida como Adquisición, ocurre después de la entrada de un elemento genético móvil. El DNA invasor es fragmentado y un nuevo protoespaciador (morado) es seleccionado, procesado e integrado como un nuevo espaciador en el extremo líder del *locus* CRISPR gracias a Cas1 y Cas2. Durante la segunda etapa, conocida como Expresión, el *locus* CRISPR es transcrito y el pre-crRNA es procesado en pequeños crRNAs mediante ribonucleasas asociadas a CRISPR (Cas6) y/o *housekeeping* (como la RNasa III). Los crRNAs maduros y las proteínas Cas se ensamblan para formar un complejo crRNP. Durante la etapa final de Interferencia, el complejo crRNP busca un blanco complementario en el DNA invasor, si hay reconocimiento, el blanco es degradado por nucleasas Cas. En la figura se muestran las diferencias entre los tres tipos de sistemas CRISPR/Cas. Tomado de Westra *et al.*, 2014.

Recientemente se ha tomado ventaja del sistema tipo II como herramienta para la edición de genes. Puesto que Cas9 hace un corte de dsDNA, las vías de reparación del DNA que tienen las células eucariotas pueden entrar en acción y como consecuencia de su actividad se generan alteraciones de un gen. En el proceso de reparación de la vía de unión de extremos no homólogos a menudo se deletan algunas bases que podrían generar un cambio en el marco de lectura de un gen; en el caso de la reparación a través de recombinación homóloga, se puede proporcionar un molde de DNA con los cambios deseados (Rath *et al.*, 2015).

Como sucede con los otros sistema de defensa bacterianos, los fagos también son capaces de evadir el sistema CRISPR/Cas. Una forma es mediante la mutación del protoespaciador, además, los fagos también pueden mutar en la secuencia PAM, la cual es crucial en el proceso de reconocimiento del protoespaciador (Samson *et al.*, 2013). Incluso, algunos fagos codifican su propio sistema CRISPR/Cas, mismo que tiene como blanco a secuencias de un sistema antifago del hospedero, con lo cual logra inactivarlo (Samson *et al.*, 2013). Otros fagos tienen genes cuyas proteínas van dirigidas contra los complejos de interferencia del sistema CRISPR/Cas bacteriano, y por tal motivo son denominados genes anti-CRISPR (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

II. ANTECEDENTES

2.1 Sistemas CRISPR/Cas de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa tiene el sistema CRISPR/Cas tipo I, siendo los subtipos I-F, I-E y I-C los que se han identificado en cepas clínicas (Cady *et al.*, 2011; Essoh *et al.*, 2013; van Belkum *et al.*, 2015).

El sistema CRISPR/Cas subtipo I-F es el prevalente en *P. aeruginosa* (Cady *et al.*, 2011; van Belkum *et al.*, 2015). Los genes *cas* que lo conforman son seis: *cas1*, *cas3*, *csy1*, *csy2*, *csy3* y *csy4*, siendo los últimos cuatro, únicos de este subtipo (Haft *et al.*, 2005). Este sistema consta de dos *loci* CRISPR (CRISPR1 y CRISPR2) que flanquean a los genes *cas* (Grissa *et al.*, 2007) (Figura 3).

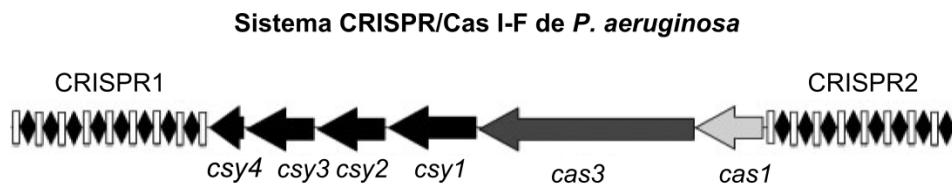


Figura 3. Organización del sistema CRISPR/Cas subtipo I-F de *P. aeruginosa*. La región CRISPR está compuesta de repetidos (rectángulos) y espaciadores (rombos). Los genes *cas* se muestran con flechas apuntando en la dirección de transcripción predicha. Modificado de Cady *et al.*, 2011.

En el 2011, Cady y colaboradores hicieron una biblioteca de los espaciadores de los sistemas CRISPR/Cas presentes en una colección de cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Muchos de los espaciadores fueron idénticos a elementos genéticos móviles. Sin embargo, fue hasta el 2012 que Cady *et al.* mostraron la primera evidencia de que el sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 de *P. aeruginosa* es funcional y media la resistencia a la infección por fagos.

2.1.1 Cepa PA14 de *P. aeruginosa*.

La cepa PA14 presenta el sistema CRISPR/Cas I-F y contiene 35 espaciadores (sp) en total: 14 en el *locus* CRISPR1 (CR1_sp1-14) y 21 en el *locus* CRISPR2 (CR2_sp1-21). El tamaño de sus espaciadores es de 32 nucleótidos mientras que el de sus repetidos es de 28 nucleótidos.

Después de la transcripción de estos *loci* se genera un transcrito largo o pre-crRNA, en cuyas secuencias repetidas se forman estructuras secundarias *stem-loop* (Haurwitz *et al.*, 2010) (Figura 4A). La endoribonucleasa Csy4 corta el pre-crRNA en la base del *stem-loop* generando crRNAs con un tamaño de 60 nucleótidos. Cada crRNA consiste de un espaciador de 32 nucleótidos flanqueado por secuencias de los repetidos: ocho nucleótidos en el extremo 5' y 20 nucleótidos en el extremo 3' (Figura 4B) (Haurwitz *et al.*, 2010). A este crRNA se le unen posteriormente proteínas Csy para formar un complejo ribonucleoproteico estable de 350 kDa, el cual también es llamado complejo Csy (Wiedenheft *et al.*, 2011). Dicho complejo está organizado de la siguiente forma: en el extremo 3' del crRNA permanece unida la proteína Csy4, a lo largo del esqueleto del crRNA se ensamblan seis moléculas de la proteína Csy3 y en el extremo 5' se ensambla un heterodímero de Csy1-Csy2 (Wiedenheft *et al.*, 2011; van Duijn *et al.*, 2012 (Figura 4C).

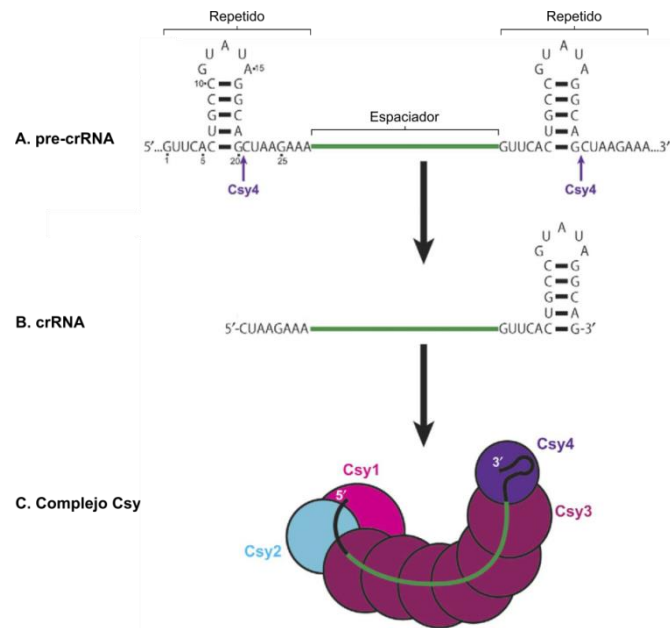


Figura 4. Formación del complejo Csy de *P. aeruginosa*. **A.** Transcrito pre-crRNA producido a partir de la región CRISPR. El corte de Csy4 en el repetido se indica con flecha morada. **B.** crRNA después del corte con Csy4. **C.** Ensamble de complejo ribonucleoproteico con las proteínas Csy1-4. Tomado y modificado de Haurwitz *et al.*, 2012).

Según el modelo de Rolling y colaboradores (2015), el complejo Csy comienza a tener interacciones no específicas de secuencia con el DNA foráneo en busca de protoespaciadores. Aunque débiles, estas interacciones se vuelven específicas cuando el complejo encuentra dos pares de bases secuenciales G-C (secuencia PAM). Estas interacciones son necesarias para la invasión del DNA foráneo, la cual es guiada por el crRNA. Mediante la hibridación del crRNA con el protoespaciador se genera una interacción estable que recluta a la nucleasa-helicasa Cas3 para la degradación del DNA foráneo.

2.2 Genes anti-CRISPR en fagos de *P. aeruginosa*.

En 2013, Bondy-Denomy y colaboradores reportaron por primera vez la existencia de proteínas que inhiben el sistema CRISPR/Cas I-F de la cepa PA14. Posteriormente se encontraron proteínas que inhiben al subtipo I-E de *P.*

aeruginosa (Pawluk *et al.*, 2014). Estas proteínas, denominadas anti-CRISPR, están codificadas en una región accesoria del genoma de fagos Mu-like de *P. aeruginosa*, la cual llamaron *locus* o región anti-CRISPR (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Esta región está flanqueada río arriba por el homólogo del gen que codifica la proteína G, la cual podría estar implicada en la morfogénesis de la cola (Grundy & Howe, 1985), y río abajo por el homólogo del gen que codifica la proteína proteasa/andamio. En el extremo 5' de la región hay un promotor putativo y en el extremo 3' se encuentra un gen que codifica una proteína con un dominio de unión a DNA hélice-vuelta-hélice, la cual podría regular al posible operón anti-CRISPR (Pawluk *et al.*, 2014) (Figura 5).

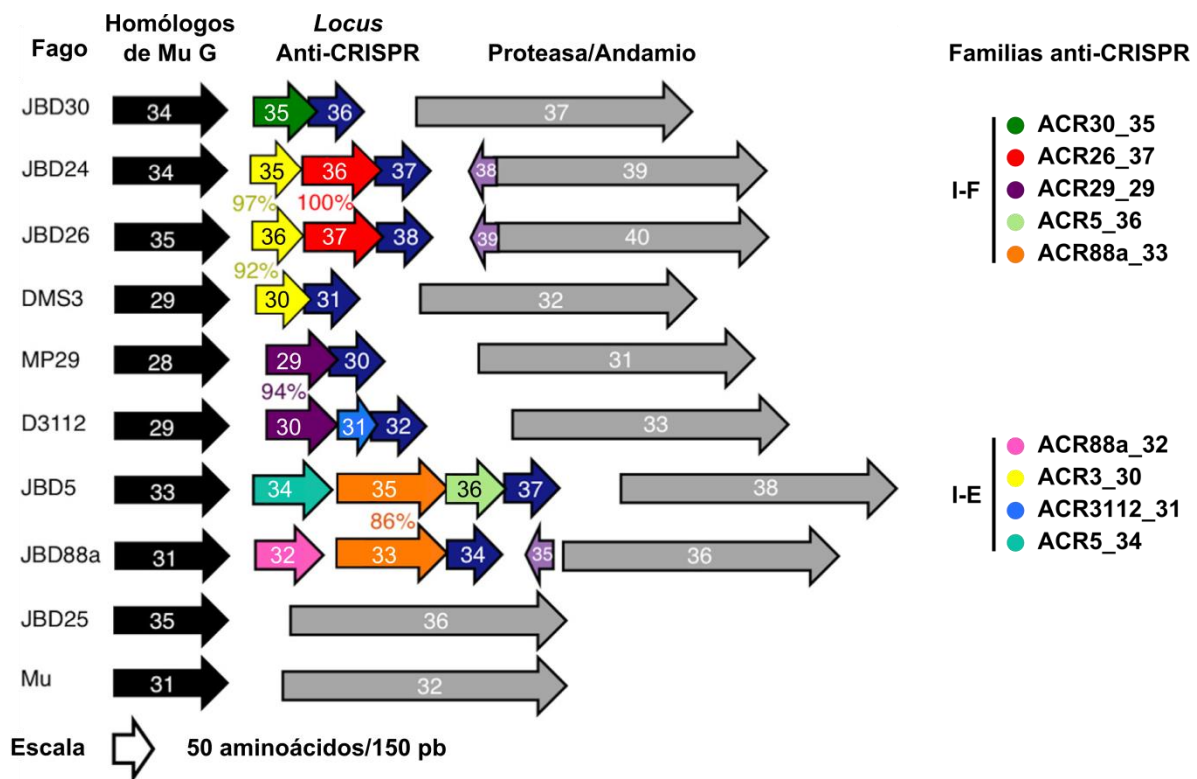


Figura 5. Comparación del locus anti-CRISPR de fagos Mu-like y clasificación de las proteínas anti-CRISPR. La región antiCRISPR se encuentra entre el gen homólogo al gen G del fago Mu (flechas negras) y el gen de la proteasa/andamio (flechas grises). Las flechas de colores representan genes incluidos en la región anti-CRISPR. Los genes que comparten alta identidad de secuencia están indicados con flechas del mismo color, y se muestra el porcentaje de identidad de las proteínas correspondientes. Los números dentro de las flechas indican la posición genómica de los genes. Es de notar que el gen conservado en el extremo 3' (en color azul oscuro) está presente en todos los fagos que codifican genes anti-CRISPR. Las familias de proteínas anti-CRISPR I-E y I-F se muestran en el extremo derecho de la figura. Tomado y modificado de Pawluk *et al.*, 2014.

Las proteínas anti-CRISPR fueron clasificadas con base en su homología de secuencia, en términos de un porcentaje de identidad de alrededor del 90%, resultando en cinco familias de anti-CRISPR I-F (ACR26-37, ACR30-35, ACR88a-33, ACR5-36, ACR29-29) y cuatro familias anti-CRISPR I-E (ACR3-30, ACR88a-32, ACR5-34, ACR3112-31) (Pawluk *et al.*, 2014). La nomenclatura utilizada por los autores fue la siguiente: ACR (abreviación de anti-CRISPR) seguida por el número al final del nombre del fago representante de la familia, posterior al guión se indica la posición genómica del gen anti-CRISPR de dicho fago.

2.3 Mecanismos de las proteínas anti-CRISPR para inhibir el sistema CRISPR/Cas.

Los mecanismos mediante los cuales el sistema CRISPR/Cas de PA14 es inhibido fueron dilucidados *in vitro* e *in vivo* para tres proteínas anti-CRISPR: *acrF1* codificada en el gen 35 del fago JBD30 (familia ACR30_35), *acrF2* codificada en el gen 30 del fago D3112 (familia ACR29_29) y *acrF3* codificada en el gen 35 del fago JBD5 (familia ACR88a_33) (Bondy-Denomy *et al.*, 2015).

Las proteínas anti-CRISPR ejercen su efecto a nivel del complejo Csy (Bondy-Denomy *et al.*, 2013), pero sus mecanismos de acción son diferentes (Bondy-Denomy *et al.*, 2015) (Figura 6). Las proteínas *acrF1* y *acrF2* impiden la unión del complejo Csy al DNA foráneo mediante formas diferentes. *acrF1* se une a las subunidades Csy3 que están distribuidas en la región espaciadora del crRNA, por lo que evita la unión del DNA a lo largo de todo el espaciador. Por su parte, *acrF2* se une al heterodímero Csy1-Csy2 impidiendo la unión del DNA al extremo 5' del complejo Csy. En contraste, la proteína *acrF3* se une a la nucleasa-helicasa Cas3, impidiendo que sea reclutada por el complejo Csy y se una al DNA blanco.

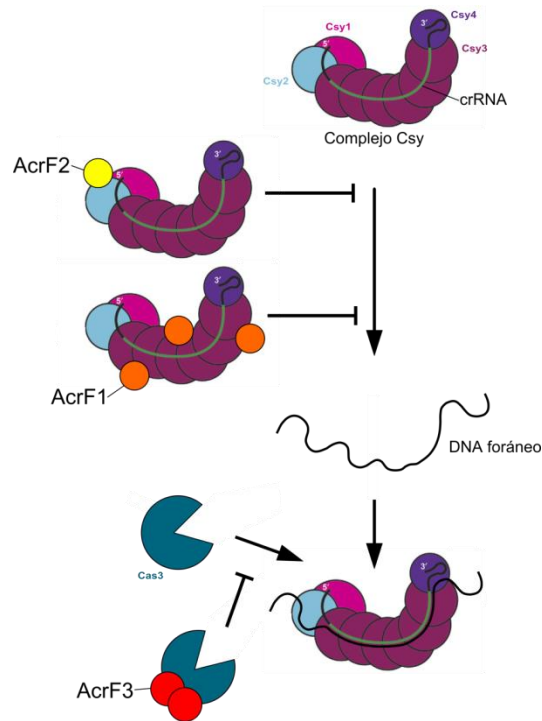


Figura 6. Modelo de los mecanismos anti-CRISPR. La proteína AcrF1 hace que todo el crRNA sea inaccesible al DNA foráneo, mientras que AcrF2 bloquea sólo el extremo 5' del crRNA. AcrF3 evita que la nucleasa-helicasa Cas3 sea reclutada cuando el complejo Csy se ha unido al DNA foráneo. Tomado y modificado de Haurwitz *et al.* (2012) y Bondy-Denomy *et al.* (2015).

2.4 Fagos Mu-like del laboratorio GBM-L3.

En 2014, Cazares y colaboradores reportaron la caracterización y comparación del genoma de dos ejemplares Mu-like de la colección de fagos de *P. aeruginosa* del laboratorio 3 de Genética y Biología Molecular: el fago PaMx73, proveniente de una muestra ambiental del agua, y el fago H70, aislado de una cepa clínica. En dicho estudio se analizó una región de plasticidad genómica en ambos fagos (Figura 7), misma que corresponde al *locus* anti-CRISPR descrito por Bondy-Denomy *et al.* (2013). Esta región contiene elementos característicos del operón anti-CRISPR, esto es, un promotor putativo en el extremo 5' así como un gen que codifica un regulador putativo asociado a los genes anti-CRISPR hasta ahora conocidos (correspondiente al ORF *g9*), en el extremo 3'.

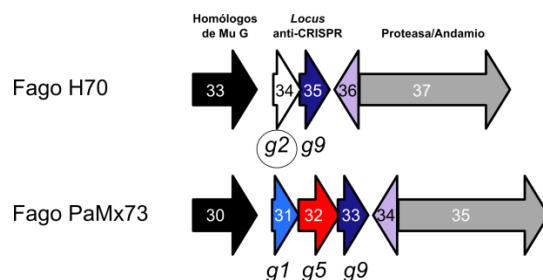


Figura 7. ORFs en la región anti-CRISPR de los fagos H70 y PaMx73. El código de colores de los ORFs (flechas) corresponde al utilizado por Pawluk *et al.* (2014) (Ver la Figura 4). Los ORFs *g1* y *g5* de PaMx73 son homólogos a proteínas anti-CRISPR ya reportadas, mientras que *g2* de H70 está representado en blanco ya que no comparte identidad de secuencia de aminoácidos (BLASTp) con anti-CRISPR conocidos. El ORF *g9* es homólogo al gen que codifica una proteína reguladora putativa (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

Los productos de los ORFs *g1* y *g5* de PaMx73 encontrados en esa región son homólogos a anti-CRISPRs ya reportados: *g1* tiene 97% de identidad de secuencia de aminoácidos respecto al gen 30 del fago DMS3 (familia ACR3-30) y *g5* tiene 100% respecto al gen 37 del fago JBD26 (familia ACR26-37). En el caso de H70, su ORF *g2*, a pesar de estar presente en la región anti-CRISPR, no presenta identidad de secuencia de aminoácidos con ninguno de los anti-CRISPR reportados, haciendo una búsqueda tipo BLASTp.

III. JUSTIFICACIÓN

Existen cinco familias de genes anti-CRISPR I-F reportadas que codifican proteínas que tienen la capacidad de inhibir el sistema CRISPR/Cas de *P. aeruginosa*. El análisis de la región anti-CRISPR del fago H70 de *P. aeruginosa* reveló la presencia del ORF *g2*. La búsqueda tipo BLASTp del producto de *g2* demostró no compartir identidad de secuencia de aminoácidos con ninguna de las proteínas anti-CRISPR hasta ahora reportadas. Esto lo hace un buen candidato para ser identificado como un gen anti-CRISPR novedoso, con lo que se ampliaría el conocimiento de la diversidad de los mismos.

IV. HIPÓTESIS

El ORF *g2* del fago H70 de *P. aeruginosa* es un gen que codifica una proteína con función anti-CRISPR ya que se localiza en la región identificada como anti-CRISPR que es semejante a la de fagos *Mu-like* en donde se han identificado genes de este tipo.

V. OBJETIVOS

A) Objetivo general.

Investigar la función del ORF *g2* del fago H70 de *Pseudomonas aeruginosa* como anti-CRISPR.

B) Objetivos particulares.

1. Determinar si el fago H70 es capaz de inhibir al sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14.

2. En caso de confirmar lo anterior, determinar si la capacidad del fago H70 para inhibir al sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 es debida a su gen anti-CRISPR putativo *g2*.

3. Realizar un análisis *in silico* de la secuencia de *g2* para investigar su relación con otras proteínas anti-CRISPR.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas.

Las cepas de *P. aeruginosa* PA14 y PA14 Δ CR/Cas fueron proporcionadas por el Dr. George O'toole de Geisel School of Medicine, Dartmouth College, E.U.A. La cepa PA14 Δ CR/Cas tiene deletados tanto los genes *cas* como las regiones CRISPR1 y CRISPR2 (Cady *et al.*, 2011). La cepa de *P. aeruginosa* Ps33 (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 XL10-Gold.

6.2 Bacteriófagos.

Los fagos JBD30, D3112 y JBD18 fueron proporcionados por el Dr. Alan R. Davidson de la Universidad de Toronto, Canadá. El fago H70 fue aislado de una cepa clínica (Cazares *et al.*, 2014) y PaMx73 proviene de una muestra de agua (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012). Ambos pertenecen a la colección del Laboratorio 3 del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

6.3 Plásmidos.

El plásmido pUCP24 fue proporcionado por la Dra. Herminia Loza Tavera de la Facultad de Química de la UNAM. Las construcciones p6H5'-pth y p4H3'-pth fueron proporcionadas por la Dra. Eva Jacinto Loeza del Dpto. de Genética y Biología Molecular del Cinvestav, Unidad Zacatenco.

6.4 Oligonucleótidos.

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

Tabla 1. Lista de *primers* utilizados en este trabajo.

Primer	Secuencia 5' → 3'
Mut For	cacacaggaaacagaa <u>attc</u> accatgattacc <u>gattc</u> gagctcggtaaccgg
Mut Rev	ccgggtaccgagctcgaat <u>cgg</u> taatcatggtga <u>attc</u> tgtttcctgtgtg
SMCpUCP24_F	Ggcgattaagtgggtaacg
SMCpUCP24_R	Ggctttacactttatgcttc
g2EcoRI_F	CCCgaattcgatgactacggtcaccagcatc
g2HindIII_R	CCCGGgaagcttcaggcttcatgcgagacatt
pJET1.2 forward	cgactcactatagggagagcggc
pJET1.2 reverse	aagaacatcgattttccatggcag
4Hisg2EcoRI_F	GCCGCGgaattcatg cacaaccaccgtcaca aacacactacggtcaccagcatcgttacc

Las bases subrayadas son los cambios introducidos, las mayúsculas son bases agregadas que facilitan una restricción directa del producto de PCR para la obtención del inserto, en rojo se muestran los sitios de restricción y las bases correspondientes a las histidinas intercaladas se indican en negritas.

6.5 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 de toda la noche bacteriano. 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.

6.6 Obtención del título de un fago.

Se hicieron diluciones de un stock de fagos empezando con una dilución 1:100 (factor de dilución 10^2) de la siguiente manera: 990 μ l de medio TMG (ver ANEXO 1) más 10 μ l del stock de fago. Después se siguieron con los factores de dilución de 10^4 , 10^6 y 10^8 . Se gotearon 5 μ l 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 donde se aislaron mejor y se determinó el título con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas (UFP)/ml} = \frac{\text{No. de placas en una gota} \times \text{Factor de dilución}}{\text{Volumen goteado (ml)}}$$

6.7 Preparación de *stock* de fagos.

A partir de un *stock* de fagos se obtuvieron placas aisladas goteando diluciones seriales en un tapiz de la cepa en la se puede propagar el fago deseado. En caso de H70 y PaMx73 se usó la cepa Ps33, para JBD30 y JBD8 se usó PA14, y para JBD18 se usó PA14 Δ CR/Cas. Después se tomó una placa con la punta de un palillo estéril y se estrió una línea en medio de una caja Petri con T Φ . Se hizo un tapiz bacteriano sobre esta caja cuidando que se distribuyera bien el fago para purificarlo. La caja se dejó incubando toda la noche a 37°C. Se dieron tres pases más del fago. Con una pipeta Pasteur, se tomaron 35 placas del tapiz con fago y se colocaron en un tubo EPPENDORF con 1 ml de medio TMG. El tubo EPPENDORF se puso en movimiento constante durante dos horas a 4°C. Luego, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Finalmente se hicieron diluciones para obtener el título del *stock* y se guardó a 4°C.

6.8 Construcción de lisógenas.

Para hacer las lisógenas PA14 (H70), PA14 (PaMx73) y PA14 (JBD30), se hicieron diluciones de un stock de fagos con el fin de obtener placas aisladas en un tapiz bacteriano. En el centro de cada placa se observó crecimiento bacteriano. Con un asa de siembra se tomó con cuidado dicho centro y se estrió en una caja Petri con LB (ver ANEXO 1). Se dieron tres pases a las colonias lisógenas candidatas. Después se corroboró que fueran lisógenas, esto es, que liberen fagos y que no permitan una segunda infección por el mismo fago (inmunidad).

a) Liberación de fago. Se puso un cultivo líquido de toda la noche en medio LB (ver ANEXO 1) de la colonia candidata a 37°C con movimiento. Después, 1 ml del cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se gotearon 5 µl sobre un tapiz de la cepa parental PA14. Se incubó toda la noche a 37°C.

b) Inmunidad. Con el mismo cultivo de toda la noche de la colonia candidata, se hizo un tapiz y se gotearon diluciones del *stock* de fago original y del sobrenadante. Se incubó toda la noche a 37°C.

6.9 Extracción de DNA bacteriano.

Se siguió el método reportado por Chen & Kuo (1993). Se llenó un tubo EPPENDORF de 1.5 ml con un cultivo de toda la noche de la lisógena PA14 (H70) y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min. Se decantó y se agregaron 500 µl de buffer de lisis (ver ANEXO 1). Se incubó a 37°C durante 30 min y se invirtió cada 5 min. Se agregaron 2 µl de RNAsa [10 mg/ml] y se incubó a 37°C durante 30 min invirtiendo cada 5 min. Luego se agregaron 300 µl de NaCl 5 M para precipitar el DNA y se invirtió lo suficiente para que se mezclara bien. Se incubó 5 min en hielo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante al cual se le agregó un volumen de cloroformo. Se centrifugó a 14,000 rpm durante

15 min a 4°C. De nuevo se obtuvo el sobrenadante y se le agregó un volumen de etanol absoluto. Se invirtió el tubo hasta ver la formación de fibras. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó dos veces la pastilla con 1 ml de etanol al 70% centrifugando a 14,000 rpm durante 10 min en cada lavado. La pastilla se secó al vacío en speed-vac DNA120 Savant y se resuspendió en 100 µl de agua estéril. Se dejó a temperatura ambiente toda la noche para hidratar el DNA. Se guardó a -20°C.

6.10 Extracción de plásmido.

Se utilizó el kit de extracción Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega. Se centrifugaron 5 ml de un cultivo de toda la noche a 10,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante. El 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 14,000 rpm 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 14,000 rpm durante 1 min y se desechó el filtrado. Se hizo un primer lavado con 750 µl de *Wash Solution* centrifugando a 14,000 rpm durante 1 min y después un segundo lavado con 250 µl de *Wash Solution* centrifugando a 14,000 rpm 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 14,000 rpm 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.

6.11 Preparación de células electrocompetentes de *P. aeruginosa*.

Se hicieron células electrocompetentes de PA14 según el método de Choi y *et al.* (2006). Se dejaron 6 ml de cultivo líquido de PA14 en medio LB toda la noche a 37°C y 210 rpm. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min y se decantó el sobrenadante. Se hicieron cuatro lavados de la pastilla, cada uno con 1 ml de sacarosa 300 mM y centrifugando a 10,000 rpm durante 1 min. Se resuspendió la pastilla en 100 µl de sacarosa 300 mM. La alícuota se guardó a -70°C.

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

Se siguió el protocolo de Green & Rogers (2013). A partir de un cultivo líquido de toda la noche en medio LB de *E. coli* 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.₆₀₀ de 0.5-0.6. Se incubó 5 minutos en hielo. Después se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente en 33 ml de solución TfbI (ver ANEXO 1). Se incubó 10 min en hielo y se centrifugó otra vez a 5,000 rpm 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.

6.13 Electroporación en *P. aeruginosa*.

Se pusieron a descongelar en hielo 90 µl de células electrocompetentes y se mezclaron con 250 ng de plásmido. Se transfirió a una celda de 1 mm de Biorad y se dejó incubando en hielo durante 10 min. En el electroporador Gene Pulser™ de Biorad se dio un pulso a 2.2kV, 25µF y 200Ω.

6.14 Transformación química en *E. coli*.

Se descongeló en hielo una alícuota de 100 μ l de células quimiocompetentes y se mezcló con 5 μ l de reacción de ligación o 1 μ l (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 10,000 rpm durante 3 min. Por último, se plaqueó la reacción en cajas de LB con el antibiótico de selección correspondiente.

6.15 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 2 μ l 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 h.

6.16 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 μ l de *Membrane Binding Solution*. Se mezcló con vórtex y se incubó 10 min a 60°C mezclando con vórtex cada minuto. 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 14,000 rpm durante 1 min. Se desechó el filtrado y se hizo un primer lavado con 700 μ l de *Membrane Washing Solution*. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min y se desechó el filtrado. Después se hizo otro lavado con 500 μ l de la misma solución, centrifugando a 14,000 rpm durante 5 min y se desechó el filtrado. Se agregaron 50 μ l de agua libre de nucleasas (precalentada a 40°C) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. El DNA purificado se guardó a -20°C.

6.17 Clonación de *g2* y *4HISg2* en pJET1.2/blunt.

Para clonar un producto de PCR en pJET1.2/blunt se utilizó el kit CloneJET PCR Cloning de ThermoScientific.

Se hizo una reacción de PCR para amplificar al gen *g2*, la cual consistió en:

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	5 μ l
MgCl ₂ 50 μ M	1.25 μ l
dNTPs 10 μ M	1 μ l
<i>g2EcoRI_F</i> 10 μ M	1 μ l
<i>g2HindIII_R</i> 10 μ M	1 μ l
Taq Pol 5 U/ μ l	0.2 μ l
PA14(H70) 20 ng/ μ l	2 μ l
Agua	Para 50 μ l

Se utilizaron las siguientes condiciones para la PCR:

Desnaturalización inicial	96°C	10 min	
Desnaturalización	96°C	30 s	} 35 ciclos
Alineamiento	61.3°C	30 s	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	7 min	
	4°C	∞	

Puesto que la polimerasa de DNA Taq genera productos con extremos 3'-dA, se hizo una reacción para generar extremos romos según se especifica en el manual del kit:

Reactivo	Cantidad
Buffer 2X	5 µl
Producto de PCR no purificado	0.5 µl
Enzima DNA blunting	0.5 µl
Agua	Para 9 µl

Se mezcló con vórtex y se dio un *spin* en la centrifuga. Se incubó a 70°C durante 5 min. Se enfrió en hielo y se agregaron los siguientes reactivos al tubo:

Reactivo	Cantidad
pJET1.2/blunt 50 ng/µl	0.5 µl
T4 DNA ligasa 5 U/µl	0.5 µl

Se mezcló con vórtex y se dio un *spin* en la centrifuga. La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después, se transformó *E. coli* DH5α con 5 µl de la reacción de ligación.

En el caso de la PCR para amplificar *4HISg2* se hizo la siguiente reacción:

Reactivo	Cantidad
Buffer HF 5X	10 μ l
dNTPs 10 μ M	1 μ l
4Hisg2EcoRI _F 10 μ M	1 μ l
g2HindIII_R 10 μ M	1 μ l
DNA 20 ng/ μ l	2 μ l
Polimerasa Phu High-Fidelity 2 U/ μ l	
Agua	Para 50 μ l

Y se utilizaron las siguientes condiciones para la PCR:

Desnaturalización inicial	98°C	1 min	
Desnaturalización	98°C	30 s	} 30 ciclos
Alineamiento	58°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	
	4°C	∞	

Puesto que la enzima Phusion High Fidelity de Thermo Scientific sí genera productos de PCR romos, se procedió a realizar la siguiente reacción de ligación:

Reactivo	Cantidad
Buffer 2X	5 μ l
Producto de PCR no purificado	0.5 μ l
pJET1.2/blunt 50 ng/ μ l	0.5 μ l
T4 DNA ligasa 5 U/ μ l	0.5 μ l
Agua	Para 10 μ l

Se mezcló con vórtex y se dio un *spin* en la centrifuga. La reacción de ligación se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después, se transformó *E. coli* DH5 α con 5 μ l de la reacción de ligación.

Se hizo una PCR de para verificar la presencia de *g2* y *4HISg2* utilizando los *primers* del kit pJET1.2 *forward* y pJET1.2 *reverse*.

6.18 Mutagénesis sitio-dirigida para la modificación del plásmido pUCP24.

Se diseñaron los *primers* Mut for y Mut Rev procurando seguir, en la medida posible, las recomendaciones del manual del kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis de Agilent Technologies. El tamaño de los *primers* es de 51 bases, su temperatura de alineamiento calculada es de 78.2°C, su contenido de GC es del 50% y fueron purificados mediante PAGE.

Se cuantificó y se verificó la integridad del plásmido pUCP24 en un gel de agarosa al 1%. Debido a que el número de cambios y la distancia entre ellos era mayor al recomendado, la mutagénesis se llevó a cabo en dos pasos. Primero, se hicieron dos PCR: una con el primer forward y otra con el reverse. Los cálculos de cada reacción se muestran a continuación:

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	2.5 µl
Primer Mut For o Mut Rev (62.5 ng)	1 µl
pUCP24 (50 ng)	1.5 µl
Mix dNTPs	0.5 µl
Quik Solution	0.75 µl
Agua	18.25 µl
Enzima QuikChange Lightning	0.5 µl
Volumen final	25 µl

Las condiciones de la PCR fueron:

Desnaturalización inicial	95°C	2 min	
Desnaturalización	95°C	20 seg	} 5 ciclos
Alineamiento	60°C	10 seg	
Extensión	68°C	2.02 min	

Después, el contenido de las dos reacciones se mezcló en un sólo tubo y se siguió con los ciclos de PCR:

Desnaturalización	95°C	20 seg	} 18 ciclos
Alineamiento	60°C	10 seg	
Extensión	68°C	2.02 min	
Extensión final	68°C	5 min	

Se mezclaron los dos productos de PCR (50 µl totales), se agregaron 2 µl de enzima *DpnI* y se incubó durante 10 min a 37°C. Se separaron 10 µl de esta reacción para visualizar en un gel de agarosa al 1% y verificar que la presencia de amplificación. Finalmente, la reacción se transformó en células XL10-Gold según las especificaciones del Kit:

Se descongelaron las células competentes del kit manteniéndolas en hielo siempre. Se agregaron 2 µl del mix β-ME a 45 µl de células competentes. Se mezcló e incubó en hielo durante 2 min. Después se agregaron 2 µl del DNA tratado con *DpnI*, se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 30 min. Se dio un choque térmico por 30 s a 42°C y se incubó en hielo durante 2 min. Luego se agregaron 500 µl de medio NZY+ (ver ANEXO 1) precalentado a 42°C y se incubó a 37°C con movimiento (225-250 rpm) durante una hora. Finalmente se plaqueó en cajas Petri de LB con gentamicina [15 µg/ml] y se dejó incubando toda la noche a 37°C.

Se extrajo el plásmido de dos de las colonias que crecieron y se mandaron a secuenciar.

6.19 Clonación de *g2* y *4HISg2* en pUCP24 y pUCP24-L3.

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

Reactivo	Cantidad
Buffer HF 5X	10 μ l
dNTPs	4 μ l
pJET1.2 forward	1 μ l
pJET1.2 reverse	1 μ l
pJET1.2/ <i>g2</i> o pJET1.2/ <i>4HISg2</i> 20 ng/ μ l	2 μ l
Polimerasa Phu High-Fidelity 2 U/ μ l	0.25 μ l
Agua	Para 50 μ l

Se siguieron las siguientes condiciones de PCR:

Desnaturalización inicial	98°C	1 min	
Desnaturalización	98°C	30 s	} 35 ciclos
Alineamiento	60°C	30 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	72°C	10 min	
	4°C	∞	

El producto de PCR fue denominado pJET(118)/*g2* ya que consta de *g2* flanqueado de 63 y 65 pb pertenecientes a pJET. Este producto fue corrido en un gel de agarosa 1%, se cortaron las bandas y se purificaron mediante el Kit

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. 5 µg del producto de PCR purificado y 5 µg del vector fueron doblemente restringidos con las enzimas *EcoRI* HF de NEB y *HindIII* de Thermo Scientific de la siguiente manera:

Reactivo	Cantidad (Vector)	Cantidad (Producto de PCR)
Buffer 2 (NEB) 10X	3 µl	4 µl
<i>EcoRI</i> HF	1 µl	2 µl
<i>HindIII</i>	2 µl	4 µl
DNA	5 µg	2.5 µg
Agua	Para 30 µl	Para 40 µl

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

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	2 µl
Vector	300 ng
Inserto	300 ng
Ligasa T4	1.5 µl
Agua	Para 20 µl

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

Después se utilizaron 5 µl del producto de ligación para transformar químicamente a *E. coli* DH5α. Las células recuperadas fueron plaqueadas en una caja con medio LB con gentamicina [15 µg/ml]. Se hizo PCR de colonia a 10 candidatas y se extrajo plásmido de una colonia que tenía el inserto.

El protocolo anterior se usó para hacer las construcciones pUCP24/g2, pUCP24-L3/g2 y pUCP24-L3/4HISg2.

6.20 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
DNA	1 µg
Oligo For o Rev	20 pmoles
Ready reaction Mix	4 µl
Sequencing buffer 5X	4 µl
Agua	Para a 20 µl

Se usó el siguiente programa:

Desnaturalización inicial	94°C	5 min	
Desnaturalización	94°C	30 s	} 30 ciclos
Alineamiento	55°C	20 s	
Extensión	60°C	4 min	
Extensión final	60°C	7 min	
	4°C	∞	

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 µl de agua destilada estéril y se mezcló con vórtex para hidratar el gel. Se quitaron las burbujas formadas, se dejó mínimo 2 h a temperatura ambiente y sin mover. Se quitó la tapa superior de la columna, luego la inferior y se colocó en un tubo colector. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 2 min en una centrífuga EPPENDORF 5415C. Se transfirieron los 20 µl de la reacción de PCR con cuidado de no tocar el gel y se centrifugó a 3,000 rpm

durante 2 min. La muestra fue secada mediante vacío en speed-vac y mandada a secuenciar.

6.21 Ensayos de eficiencia de plaqueo.

Se hicieron diluciones del fago sensible al sistema CRISPR/Cas, JBD18. Se gotearon por triplicado 5 μ l de cada una de las diluciones en un tapiz de PA14, Δ CR/Cas, PA14 (H70), PA14(JBD30), PA14(PaMx73) y PA14(vector/g2).

6.22 Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas.

La cepa *E. coli* DH5 α fue transformada con los plásmidos pUCP24-L3/4HISg2 (lleva clonado el gen g2 con una etiqueta de cuatro histidinas en el extremo amino de la proteína), pUCP24-L3 (vector de clonación) y como control con los plásmidos p6H5'-pth y p4H3'-pth los cuales son inducibles con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) para sobreexpresar la proteína peptidil-tRNA hidrolasa (Pth) etiquetada con seis histidinas en el extremo amino y cuatro en el extremo carboxilo, respectivamente. En adelante p6H5'-pth será nombrado como pKQV4/6HISpth y pthp4H3'-pth como pKQV4/4HISpth para asemejar la nomenclatura usada en ese trabajo.

Cultivo bacteriano.

Un cultivo de toda la noche fue diluido 1:100 en 50 ml de LB fresco con el antibiótico correspondiente; gentamicina [15 μ g/ml] para pUCP24-L3 y pUCP24-L3/g2, y ampicilina [100 μ g/ml] para pKQV4/6HISpth y pKQV4/4HISpth. Las células fueron crecidas a 37°C con agitación vigorosa e inducidas con 1 mM de IPTG durante una hora cuando alcanzaron una D.O₆₀₀ de 0.4 (pKQV4/6HISpth y pKQV4/4HISpth). Las construcciones pUCP24-L3 y pUCP24-L3/g2 son de expresión constitutiva así que sólo se continuo el crecimiento una hora para

aumentar la masa celular. Inmediatamente después los cultivos fueron enfriados en agua-hielo durante 10 minutos y después se centrifugó a 7,000 rpm durante 10 min a 4°C, la pastilla se lavó dos veces con 30 ml solución de lavados fría (Tris 25 mM pH. 8.0) centrifugando a 6,000 rpm durante 5 min, después se congeló con nitrógeno líquido y se guardó a -70°C.

Lisis celular.

La células fueron resuspendidas en 3 ml de buffer de lisis frío (ver ANEXO 1), se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron criogénicamente en un crio-pulverizador Retsch modelo MM400, a 15 Hz por 3 minutos en cinco 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.

Clarificado del extracto celular.

Las células pulverizadas fueron descongeladas en hielo, se agregó DNasa [10U/ml] y se incubó durante una hora en hielo (o el tiempo necesario para que disminuya la viscosidad) mezclando cada 2 min. Posteriormente se agregaron 3.5 ml de buffer de lisis frío a cada muestra con el fin de aumentar o disminuir la concentración del extracto celular. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C para retirar los restos celulares y en una segunda centrifugación se clarificó el extracto a 14,000 rpm durante 30 min a 4°C en el rotor Beckman JA-20. Se reservó el sobrenadante manteniéndolo en hielo.

Purificación en columnas de Níquel.

Se colocó 1 ml de Ni-NTA agarose 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 lavados (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.

6.23 Concentración de muestras de proteína.

Las tres primeras fracciones de 1 ml fueron mezcladas y concentradas en columna con membrana de filtración molecular (Centricon de Millipore). En el caso de pUCP24-L3 y pUCP24-L3/g2 se usó un corte de 50 kDa (Ultracel YM-50 membrane-50,000 NMWL) y se recuperó lo que atravesó la membrana debido a que la proteína g2 tiene un peso molecular menor de 50 kDa, después fue dializada. Para las recombinantes de Pth se usó un corte de 10 kDa (Ultracel YM-10 membrane-10,000 NMWL) y se recuperó la fracción que se quedó retenida en la membrana de la columna, así que no fue necesario dializar.

6.24 Diálisis de las muestras.

Se cortaron cuatro trozos de 3 cm del tubo de membrana para diálisis (Spectra/Por molecularporous membrane tubing MWCO 3.5 kDa de Spectrumlab) y se hidrataron en agua destilada estéril. Un extremo del tubo de diálisis fue sellado con una pinza de presión, se llenó con la muestra y fue sellado el otro extremo cuidando de dejar el menor espacio libre posible para evitar que la muestra se diluyera con la entrada del buffer de diálisis en el interior del tubo. Se dializaron con 660 ml de buffer de diálisis (ver ANEXO 1) durante 5 horas a 4°C. Posteriormente, se hizo un segundo cambio del buffer de diálisis para toda la noche y finalmente un último cambio durante 5 horas, después de lo cual se

recuperó la muestra del tubo de diálisis y fue guardada en tubos EPPENDORF a 4°C.

6.25 Gel de acrilamida Tris-tricina para proteínas.

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 matraz Erlenmeyer de 20 ml. Los reactivos se fueron añadiendo y mezclando en el orden en que aparecen a continuación:

Reactivo	Gel separador (16.5%)	Gel concentrador
Agua destilada estéril	6.8 ml	8.29 ml
Glicerol	3.17 ml	---
Monómeros (ver ANEXO 1)	10 ml	1 ml
Buffer gel (ver ANEXO 1)	10 ml	3.1 ml
APS 10%	150 µl	100 µl
TEMED	15 µl	8 µl

Tomado de Schägger & Von Jagow (1987)

Al adicionar el TEMED comienza la polimerización así que enseguida se mezcló todo y se vació con una pipeta de 10 ml en el interior de los vidrios. Rápidamente pero de manera suave se agregaron 3 ml de isopropanol y se dejó solidificar por 30 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 pipeta de 10 ml. Inmediatamente se colocó el peine con cuidado de no formar burbujas. Se dejó polimerizando durante 30 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 del cátodo (ver ANEXO 1) en medio de los dos geles hasta que los cubrió. Se verificó que no hubiera fugas y se vació el buffer del ánodo (ver ANEXO 1) en el espacio entre la cámara y los geles. Las muestras fueron mezcladas con 10 µl de buffer de lisis para proteínas (ver ANEXO 1), excepto el marcador; se cargaron en el gel y se corrieron a 90 V durante 6 horas a 4°C.

6.26 Tinción con Coomassie.

Una vez que terminó la electroforesis, un 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.

6.27 Western blot.

Transferencia.

El segundo gel se electrotransfirió a membrana de PVDF previamente hidratada en metanol. Cuatro placas de papel filtro (Whatman™ 3MM ChrChromatographyPaper de Fisher Scientific) y una de membrana de PVDF de igual dimensión del gel fueron equilibradas en el buffer de transferencia (ver ANEXO 1) durante 10 minutos. Se apilaron en el siguiente orden: esponja, dos placas de papel filtro, gel, membrana de PVDF, dos placas papeles de filtro y otra esponja, este acomodo es llamado coloquialmente *sándwich*, el cual fue dispuesto en la cámara de transferencia (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 dejó toda la noche a 45 V a 4°C.

Inmunodetección.

Después de la electrotransferencia de proteínas a la membrana de PVDF, ésta fue secada a temperatura ambiente (si se desea en este punto la membrana se guarda hasta su uso), se lavó dos veces con 20 ml de PBS-Tween 1X (ver ANEXO 1) y se bloqueó en 50 ml de leche descremada al 5% en PBS-Tween 1X en agitación a temperatura ambiente.

Se retiró la solución de bloqueo de la membrana y colocó en anticuerpo primario (2 µl anti-MAT-tag de Sigma) en 5 ml de leche descremada al 5% en PBS-Tween 1X, se dejó durante dos horas a temperatura ambiente en agitación. Después se lavó la membrana tres veces con 20 ml de PBS-Tween 1X a temperatura ambiente en agitación. Al término de los lavados se colocó el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (Rabbit anti-Mouse IgG de Invitrogen) en 10 ml de buffer para anticuerpo secundario (ver ANEXO 1). Se lavó la membrana tres veces durante 10 min a temperatura ambiente en agitación con 20 ml de PBS-Tween 1X.

La detección se llevó a cabo con 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 vidrio. 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→Seleccionar características, nombrar y elegir la carpeta de destino→Save).

VII. RESULTADOS

7.1 Análisis del fenotipo anti-CRISPR de los fagos H70 y PaMx73.

El complejo de vigilancia del sistema CRISPR/Cas de PA14 tiene la función de degradar elementos genéticos móviles cuya secuencia de DNA contenga secuencias idénticas a las regiones espaciadoras de la región CRISPR. Por tanto se analizaron los genomas de los fagos PaMx73 y H70 en busca de tales secuencias conocidas como protoespaciadores (Figura 8).

Se encontraron dos protoespaciadores en el fago H70 que corresponden a los espaciadores CR2_sp17 y CR2_sp20 de PA14 (espaciadores número 17 y 20 del *locus* CRISPR2), mismos que se encuentran en la mayoría de fagos Mu-like con genes anti-CRISPR descritos (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). El protoespaciador correspondiente a CR2_sp17 se encuentra a partir del codón 4 de un ORF accesorio de función desconocida, y el correspondiente a CR2_20 se encuentra a partir del codón 87 de un ORF conservado que codifica una proteína de unión a DNA putativa. Por su parte, PaMx73 sólo cuenta con este último protoespaciador. Éstos protoespaciadores también cuentan con la secuencia PAM 5´ GG 3´ necesaria para ser reconocidos por el sistema CRISPR/Cas de PA14.

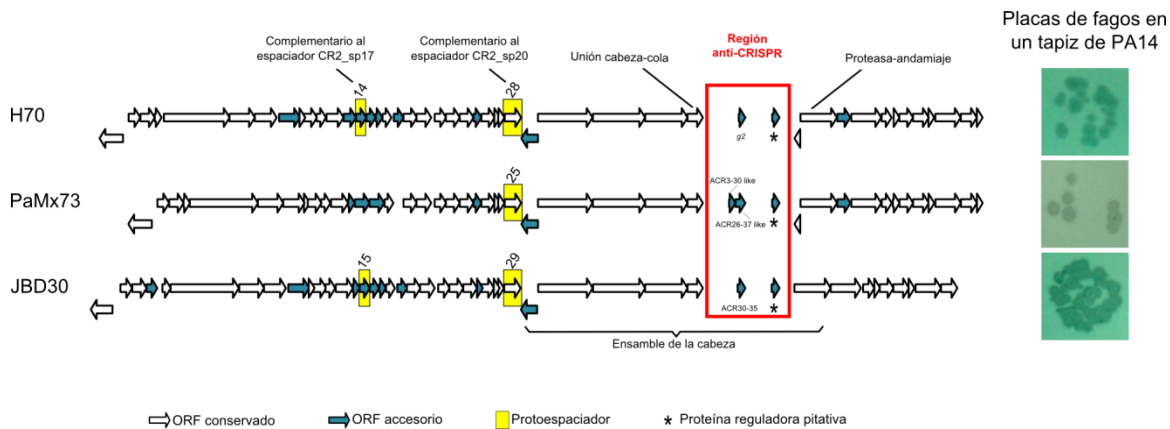


Figura 8. Comparación de genomas de fagos H70, PaMx73 y JBD30. Se muestra el genoma conservado y accesorio, resaltando en recuadros amarillos a los protoespaciadores con el número de ORF en la parte superior del recuadro amarillo. La región anti-CRISPR se señala en recuadro rojo. A pesar la presencia de estos protoespaciadores, los ensayos de infección demostraron que estos fagos pueden infectar a la cepa PA14.

La presencia de protoespaciadores sugiere que la cepa PA14 sería capaz de evitar la infección por cualquiera de estos fagos. Sin embargo, los ensayos de infección demuestran que tanto H70 como PaMx73 y el fago control JBD30, que porta un gen anti-CRISPR I-F (Bondy-Denomy *et al.*, 2013), son capaces de infectar exitosamente PA14 (Figura 8).

7.2 Inhibición del sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 por el fago H70.

7.2.1 Construcción de lisógenas en PA14.

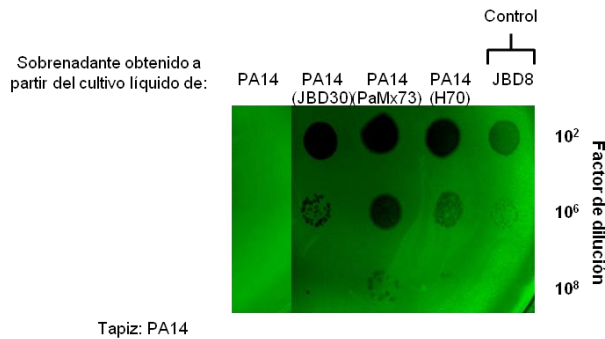
Las bacterias lisógenas para fagos que portan genes anti-CRISPR permiten el desarrollo de fagos súper-infectantes susceptibles a la inhibición por el sistema CRISPR/Cas de la bacteria (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Con el fin de indagar si el fago H70 podría inhibir al sistema CRISPR/Cas, se hicieron lisógenas de la cepa PA14.

Las lisógenas de la cepa PA14 se hicieron usando los fagos H70, PaMx73 y el fago control JBD30. Cada candidata lisógena se obtuvo del centro de infección de una placa aislada de cada fago en la cepa parental. Se probó su capacidad

para liberar fagos infectantes y su inmunidad a la infección por el mismo fago (homo-inmunidad).

Se gotearon diluciones del sobrenadante de un cultivo líquido en medio LB de una candidata lisógena para cada uno de los tres fagos en el tapiz de la cepa parental PA14. Se observaron placas aisladas (Figura 9A), demostrándose la liberación de fagos. Las mismas candidatas presentaron el fenómeno de inmunidad a una segunda infección por parte del mismo fago que las lisogeniza (Figura 9B). El fago JBD8 fue usado como control ya que puede infectar a PA14 porque porta un gen anti-CRISPR (Pawluk *et al.*, 2014).

A. Liberación de fago



B. Inmunidad

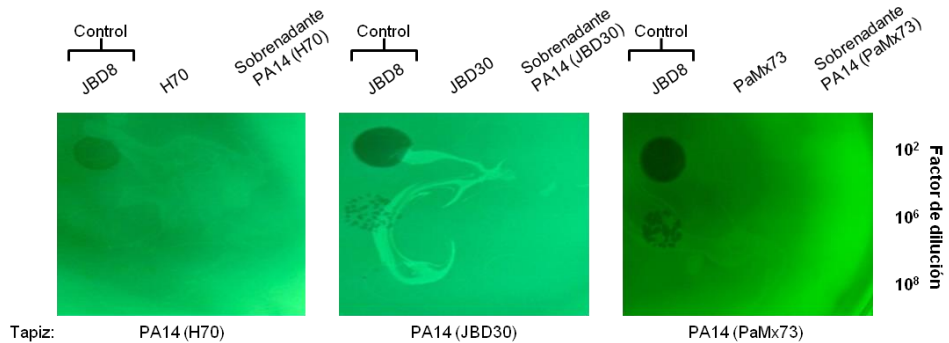


Figura 9. Comprobación de lisógenas en PA14. Se gotearon diluciones de los sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo líquido con medio LB de las candidatas lisógenas, tanto en un tapiz de la cepa parental (A) como en la cepa lisógena candidata (B). JBD8 es un fago que fue usado como control ya que puede infectar a PA14 (porta un gen anti-CRISPR) y es heteroinmune a los fagos JBD30, H70 y PaMx73.

7.2.2 Ensayos de eficiencia de infección del fago JBD18.

Con el objetivo de probar la función anti-CRISPR asociada a los profagos JBD30, PaMx73 y H70, se analizó la eficiencia de infección del fago JBD18 (Figura 10), que es sensible al sistema CRISPR/Cas de PA14 pero sí es capaz de infectar a la lisógena PA14(JBD30) (Bondy-Denomy *et al.*, 2013).

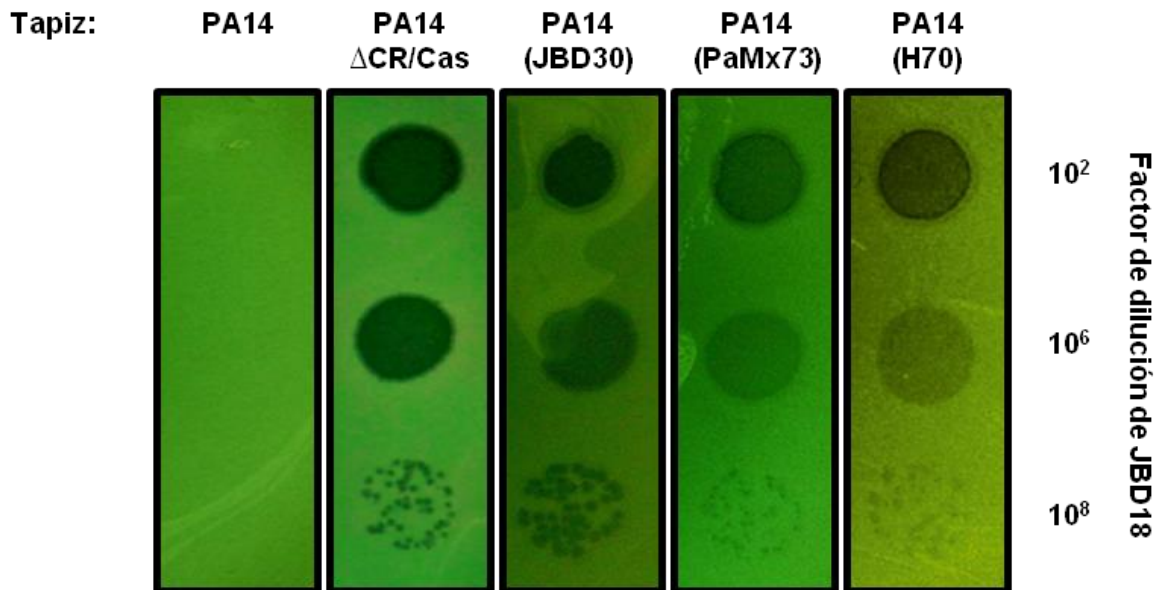


Figura 10. Inhibición del sistema CRISPR/Cas de PA14 mediada por el profago H70. Se gotearon diluciones de JBD18 (sensible a CRISPR/Cas), el cual sólo puede infectar a PA14 cuando el sistema CRISPR/Cas está deletado o a las lisógenas de fagos que expresan una función anti-CRISPR. Los profagos JBD30, PaMx73 y H70 permitieron la infección del fago sensible a CRISPR/Cas.

En este ensayo se corroboró que JBD18 no es capaz de infectar la cepa PA14 que contiene un sistema CRISPR/Cas funcional, pero si infectó a la mutante PA14 Δ CR/Cas y de forma similar a las tres lisógenas (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). JBD30 es portador de un gen anti-CRISPR (Bondy-Denomy *et al.*, 2013) que inhibió al sistema CRISPR/Cas de PA14 permitiendo la infección de JBD18, de igual forma, PaMx73 contiene un gen, cuyo producto es homólogo a la familia anti-CRISPR ACR26_36 mostrando el mismo resultado. Interesantemente, H70 también permitió el crecimiento de JBD18 indicando que contiene un gen, que es

expresado en su estadio de profago, que le confiere el fenotipo anti-CRISPR a niveles similares que JBD30 y PaMx73.

7.3 Inhibición del sistema CRISPR/Cas de la cepa PA14 mediante el gen anti-CRISPR putativo (*g2*) del fago H70.

7.3.1 Clonación del ORF *g2* en un vector de expresión.

Con el fin de asociar el fenotipo anti-CRISPR observado en las lisógenas (Figura 10) al ORF candidato *g2*, se clonó en el vector de expresión constitutiva.

7.3.1.1 Clonación del ORF *g2* en pJET1.2.

Se diseñaron *primers* para obtener el producto de PCR de *g2* los cuales contienen en los extremos sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y bases extras a los lados de los sitios de corte que permiten un corte eficiente de las enzimas de restricción directamente en el producto de PCR. Sin embargo, se optó por clonar el fragmento *g2* en el vector pJET1.2/blunt de Thermo Scientific (Figura 11A) y utilizar esta construcción como plantilla para obtener un producto de PCR con los *primers* que amplifican en los extremos del sitio múltiple de clonación de este vector. Con esto se añaden ~60 pb en cada extremo de *g2* que, aparte de aumentar la eficiencia de corte de las enzimas, facilita la identificación del inserto *g2* completamente restringido con *EcoRI* y *HindIII*.

La amplificación del ORF *g2* fue estandarizada mediante una PCR de gradiente usando como molde el DNA de la lisógena PA14(H70) (Figura 11B). El producto de PCR que se obtuvo con una temperatura de alineamiento de 60.3°C fue ligado al vector. La reacción de ligación pJET/*g2* fue transformada en *E. coli* DH5 α ; sólo las colonias que contenían el inserto pudieron sobrevivir ya que *g2* clonado en el sitio múltiple de clonación interrumpe un gen letal del vector pJET.

Diez candidatas se analizaron por PCR de colonia (Figura 11C) con los *primers* del kit CloneJET PCR Cloning obteniéndose un producto con el tamaño esperado.

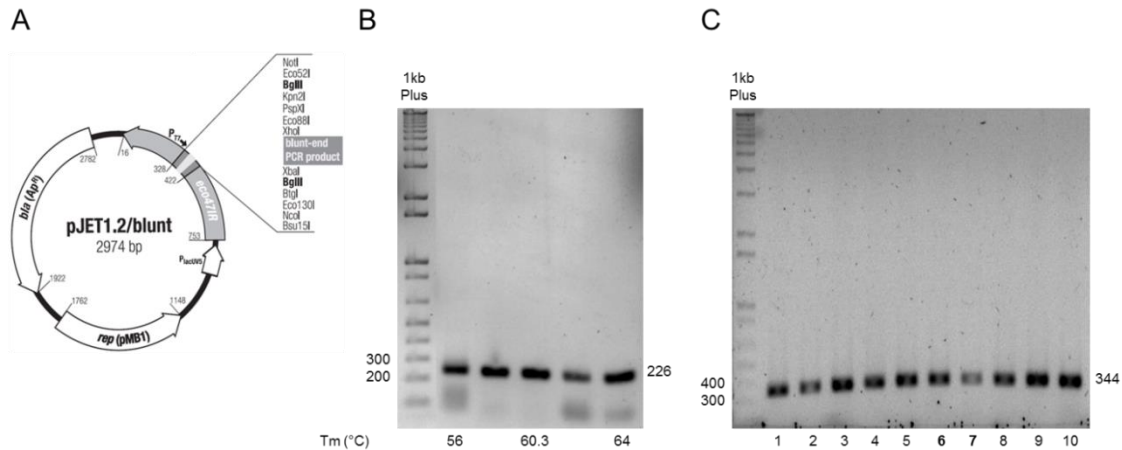


Figura 11. Clonación de g2 en el vector pJET1.2. **A.** El vector pJET contiene al gen de la β-lactamasa que le confiere resistencia a ampicilina, cuenta con un sitio múltiple de clonación así como un promotor T7 que permite la transcripción de los fragmentos clonados. **B.** PCR de gradiente de temperaturas de alineamiento. El fragmento esperado es de 226 pb ya que los *primers* incluyen a g2, los sitios de restricción y bases extras. **C.** PCR de 10 colonias (enumeradas del 1-10) usando *primers* del kit CloneJET PCR Cloning que amplifican 118 pb cuando no hay inserto. El fragmento esperado es de 344 pb (226 pb del fragmento clonado más 118 de pJET), observándose que todas las candidatas amplifican el fragmento esperado.

El plásmido de la candidatas 7 fue secuenciado (ver ANEXO 2). La Figura 12 muestra la secuencia de la construcción pJET/g2.

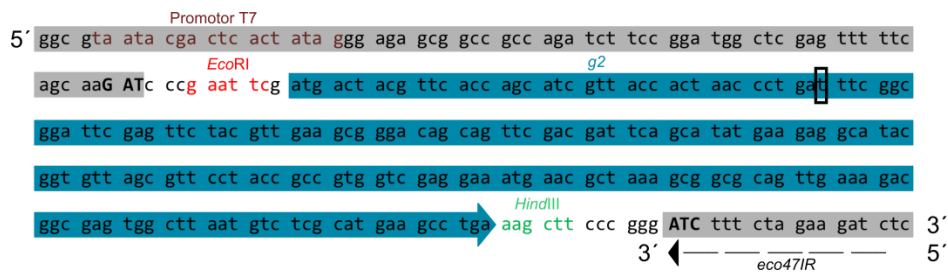


Figura 12. Secuencia de la construcción pJET/g2. Se marca con un recuadro negro en donde inicia una lectura confiable. En gris se muestra la secuencia de pJET en la que, de no haber inserto, sería continua la secuencia de restricción de *EcoRV* 5'GATATC 3' (marcado en negritas). El inserto clonado es la secuencia en medio de las regiones marcadas con gris. La cadena complementaria a la región gris es un gen letal, la endonucleasa *eco471R*, cuyos tripletes serían los indicados con las líneas de la flecha correspondientes a la cadena complementaria. El inserto rompe el marco de lectura del gen letal, por eso las colonias candidatas pudieron sobrevivir.

7.3.1.2 Clonación del ORF g2 en el vector pUCP24.

El plásmido pUCP24 (Figura 13A) proviene de la modificación del vector pUC18, y tiene la capacidad de replicarse en *Escherichia* y *Pseudomonas*, conocido como un vector *shuttle Escherichia/Pseudomonas* (West *et al.*, 1994). Gracias a esta característica, el producto de ligación puede ser propagado primero en *E. coli*, en donde la eficiencia de transformación es mayor que en *Pseudomonas*. Además, en este sistema es posible seleccionar las candidatas adecuadas mediante la α complementación del gen *lacZ* ya que el vector pUCP24 codifica el fragmento α de LacZ que puede complementar el fragmento ω de LacZ producido por el huésped para formar β -galactosidasa. Esta enzima hidroliza el metabolito X-gal, generándose un compuesto azul insoluble, que da una coloración característica a las bacterias transformadas que expresan LacZ α . El sitio múltiple de clonación (MSC) de pUCP24 se localiza dentro del gen *lacZ* α que al ser interrumpido por los fragmentos clonados resulta en la aparición colonias blancas.

El plásmido pUCP24 (Figura 13A) fue purificado y analizado en un gel de agarosa, posteriormente se cortó mediante una doble restricción con *EcoRI* y *HindIII* (Figura 13B). El fragmento *g2* se obtuvo a partir de la construcción pJET/*g2* (Figura 13C). Ambos fragmentos fueron cuantificados (Figura 13D); la ligación de los dos fragmentos fue transformada en *E. coli* DH5 α . Nueve colonias candidatas fueron verificadas mediante PCR (Figura 13E). Se extrajo el plásmido de una colonias candidatas y se secuenció para comprobar la inserción adecuada de *g2* (ver ANEXO 3).

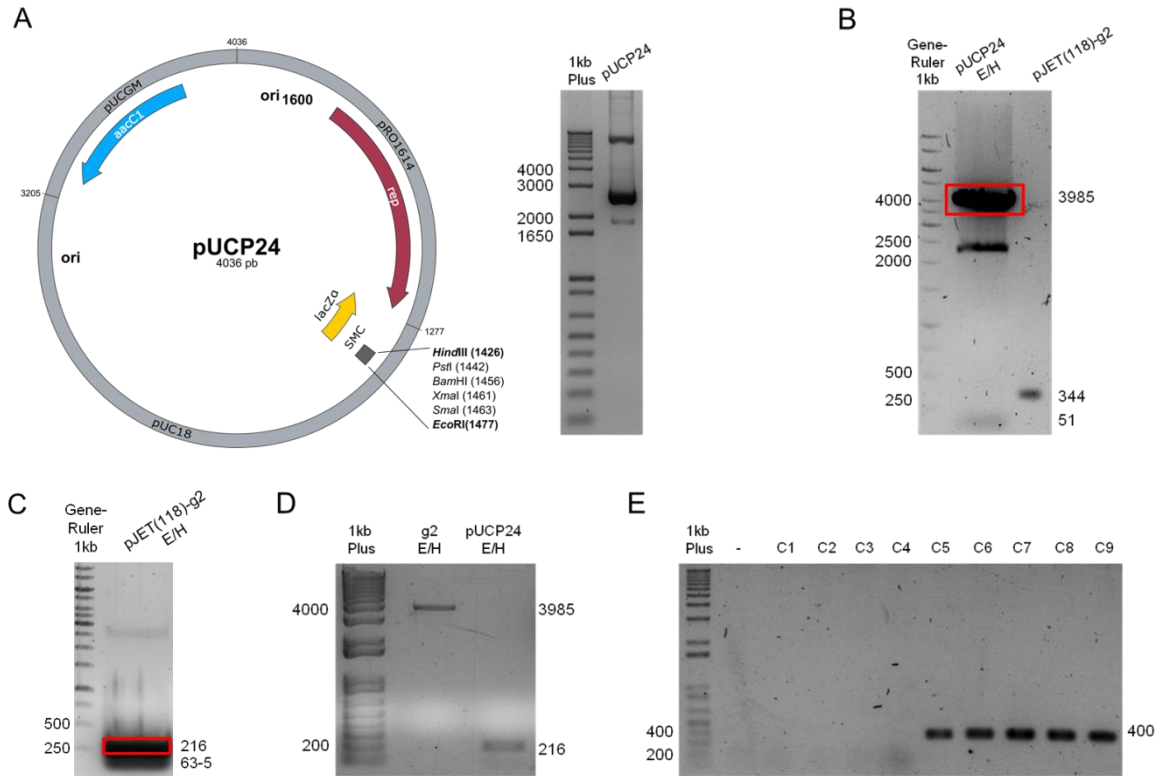


Figura 13. Clonación de g2 en el vector plasmídico pUCP24. **A.** A la izquierda se muestra el esquema de pUCP24: En gris se indica la procedencia de los fragmentos para la construcción del plásmido, en los cuales están contenidos los orígenes de replicación para *Escherichia* (ori) y *Pseudomonas* (ori1600); *aaCC1* es el gen de resistencia a gentamicina; *rep* es el gen de la replicación para *Pseudomonas*; *lacZα* es el gen del fragmento α de lacZ; SMC es el sitio múltiple de clonación que se encuentra interno a *lacZα*. A la derecha se muestran las isoformas de pUCP24 en un gel de agarosa al 1%. **B.** Doble restricción de pUCP24 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (E/H). Con el corte de ambas enzimas se obtiene un vector linealizado de 3985 pb y se libera un fragmento pequeño de 51 pb. A un lado se corrió el producto de PCR hecha con *primers* del kit CloneJET PCR Cloning que amplifican 118 pb más el inserto g2, dando un total de 344 pb; este fragmento se usó para obtener el inserto para ligar. **C.** Doble restricción del producto de PCR con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (E/H) para obtener el inserto g2. Cuando el fragmento pJET(118)-g2 es doblemente restringido se liberan dos fragmentos pequeños de 63 y 65 pb y el inserto de 216 pb correspondiente a g2. **D.** Fragmentos purificados del vector y el inserto doblemente restringidos. **E.** PCR de nueve colonias candidatas transformadas con los productos de ligación mostrando la amplificación esperada de 400 pb usando *primers* que flanquean el sitio múltiple de clonación de pUCP24. En el control (-) se usó agua en vez de DNA.

7.3.1.3 Secuenciación de la construcción: delección en pUCP24 y mutación puntual en g2.

Debido a la localización del sitio de corte de *EcoRI*, se esperaba obtener una proteína de fusión con los primeros siete aminoácidos de LacZα seguidos de la proteína g2. Al analizar la secuencia observamos que el plásmido presenta una delección en la posición seis de *lacZα* (citosina 6) que cambia el marco de lectura

generando un codón de paro en el tercer codón (Figura 14). Las posibles consecuencias de esta deleción se muestran en la Figura 14. Primero, se produciría un dipéptido (a partir del atg en azul oscuro); río abajo la traducción puede reanudarse a partir del segundo codón de inicio (identificado en azul claro), generando una fusión de cinco aminoácidos de *LacZα* y el g2. En otro caso, la traducción puede reanudarse a partir del codón de inicio del gen *g2* (señalado en verde).

También observamos una mutación puntual en la base 38 de *g2* con lo que se sustituye un aspartato por glicina (aminoácido 13 de *g2*).

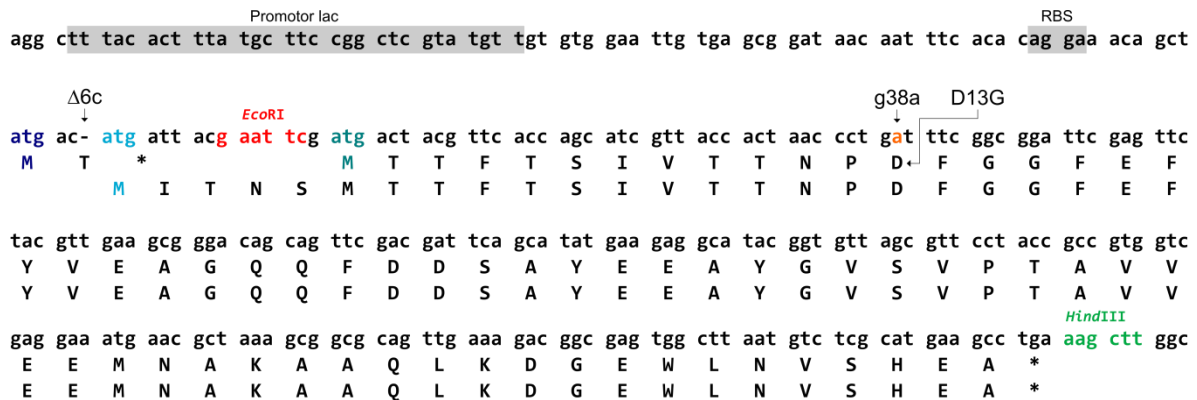


Figura 14. Secuencia de la construcción pUCP24/g2. Con la secuenciación usando *primers* que amplifican el SMC de pUCP24 se pudo detectar una deleción en el vector y un cambio de base en *g2*. En colores azul oscuro, azul claro y verde se muestran los posibles codones de inicio (atg) resultado de la deleción de la base número seis ($\Delta 6c$) de *lacZα* se muestran. El cambio de base encontrado fue en la posición 38 de *g2*, se sustituyó una guanina por un adenina (g38a), que resulta en un cambio glicina por aspartato en la posición 13(G13D). Se señalan elementos importantes en la secuencia: en gris se indica el promotor de lac seguido del sitio de unión al ribosoma (RBS), además de los sitios de restricción usados *EcoRI* en rojo y *HindIII* en verde. La primer metionina de cada proteína se indica con colores distintos señaladas con los mismos colores en la secuencia de nucleótidos. Los asteriscos corresponden a codones de paro.

A pesar de lo anterior, se evaluó la funcionalidad mediante ensayos de infección que demostraron la actividad anti-CRISPR de *g2* (ver sección 7.3.3).

7.3.1.4 Modificación del vector pUCP24.

Los inconvenientes mencionados en la sección anterior dieron pauta a generar una construcción que expresara a g2 sin secuencias de *lacZ*. Otro de los motivos para tal modificación fue el hecho de que cuando se trató de observar la proteína en un gel de proteínas, ésta no se pudo evidenciar y existía la incertidumbre de si la expresión de g2 era afectada por la expresión del dipéptido putativo (ver Figura 14).

Para poder usar los mismos sitios de restricción (*EcoRI* y *HindIII*) que en la construcción anterior se decidió eliminar el sitio *EcoRI* de pUCP24 (Figura 15A) y crear un sitio *EcoRI* que inicia justo antes del codón de inicio de LacZ α , de tal modo que no se ubicará dentro de *lacZ* α . Por lo tanto, cualquier clonación a partir de *EcoRI* en este nuevo vector no quedaría fusionada con los primeros aminoácidos de LacZ α . Lo anterior fue posible con el cambio de seis bases mediante mutagénesis dirigida.

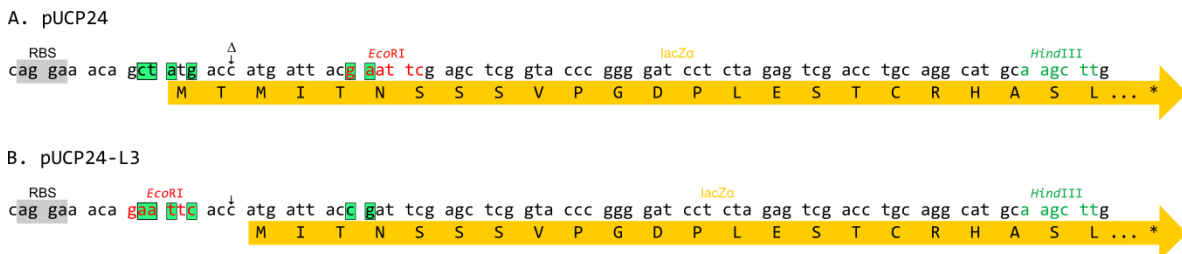


Figura 15. Modificación del plásmido pUCP24. La parte superior representa la secuencia del vector pUCP24 en base de datos y la inferior corresponde la secuencia cuando se recorre el sitio *EcoRI*. Las bases resaltadas en verde son las posiciones que se cambiaron mediante mutagénesis dirigida. La citosina en señalada con una flecha negra corresponde a la deleción (Δ) observada en el vector pUCP24, dicha citosina sí está en la secuencia de la base de datos; esta modificación fue considerada en el diseño de los *primers* que introducen los cambios deseados.

La mutagénesis sitio dirigida consistió en amplificar todo el plásmido usando *primers* largos que llevan los cambios deseados. El DNA parental fue eliminado mediante una enzima que reconoce al DNA metilado y semimetilado, dejando sólo el DNA amplificado que corresponde al plásmido con las mutaciones deseadas

(Nelson & McClelland, 1992). Este producto fue transformado en *E. coli* DH5 α . A partir de dos candidatas se extrajo el plásmido y se secuenciaron usando *primers* que flanquean al sitio múltiple de clonación de pUCP24. Los plásmidos tienen los cambios esperados como se muestra en la Figura 15B (ver ANEXO 4).

7.3.1.5 Clonación del ORF *g2* en el vector pUCP24-L3.

Se obtuvieron los fragmentos restringidos tanto del vector (Figura 16A) como del inserto (Figura 16B) usando las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Se cuantificaron (Figura 16C) y ligaron, los productos de la ligación fueron transformados en *E. coli* XL1-Blue. Dos de las candidatas obtenidas se verificaron mediante PCR de colonia (Figura 16D); mostrando un amplicón del tamaño esperado.

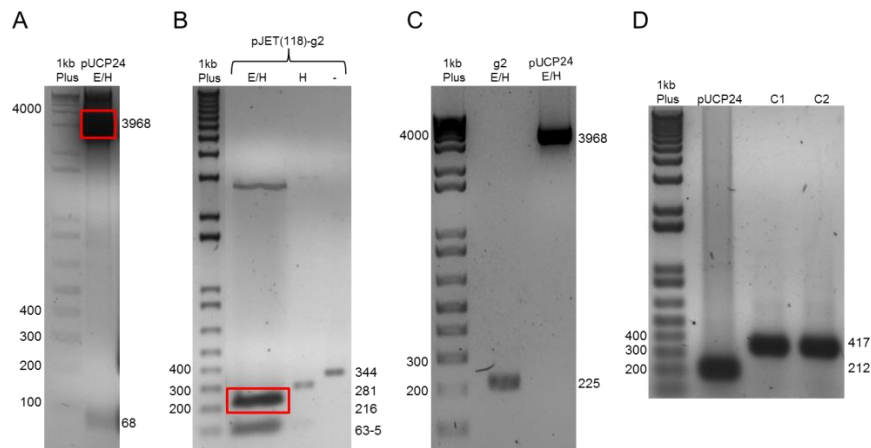


Figura 16. Clonación de *g2* en pUCP24-L3. **A.** Doble restricción del vector pUCP24 con las enzimas *EcoRI* (E) y *HindIII* (H) en la que se libera un fragmento pequeño de 68 pb y uno grande de 3968 pb (señalado en el recuadro rojo). **B.** Doble restricción con *EcoRI* y *HindIII* del producto de PCR (344 pb) obtenido a partir de pJET/*g2*, que contiene a *g2* flanqueado de 63 y 65 pb. La doble restricción elimina cada uno de los extremos y reducen el tamaño del fragmento liberado a 281 pb (señalado en un recuadro rojo). **C.** Las bandas obtenidas en A y B (recuadros rojos) fueron purificadas y visualizadas en un gel de agarosa al 1% para después ser mezcladas en una reacción de ligación. **D.** PCR de colonia de dos candidatas (C1 y C2) ambas tienen el amplicón esperado (417 pb). Los *primers* usados en la amplificación generan un producto de 212 pb cuando no hay inserto y de 417pb con la adición de *g2*.

En la Figura 17 se muestra la secuencia obtenida a partir de uno de los plásmidos candidatos. Se observa la adecuada inserción del ORF *g2*, desde el codón de inicio hasta el codón de paro incluyendo los sitios de regulación (promotor y sitio de unión a ribosoma) (ver ANEXO 5).

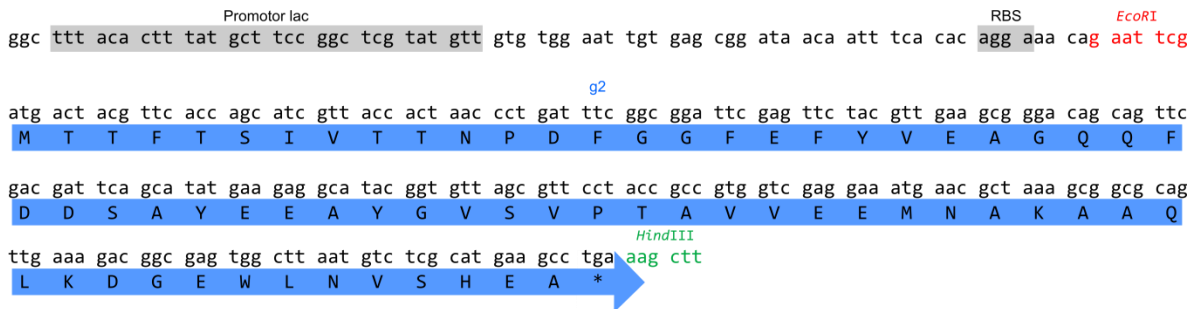


Figura 17. Secuencia de *g2* en pUCP24-L3. Se muestra que la secuencia no contiene modificaciones. En gris se indican el promotor lac y el sitio de unión a ribosoma (RBS), en rojo el sitio *EcoRI*, en verde el sitio *HindIII* y en azul a *g2*.

7.3.2 Demostración de la expresión de la proteína *g2*.

Los resultados obtenidos con la expresión de *g2* a partir de pUCP24 sugirieron fuertemente que el producto del gen *g2* fue responsable de la actividad anti-CRISPR previamente observada en H70 (ver sección 7.3.3). Sin embargo, usando la construcción pUCP24/*g2* no se logró observar a la proteína *g2* sobreexpresada. Para poder verificar la expresión de la proteína *g2*, se incorporó un etiqueta de histidinas intercaladas (HNHRHKKH) al gen *g2* que posteriormente se ligó en pUCP24-L3. Esta etiqueta permite enriquecer la proteína utilizando columnas de Ni-NTA Agarosa y analizar la expresión mediante western blot con un anticuerpo comercial específico para esta etiqueta.

7.3.2.1 Construcción del vector de expresión pUCP24-L3/4HISg2.

Usando la misma estrategia de clonación que en pUCP24/g2, un fragmento de DNA que contiene el gen *g2* y en el extremo 5' una etiqueta de histidinas (Figura 18A) fue clonado en el vector de transición pJET. El producto de ligación fue transformado en *E. coli* DH5a. Las candidatas fueron verificadas mediante PCR de colonia (Figura 19B) utilizando *primers* de pJET, observándose el tamaño esperado.

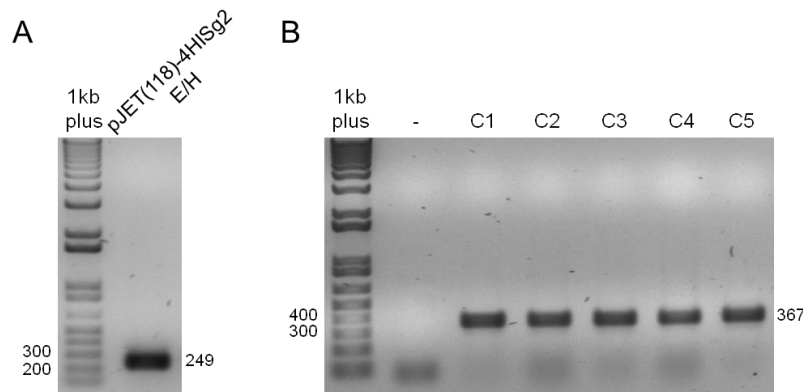


Figura 18. Clonación de 4HISg2 en pJET1.2. **A.** El producto de PCR usado para la reacción de ligación con el plásmido pJET1.2; el producto esperado es de 249 pb ya que el primer lleva las bases que codifican la etiqueta de histidinas, a parte de los sitios de restricción. **B.** PCR de colonia de las candidatas DH5 α transformadas; el fragmento esperado es de 367 pb usando *primers* del kit CloneJET PCR Cloning que amplifican 118 pb cuando no hay inserto. En el carril control (-) se usó agua en vez de una colonia.

Las candidatas obtenidas no fueron secuenciadas en esta ocasión. Se prosiguió a usar como plantilla el plásmido de una de las candidatas para obtener el producto de PCR y restringirlo.

Posteriormente, el fragmento *4HISg2* amplificado a partir de pJET fue clonado en el vector pUCP24-L3 usando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para restringir doblemente a ambos (Figura 19A y B). Los productos ligados se transformaron en *E. coli* XL1-Blue y las candidatas se analizaron por PCR de colonia (Figura 19C).

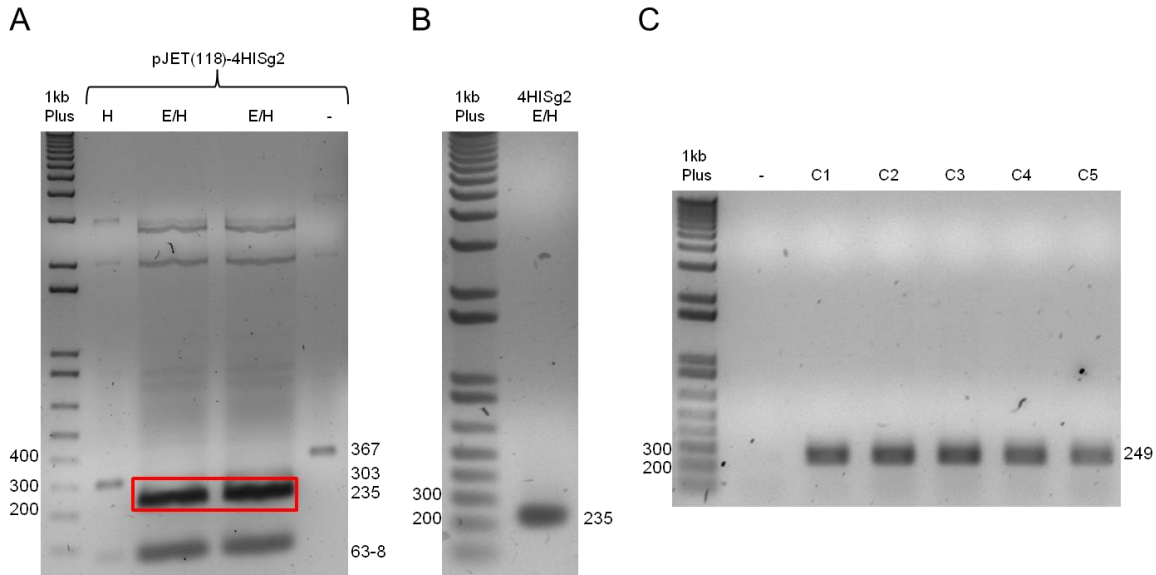


Figura 19. Construcción del vector pUCP24-L3/4HISg2. **A.** Señalados en un recuadro rojo se indican los productos de la doble restricción (235 pb), *EcoRI* (E) y *HindIII* (H), del fragmento *4HIS-g2* de 367 pb obtenido a partir de pJET1.2/His-g2. El carril H muestra la restricción sencilla con *HindIII*, que libera un producto de 303 pb y uno de 63 pb. La doble restricción con *EcoRI* y *HindIII* genera 235 pb más dos fragmentos de 63 y 68 pb. **B.** Las bandas obtenidas en A (recuadro rojo) fueron cortadas, purificadas y visualizadas en un gel de agarosa al 1% y para hacer la reacción de ligación usando el vector restringido anteriormente (Figura 17A). **C.** PCR de colonia de cinco candidatas que contienen el plásmido con el inserto esperado. Se usaron *primers* que amplifican a *4HISg2* (249 pb); en el carril – se usó agua en vez de alguna colonia como DNA.

La Figura 20 muestra la secuencia de un plásmido candidato, en la que se verifica la integridad de la secuencia clonada y su adecuada inserción (ver ANEXO 6).



Figura 20. Secuencia de la construcción pUCP24-L3/4HISg2. En gris se señala la secuencia promotora y el RBS, en rojo la secuencia de *EcoRI*, en verde la secuencia *HindIII* y en azul a *g2*. Los codones para la etiqueta de histidinas (HNHRHKKH) se encuentran en el extremo 5' entre el primer codón (M) y el segundo codón (T) del gen *g2*.

7.3.2.2 Análisis de la expresión de 4HISg2 por western blot.

La proteína de fusión 4HISg2 fue enriquecida mediante una resina cargada de Níquel (Ni-NTA agarosa). La muestra del enriquecimiento fue concentrada mediante columnas Centricon y dializada. La proteína fue analizada en un gel de Tris-tricina al 16.5% (Figura 21A). Un duplicado del gel de la Figura 21A fue transferido a una membrana de PVDF para analizarla con el anticuerpo comercial antiMAT (Sigma) que reconoce los siete aminoácidos de la etiqueta de histidinas fusionado a g2 (Figura 21B).

Como controles, se purificó a la proteína Pth con la etiqueta de cuatro histidinas intercalas (HNHRHKH) y a Pth con una etiqueta de seis histidinas secuenciales (HHHHHH) expresados a partir del vector pKQV4. Se pudo observar que el anticuerpo antiMAT también es capaz de reconocer a la etiqueta de seis histidinas seguidas, pero con menor especificidad que la etiqueta de cuatro histidinas intercaladas, ya que se cargó mayor cantidad de la primera que de la segunda, no obstante, en el western blot la banda de 4HISpth es más intensa.

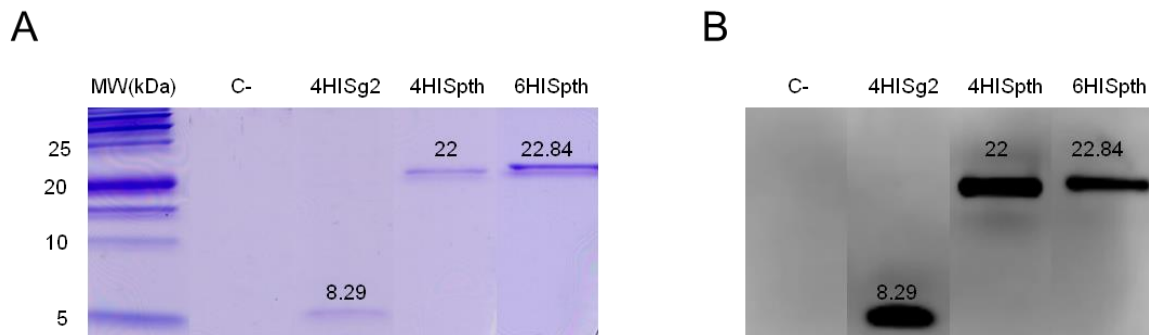


Figura 21. Expresión de la proteína 4HISg2 en *E. coli*. **A.** Gel de Tris-tricina al 16.5% teñido con Coomassie mostrando el purificado de proteínas a través resina cargada de Níquel (Ni-NTA agarosa) provenientes de *E. coli* DH5 α transformada con el vector vacío pUCP24-L3 (C-), y la construcción pUCP24-L3/g2 (4HISg2), con el vector pKQV4 que expresa a la proteína Pth fusionada con la misma etiqueta que lleva g2 (4HISpth) y con vector pKQV4 que expresa a la proteína Pth fusionada con una etiqueta de seis histidinas (6HISpth). **B** Análisis por western blot de la expresión de las proteínas visualizadas en A, utilizando el anticuerpo comercial antiMAT.

Con estos resultados se comprobó que la proteína g2 sí es expresada desde el vector pUCP24-L3 siendo necesario su enriquecimiento para ser detectada.

7.3.3 Ensayos de infección del fago JBD18.

Para evaluar la posible función anti-CRISPR del ORF *g2* las construcciones pUCP24/*g2*, pUCP24-L3/*g2* y pUCP24-L3/4HIS*g2* fueron expresados en la bacteria PA14, de esta manera la expresión a partir del plásmido permitiría el desarrollo de un fago sensible a la actividad CRISPR de PA14. Tanto la cepa PA14 como la mutante PA14 Δ CR/Cas fueron transformadas con las construcciones y con los plásmidos vacíos y sobre éstas se realizaron ensayos de infección usando el fago JBD18, sensible al sistema CRISPR/Cas de PA14. Se corroboró que las construcciones pUCP24/*g2*, pUCP24-L3/*g2* y pUCP24-L3/4HIS*g2* (Figuras 14, 17 y 20) presentaron actividad la anti-CRISPR observada en la Figura 22.

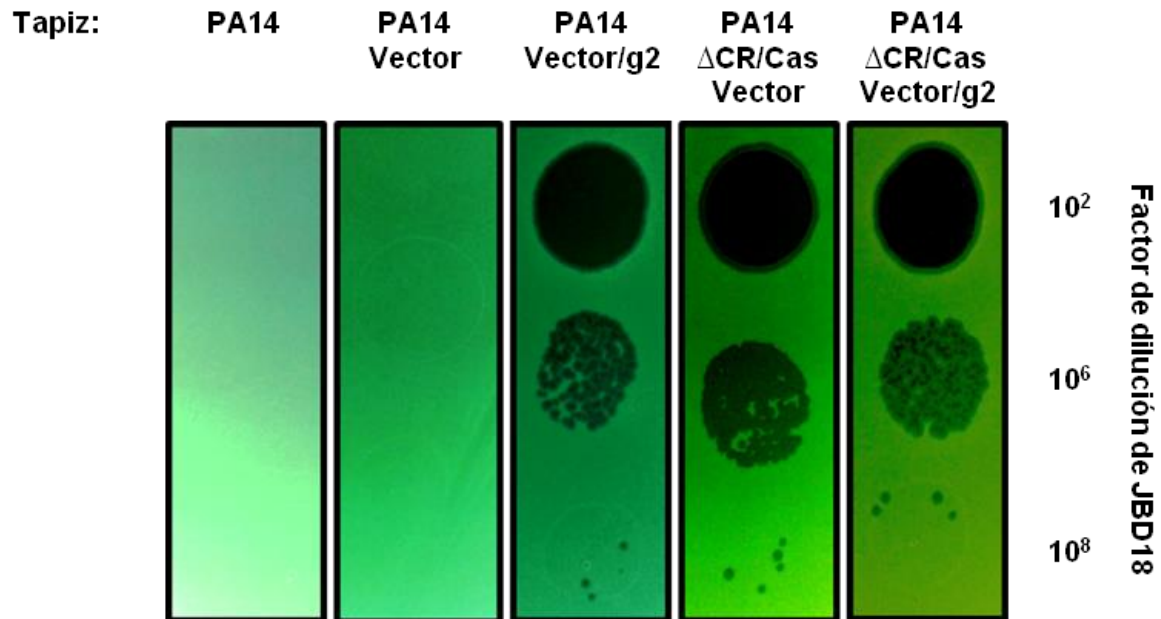


Figura 22. Inhibición del sistema CRISPR/Cas de PA14 mediada por el gen *g2* del fago H70. Se gotearon diluciones de JBD18, el cual no puede infectar a PA14 debido a su sistema CRISPR/Cas activo. Sin embargo, la presencia de *g2* es suficiente para permitir infección de forma semejante a cuando el sistema CRISPR/Cas está deletado de PA14 (PA14 Δ CR/Cas). En esta figura, Vector hace referencia a pUCP24 y pUCP24-L3, mientras que Vector/*g2* hace referencia a las construcciones pUCP24/*g2*, pUCP24-L3/*g2* y pUCP24-L3/4HIS*g2*.

El gen *g2* del fago H70 expresado a partir de un plásmido fue capaz de inhibir el sistema CRISPR/Cas de PA14 y permitir la infección de JBD18. De hecho, las placas líticas de JBD18 que en la lisógena PA14(H70) eran turbias, ahora son más claras, semejante a las observadas en PA14 Δ CR/Cas.

7.4 Análisis *in silico* de *g2*.

Con el objetivo de conocer la localización del gen *g2* en otros genomas, se hizo una búsqueda tipo BLASTn de *g2* contra la base de datos del NCBI. Con ello se encontró que homólogos a *g2* están presentes tanto en fagos como en profagos de *P. aeruginosa* (un fago y cinco profagos). En los casos del fago LPB1 y el profago de la cepa PACS458, se encontraron proteínas homólogas a *g2* que codifican una versión más larga que la proteína *g2* del fago H70 en el extremo 5' (Figura 23A y B). La proteína homóloga a *g2* en el profago de la cepa PACS458 clona fa1376 (No. de acceso EU595743) de *P. aeruginosa* tendría 16 aminoácidos más empezando con el aminoácido valina, mientras que la proteína homóloga a *g2* en LPB1 (No. de acceso NC_027298) tendría 20 aminoácidos más empezando con una metionina. En la Figura 23 se muestran un alineamiento de *g2* de H70 con las regiones río arriba de las versiones más largas de *g2* en el fago y profago arriba mencionados.

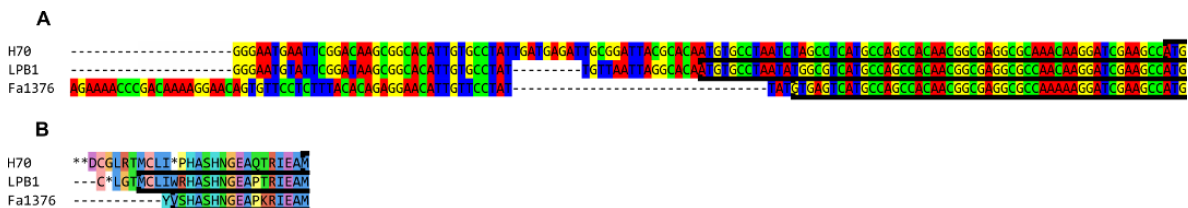


Figura 23. Comparación de la región río arriba del gen *g2* de H70 con las versiones más largas de *g2*. Se muestra el alineamiento de secuencia de nucleótidos (A) y aminoácidos (B) río arriba del codón de inicio de *g2* de H70 y las versiones largas de *g2* del profago de la clona fa1376 de *P. aeruginosa* y del fago LPB1. Se resalta en líneas negras el extremo 5' de cada proteína. Se utilizó la herramienta Seaview (Gouy *et al.*, 2010) usando el programa MUSCLE.

Por otra parte, se comparó la secuencia de aminoácidos de la proteína g2 con un miembro de las cinco familias de anti-CRISPR I-F reportadas por Bondy-Denomy *et al.* (2013) haciendo un alineamiento basado en su estructura secundaria con el fin de evidenciar su relación con las otras familias anti-CRISPR.

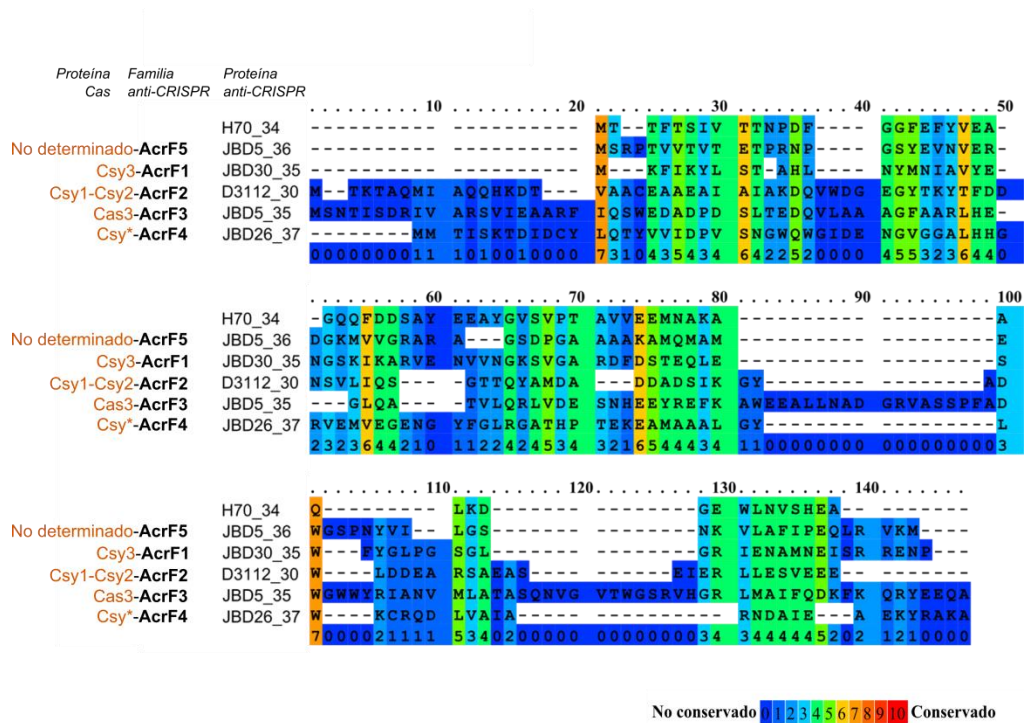


Figura 24. Comparación de proteínas anti-CRISPR I-F. En la figura se muestran las secuencias de proteínas representantes de las cinco familias anti-CRISPR comparadas con la proteína codificada por el gen 34 del fago H70 (H70_34) o g2. Además se señala en letras negras el nombre de la familia a la que pertenecen (AcrF1-AcrF5) y en letras café el nombre de la proteína Cas a la que se unen; el asterisco indica que no se ha determinado a qué componente del complejo Csy se unen esa proteína anti-CRISPR. El alineamiento fue hecho con el programa PRALINE (Simossis & Heringa, 2005).

En la Figura 24 se observa el grado de conservación en diferentes posiciones de los aminoácidos de las proteínas anti-CRISPR. A pesar de ser proteínas diferentes, es notorio que existen posiciones conservadas, sobre todo entre nuestra proteína de interés g2 y AcrF5. Debido a ello se realizó un nuevo alineamiento entre dichas secuencias y fue posible evidenciar una mayor conservación entre g2 y AcrF5 (Figura 25). Sin embargo, el porcentaje de identidad entre g2 y AcrF5 resultó ser del 23%. Además, se hicieron

comparaciones entre las demás proteínas anti-CRISPR y el porcentaje de identidad no fue mayor al 28% (ver ANEXO 7).

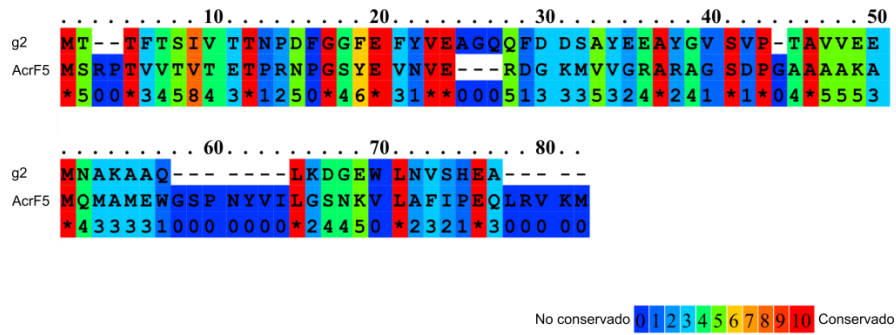


Figura 25. Comparación de las proteínas g2 y AcrF5. En la figura se muestra el alineamiento de g2 con AcrF5. El alineamiento fue hecho con el programa PRALINE (Simossis & Heringa, 2005).

VIII. DISCUSIÓN

Inicialmente, cinco familias de proteínas anti-CRISPR fueron reportadas (Bondy-Denomy *et al.*, 2013), todas ellas codificadas en fagos *Mu-like*. Posteriormente, una búsqueda en una colección de fagos de este tipo no identificó ningún otro gen diferente asociado a esta función. Al comparar el genoma del fago H70 de *P. aeruginosa* con otros fagos tipo *Mu-like*, se identificó un ORF novedoso (*g2*) en la región de plasticidad genética donde se ubican todos los genes anti-CRISPR hasta ahora reportados en diferentes genomas *Mu-like* (Cazares *et al.*, 2014), por lo que se especuló una función anti-CRISPR por parte de este nuevo ORF. En el mismo trabajo Cazares *et al.* (2014) señalaron que el fago PaMx73, de la misma colección, codifica una proteína homóloga al anti-CRISPR I-F presente en el fago JBD26, por este motivo PaMx73 se usó como control en esta tesis.

A pesar de que los fagos *Mu-like* tienen dos protoespaciadores blanco del sistema CRISPR/CAS de la cepa PA14, sus proteínas anti-CRISPR les permiten infectar exitosamente esta cepa (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Al analizar el genoma de los fagos H70 y PaMx73, se encontraron esos mismos dos protoespaciadores en H70 y sólo uno en PaMx73. Un elemento importante para que los protoespaciadores puedan ser reconocidos por el complejo CRISPR/Cas de PA14 es la presencia de un motivo 5´GG 3´ adyacente al protoespaciador (Cady *et al.*, 2014). Ambos fagos contienen las secuencias blanco intactas, por lo tanto, pueden ser blanco del sistema CRISPR/Cas de PA14, no obstante, estos fagos infectan exitosamente a la cepa PA14 evadiendo su sistema de inmunidad. De acuerdo a nuestros resultados, la proteína *g2* de H70 sería la responsable de evadir el sistema inmune de la bacteria. La rápida respuesta de las proteínas anti-CRISPR es necesaria para evitar la degradación del genoma viral; se ha sugerido que éstas pueden ser empaquetadas en la cápside e introducidas a la bacteria cuando ingresa el genoma del fago (Samson *et al.*, 2013). Esto no se ha podido esclarecer ya que, si bien Cazares *et al.* (2014) no pudieron visualizar a la proteína

anti-CRISPR putativa dentro de las partículas de fagos PaMx73, su metodología no permitió observar proteínas más pequeñas de 13 kDa, existiendo la posibilidad de que la proteína de g2 esté presente en pequeñas cantidades en los viriones.

Por otra parte, se ha reportado que los profagos que portan genes anti-CRISPR median la actividad anti-CRISPR permitiendo la infección del fago JBD18 que es inhibido por el sistema CRISPR/Cas de PA14 (Bondy-Denomy *et al.*, 2013). Pudimos observar la infección de JBD18 en un tapiz de la lisógena PA14(H70) y PA14(PaMx73), evidenciando el fenotipo anti-CRISPR. Este fenómeno representa un escenario natural ya que, al igual que otros genes anti-CRISPR, g2 se encuentra en fagos y profagos de *P. aeruginosa*. Además, algunos genes anti-CRISPR se localizan en elementos móviles de *P. aeruginosa*. Se ha observado que los genes anti-CRISPR se encuentran ampliamente distribuidos en cepas clínicas de *P. aeruginosa* por lo que se ha sugerido que estos genes cobran relevancia en la transferencia horizontal de genes ya que al bloquear el sistema CRISPR/Cas permitirían la entrada de material genético foráneo (Pawluk *et al.*, 2014; van Belkum *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que las cepas con un sistema CRISPR/Cas I-F y I-E que carecen de genes anti-CRISPR presentan un menor tamaño genómico con respecto a las que sí los tienen, sugiriendo una importante función en la variabilidad de la población bacteriana (van Belkum *et al.*, 2015).

Al expresar el gen g2 a través de un plásmido en la cepa PA14 se observó la infección del fago JBD18, confirmando su actividad anti-CRISPR ya que este fago es blanco del sistema CRISPR/Cas de PA14. Esto representa un caso más en el que se puede inferir la función de un gen debido a la posición genómica a pesar de no compartir identidad de secuencia con otros genes (Cumby *et al.*, 2012).

Para confirmar la expresión de la proteína g2 fue necesario agregar una etiqueta de histidinas para purificarla ya que a pesar de que fue expresada a partir de un vector de alto número de copias en *E. coli* (West *et al.*, 1994), no fue posible observar una sobreexpresión. Se ha reportado que la proteína anti-CRISPR AcrF4

no pudo ser purificada incluso bajo la expresión de promotores fuertes (Bondy-Denomy *et al.*, 2015), pudiendo tratarse de una proteína no tolerable en grandes cantidades por la bacteria.

Adicionalmente, realizamos un análisis comparativo basado en la búsqueda de similitud de la estructura secundaria, con lo que se reveló la existencia de ciertos residuos conservados entre las proteínas anti-CRISPR y una posible semejanza de g2 con AcrF5. Una alta similitud entre proteínas permite evidenciar un mismo origen evolutivo, es decir, que son homólogas; a menudo, la similitud se describe en términos de porcentaje de identidad (Pearson, 2013). En general se considera que dos secuencias son homólogas si presentan más del 30% de identidad a lo largo de toda su secuencia (Pearson, 2013). Es difícil determinar si dos secuencias son homólogas cuando existen porcentajes de identidad entre 20-35% (“twilight zone”), ya que muchas resultan ser falsos positivos (Rost, 1999). No obstante, también se sabe que una baja similitud de secuencia no significa ausencia de homología, por ejemplo, existen proteínas parálogas que son 25-45% idénticos (Pearson, 2013). En el caso de g2 y AcrF5, el porcentaje de identidad de aminoácidos es del 23%, de modo que si existe homología entre estas proteínas es difícil de determinar. Los miembros de cada una de las familias de anti-CRISPRs son homólogos, ya que presentan un alto porcentaje de identidad (alrededor del 90%), y entre algunos de los representantes de estas familias se encontró que este porcentaje no es mayor al 28%. Las familias anti-CRISPR podrían ser proteínas homólogas que llevan a cabo una misma función pero de diferentes formas. Hasta ahora se ha descrito que estas proteínas inhiben al sistema CRISPR/Cas uniéndose ya sea al complejo Csy o a la proteína Cas3 (Bondy-Denomy *et al.*, 2015).

Mediante la búsqueda de g2 en otros genomas se pudo conocer que podrían existir dos versiones de g2 más largas en el extremo 5' en el fago LPB1 y el profago de la clona fa1376 de *P. aeruginosa*. Las comparaciones de las regiones río arriba de estas versiones de g2 parecen coincidir más entre H70 y LPB1. En fa1376, los cambios de bases generarían una proteína más parecida a

la versión de g2 de LPB1. Sin embargo, ésta es cuatro aminoácidos más pequeña ya que en la posición de su triptófano que en H70 coincide con el mencionado codón de paro, existe una valina con la que empezaría esta versión de g2 de fa1376. Sin embargo, es necesario descartar una errónea anotación debido a la secuencia incorrecta de los genomas en que se encontraron dichas versiones de g2.

La región genómica en donde se encuentra g2 es muy similar en los tres fagos, de hecho existe un promotor putativo río arriba del *locus* anti-CRISPR en fagos *Mu-like* que posiblemente regule su transcripción. Además, Cazares *et al.* (2014) señalan la existencia de un posible terminador al final de dicho *locus* y un bajo contenido de GC de esta región en PaMx73 y H70. Estas características apuntan a que el *locus* anti-CRISPR es una unidad transcripcional independiente (Bondy-Denomy *et al.*, 2013; Cazares *et al.*, 2014) o elemento “*moron*”, el cual se transmite de manera horizontal (Cumby *et al.*, 2012). Esto también es apoyado por el hecho de que se han encontrado nueve distintos arreglos de varios genes anti-CRISPR I-F y I-E posiblemente generados mediante múltiples eventos de recombinación a través de transferencia horizontal de genes (Pawluk *et al.*, 2014). El arreglo anti-CRISPR de PaMx73 pertenece a uno de los ya descritos. En cambio, el arreglo de H70 es nuevo pero semejante al de los fagos DMS3, JBD30 y MP29 en el hecho de que sólo tienen un gen anti-CRISPR junto al gen que codifica la proteína reguladora putativa.

Los genes anti-CRISPR y los sistemas CRISPR/Cas ejemplifican muy bien el “*arms race*” en el desarrollo de mecanismos de defensa y contradefensa entre fagos y bacterias. Su presencia está implicada en el *fitness* de la bacteria posiblemente regulando la transferencia horizontal de genes, inclusive, pueden relacionarse con la falta de funcionalidad observada en muchos de los sistemas CRISPR/Cas (van Belkum *et al.*, 2015). Además, no sólo están involucrados en la etapa de interferencia CRISPR/Cas, sino que recientemente se ha revelado que bloquean la adquisición de protoespaciadores (Vorontsova *et al.*, 2015)

demostrándose que la existencia de estos genes parece ser muy importante en muchos aspectos.

IX. CONCLUSIONES

- Los fagos H70 y PaMx73 infectaron la cepa PA14 a pesar de tener protoespaciadores blanco de su sistema CRISPR/Cas.
- Como profago, H70 permitió la infección del fago JBD18, sensible al sistema CRISPR/Cas de PA14.
- Solamente la expresión de el gen *g2* a partir del plásmido pUCP24-L3 medió la actividad anti-CRISPR.
- Homólogos al gen *g2* con alta identidad de secuencia de nucleótidos fueron identificados en un fago y cinco profagos de *P. aeruginosa* y podrían existir otras versiones que codifican proteínas más largas de *g2*.
- Existen aminoácidos conservados en ciertas posiciones de la proteína *g2* y otros anti-CRISPR. Sin embargo, no es posible determinar si estas proteínas tienen un origen común.

X. PERSPECTIVAS

- Confirmar el requerimiento de g2 durante el proceso de infección lítica de H70 y determinar si g2 como proteína podría ser empaquetada en el virión.
- Analizar *in silico* la posible interacción de g2 con las proteínas del complejo Csy y Cas3.
- Determinar si g2 interacciona con algún componente del sistema CRISPR/Cas de PA14
- Determinar los residuos importantes en g2 para que lleve a cabo la inhibición del sistema CRISPR/Cas.
- Corroborar la secuencia correcta de los genomas en donde se encontraron las versiones más largas de g2. En caso de confirmar la secuencia en base de datos, determinar si son funcionales en el proceso de inhibición de CRISPR/Cas y comparar su actividad anti-CRISPR.

REFERENCIAS

Ackermann H. W. (1998). **Tailed bacteriophages—the order Caudovirales.** *Advances in Virus Research.* 51: 135-201.

Ackermann H. W. (2007). **5500 Phages examined in the electron microscope.** *Archives of Virology.* 152(2): 227-243.

Bohannan B. J. M. and Lenski R. E. (2000). **Linking genetic change to community evolution: insights from studies of bacteria and bacteriophage.** *Ecology Letters.* 3(4): 362-377.

Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K. L. and Davidson A. R. (2013). **Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system.** *Nature.* 493(7432): 429-432.

Bondy-Denomy J., Garcia B., Strum S., Du M., Rollins M. F., Hidalgo-Reyes Y., Wiedenheft B., Maxwell K. L. and Davidson A. R. (2015). **Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti-CRISPR proteins.** *Nature.* 526(7571): 136-139.

Brüssow H. and Hendrix R. W. (2002). **Phage genomics: small is beautiful.** *Cell.* 108(1): 13-16.

Buckling A. and Brockhurst M. (2012). **Bacteria-virus coevolution.** *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 751: 347-370.

Cady K. C., White A. S., Hammond J. H., Abendroth M. D., Karthikeyan R. S. G., Lalitha P., Zegans M. E. and O'Toole G. A. (2011). **Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates.** *Microbiology.* 157(Pt 2): 430-437.

Cady K. C., Bondy-Denomy J., Heussler G. E., Davidson A. R. and O'Toole G. A. (2012). **The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas***

***aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages.** *Journal of Bacteriology*. 194(21): 5728-5738.

Cazares A., Mendoza-Hernández G. and Guarneros G. (2014). **Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages.** *BMC Genomics*. 15: 1146.

Chen W. P. and Kuo T. T. (1993). **A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA.** *Nucleic Acids Research*. 21(9): 2260.

Choi K. H., Kumar A. and Schweiser H. P. (2006). **A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation.** *Journal of Microbiological Methods*. 64(3): 391-397.

Cumby N., Davidson A. R. and Maxwell K. L. (2012). **The moron comes of age.** *Bacteriophage*. 2(4): 225-228.

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z. A., Eckert M. R., Vogel J. and Charpentier E. (2011). **CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III.** *Nature*. 471(7340): 602-607.

Essoh C., Blouin Y., Loukou G., Cablanmian A., Lathro S., Kutter E., Thien H. V., Vergnaud G. and Pourcel C. (2013). **The Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Cystic Fibrosis Patients to Bacteriophages.** *PLoS One*. 8(4): e60575.

Fokine A. and Rossman M. G. (2014). **Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages.** *Bacteriophage*. 4(1): e28281.

Gasiunas G. and Sinkunas T. (2014). **Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity.** *Cellular and Molecular Life Sciences*. 71(3): 449-465.

Gouy M., Guindon S. and Gascuel O. (2010). **SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building.** *Molecular Biology and Evolution*. 27(2): 221-224.

Green R. and Rogers E. J. (2013). **Chemical transformation of *E. coli*.** *Methods in Enzymology*. 529: 329-336.

Grissa I., Vergnaud G. and Pourcel C. (2007). **CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats.** *Nucleic Acids Research*. 35(Web Server issue): W52-W57.

Grundy F. J. and Howe M. M. (1985). **Morphogenetic Structures Present in Lysates of Amber Mutants of Bacteriophage Mu.** *Virology*. 143(2): 485-504.

Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F. and Nelson K. E. (2005). **A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes.** *PLoS Computational Biology*. 1(6): e60.

Haurwitz R. E., Jinek M., Wiedenheft B., Zhou K. and Doudna J.A. (2010). **Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease.** *Science*. 329(5997): 1355-1358.

Haurwitz R. E., Sternberg S. H. and Doudna J. A. (2012). **Csy4 relies on an unusual catalytic dyad to position and cleave CRISPR RNA.** *The EMBO Journal*. 31(12): 2824-2832.

Horvath P. and Barrangou R. (2010). **CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea.** *Science*. 327 (5962): 167-170.

Hyman P. and Abedon S. T. (2010). **Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance.** *Advances in Applied Microbiology*. 70: 217-248.

Jansen R., Embden J. D., Gaastra W. and Schouls L. M. (2002). **Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.** *Molecular Microbiology*. 43(6): 1565-1575.

Koskella B. and Brockhurst M. A. (2014). **Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities.** *FEMS Microbiology Reviews*. 38(5): 916-931.

Labrie S. J., Samson J. E. and Moineau S. (2010). **Bacteriophage resistance mechanisms.** *Nature Reviews Microbiology*. 8(5): 317-327.

Makarova K. S., Haft D. H., Barrangou R., Brouns S. J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F. J., Wolf Y. I., Yakunin A. F., van der Oost J. and Koonin E. V. (2011). **Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems.** *Nature Reviews Microbiology*. 9(6): 467-477.

Makarova K. S. and Koonin E.V. (2015). **Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems.** *Methods in Molecular Biology*. 1311: 47-75.

Nelson M. and McClelland M. (1992). **Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes.** *Methods in Enzymology*. 216: 279-303.

Pawluk A., Bondy-Denomy J., Cheung V. H., Maxwell K. L. and Davidson A. R. (2014). **New Group of Phage Anti-CRISPR Genes Inhibits the Type I-E CRISPR-Cas System of Pseudomonas aeruginosa.** *mBio*. 5(2): e00896.

Pearson W. R. (2013). **An introduction to sequence similarity ("homology") searching.** *Current Protocols in Bioinformatics*. Chapter 3: Unit 3.1.

Rath D., Amlinger L., Rath A. and Lundgren M. (2015). **The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications.** *Biochimie*. 117: 119-128.

Rollins M. F., Schuman J. T., Paulus K., Bukhari H. S. and Wiedenheft B. (2015). **Mechanism of foreign DNA recognition by a CRISPR RNA-guided surveillance complex from Pseudomonas aeruginosa.** *Nucleic Acids Research*. 43(4): 2216-2222.

Rost B. (1999). **Twilight zone of protein sequence alignments.** *Protein Engineering*. 12(2): 85-94.

Samson J. E., Magadan A. H., Sabri M. and Moineau S. (2013). **Revenge of the phages: defeating bacterial defences.** *Nature Reviews Microbiology*. 11(10): 675-687.

Schägger H. and Von Jagow G. (1987). **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa.** *Analytical biochemistry*. 166(2): 368-379.

Sepúlveda-Robles O., Kameyama L. and Guarneros G. (2012). **High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages.** *Applied and Environmental Microbiology*. 78(12): 4510-4515.

Simossis V. A. and Heringa J. (2005). **PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information.** *Nucleic Acids Research*. 33(Web Server issue): W289-W294.

Stern A. and Sorek R. (2011). **The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes.** *Bioessays*. 33(1): 43-51.

van Belkum A., Soriaga L. B., LaFave M. C., Akella S., Veyrieras J. B., Barbu E. M., Shortridge D., Blanc B., Hannum G., Zambardi G., Miller K., Enright M. C., Mugnier N., Bami D., Schicklin S., Felderman M., Schwartz A. S., Richardson T. H., Peterson T. C., Hubby B. and Cady K.C. (2015). **Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.** *mBio*. 6 (6): e01796-15.

van der Oost J., Westra E. R., Jackson R. N. and Wiedenheft B. (2014). **Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems.** *Nature Reviews Microbiology*. 12(7): 479-492.

van Duijn E., Barbu I. M., Barendregt A., Jore M. M., Wiedenheft B., Lundgren M., Westra E. R., Brouns S. J., Doudna J. A., van der Oost J. and Heck A. J. (2012). **Native tandem and ion mobility mass spectrometry highlight structural and modular similarities in clustered-regularly-interspaced shot-**

palindromic-repeats (CRISPR)-associated protein complexes from *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and Cellular Proteomics*. 11(11): 1430-1441.

Vorontsova D., Datsenko K. A., Medvedeva S., Bondy-Denomy J., Savitskaya E. E., Pougach K., Logacheva M., Wiedenheft B., Davidson A. R., Severinov K. and Semenova E. (2015). **Foreign DNA acquisition by the I-F CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery.** *Nucleic Acids Research*. 43(22): 10848-10860.

West S. E. H., Schweizerb H. P., Dall C., Sample A. K. and Runyen-Janecky L. J. (1994). **Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/l9 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Gene*. 148(1): 81-86.

Westra E. R., Buckling A. and Fineran P. C. (2014). **CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity.** *Nature Reviews Microbiology*. 12(5): 317-326.

Wiedenheft B., van Duijn E., Bultema J. B., Waghmare S. P., Zhou K., Barendregt A., Westphal W., Heck A. J., Boekema E. J., Dickman M. J. and Doudna J. A. (2011). **RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions.** *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(25): 10092-10097.

Wiedenheft B. (2013). **In defense of phage: Viral suppressors of CRISPR-mediated adaptive immunity in bacteria.** *RNA Biology*. 10(5): 886-890.

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.
- NZY+: 10 g NZ amina (*casein hydrolysate*), 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl. Llevar a un litro con agua destilada (ajustar el pH a 7.5 con NaOH). Esterilizar por autoclave. Antes de usarse añadir los siguientes suplementos esterilizados por filtración: 12.5 ml MgCl₂ 1 M, 12.5 ml MgSO₄ 1 M, 20 ml glucosa 20% v/v.

Extracción de DNA bacteriano

- Buffer de lisis: 0.72 g tris-acetato pH 7.8, 0.16 g acetato de sodio, 0.029 g EDTA, 1 g SDS.

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 µl Tritón X-100, 21.43 µl 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 µl 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.

Diálisis

- Buffer de diálisis: 20 ml tris-HCl 1 M pH 7.6, 100 ml glicerol al 100%. Llevar a dos litros con agua destilada estéril.

Gel de proteínas

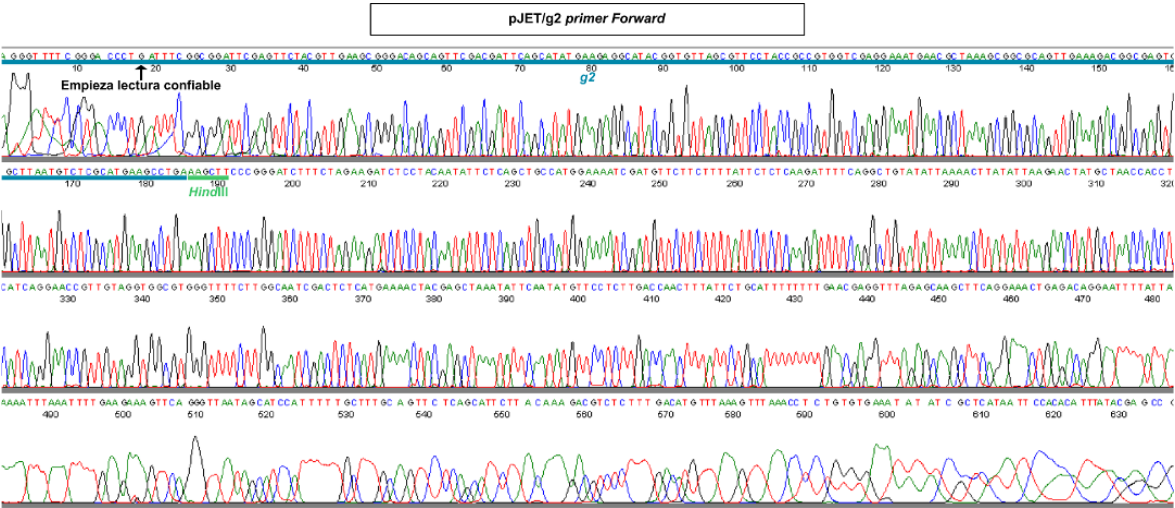
- Monómeros (49.5%T, 3%C): 48 g de acrilamida, 1.5 g de bis-acrilamida. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril. Filtrar y guardar a 4°C en frasco ámbar.
- Buffer gel: 36.4 g tris, 3 g SDS. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.45 con HCl). Filtrar y guardar a 4°C.
- Buffer cátodo: 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.

Western blot

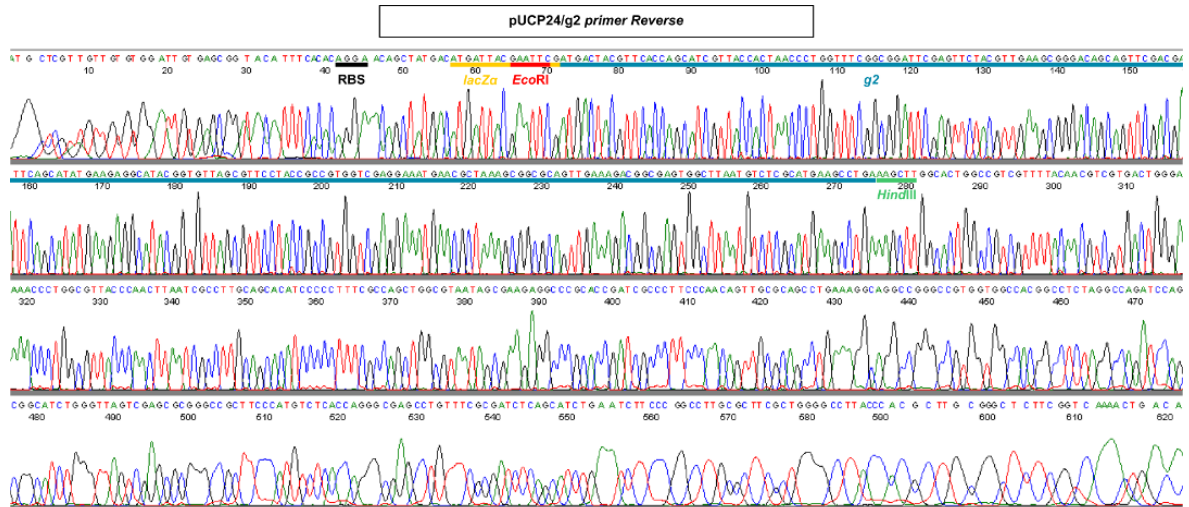
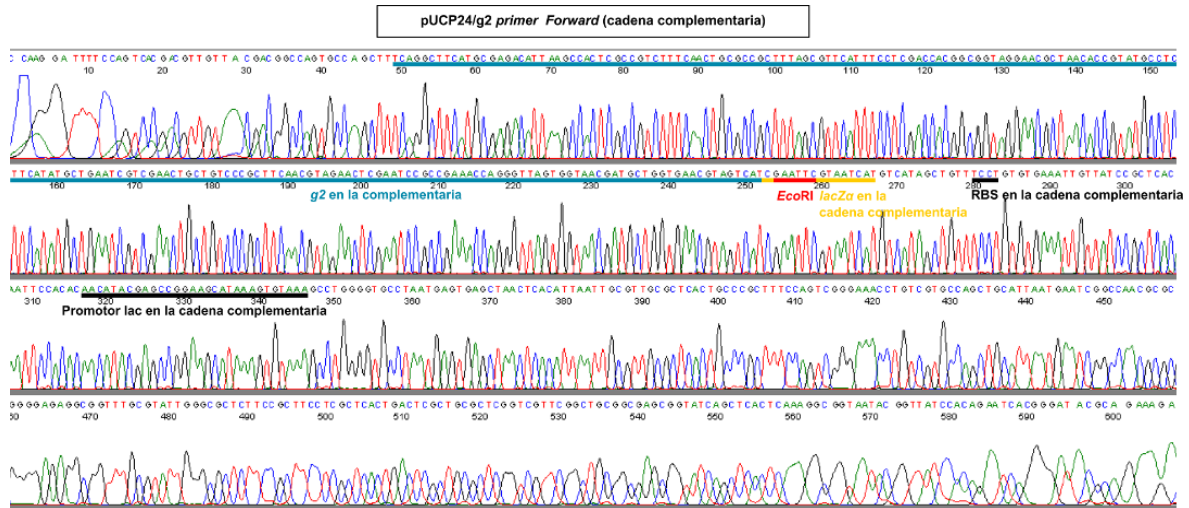
- Buffer de transferencia: 100 ml *tank* buffer, 200 ml metanol. Llevar a un litro con agua destilada.
- *Tank* buffer: 12 g tris, 57.6 g glicina, 40 ml de SDS al 10%. Llevar a un litro con agua destilada. No es necesario medir el pH.

- *Stock* PBS 10X: 80 g NaCl, 2 g KCl, 11.5 g Na₂HPO₄*7H₂O, 2 g KH₂PO₄. Llevar a un litro con destilada (ajustar el pH a 7.4 con NaOH). Filtrar con autoclave.
- PBS-Tween 20 1X: 50 ml stock PBS 10X, 1 ml Tween 20. Llevar a 500ml con agua destilada.
- Buffer para anticuerpo secundario (regulador de bloqueo): 2.5 g EDTA tetrasódico, 1 ml Tween 20, 100 ml PBS 10X. Disolver el EDTA y la gelatina por separado en 100 ml; después mezclar con el total de reactivos. Calentar y al final se agrega el Tween 20.

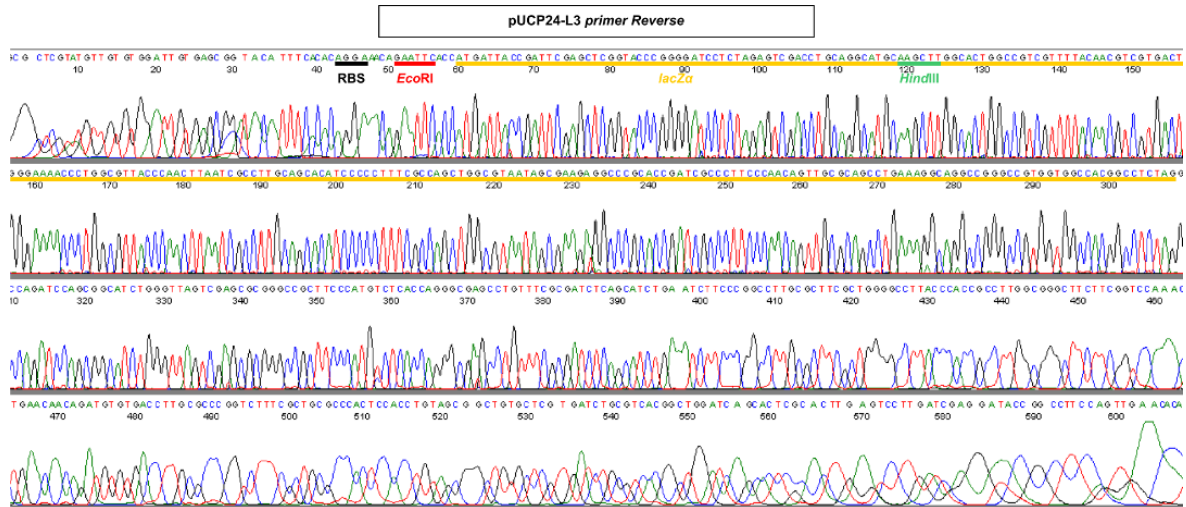
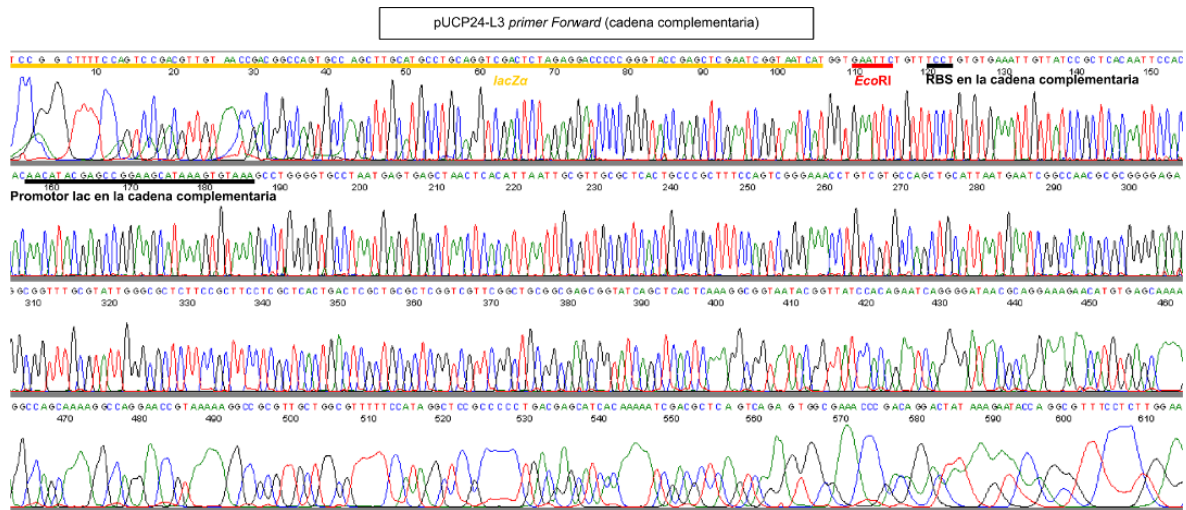
ANEXO 2. Electroferograma de la construcción pJET/g2.



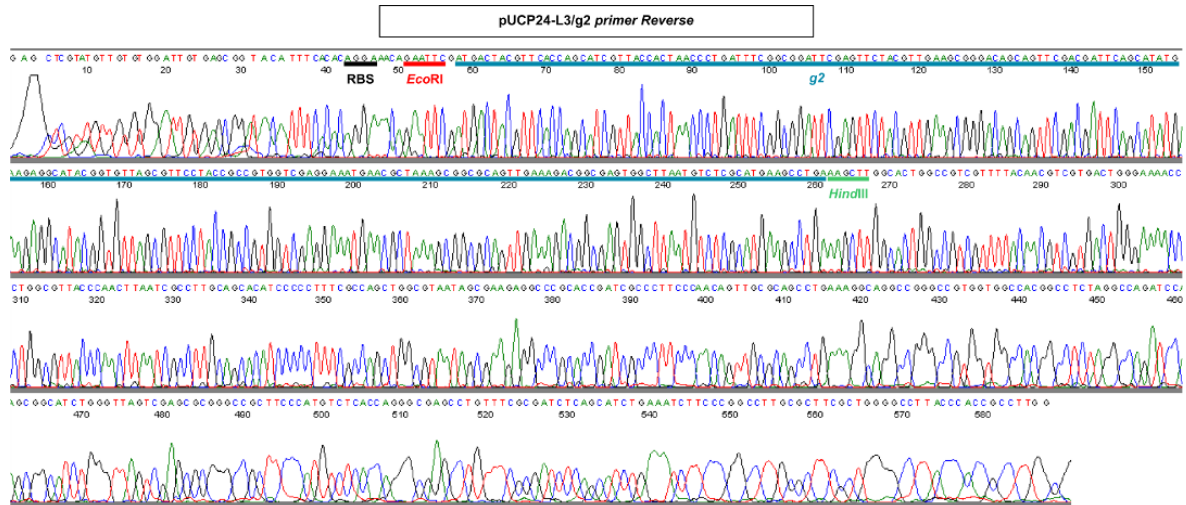
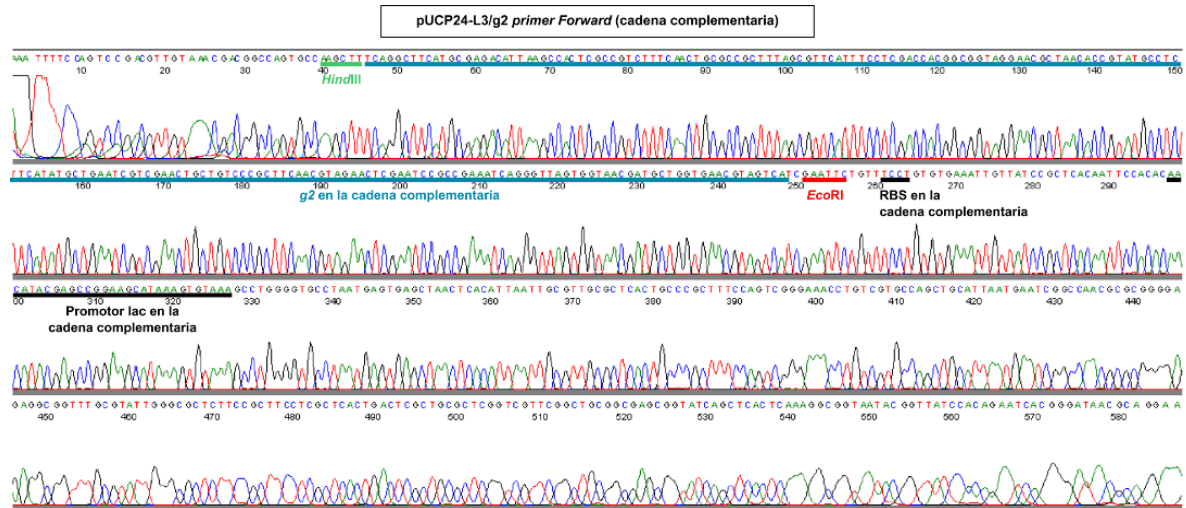
ANEXO 3. Electroferogramas de la construcción pUCP24/g2.



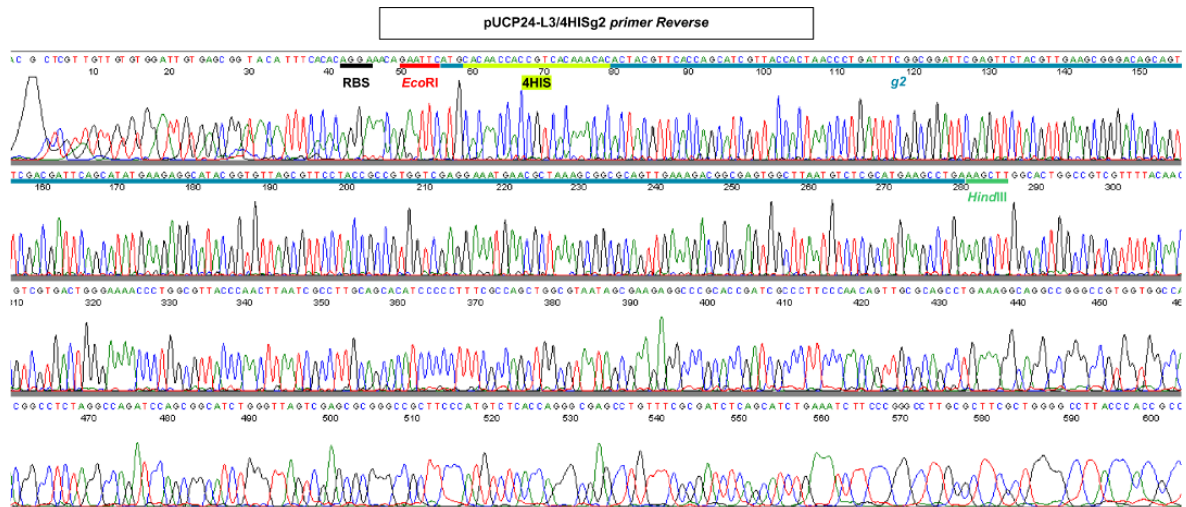
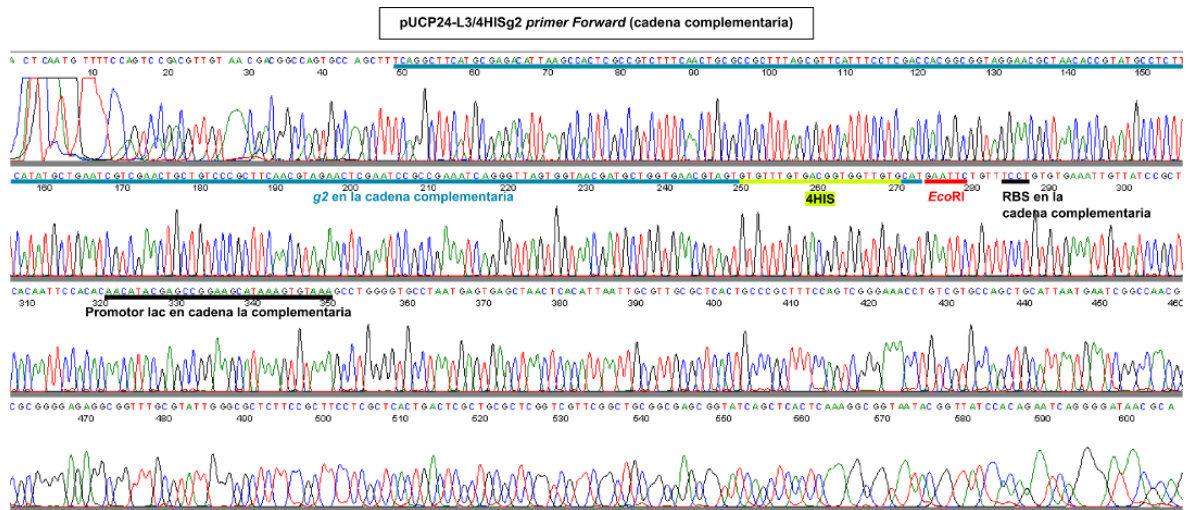
ANEXO 4. Electroferogramas de la construcción pUCP24-L3.



ANEXO 5. Electroferogramas de la construcción pUCP24-L3/g2.



ANEXO 6. Electroferograma de la construcción pUCP24-L3/4HISg2.



ANEXO 7. Alineamientos entre AcrFs con PRALINE.

```

      . . . . . 10. . . . . 20. . . . . 30. . . . . 40. . . . . 50
AcrF1  M--KFIKYLST AHLNYMNI AV YENGSKIKAR VENVVNG---K-----
AcrF2  MTKTAQMI AQHKD--TVAA CEAAEAIAIA KDQVWDGEGY TKYTFDDNSV
Consistency *0*2353763 3*250048*5 1*2443*333 264*05*000 0*00000000
  
```

23%
idénticos

```

      . . . . . 60. . . . . 70. . . . . 80. . . . . 90. . . . . 100
AcrF1  -----S V GARDFDSTE QLESWFYGLP G SGLGRIENA MNEISRREN P
AcrF2  LIQSGTTQYA MDADDADSIK GYADWLDDEA R SAEASEIER LLESVEEE--
Consistency 000000000 6 53*2*2**3 5 2334*40313 2*41431143 71*2244*00
  
```

```

      . . . . . 10. . . . . 20. . . . . 30. . . . . 40. . . . . 50
AcrF2  M--TKTAQMI AQHKD---VAACEAAEAT AIAKDQVWDG EGYTKYTFD D
AcrF3  MSNTISDRIV ARSVIEAARF IQSWEDADPD SLTEDQVLAA AGFAARLHE-
Consistency *00*152558 *5411164000 8361*2*631 6745***124 3*64323260
  
```

23%
idénticos

```

      . . . . . 60. . . . . 70. . . . . 80. . . . . 90. . . . . 100
AcrF2  NSVLIQSGTT QYAMDA---D DADSIKGY-- ----ADW---
AcrF3  ---GLQATVL QRLVDESNE EYREFKAWEE ALLNADGRVA SSPFADWGW
Consistency 00007*6243 *235*3000 6 62244*4400 0000000000 0000***000
  
```

```

      . . . . . 110. . . . . 120. . . . . 130. . . . . 140. . .
AcrF2  -LDDEARSAE AS----- --EIERLLES VEEE-----
AcrF3  YRIANVMLAT ASQNVGVVTWG SRVHGRMLAI FQDKFKQRYE EQA
Consistency 02124532*3 *00000000 00212*732 3665000000 000
  
```

```

      . . . . . 10. . . . . 20. . . . . 30. . . . . 40. . . . . 50
AcrF3  MSNTISDRIV ARSVIEAARF IQSWEDADPD SLTEDQVLAA AGFAARLHEG
AcrF4  M--MTIS---- -KTDIDC--Y LQTYVVVIDPV SNGWQWIDE NGVGGALHHG
Consistency *02***0000 0651*6300 6 7*54213**1 *120411723 2*3443**3*
  
```

28%
idénticos

```

      . . . . . 60. . . . . 70. . . . . 80. . . . . 90. . . . . 100
AcrF3  ---LQATVL QRLVDESNE EYREFKAWEE ALLNADGRVA SSPFADWGW
AcrF4  RVEMVEGENG YFGLRGATHP TEKE--AMAA AL-----GYLW-
Consistency 0000664310 31062264*3 326*00*233 **00000000 00000340*0
  
```

```

      . . . . . 110. . . . . 120. . . . . 130. . . . . 140. . .
AcrF3  YRIANVMLAT ASQNVGVVTWG SRVHGRMLAI FQDKFKQRYE EQA
AcrF4  -KCRQDLVAI A----- --RNDAI EA EK----YR AKA
Consistency 06234176*3 *00000000 00000*11** 136*0000*4 35*
  
```

```

      . . . . . 10. . . . . 20. . . . . 30. . . . . 40. . . . . 50
AcrF5  MSRPTVVTVT ETPRNPGSYE VNVERDGMV VGRARA---G SDPGAAAAKA
AcrF1  M--KFIKYL ST-AHLNYMN IAVYENGSKI KARVENVVNG KSVGARDFDS
Consistency 000338333 4*03414234 82*245*438 24*542000* 442**32236
  
```

18%
idénticos

```

      . . . . . 60. . . . . 70. . . . . 80. . . . .
AcrF5  MQMAMWGWSP NYVI--LGSN KVLAFIPEQL RVKM-
AcrF1  TEQLESW--- FYGLPGSGLG RIENAMNEIS RREN P
Consistency 364324*000 1*17002*24 6812251*12 *1520
  
```