



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

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Identificación de los componentes de la envoltura celular en la
infección del colifago mEp021

Tesis que presenta

Biol. Roxana Yessika Vargas Jerónimo

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Ciudad de México, Agosto 2016

Asesores:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Dr. Jaime García Mena

Dra. Ruth Reyes Cortes

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, profesor investigador del Departamento de Genética y Biología Molecular de esta institución.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), durante el periodo de Septiembre 2014 a Agosto 2016, número de becario: 626449 (CVU).

DEDICATORIA

A mis padres Isabel Jerónimo Reyes y Marco Antonio Vargas Jerónimo por su apoyo incondicional, ejemplo de perseverancia, sacrificio y amor. Por apoyarme incluso en los momentos más difíciles, por ser mi pilar y mi fuerza.

A mis abuelos Gloria Ortega Ramírez y Rubén Vargas Correa por estar en cada momento de mi vida, por apoyarme y amarme incondicionalmente.

A mi hija Laia Valentina Vargas Jerónimo por enseñarme el verdadero significado de la palabra AMOR y por ser mi motor y mi inspiración, “Gracias mi niña”.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada a la vida, por haberme traído hasta este momento, y a todos los que han formado parte de la misma, por que ayudaron a construir lo que soy ahora.

A mi familia que sin duda ha sido todo en mi vida, gracias por cada momento, cada enseñanza y cada alegría.

A mis amigos de la P3, FESI, CMN S.XXI y INCMNSZ, por que a pesar de la distancia y del tiempo transcurrido, su amistad y apoyo han perdurado.

A mis compañeros de generación de CINVESTAV, “lo logramos”...

A “los plebes” por el equipo tan ch... que llegamos a formar, gracias especialmente a Andrea y Cinthya “las quiero”.

A mis compañeras, amigas y cómplices Lupita y Elissa, gracias por mostrarme las hermosas personas que son, gracias por su apoyo, sin el cual no hubiera sido posible llegar a este momento, gracias por cuidarnos a mi beba y a mí, por las risas, por las lágrimas y sobre todo por compartir este sueño conmigo y ser parte de él.

Al Dr. Luis Kameyama Kawabe por aceptarme en su laboratorio, por su apoyo académico y personal, por los jalones de orejas y por la confianza otorgada. A las personas que integran el equipo de trabajo del laboratorio 5, a la Dra. Eva Martínez, al Sr. Toño, a Rosy y Gerson.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I.	Bacteriófagos	1
II.	Ciclo de replicación	2
III.	Mecanismos de exclusión y defensa fágica	5
IV.	Envoltura celular bacteriana	8
V.	Bacteriófago mEp021	11

ANTECEDENTES	13
--------------	----

JUSTIFICACIÓN	17
---------------	----

HIPÓTESIS	18
-----------	----

OBJETIVO GENERAL	19
------------------	----

OBJETIVOS PARTICULARES	19
------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	20
----------------------	----

RESULTADOS	32
------------	----

DISCUSIÓN	44
-----------	----

CONCLUSIONES	47
--------------	----

PERSPECTIVAS	48
--------------	----

BIBLIOGRAFÍA	49
--------------	----

APÉNDICE 1	55
------------	----

ANEXO 1	57
---------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfotipos de tallos fágicos	2
Figura 2 Estructura del fago lambda	3
Figura 3 Diferentes estructuras presentes en el tallo fágico	4
Figura 4. Ciclo de replicación de un fago temperado (colifago λ)	5
Figura 5. Arquitectura de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas	11
Figura 6. Algunos receptores de membrana utilizados por fagos	14
Figura 7. Esquema General de trabajo	20
Figura 8. Esquema de la disposición de los goteos en el ensayo de infección	23
Figura 9. Fórmula utilizada para el cálculo de UFP/ml, que evidencian la carga viral de un stock de trabajo	24
Figura 10. Condiciones usadas en el ensayo de PCR para amplificar los genes <i>srlB</i> y <i>livG</i>	27
Figura 11. Titulación de los stocks de trabajo, del fago λ y del fago mEp021	32
Figura 12. Ensayo de restricción	33
Figura 13. Ensayo de infección en cepas mutantes de <i>Escherichia coli</i> , utilizando los fagos λ y mEp021	36
Figura 14. Ensayo de infección en cepas mutantes de <i>Escherichia coli</i> , utilizando los fagos λ y mEp021	37
Figura 15. Verificación del genoma en la cepa silvestre Keio y	38

amplificación de los genes de interés

Figura 16. Clonación del gen <i>srlB</i> en el plásmido PJET	39
Figura 17. Restricción del vector de expresión pKQV4 con las enzimas <i>HindIII</i> y <i>EcoRI</i>	40
Figura 18. Ensayo de infección y titulación del fago λ NK1316 en la cepa LE392 y W3110	41
Figura 19. Mutagénesis en la cepa W3110	42,43
Figura 20. Modelo de infección del fago mEp021	46

ABREVIATURAS

Abi	Infección abortiva
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BrEt	Bromuro de etidio
dNTP's	Desoxinucleotidos
L	Litro
LB	Luria Bertani
LivG	Transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada, (leucina, isoleucina, valina).
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
ME	Membrana externa
MI	Membrana interna
Min.	Minutos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mEp	Mexican <i>E. coli</i> phages
ml	Mililitro
ng	Nanogramos
OmpA	Porina A de membrana externa
ON	Overnight
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rpm	Revoluciones por minuto
SrlB	Componente IIA del sistema de fosfotranferasa de glucitol/sorbitol
TMG	Buffer Tris-Magnesio-Gelatina
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFP	Unidades formadoras de placa

RESUMEN

Un paso esencial en el inicio de la infección del fago es la interacción con los componentes de la envoltura celular bacteriana que son básicamente los receptores. Este estudio se inició con la identificación de componentes de la envoltura celular en el proceso de infección del fago mEp021.

El fago mEp021 es un fago denominado no lamboide, perteneciente a un único grupo de inmunidad, no se desarrolla a 32°C, y hasta el momento se desconocen los receptores que utiliza para iniciar su infección. Se probó la capacidad infectiva del fago mEp021 en ~50 mutantes (obtenidas de la colección Keio) derivadas de la cepa BW25113 *E. coli* K-12. Se observó una disminución en la producción de partículas virales de hasta 2 logaritmos en las mutantes *livG*⁻ y *srlB*⁻, que están afectadas en un transportador ABC y en el componente IIA del sistema de fosfotransferasa de glucitol/sorbitol, respectivamente. Por otro lado la mutante *ompA*⁻, mostró un abatimiento total de la infección por este fago, fenómeno que no se observó al probar otras porinas de la misma familia, lo que nos indica que muy probablemente OmpA funcione como receptor de membrana externa para mEp021. Se diseñaron primers específicos para estos dos genes *srlB* y *livG*, y se realizó un ensayo de PCR para comprobar la identidad de las mutantes antes mencionadas donde se observó la ausencia del amplicón correspondiente para cada gen, sin embargo, únicamente se obtuvo la amplificación para el gen *srlB* pero no así para *livG* en la cepa silvestre, por lo que se están estandarizando las condiciones adecuadas de amplificación.

El gen *ompA*, se encuentra clonado en un plásmido *pompA* (M. en C. Saida Jessica Briones Peña), que será utilizado en la complementación, donde se espera reestablecer la función y por lo tanto, la capacidad infectiva del fago mEp021 en su célula hospedera. Adicionalmente, se clonarán los genes *srlB* y *livG* para el mismo ensayo.

ABSTRACT

An essential step in the initiation of phage infection is the interaction with components of the cell envelope that named as receptors. This study is related with the identification of components of the cell envelope for infection process of mEp021 phage.

The mEp021 phage is called as non lambdoid phage, belonging to a single group of immunity that does not develop at 32°C, and so far the receptors used to start their infection is unknown. We tested, the phage infectivity mEp021 in ~50 mutants (obtained from Keio collection) derivative of BW25113 *E. coli* K-12 strain. A decrease was observed in the production of viral particles up to 2 logs in mutant *livG*- and *srlB*-, they are affected in an ABC transporter and IIA component of the phosphotransferase system glucitol/sorbitol, respectively. On the other hand, in the *ompA*- mutant, it showed a total grow inhibition of this phage, a phenomenon that was not observed when we testing other porins of the same family, which indicates that probably OmpA is the outer membrane receptor for mEp021.

Specific primers were designed for these two genes *srlB* and *livG*, and a PCR assay was performed to verify the identity of the mutant aforementioned where the absence of the corresponding amplicon for each gene was observed, however, only the amplification was obtained for *srlB* gene but not for *livG* in the wild strain, so we are standardizing the suitable amplification conditions.

The *ompA* gene is cloned into a plasmid *pompA* (M. C. Saida Jessica Briones Peña), which we will used for complementation assay, where we are expecting to restore the function and therefore, the infectivity of phage mEp021 in its cell. Additionally, genes *livG* and *srlB* will be cloned for the same test.

INTRODUCCIÓN

I. Bacteriófagos

Los bacteriófagos se pueden definir como virus que tienen selectividad por la infección exclusiva de bacterias y contienen básicamente dos componentes; ácidos nucleicos (DNA/RNA) y proteína.

Estas entidades son las más abundantes y diversas sobre la tierra y pueden ser encontrados en todos los ambientes poblados por bacterias, el orden de magnitud de abundancia estimada es de aproximadamente 25 veces mayor en comparación con sus huéspedes bacterianos, con $\sim 10^{31}$ partículas fágicas (Chaturongakul & Ounjai, 2014).

A medida que las bacterias desarrollan mecanismos para prevenir la infección por fagos, por ejemplo; la modificación del receptor bacteriano y la degradación del DNA del fago, los fagos pueden eludir la resistencia y evolucionar para nuevamente invadir dichas bacterias resistentes. De esta manera la co-evolución entre fagos y bacterias amplía la diversidad genética global y mantiene el equilibrio de las comunidades microbianas (Koskella et al., 2011).

Los fagos tienen una variedad de formas y tamaños y se han clasificado de acuerdo a diferentes criterios, tal como; morfología, ciclo de replicación, tipo de hospederero, etc.

Aproximadamente el 90% de los fagos analizados por microscopía electrónica pertenecen al orden de los *Caudovirales*. Estos fagos, tienen una estructura con forma de cola o cauda unida a la cabeza icosaédrica, el cual contiene el material genético (Chaturongakul & Ounjai, 2014).

Los fagos con cola o cauda "*Caudovirales*" han sido clasificados en tres familias; *Myoviridae*, con tallos largos contráctiles, *Siphoviridae*, con tallos largos, flexibles y no contráctiles, y *Podoviridae* con tallos cortos (Hans-W., 1999) (Fig.1).

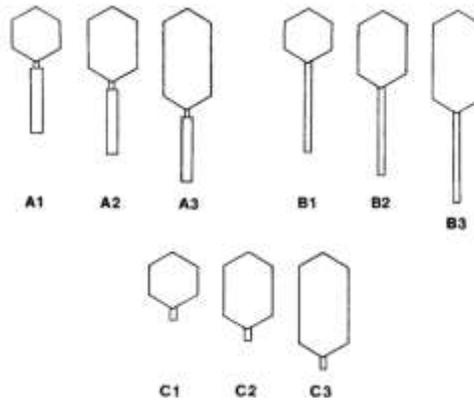


Figura 1. Morfotipos de tallos fágicos. Tipo A: *Myoviridae*, Tipo B: *Siphoviridae*, Tipo C: *Podoviridae*. Tomado y modificado de (Hans-W., 1999).

El fago *Lambda* “ λ ” es un fago perteneciente a la familia *Siphoviridae* y es uno de los bacteriófagos más estudiados a nivel molecular (Fig. 2).

El bacteriófago *Lambda* y los bacteriófagos tipo *lambdoides* poseen características específicas que distinguen a estos de otras familias de bacteriófagos, esto incluye una organización genómica común y específica, presentan diversos grupos de genes relacionados a funciones como: recombinación, regulación, la replicación del DNA y genes que codifican para las proteínas estructurales para la cabeza y la cola. Por otro lado, se denominó como fagos “no *lambdoides*” a todos aquellos fagos con características diferentes, pero que compartían una característica en común con los fagos tipo *lambdoides*; que requieren a los factores Nus del hospedero para desarrollarse (Hernández-Sánchez et al., 2008).

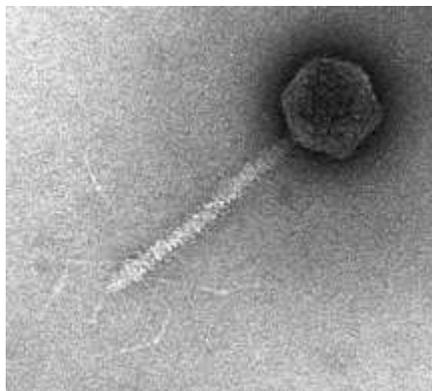


Figura 2. Estructura del bacteriófago Lambda. Microfotografía. Retrieved 24 July 2016, from <http://symbiotica.febiotecdivulga.es/wp-content/uploads/2014/06/fago-Lambda.jpg>

II. Ciclo de replicación

Si un fago lítico invade una célula bacteriana susceptible, su ácido nucleico entra en la célula y desencadena un ciclo de producción de fagos (Campbell, 2003).

La infección viral es iniciada a través de un proceso de reconocimiento reversible conocido como adsorción, y posteriormente la unión irreversible, que involucra una interacción física específica fago-hospedero la cual se establece entre el receptor de membrana externa (ME) del huésped bacteriano y la zona distal del tallo del fago (Mahony & van Sinderen, 2012). Este es uno de los eventos más complejos, ya que los fagos deben reconocer un componente celular específico y se enfrentan a una asombrosa diversidad de moléculas en la composición de las membranas y la pared celular (Labrie et al., 2010).

Algunos fagos poseen estructuras complejas en el tallo que incluyen espículas y fibras que ayudan al reconocimiento y/o anclaje a la ME bacteriana (Chaturongakul & Ounjai, 2014); (Fig. 3).

Dado que la adsorción precede a la eyección del DNA del fago, la interacción específica entre la proteína de unión al receptor del fago (RBP por sus siglas

en inglés) y su receptor en la superficie celular, es uno de los parámetros principales que definen la cinética de la infección (Samson et al., 2013).

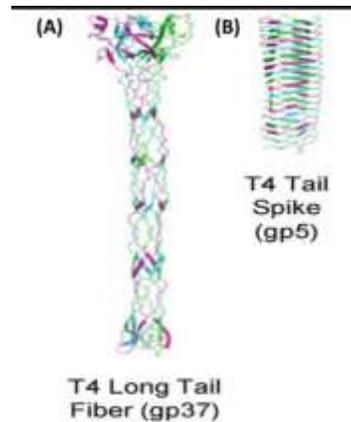


Figura 3. Diferentes estructuras presentes en el tallo fágico. A) Fibras. Estructura de la fibra del tallo largo del fago T4, B) Espinas o espículas. Estructura de la espícula del tallo del fago T4. Tomada y modificada de (M. Rossmann & Rao, 2012).

Durante el ciclo de replicación, la célula es reprogramada para la producción del fago, en el que se desvían los componentes del aparato biosintético (tales como ribosomas y generadores de ATP) de sus tareas normales del crecimiento bacteriano. Las diversas vías para la reprogramación se inician por las proteínas fago-específicas, que se traducen a partir del RNAm del fago producidas durante los primeros pasos de la infección. El programa temporal se ordena y se regula. Generalmente, la replicación del ácido nucleico se produce antes que la síntesis de proteínas estructurales de la partícula de fago. Nuevas partículas de fago se ensamblan, y se liberan más tarde de la célula.

Para la mayoría de los colifagos, la liberación se efectúa por la alteración de la envoltura celular y la lisis repentina de la célula donde el contenido se libera hacia el medio. Todo el ciclo puede durar desde 40 a 75 minutos y dependiendo del fago, se pueden producir hasta 100 nuevas partículas virales. A este tipo de replicación se le conoce como ciclo lítico.

El ciclo lisogénico es aquel en donde la célula es capaz de sobrevivir a la infección fágica ya que el genoma del fago es capaz de permanecer albergado

en una forma quiescente como profago. Los fagos temperados, son capaces de seguir el ciclo lítico ó el ciclo lisogénico (Campbell, 2003); (Orlova, 2009), (Fig. 4).

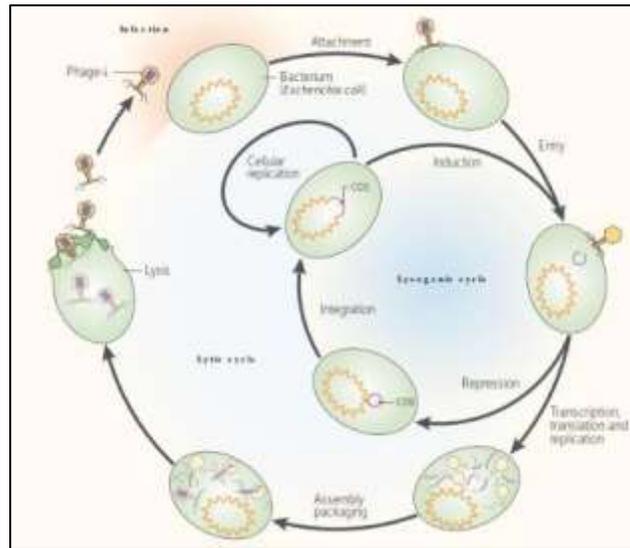


Figura 4. Ciclo de replicación un fago temperado (colifago-λ). El fago se une a la superficie celular bacteriana por la zona distal de la cola del fago, el DNA fágico entra, lo que deja una cápside vacía de proteínas unida al exterior de la célula. En algunas células infectadas, el DNA se replica y se traduce hasta formar una progenie de fagos. En otras células infectadas, el desarrollo del fago es reprimida y el DNA del fago se integra en el cromosoma bacteriano. La célula resultante (lisogénica) puede replicarse indefinidamente, pero puede ser inducida para volver al ciclo lítico con la escisión de DNA de fago a partir del cromosoma (Tomada y modificada de Campbell, 2013).

III. Mecanismos de exclusión y defensa fágica

La competencia evolutiva recíproca y rápida entre las bacterias y fagos (e incluso entre los fagos con huéspedes bacterianos comunes en un entorno compartido) crea una alta presión selectiva, forzando la diversificación de las estructuras relacionadas con la interacción fago-hospedero y a la aparición de diversas tácticas de infección (Chaturongakul & Ounjai, 2014); (Orlova, 2009).

De acuerdo a Labrie y colaboradores en 2010, las bacterias potencialmente susceptibles a la infección por bacteriófagos, son capaces de desarrollar diversas estrategias para prevenirla, con mecanismos conocidos como de exclusión o resistencia. Para contrarrestar tales barreras, los fagos a su vez, pueden conservar mutando o adquirir genes de novo con la capacidad de infectar a sus hospederos, manteniendo de este modo, el cambio y/o ampliar su gama de células que infectan (Samson et al., 2013).

Algunos de estos mecanismos se pueden clasificar en:

1. **En la bacteria. (Mecanismos para evitar la adsorción fágica).** Estos mecanismos de bloqueo de adsorción se pueden dividir en al menos tres categorías:
 - a. El bloqueo de los receptores de fagos. Para limitar la propagación de los fagos, las bacterias pueden adaptar la estructura de sus receptores de la superficie celular o de su conformación tridimensional de los inhibidores competitivos.
 - b. La producción de matriz extracelular. La producción de polímeros extracelulares estructurados pueden promover la supervivencia bacteriana en diversos nichos ecológicos mediante la protección de las bacterias frente a las duras condiciones ambientales, y en algunos casos, proporcionando una barrera física entre fagos y sus receptores
 - c. La producción de inhibidores competitivos. Las moléculas que están naturalmente presentes en el medio ambiente, pueden unirse específicamente a los receptores utilizados por los fagos, lo que hace estos receptores no se encuentren disponibles para ellos.

1.1 En el fago. (Adaptación a nuevos receptores).

En algunos bacteriófagos con cola, tallo o cauda, se ha demostrado que el fago es capaz de modificar las proteínas RBP (receptor binding protein) de la misma, para adquirir un nuevo tropismo al receptor, cuando la expresión del receptor principal del fago es bloqueado.

También se ha demostrado que, cuando una forma mutada del receptor celular, es expresada, los fagos pueden mutar y reconocer a su vez las estructuras alteradas e infectar a su célula huésped (Samson et al., 2013).

2. **En la bacteria. (Sistemas de exclusión de la superinfección (Sie))**

Son proteínas de la célula que bloquean la entrada de DNA del fago, confiriendo de este modo inmunidad contra fagos específicos. Estas proteínas se anclan a la membrana externa o se asocian a componentes de la misma. Los genes que codifican estas proteínas se encuentran a menudo en profagos, lo que sugiere que en muchos casos los sistemas Sie son importantes para las interacciones fagos-fagos en lugar de interacciones fago-huésped.

2.1 **En el fago. (Contra los Sistemas de exclusión de la superinfección (Sie))**

Cuando un receptor se encuentra bloqueado o enmascarado por un componente de superficie, los fagos pueden acceder al receptor por la hidrólisis de tales barreras (Samson et al., 2013).

3. **En la bacteria. (Sistemas de Restricción-Modificación (R-M))**

La principal función del sistema R-M es proteger a la célula contra DNA extraño e incluyendo a los virus. Cuando el DNA no metilado del fago entra a la célula que posee el sistema R-M, este será reconocido por una enzima de restricción y será rápidamente degradado.

3.1 **En el fago. (Contra sistemas de Restricción-Modificación)**

Para escapar del sistema R-M, los fagos usan estrategias anti-restricción, que pueden ser categorizadas en pasivas y activas.

Las estrategias de anti-restricción pasivas se dan cuando el genoma del fago de doble cadena entra en un huésped que contiene un sistema R-M, el DNA del fago invasor se protege, con la acción rápida de una metil-transferasa, modificando el DNA antes del reconocimiento por la enzima de restricción.

Así, el genoma del fago modificado puede replicarse en la cepa que contiene el sistema R-M y también puede propagarse en otras células que expresen el mismo sistema. Sin embargo, debido a la especificidad de los sistemas R-M, el mismo DNA de fago se reconoce como extraño en una célula que contiene un sistema diferente, y por lo tanto se procesa por otra enzima de restricción. Por el contrario, algunas enzimas bacterianas pueden reconocer y cortar el DNA que haya sido modificado.

Las estrategias de anti-restricción activas se dan cuando proteínas del huésped se unen al DNA del fago, protegiendo los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción y previniendo de esta manera la degradación (Samson et al., 2013).

4. **En la bacteria. (Sistemas de infección abortiva (Abi)).**

La bacteria entra en muerte celular, tras ser infectada, mediante la segregación de proteínas especiales, de esta manera, se previene la propagación de los fagos a otras células que no han sido infectadas.

4.1 En el fago. (Contra sistemas de infección abortiva).

El sistema se compone de una antitoxina neutralizante. La antitoxina es más lábil que la toxina, por lo que cuando se encuentra en estrés, se degrada la antitoxina y la toxina es libre para inducir la latencia o la muerte celular, (Samson et al., 2013).

IV. Envoltura celular bacteriana

La envoltura celular bacteriana funciona como una estructura semirígida, además es una barrera permeable para ciertas moléculas que protege a la célula de estrés osmótico, de xenobióticos y cambios en el ambiente. Da soporte a la morfología celular y transporta nutrientes esenciales y elimina los desechos. La envoltura celular también juega un papel crucial en la patogénesis bacteriana (Babu et al., 2011).

Los bacteriófagos que infectan a las bacterias Gram-negativas tal como a la *Escherichia coli* tienen que superar el obstáculo de la envoltura celular del huésped. En *E. coli* como en toda bacteria Gram-negativa, la envoltura celular bacteriana se compone de la membrana interna, la membrana externa y entre ellas el espacio periplásmico, donde se encuentra la pared celular compuesta por peptidoglicanos (Reyes-Cortés et al., 2012) (Fig.5).

Membrana externa

La membrana externa (ME) es la primera línea de contacto entre la bacteria y el ambiente externo, esta funciona como una barrera selectiva que previene la entrada de muchas moléculas tóxicas, mientras que simultáneamente permite la entrada de nutrientes requeridos para la supervivencia de la célula (Davies, 1963). Esto permite la supervivencia de la bacteria en ambientes hostiles (p. ej. el tracto gastrointestinal de los mamíferos) encontrado durante la colonización o infección al hospedero.

Varios aspectos estructurales y funcionales diferencian a la ME de la membrana citoplasmática (MI). La diferencia estructural más llamativa es la estructura asimétrica de la bicapa de la ME que, con una polaridad negativa se caracteriza principalmente por la presencia de glicolípidos complejos; los lipopolisacáridos (LPS), que miran hacia el exterior de la célula, mientras que la parte interna de la ME que mira al espacio periplásmico, se compone básicamente de fosfolípidos.

Las proteínas de membrana externa y lipoproteínas también están integrados y anclados, respectivamente en la ME y se encuentran implicadas en varias funciones tal como la absorción de nutrientes, transporte y secreción de varias moléculas (proteínas, polisacáridos, drogas y otros) (Polissi & Sperandeo, 2014).

Membrana interna

La membrana interna (MI) rodea al citoplasma y es una estructura dinámica, compuesta de fosfolípidos, la cual alberga una amplia variedad de proteínas que funcionan en diversos procesos celulares vitales, como el tráfico de iones, moléculas y macromoléculas; lípidos y polisacáridos, además participa en procesos como la división celular, detección del ambiente, biosíntesis de peptidoglicanos, y metabolismo (Papanastasiou et al., 2013).

Espacio periplásmico

El espacio entre la MI y la ME es un compartimento acuoso denominado periplasma, que contiene una capa de peptidoglicano, un polímero que rodea a la célula bacteriana. Este exoesqueleto celular es la estructura principal responsable de la forma de la célula, la resistencia mecánica y la elasticidad de la envoltura bacteriana (Polissi & Sperandeo, 2014).

En este compartimento se encuentran algunas proteínas entre las que se encuentran; proteasas, chaperonas moleculares y catalizadores de plegado, que trabajan juntos en el plegamiento de proteínas, reparación y degradación respectivamente, (Davies, 1963).

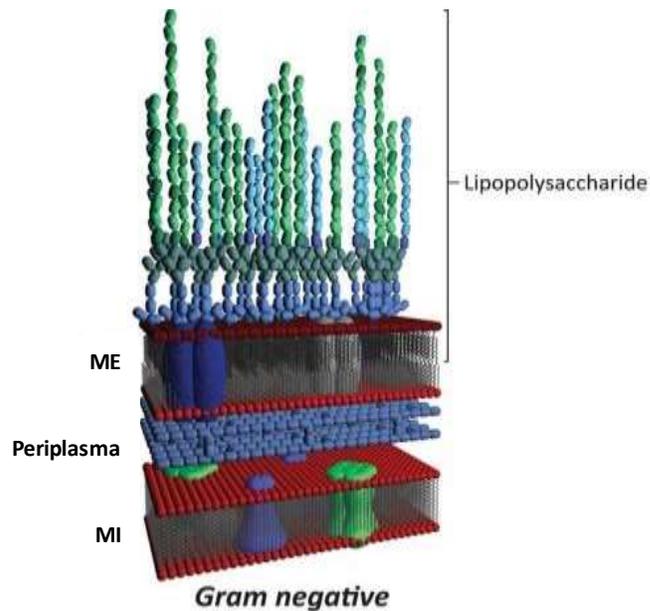


Figura 5. Arquitectura de la envoltura celular en bacterias Gram-negativas, MI: Membrana interna, ME: Membrana externa y periplasma. Tomado y modificado de (IsLam & Lam, 2013).

V. *Bacteriófago mEp021*

El colifago temperado no lambdoide mEp021 pertenece a un grupo de fagos con una única inmunidad (grupo de inmunidad I). Este virus adquiere importancia clínica ya que es capaz de inducir un fenotipo hemolítico en su célula huésped, y fue aislado de muestras fecales humanas de población mexicana.

Algunas características del fago mEp021 incluyen: posee una secuencia genómica totalmente distinta al fago λ (notación proporcionada por el M. en C. Adrián Cázares), sus sondas de DNA no hibridan con sondas de DNA del fago λ , no es capaz de crecer a temperaturas de 32°C o menores, su periodo de latencia es mucho más largo que el reportado para el fago λ , los profagos no se inducen después de la aplicación de luz UV, sin embargo este fago requiere de los factores Nus del hospedero tal como lo hacen los fagos

lamdoides (Kameyama et al., 1999); (Kameyama et al., 2001) (Martínez-Peñafiel et al., 2012).

El mecanismo de infección de este fago a su célula huésped es aún incierto y resulta de suma importancia esclarecer este proceso para este y otros fagos de interés.

ANTECEDENTES

Existen distintos componentes de la superficie celular que han sido adoptados por diferentes fagos, al que se unen con el fin de iniciar la infección. Las proteínas fágicas involucradas en la unión a los receptores del huésped usualmente son referidas como anti-receptores, proteínas de unión a receptor o adhesinas (Mahony & Sinderen, 2012). El proceso de búsqueda del receptor viral es crucial para la iniciación del proceso de infección y determina el destino de la misma (Chatterjee & Rothenberg, 2012).

Aproximadamente el 50% de la masa seca de la membrana externa de las bacterias Gram negativas son proteínas (Schaechter, 2001), y muchas de estas funcionan como receptores para la infección por bacteriófagos.

Los receptores bacterianos pertenecen a diferentes familias y están representados principalmente por proteínas de superficie, polisacáridos y lipopolisacáridos (LPS) (Fig. 6). Además de la presencia de éstos, su accesibilidad y distribución espacial en la superficie celular influye en la eficiencia de la infección fágica (Samson et al., 2013).

Entre las proteínas estructurales de ME que han servido como receptores para la adsorción de virus se encuentran las porinas, que forman un canal acuoso permitiendo la difusión pasiva de moléculas y de materiales de desecho, en general se componen de tres dominios funcionales, incluyendo un dominio extracelular hidrofílico, una estructura β -barril transmembranal y un dominio de unión a peptidoglicano, contribuyen a la integridad estructural de la membrana en conjunto con las lipoproteínas y los peptidoglicanos asociados a lipoproteínas, además funcionan como receptor de colicinas y juega roles importantes en la adhesión celular y la invasión (Wang, 2002), (Confer & Ayalew, 2013).

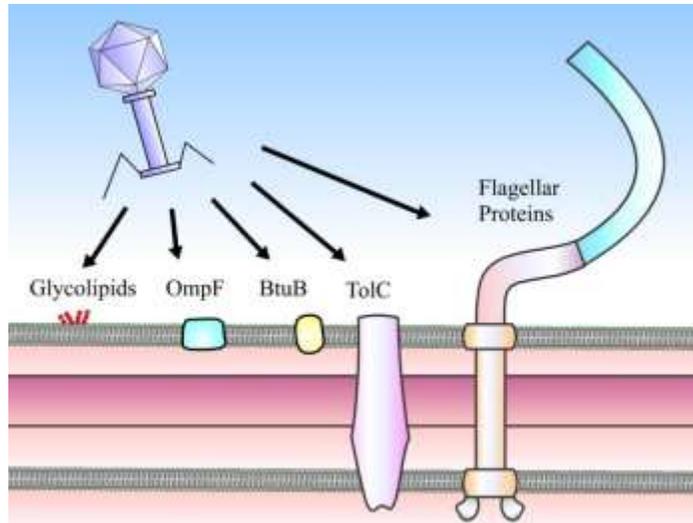


Figura 6. Algunos receptores de membrana utilizados por fagos. Los fagos pueden usar distintos componentes de la superficie celular bacteriana como receptores, incluyendo glicolípidos (antígenos O y VI), proteínas integrales de membrana (p. ej. OmpF, BtuB, y TolC) y proteínas flagelares (p. ej. FliC, fljB y Flik), (Tomada y modificada de Chaturongakul, 2014).

Una de las porinas que además funciona como receptor para algunos bacteriófagos es la maltoporina Lamb, esta actúa como receptor para el fago λ (Randall & Schwartz, 1973) y para el fago HK97 (Cumby et al., 2015). Ambos fagos utilizan además otros componentes de la envoltura celular, como es el sistema de fosfotransferasa de azúcar (PTS por sus siglas en inglés), ubicado en la membrana interna, y los componentes de este complejo, este sistema media el transporte y fosforilación de azúcares específicas, también juega un papel importante en el proceso de infección, permitiendo el paso del DNA de los fagos hacia el citoplasma. El PTS de transporte de manosa es usado por el fago λ (Esquinas & Erni, 2001), mientras que el PTS de transporte de glucosa y la chaperona FkpA en el espacio periplásmico, intervienen en la infección del fago HK97, (Cumby et al., 2015).

Otra proteína importante que funciona como receptor para algunos fagos es FhuA. En la bacteria, esta proteína es receptor para el ferricromo Fe^{3+} , la

colicina M, la micromicina 25 y para los antibióticos albomicina y rifamicina (Hernández et al., 2008).

Entre algunos fagos que son FhuA dependientes para la infección, se encuentran el fago C6 y el fago T1. Estos además, requieren la actividad de de TonB (Hancock & Braun, 1976), una proteína que está anclada en la membrana interna, en la cara que mira al espacio periplásmico (Postle & Skare, 1988); (Hannavy et al., 1990); (Roof et al., 1991). Esta proteína integra un sistema de transducción de energía que va desde la membrana interna, hasta ciertas proteínas de la membrana externa (Hernández et al., 2008).

El fago mEp213 también es un fago que utiliza a FhuA como receptor en la membrana externa, sin embargo, requiere de la presencia de los lipopolisacáridos para iniciar su proceso infectivo (Reyes et al., 2012).

Por otro lado, el fago C1 perteneciente a la familia *Podoviridae* y el fago C6 perteneciente a la familia *Siphoviridae* usan las proteínas de membrana externa BtuB (transporte de vitamina B12 en la bacteria) y FhuA respectivamente, junto con las proteínas de membrana interna y espacio periplásmico DcrA y DcrB, las cuales están implicadas en el transporte de serina (Samsonov et al., 2002).

Los colifagos, T5, ϕ 80, HK022, mEp167, y otros fagos mEp (Killmann et al., 1995); (Böhm et al., 2001); (Uc-Mass et al., 2004); (Hernández-Sánchez et al., 2008); (Braun, 2009); son otros ejemplos de fagos FhuA dependientes.

Otras porinas que usualmente son usadas por los fagos para iniciar su infección son las porinas tipo Omp. La osmoporina OmpC de *E. coli* es usada por el fago T4 (F. Yu & Mizushima, 1982); (Rossmann et al., 2004). La porina OmpA en diversos fagos tipo T (Morona et al., 1984) y el uso de OmpA y OmpC, en la infección del fago Sf6 en *Shigella* (Parent et al., 2014).

Por otro lado, los lipopolisacáridos presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, resultan ser de gran importancia para la protección de la bacteria y para la infección de algunos fagos como CSF-10 que infecta a *Klebsiella* spp., (Camprubí et al., 1991), el colifago T7 (Chang et al., 2010), (Molineux, 2001), y el fago ϕ Ye03-12 de *Yersinia enterocolitica* serotipo O3, (Pajunen, Kiljunen, & Skurnik, 2000).

Se ha reportado que algunas otras estructuras en la bacteria, han sido usadas por los fagos como receptores, éstas estructuras son usadas con menos frecuencia, y están involucradas en el movimiento de la bacteria, un ejemplo es el pili tipo IV de *P. aeruginosa* por el podofago MPK7 (Bae & Cho, 2013), y los fagos D3112 y MP22 (Heo et al., 2007), y las proteínas del flagelo FliC y FliB de *Salmonella* por algunos fagos de los grupos F-I y F-II (Shin et al., 2012).

Además se ha reportado el uso de un receptor secundario de membrana externa para algunos otros organismos, como los bacteriófagos K20, 0x2 y T2 (Heller & Braun, 1979); (Lenski, 1984); (Silverman & Benson, 1987).

Estos datos ilustran que incluso dentro de las interacciones más comunes fago-hospedero conocidas hasta el momento, los fagos usan una variedad de diferentes proteínas para atravesar las capas de la envoltura celular bacteriana durante la inyección del genoma, y que este proceso es sumamente complejo.

JUSTIFICACIÓN

La interacción fago-hospedero es el primer paso que se establece en el momento de la infección. A pesar de los esfuerzos por describir los mecanismos que intervienen en este proceso, los estudios distan de estar completos. Anteriormente se determinaron algunos elementos de la envoltura bacteriana que funcionan como receptores y/o proteínas helper para los fagos, y la existencia de receptores secundarios para algunos de ellos.

La información relacionada a este mecanismo para el fago mEp021 es prácticamente nula y dado que es un fago presente en el tracto intestinal de población mexicana y ya que es capaz de conferir un fenotipo hemolítico en cajas de agar sangre, resulta de suma importancia el esclarecimiento de este proceso.

HIPÓTESIS

El bacteriófago mEp021 requiere de los componentes de la envoltura celular (membrana externa, interna, periplasma, y/u otros), para el inicio de la infección.

OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes de la envoltura celular en la infección del colifago mEp021

OBJETIVOS PARTICULARES

- Comprobación del genoma del fago mEp021
- Buscar o identificar mutantes resistentes a la infección el fago mEp021
- Caracterizar la identidad de los genes involucrados
- Corroborar su participación en el proceso infectivo

ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

Con el objetivo de abarcar el proyecto de una forma integral, se usaron dos vertientes de trabajo, una ligada al uso de mutantes específicas, “colección Keio” (Fig. 7A), y otra mediante la implementación de mutagénesis al azar (Fig. 7B).

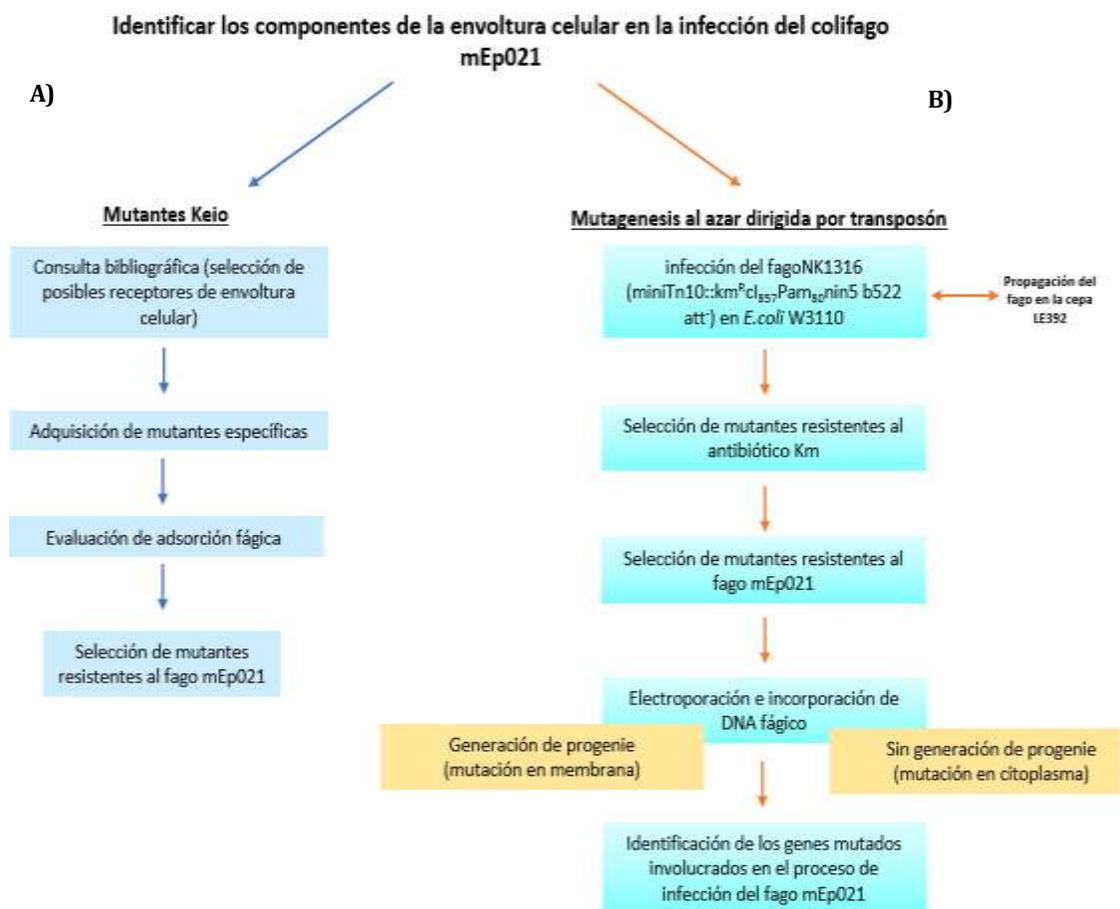


Figura 7. Esquema general de trabajo. A) Estrategia que incluye el uso de mutantes específicas “Keio”. B) Estrategia de mutagénesis al azar dirigida por transposón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bibliográfico. Selección de posibles receptores para la infección del fago mEp021

Con el objetivo de elucidar los factores hospederos involucrados en la infección del fago mEp021, se realizó un análisis minucioso de ~4000 genes pertenecientes al genoma de la bacteria *E. coli* K12, célula hospedera de este fago, se revisó la funcionalidad de los productos de cada uno de los genes y se seleccionaron aquellos que codificaran para proteínas a nivel de envoltura celular, y que, en base a los ya reportados como receptores utilizados por otros bacteriófagos, coincidiera, fuera similar u homólogo. Las mutantes adquiridas pertenecen a la colección Keio (mutantes deletadas del gen en cuestión por inserción del transposón, que le confiere resistencia a kanamicina (km)), y se obtuvieron del Instituto Nacional de Genética en Japón.

Resiembra de bacterias silvestres y mutantes

Las bacterias silvestres W3110, BW25113 y LE392, se resembraron en cajas con medio Luria Bertani (LB), partiendo de los stocks almacenados en stabs agar a temperatura ambiente.

Las bacterias provenientes de la colección Keio, se resembraron en cajas con medio LB adicionadas con kanamicina (km) a una concentración de 50 µg/ml y se llevó a incubación toda la noche (ON) a 37°C.

Tanto las bacterias silvestres como las bacterias mutantes fueron resembradas tomando una colonia de cada una, a partir de la primera siembra, hasta completar por lo menos tres pases para realizar los siguientes ensayos.

Almacenamiento de cepas

Las cepas usadas en este estudio (ANEXO 1), fueron almacenadas en frascos estériles con stab agar “agar suave nutritivo” (APENDICE 1), en condiciones de esterilidad, a temperatura ambiente.

Bacteriófagos

Los fagos utilizados en este estudio (ANEXO 1), provienen de la biblioteca fágica del laboratorio 5, del Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV. El fago mEp021 fue aislado de muestras fecales humanas, de población mexicana, (Kameyama et al., 1999).

Propagación de bacteriófagos

A partir de la tercera re-siembra se seleccionó una colonia de la cepa W3110 y se inoculó en 3ml de medio LB líquido (APENDICE 1) y se llevó a incubación a 37°C, en agitación constante a 250 rpm, ON.

Por otro lado, se tomaron 15µl del stock del fago mEp021 o del fago λ , y se vertieron en una caja con medio T ϕ (APENDICE 1), se dejó escurrir la gota a través de la caja y se dejó secar. De forma conjunta, se tomaron 300µl del cultivo ON de W3110 y se mezclaron con 3ml de medio T ϕ líquido, se vertió sobre la caja T ϕ y se dejó solidificar, la caja se llevó a incubación a 37°C ON.

Una vez concluido el tiempo de incubación, se tomaron 5 placas líticas con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron en un matraz Erlenmeyer con 1 ml de CaCl₂/MgCl₂ 0.5M y 500µl del cultivo ON de bacteria W3110 se dejó absorber durante 10 min. a temperatura ambiente (TA), posteriormente se añadieron 50ml de medio LB líquido y se llevó a incubación a 37°C en agitación constante por 6 horas hasta que se observó lisis celular. Después,

el cultivo se transfirió a un tubo falcon de 50ml, y se agregaron 5ml de cloroformo, se invirtió varias veces y se centrifugó a 6000g por 10 min. a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a 4°C.

Titulación de fagos

Se tomaron 300µl de un ON de W3110 o LE392 y se mezclaron con 3 ml de Tφ suave templado, se mezcló bien, se vertió en una caja con medio Tφ, y se dejó solidificar.

Se prepararon diluciones seriadas del fago λ, mEp021 y NK1316 (ANEX01) mezclando 900µl de TMG y 100µl del stock de cada fago en diluciones que van de 10⁻¹ a 10⁻⁸, y se gotearon 5µl de cada dilución sobre el tapiz como se muestra en la Figura 8 y se dejaron secar. La caja se incubó a 37°C, ON.

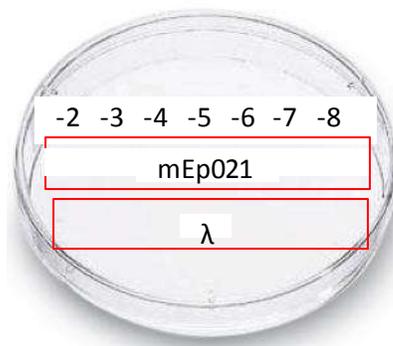


Figura 8. Esquema de la disposición de los goteos en el ensayo de infección. Los fagos y mEp021 se gotearon sobre los tapices de las cepas silvestres y mutantes.

Al día siguiente se contaron las placas líticas que se generaron, y se calcularon las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml) (Fig. 9).

$$\left(\frac{\text{\#UFP}}{\text{Dilución}} \right) \left(\frac{1000}{\text{Volumen de gota por } \mu\text{l}} \right) = \text{UFP/ml}$$

Figura 9. Fórmula utilizada para el cálculo de UFP/ml de la carga viral de un stock de trabajo.

Extracción de DNA fágico

Para la extracción del DNA se siguió el método de precipitación con DEAE celulosa (Silhavy et al., 1984), con algunas modificaciones

Se tomaron 500µl del lisado de los fagos λ y mEp021 con un título de 10¹⁰ UFP/ml, se le añadieron 500µl de DEAE celulosa equilibrada con medio LB y se agitó invirtiendo el tubo aproximadamente 30 veces. La DEAE se eliminó por centrifugación a 4000 g durante 15min. el sobrenadante fue transferido a un tubo Eppendorf estéril, donde se agregaron 100µl de NaCl 5M y 540µl de isopropanol, se incubó a -20°C por 20min, y se centrifugó a 4000g por 15min., la pastilla obtenida se lavó con 1ml de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó a 19000 g durante 5 min.

El botón se resuspendió en 100µl de TE y 100µl de fenol, se mezcló y se centrifugó a 19,000 g por 5min., este paso se realizó dos veces, se recolectó la fase acuosa y se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, se agregaron 100µl de cloroformo y se mezcló en el vortex por 30s. y se centrifugó nuevamente para obtener la fase acuosa, posteriormente se precipitó con 2 volúmenes de Etanol absoluto frío y se colocó una gota de ácido acético 3M, se centrifugó a 14000 g por 15min. a 4°C, se lavó con 100µl de Etanol al 70%.

La pastilla resultante se dejó secar al aire libre y se resuspendió en 50µl de agua inyectable. Se almacenó a -20°C para su uso posterior

Restricción del genoma del fago mEp021 con la enzima NdeI

Para verificar la identidad del genoma del fago mEp021, se realizó un ensayo de restricción con la enzima *NdeI*. Se realizó una mezcla sobre hielo como se indica en la Tabla 1 en tubos para PCR utilizando el DNA del fago mEp021, el volumen final de reacción fue de 20µl. Se utilizó la restricción con el genoma del fago λ como control. La mezcla fue llevada a incubación a 37°C durante 3hrs. Las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 90Volts por 45min. de forma conjunta, se realizó una digestión *in silico* en el sitio NEBcutter V2.0 de New England BioLabs, y se tomó como base comparativa de la digestión del fago mEp021 con la enzima *NdeI*.

Tabla 1. Reactivos usados para la restricción del genoma del fago λ y mEp021

Reactivo	Cantidad utilizada por µl
DNA fágico (λ, mEp021)	10µl
Buffer IV	2µl
Enzima <i>NdeI</i>	1µl
H ₂ O	Ajuste a 20µl

Ensayo de infección de los fagos λ y mEp021, en las cepas mutantes Keio

Se realizó un cultivo líquido (3ml de medio LB incubado ON, con agitación constante a 250rpm a 37°C), de las cepas mutantes y silvestres.

Se templaron cajas de medio Tφ+km (50µg/ml) y se realizó un tapiz, tomando 300µl del cultivo ON de cada cepa y se mezclaron con 3ml de medio Tφ líquido, se vertió sobre la caja Tφ+km y se dejó solidificar.

Se prepararon las soluciones seriadas de los fagos λ y mEp021 de 10⁻¹ a 10⁻⁸ y se gotearon 5µl de cada una sobre el tapiz antes preparado, se dejó secar y se llevó a incubación a 37°C ON. Finalmente se observó la presencia o ausencia de placas líticas, y se calcularon las UFP/ml (Fig. 9) para cada una.

Extracción de DNA bacteriano

Se tomaron 100µl de agua inyectable y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml, se tomó una cantidad considerable de las cepas mutantes *srlB*⁻ y *livG*⁻, y de las cepas wild-type BW25113 y W3110 con el aza de siembra, directamente de la caja, y se disolvió en el agua, se colocaron las perlas solid glass beads (Sigma-Aldrich) y se agitó con el vortex durante ~10min., se traspasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Posteriormente se corroboró la presencia de material genético por electroforesis (85volts, 40 min.) en un gel de agarosa al 1%.

Las muestras finalmente se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

Corroboración de las mutantes Keio y amplificación de los genes *srlB* y *livG*.

Los genes *srlB* y *livG* se amplificaron de las cepas wild-type W3110 y Bw25113, mediante PCR punto final, utilizando los oligos mencionados en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencias nucleotídicas de los oligos utilizados

Oligos	Secuencia de DNA 5' -----> 3'
<i>SrlB</i> Fw	ACAATTTCACACAGGAAACAGAATTCATGACCGTTATTTATCA GACC
<i>SrlB</i> Rv	TCTCTCATCCGCCAAAACAGAA GCTTTTACTCCTT AACAGATTCAAA C
<i>LivG</i> Fw	ACAATTTCACACAGGAAACAGAATTCATGAGTCAG CCATTATTATC
<i>LivG</i> Rv	TCTCTCATCCGCCAAAACAGAA GCTTTTATG CCT CACCTAA ATAGG

La reacción de PCR se realizó también para las mutantes *srlB*⁻ y *livG*⁻, utilizando los mismos oligos que se utilizaron para la amplificación de los genes, (Tabla 2), esperando que para estas, no hubiera amplificación alguna, lo que evidenciaría que efectivamente el gen se encuentra ausente. Como

control, se preparó una reacción sin DNA genómico para cada muestra problema.

El volumen de reacción final fue de 20µl, las muestras a amplificar se prepararon sobre hielo como se describe en la tabla 3.

El ensayo de PCR se realizó utilizando el termociclador de BioRad, modelo T100:

Tabla 3. Reactivos usados para la amplificación por PCR de los genes *srlB* y *livG*, y corroboración del genoma de las muantes *srlB* y *livG*.

Reactivo	Cantidad utilizada por µl	
Oligos (100ng/µl)	1µl Fw	1µl Rv
DNTP's	1µl	
DNA	2µl Muestras	----- Controles
10X Buffer Dream Taq (Thermo Scientific)	2µl	
H2O	Ajuste a 20µl	

Las condiciones que se utilizaron para el ensayo de PCR fueron las que se describen en la fig. 10.

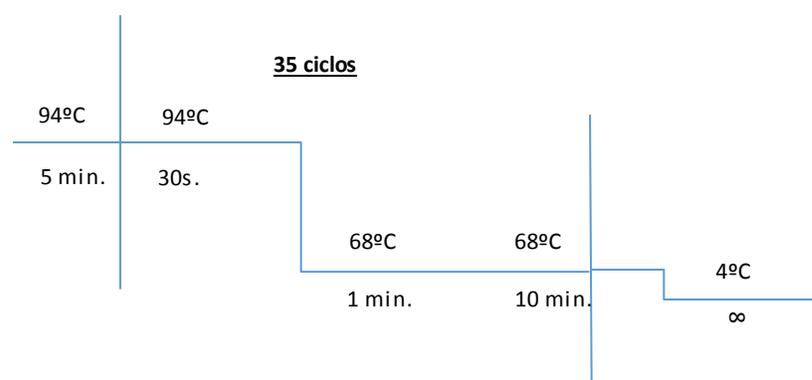


Figura 10. Condiciones usadas en el ensayo de PCR para amplificar los genes *srlB* y *livG*, y para corroborar el genoma de las mutantes *srlB*, *livG*.

Electroforesis

Se preparó un gel de agarosa (HMP, High Melting Point; SIGMA-ALDRICH) AL 1%, disuelto en 50ml de TAE 1X, se le agregó 2.5 ml de bromuro de etidio (BrEt (SIGMA-ALDRICH)).

Se mezclaron 2µL de los productos de PCR, 1µl de buffer de carga y 3µl de agua inyectable y se colocaron en los pozos, se cargó el marcador de peso molecular (Gene Ruler DNA Ladder, 1Kb). El gel se corrió en buffer TAE IX a 90 Volts en una cámara de electroforesis a temperatura ambiente. Los geles se analizaron en un fotodocumentador.

Restricción del vector de expresión pKQV4 con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*

Se tomaron 100ng/µl del vector pKQV4 y se restringieron con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*, la restricción se llevó a cabo en una incubación a 37°C durante 3hrs, y las reacciones se prepararon como en la tabla 4.

Tabla 4. Reactivos usados para la restricción del plásmido pKQV4 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Reactivo	Cantidad por reacción
Vector pKQV4	100 ng/µl
<i>EcoRI</i>	10U
<i>HindIII</i>	20U
Buffer 2.1	10% del volumen total (2.5µl)
H ₂ O	Ajustar a 25µl

Purificación de los fragmentos de PCR y del vector pKQV4

Se siguieron las instrucciones del fabricante GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

Preparación de bacterias quimio-competentes

Se tomó una colonia aislada de la cepa DH5 α y se inoculó en medio LB líquido y se incubó a 37°C, en agitación constante a 250rpm ON, de este cultivo se tomaron 500 μ l y se vertieron en un matraz Erlenmeyer, con 50 ml de medio LB líquido, se llevó a incubación a 37°C en agitación constante a 250rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 OD a una longitud de onda de 600nm, una vez que se llegó a la longitud de onda esperada, se transfirió el cultivo a un tubo falcon de 50ml y se colocó en hielo por 10 min., después se centrifugó a 6000 g por 10 min. a 4°C y se desechó el sobrenadante, se agregaron 25ml de glicerol al 10% estéril frío, se mezcló suavemente y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones antes descritas, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1ml de glicerol al 10% frío. Se realizaron alícuotas de trabajo de 100 μ l cada una y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Clonación de los productos de PCR en el plásmido pJET1.2

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

Transformación del producto de ligación de pJET1.2

Se tomaron 80 μ l de las células DH5 α competentes, se agregaron 20 μ l del producto de ligación y se incubó por 30 min. en hielo, después de ese tiempo, se incubó por 2 min. a 42°C e inmediatamente se colocó en hielo por 5 min. Posteriormente se agregaron 300 μ l de medio LB líquido y se incubó a 37°C en agitación constante a 250rpm por 1hr.

Después se centrifugó a 12,500rpm y se desechó el sobrenadante, dejando 100 μ l sobrantes en el tubo, en los cuales se resuspendió la pastilla.

Por último se espatularon los 100µl en cajas LB adicionadas con ampicilina (50ng/ml), con una varilla codeada estéril y se dejó secar, la caja se llevó a incubación a 37°C ON.

Mutagénesis al azar dirigida por transposón

La cepa silvestre W3110 fue crecida en 3ml de medio LB líquido, durante toda la noche. De ese cultivo se tomaron 500µl y se mezclaron con 50ml de medio LB fresco, en un matraz Erlenmeyer. Se tomó 1ml del sub-cultivo y se midió su densidad óptica (DO), posteriormente fue llevado a incubación a 37°C, en movimiento constante a 250rpm. La densidad óptica del cultivo fue medida cada hora hasta que el mismo llegara a una DO de 0.6.

La mutagénesis se realizó, infectando la cepa *E. coli* W3110 con el fago λNK1316. Para la adsorción, se mezclaron 10 µl del fago λNK1316 con 100 µl de la bacteria *E. coli* W3110 en distintas proporciones (Tabla 5), a temperatura ambiente (~26°C) por 10 minutos. Esto para determinar la cantidad de fago/bacteria necesario para obtener una buena cantidad de colonias, bien definidas y aisladas.

Después de la adsorción, 1 ml de medio LB fue añadido a la mezcla, posteriormente, se centrifugó a 5500 x g por 5 minutos y se removió el fago no adsorbido. Este paso fue hecho para evitar el proceso de reinfección y se repitió dos veces.

Posteriormente, 1 ml de medio LB fue añadido al pellet de bacteria infectada, se resuspendió e incubó a 37°C por 1hr a velocidad constante (~150 rpm). Después, 100µl del cultivo fue espatulado en una caja Petri con medio LB suplementado con Kanamicina (LB+Km) (50µg/ml), e incubado a 37°C toda la noche. Al siguiente día (~18 hrs de incubación) las mutantes Km resistentes fueron observadas y contadas.

Tabla 5. Cantidad de fago/bacteria utilizados para la estandarización de la mutagénesis al azar dirigida por transposón.

Número de caja	Fago UFP/ml	Bacteria UFC/ml
1	-----	10^7
2	10^5	10^5
3	10^6	10^5
4	10^6	10^6
5	10^7	10^6
6	10^7	10^7
7	10^8	10^7
8	10^8	10^8

RESULTADOS

Propagación y titulación de los fagos λ y mEp021.

Para iniciar con los ensayos pertinentes, se aislaron, purificaron y propagaron los fagos λ y mEp021, y se realizaron diluciones seriadas para obtener el título viral del stock de trabajo, que fue de 10^{11} UFP/ml para ambos fagos (Fig. 11).

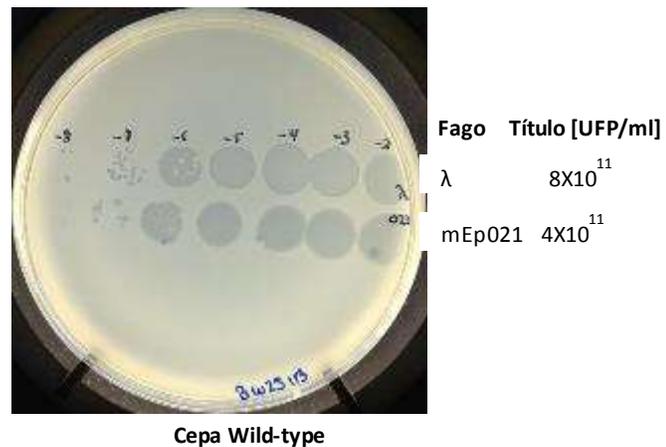


Figura 11. Títulación de los stocks de trabajo, del fago λ y del fago mEp021, en donde se observa un título de 10^{11} UFP/ml para ambos fagos.

Comprobación del genoma del fago mEp021.

Para corroborar la identidad del fago mEp021 se realizó un ensayo de restricción, utilizando la enzima *NdeI*, y se analizó en un gel de agarosa al 1%. El patrón obtenido se comparó con un análisis *in silico*, obtenido del sitio Nebcutter de New England Biolabs (Fig. 12). Como el patrón correspondía a lo estimado, se procedió con los experimentos planeados.

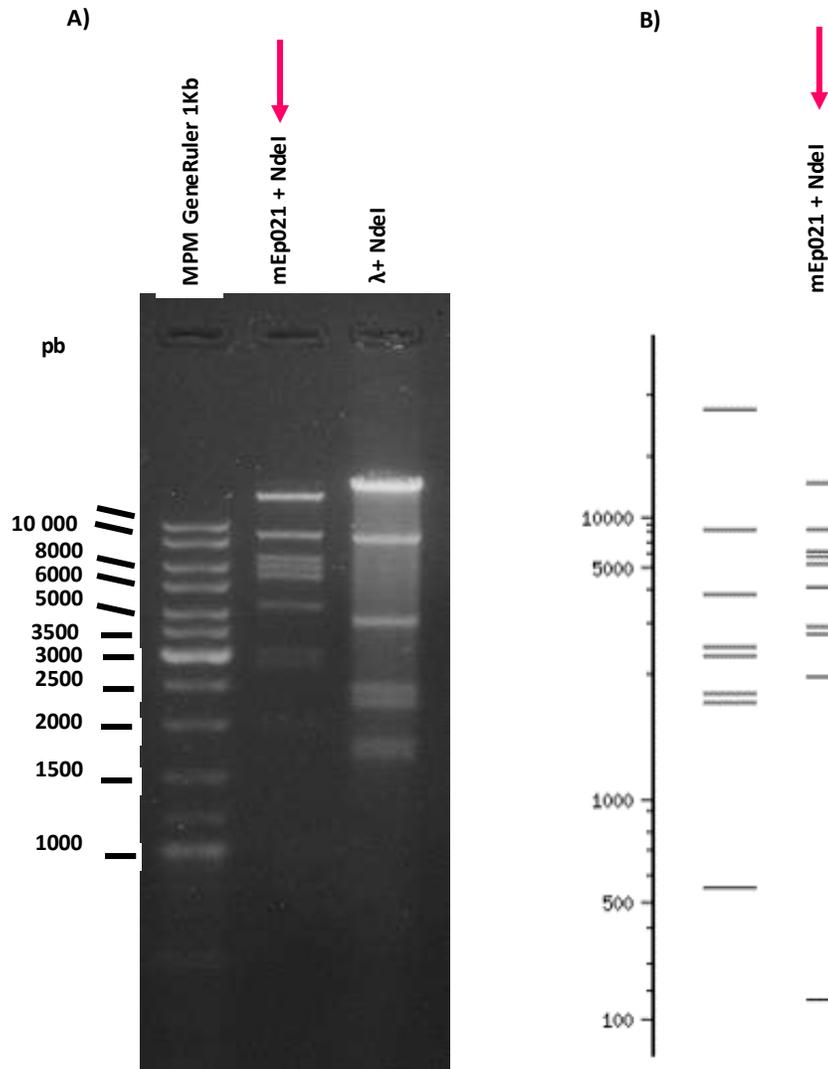


Figura 12. Ensayo de restricción. A) Genoma del fago mEp021 restringido con la enzima *NdeI*, también se observa restricción del fago λ . B) Análisis *in silico* de la restricción del genoma del fago mEp021 con la enzima *NdeI*. *NEBcutter V2.0*. (2016). *Nc2.neb.com*. from <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

Identificación de mutantes resistentes a la infección por el fago mEp021

De ~4000 genes pertenecientes al genoma de la bacteria *E. coli* K12 que se revisaron minuciosamente, se seleccionaron ~50 que tienen su función a nivel de envoltura celular. Las mutantes adquiridas pertenecientes a la colección Keio se utilizaron para realizar ensayos de infección con los fagos λ y mEp021.

De las 50 mutantes que se sometieron a los ensayos de infección con los fagos λ y mEp021, tres mostraron resistencia a la infección por el fago mEp021; *srlB*⁻ (sistema de fosfotransferasa de glucitol/sorbitol) y *livG*⁻ (transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada), ubicados en la membrana interna y *ompA*⁻ (porina), ubicada en la membrana externa de la bacteria (Tabla 6). Ensayos realizados por triplicado (ANEXO 1).

En la cepa wild-type de las mutantes Keio BW25113, se observó un crecimiento de por lo menos 10⁹ UFP/ml. En las mutantes *srlB*⁻ y *livG*⁻ se mostró una resistencia parcial, con un ligero halo de crecimiento y por lo menos 2 logaritmos por debajo del crecimiento observado en la cepa wild-type para el fago mEp021 (Fig. 13).

Por otro lado, la resistencia observada para la mutante *ompA*⁻ fue total, lo cual nos sugiere que esta proteína ubicada en la membrana externa bacteriana, podría ser utilizada por el fago mEp021 como receptor principal para ingresar su material genético al interior de la célula, (Fig. 14).

En congruencia a lo ya reportado, la mutante *lamB*⁻ (transportador de maltosa) se mostró resistente a la infección por el fago λ , ya que éste es utilizado por el fago como receptor en la membrana externa bacteriana (Hazelbauer & Schwartz, 1973), (Fig. 14).

Tabla 6. Ensayo de infección en cepas mutantes de *Escherichia coli*, utilizando los fagos λ y mEp021. Sombreado en rojo se muestran los resultados obtenidos para las mutantes, *srlB*⁻, *livG*⁻ y *ompA*⁻. Como controles del ensayo, se muestran los resultados obtenidos para las cepas BW25113 (Cepa wild-type de las mutantes Keio) y JW3996 *LamB*.

Cepas de <i>Escherichia coli</i>		Bacteriofagos	
		Λ	mEp021
Cepa wild-type	BW25113	+++	+++
Cepa control	JW3996 (<i>lamB</i>)	-	+++
Mutantes Keio (gen deletado o por inserción)	JW2385 (<i>glk</i>)	+++	+++
	JW0580 (<i>fepC</i>)	+++	+++
	JW2001 (<i>hisG</i>)	+++	+++

JW0130 (<i>panB</i>)	+++	+++
JW2155 (<i>fruK</i>)	+++	+++
JW0665 (<i>nagE</i>)	+++	+++
JW0794 (<i>glnQ</i>)	+++	+++
JW0795 (<i>glnP</i>)	+++	+++
JW1001 (<i>putP</i>)	+++	+++
JW1699 (<i>btuD</i>)	+++	+++
JW1888 (<i>araG</i>)	+++	+++
JW1895 (<i>tyrP</i>)	+++	+++
JW3700 (<i>bgfF</i>)	+++	+++
JW3992 (<i>malG</i>)	+++	+++
JW3993 (<i>malF</i>)	+++	+++
JW3995 (<i>malK</i>)	+++	+++
JW4072 (<i>proP</i>)	+++	+++
JW4081 (<i>melB</i>)	+++	+++
JW4201 (<i>mgtA</i>)	+++	+++
JW2303 (<i>hisP</i>)	+++	+++
JW2409 (<i>ptsI</i>)	+++	+++
JW2673 (<i>srlB</i>)	+++	++
JW2772 (<i>fucP</i>)	+++	+++
JW2955 (<i>pitB</i>)	+++	+++
JW3372 (<i>feoB</i>)	+++	+++
JW3420 (<i>livG</i>)	+++	++
JW3422 (<i>livH</i>)	+++	+++
JW3538 (<i>xylF</i>)	+++	+++
JW3573 (<i>mtlA</i>)	+++	+++
JW3628 (<i>gltS</i>)	+++	+++
JW1887 (<i>araH</i>)	+++	+++
JW0406 (<i>nusB</i>)	+++	+++
JW3425 (<i>livJ</i>)	+++	+++
JW4248 (<i>fecD</i>)	+++	+++
JW0565 (<i>pheP</i>)	+++	+++
JW2774 (<i>fucK</i>)	+++	+++
JW2910 (<i>galP</i>)	+++	+++
JW5560 (<i>kdgT</i>)	+++	+++
JW5946 (<i>gntR</i>)	+++	+++
JW0334 (<i>lacY</i>)	+++	+++
JW1807 (<i>manY</i>)	+++	+++
JW2304 (<i>hisM</i>)	+++	+++
JW5857 (<i>rhsD</i>)	+++	+++
JW5859 (<i>dgoT</i>)	+++	+++
JW0740 (<i>galK</i>)	+++	+++
JW1087 (<i>ptsG</i>)	+++	+++
JW0306 (<i>betT</i>)	+++	+++
JW0940 (<i>ompA</i>)	+++	-
JW0146 (<i>fhuA</i>)	+++	+++

(+++) Lisis total, (++) Lisis parcial, (-) No infección.

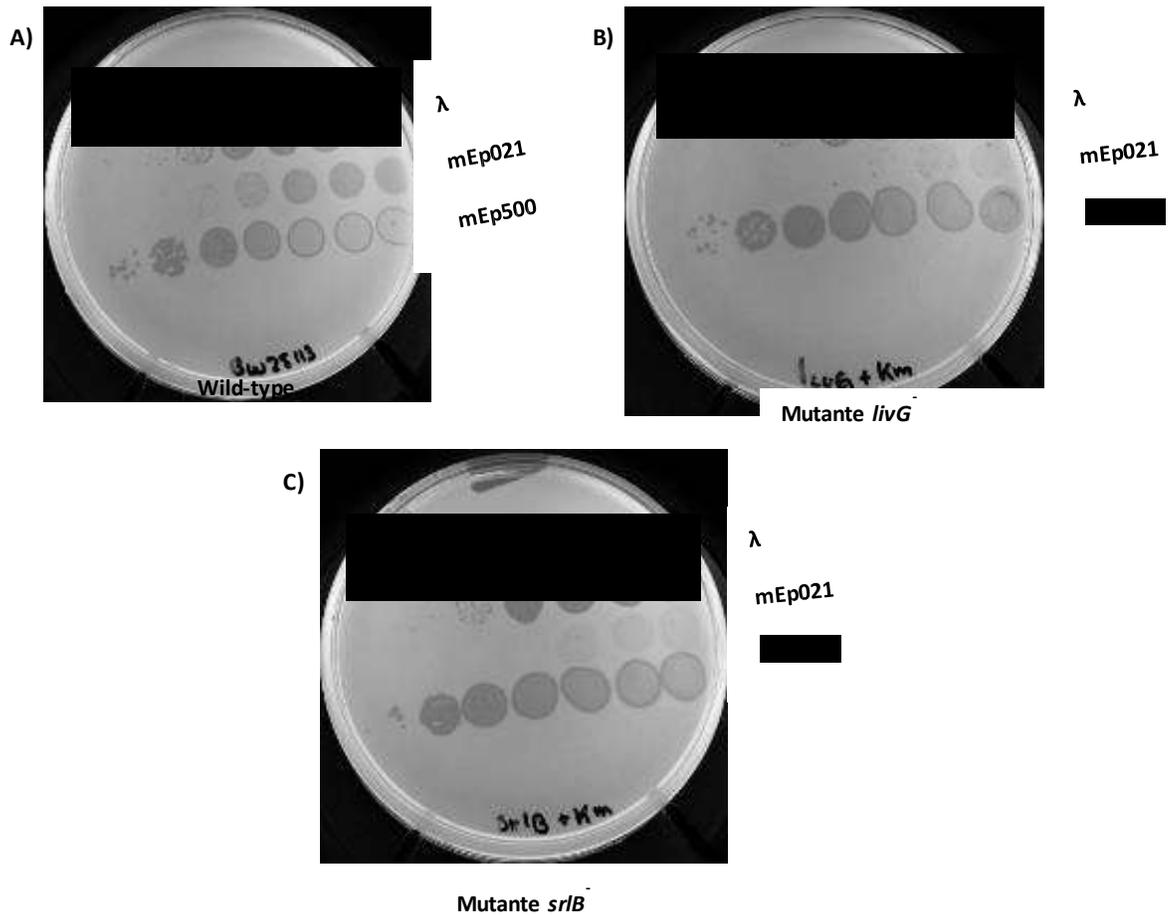


Figura 13. Ensayo de infección en cepas mutantes de *Escherichia coli*, utilizando los fagos λ y mEp021. A) Resultados obtenidos para la cepa wild-type de las mutantes Keio en donde se muestra el crecimiento normal de los dos fagos. B) y C) Mutante *livG*⁻ y *srlB*⁻ en donde se muestra una resistencia parcial a la infección del fago mEp021, con un halo de crecimiento observado hasta por lo menos 2 logaritmos por debajo de la cepa control BW25113.

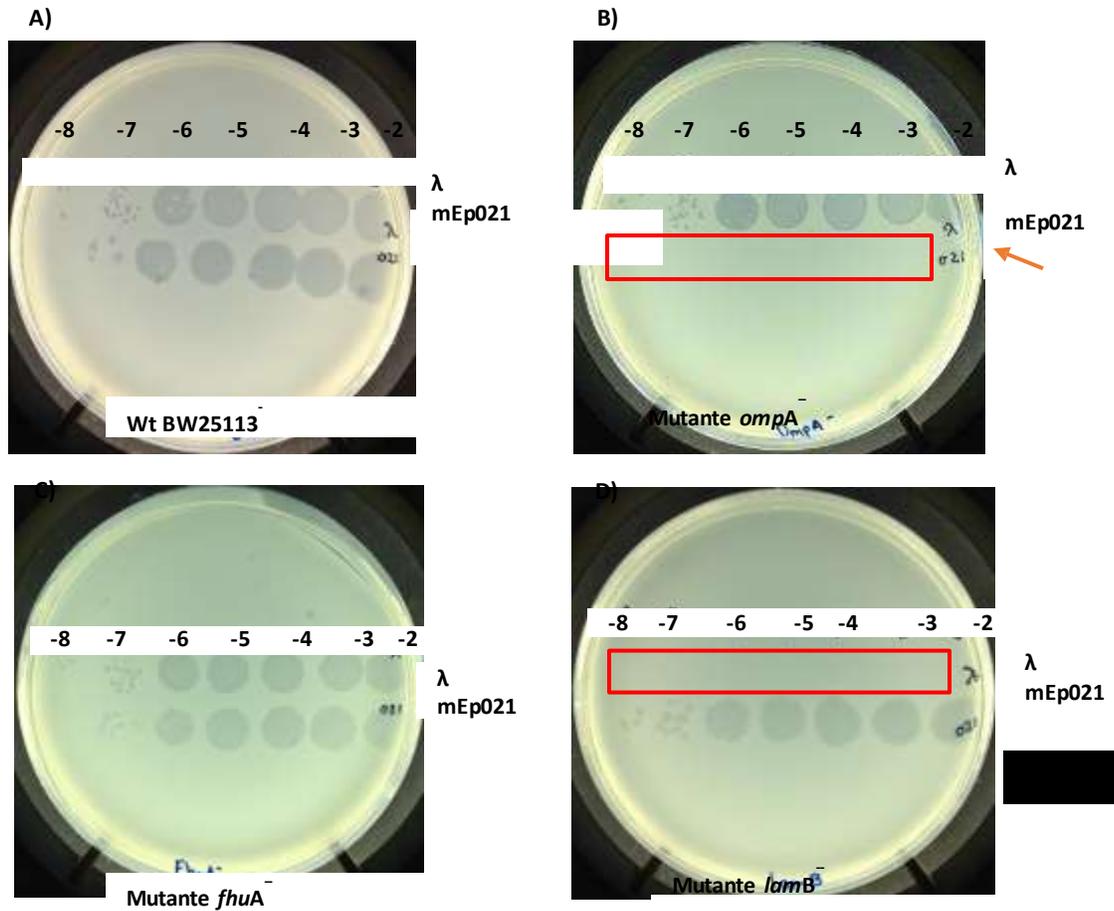


Figura 14. Ensayo de infección en cepas mutantes de *Escherichia coli*, utilizando los fagos λ y mEp021. A) Resultados obtenidos para la cepa wild-type de las mutantes Keio en donde se muestra un crecimiento normal para todos los fagos. B) Mutante *ompA*⁻ donde se muestra un crecimiento nulo del fago mEp021. C) Mutante *fhuA*⁻, donde no se muestra abatimiento en la infección en ninguno de los fagos utilizados en este ensayo. D) Cepa control mutada en el gen *lamB*, que funciona como receptor para el fago λ , el crecimiento para este fago es nulo.

Verificación del genoma de las mutantes de la colección Keio

Se diseñaron primers específicos para la amplificación de los genes *srIB* y *livG* (ANEXO 1), y se probaron en las mutantes deletadas en estos genes. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa al 1%. En ambos casos no se

observó amplificación, sin embargo, en la cepa silvestre únicamente se obtuvo amplificación para el gen *srlB*, pero no así para *livG*, por lo que se están estandarizando las condiciones adecuadas para la amplificación (Fig. 15).

Clonación de los genes de interés

Se amplificó el gen *srlB* con primers específicos y se utilizó como molde el genoma de la cepa W3110, posteriormente se analizaron las muestras en un gel de agarosa al 1% y se confirmó la obtención del amplificado de 472 pb (Fig. 15).

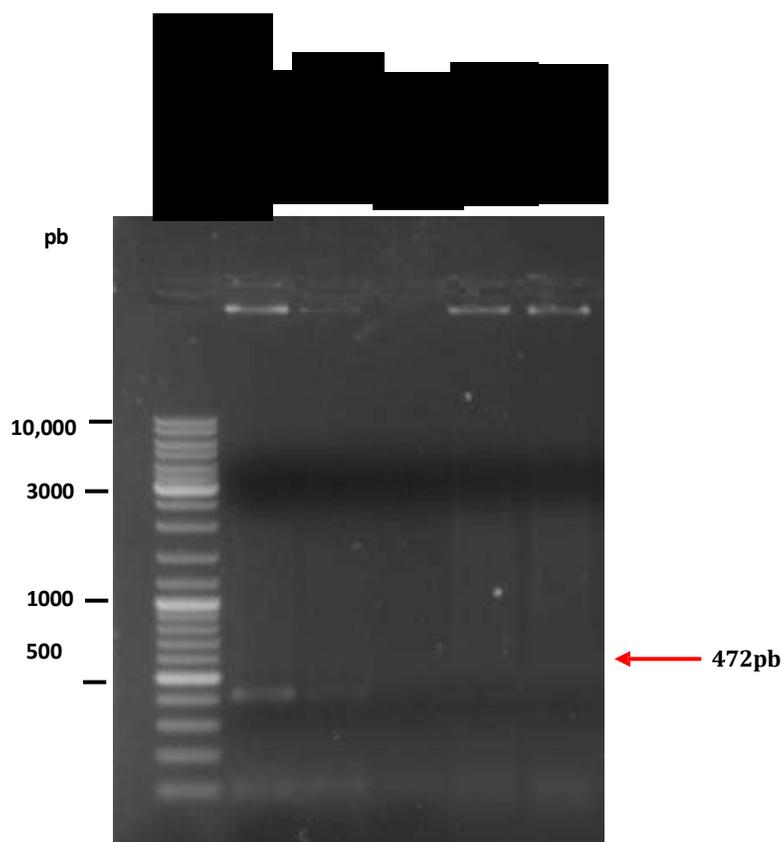


Figura 15. Verificación del genoma en la cepa silvestre Keio y amplificación de los genes de interés. Se observa una banda de 472 pb en los carriles de la cepa wild-type y W3110, perteneciente al amplificado del gen *srlB* pero no así para *livG*. No se mostró amplificación en

las cepas mutantes de los genes *srlB* y *livG* deletados, lo que sugiere que la delección del gen *srlB* es correcta.

Una vez que se obtuvo el amplificado de *srlB*, se clonó en el vector de transición PJET 1.2/blunt que contiene la resistencia a penicilina y se transformó en células competentes DH5 α (Fig. 16A), posteriormente se eligieron 24 candidatas resistentes al antibiótico, que se re-estriaron en una caja con medio LB+amp (Fig. 16B).

Las candidatas serán verificadas por PCR, se liberará el fragmento con enzimas de restricción y se clonará en el plásmido de expresión pKQV4, para la realización de los siguientes ensayos.

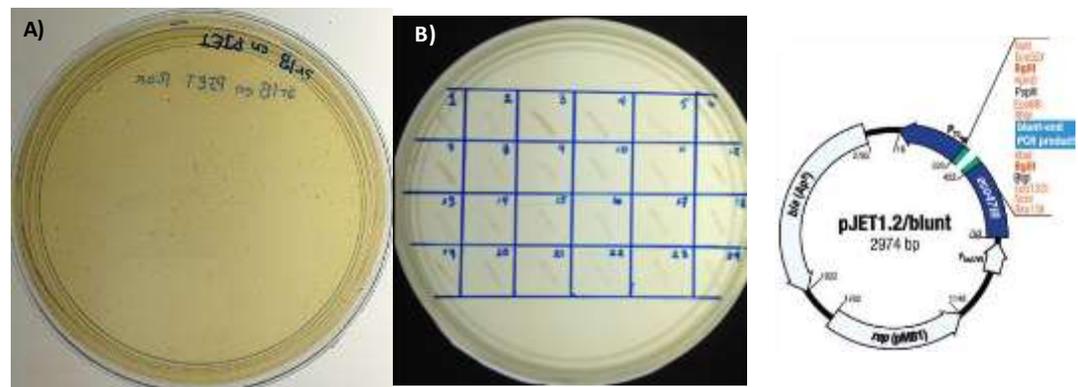


Figura 16. Clonación del gen *srlB* en el plásmido PJET 1.2/blunt. A) Células DH5 α transformadas con el amplificado del gen *srlB* clonado en el vector de transición PJET. B) Selección 24 de candidatas re-estriadas para su análisis y clonación posterior.

Por otro lado se restringió el vector de expresión pKQV4 de 5707pb, que será utilizado en este trabajo con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* resultando un producto de 5677pb, se analizó en un gel de agarosa al 1% (Fig.17), y se almacenó a -20°C para su uso posterior.

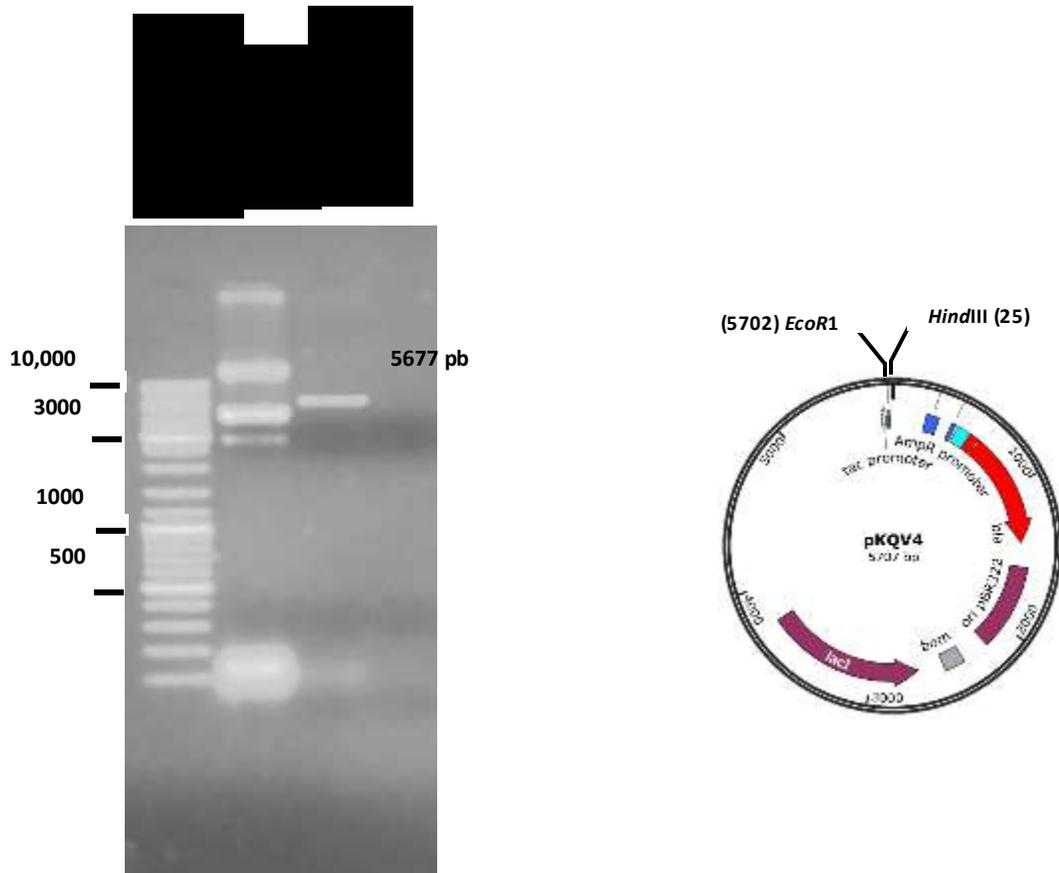


Figura 17. Restricción del vector de expresión pKQV4 con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*. A) Se puede observar una banda con un tamaño de 5677pb, perteneciente al plásmido sometido a restricción, también se muestra el corrimiento del vector circular y se puede observar las isoformas del mismo. B) Esquema del plásmido pKQV4 y sus sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Mutagénesis al azar dirigida por transposón

Para iniciar con los ensayos de mutagénesis, se aisló y propagó el fago λ NK1316 que se caracteriza por poseer un transposón que es capaz de modificar los genes del hospedero por inserción del mismo, y que le confiere resistencia a Km.

El fago λ NK1316 no se replica, ni se integra en la cepa W3110 debido a que posee una mutación tipo ambar en el gen Pam80 que está involucrado en la replicación y por una delección del sitio de recombinación específico att⁻,

pero es capaz de replicarse en la cepa LE392, que suprime la mutación del fago para poder desarrollarse (ANEXO1).

Se realizaron diluciones seriadas del stock del fago para obtener el título viral, y posteriormente, se realizaron tapices utilizando las cepas W3110 y LE392 y se gotearon 5µl de cada dilución. Se obtuvo un título viral de 7×10^{10} UFP/ml y se utilizó a la cepa W3110 como control (Fig. 18).

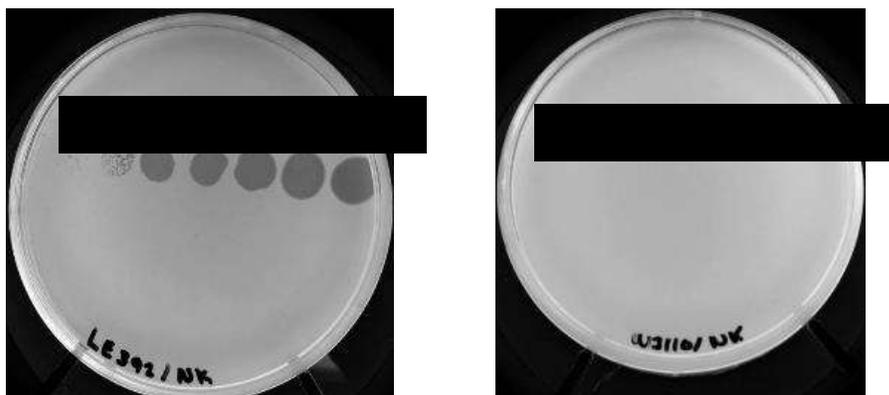
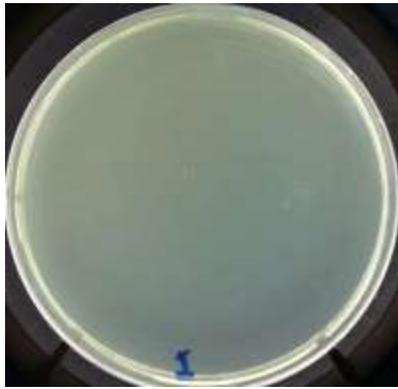


Figura 18. Ensayo de infección y titulación del fago λ NK1316 en la cepa LE392 y W3110. El fago λ NK1316 es capaz de crecer en la cepa LE392 pero no en la cepa W3110.

Posteriormente se realizó la mutagénesis en la cepa W3110 utilizando el fago λ NK1316 (Ver Materiales y Métodos). Se utilizaron distintas cantidades de fago y de bacteria, con el objetivo de estandarizar, las cantidades necesarias para la obtención de mutantes en buena cantidad y con colonias aisladas y bien definidas. La cantidad que se eligió para la realización de ensayos posteriores fue de 10^8 UFP/ml para el fago λ NK1316 y de 10^7 UFC/ml de bacteria (caja 7).

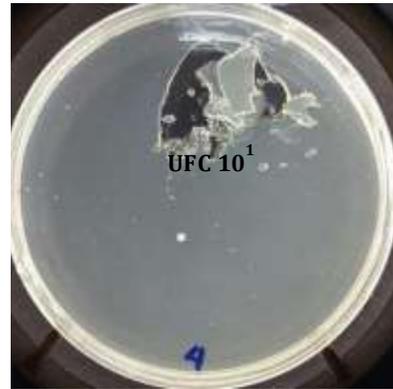
Adicionalmente se re-estriaron algunas colonias mutantes elegidas al azar en cajas de LB+Km (50µg/ml), y una colonia proveniente de la cepa W3110, que se utilizaron como control (Fig. 19).

A)

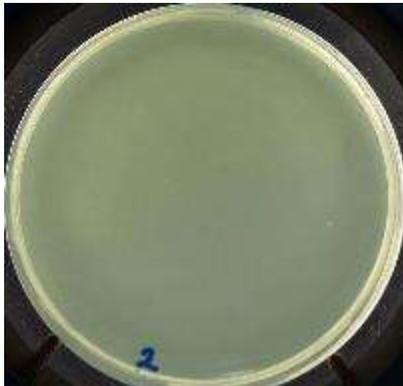


FAGO

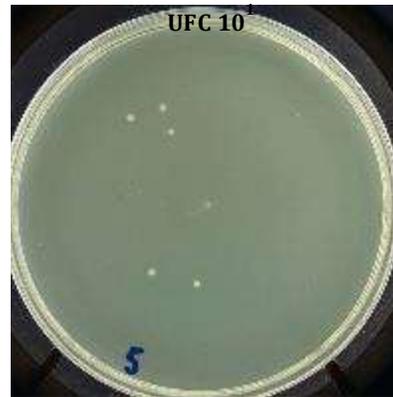
BACTERIA
10⁷



FAGO
10⁶
BACTERIA
10⁶



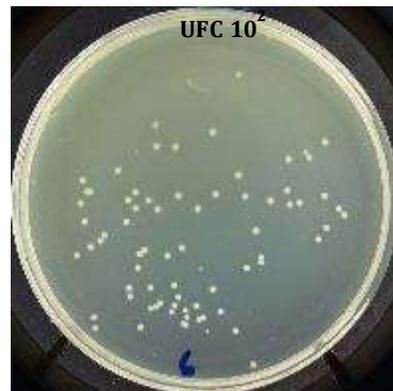
FAGO
10⁵
BACTERIA
10⁵



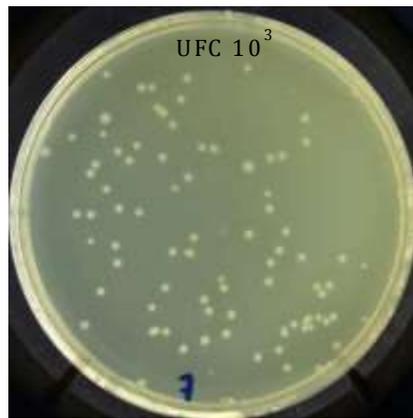
FAGO
10⁷
BACTERIA
10⁶



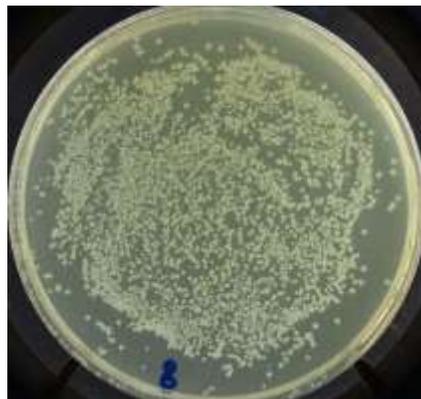
FAGO
10⁶
BACTERIA
10⁵



FAGO
10⁷
BACTERIA
10⁷



FAGO	BACTERIA
10⁸	10⁷



FAGO	BACTERIA
10⁸	10⁸

B)



Figura 19. Mutagénesis en la cepa W3110. A) Se utilizaron distintas cantidades de fago y de bacteria, para estandarizar las cantidades necesarias para la obtención de mutantes, en buena cantidad y con colonias aisladas y bien definidas. La cantidad que se eligió para la realización de ensayos posteriores fue de 10⁸ UFP/ml para el fago λNK1316 y de 10⁷ UFC/ml de bacteria (caja 7). B) Se re-estriaron algunas colonias mutantes elegidas al azar en cajas de LB+Km (50µg/ml), y una colonia proveniente de la cepa W3110, que se utilizaron como control.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue identificar los componentes de la envoltura celular utilizados por el colifago mEp021.

La estrategia para abordar este objetivo, incluyó un análisis minucioso de cerca de ~4000 genes pertenecientes al genoma de la bacteria, *Escherichia coli* K-12.

Derivado de este análisis se seleccionaron ~50 genes que codifican para proteínas que tienen su función a nivel de envoltura celular, y que, de acuerdo a los antecedentes encontrados correspondiera o fuera equivalente a los hallazgos anteriormente publicados (Tabla 6). Posterior a esto, se realizó el ensayo de infección con el fago mEp021, y utilizando como control al fago λ , donde se encontraron 3 mutantes resistentes a la infección por el fago mEp021; la mutante *srIB*⁻ y la mutante *livG*⁻ con mutaciones a nivel de membrana interna, y la mutante *ompA*⁻ con la mutación a nivel de membrana externa (Figura 13).

En estudios anteriores han reportado la importancia de la porina OmpA como receptor del fago sf6 de *Shigella flexneri* (Parent et al., 2014), (Porcek & Parent, 2015), del colifago M1 (Plank Max, 1994), del fago AR1 (Liang Yu et al., 2000), y de otros fagos tipo T (Marti et al., 2013).

La mutante *ompA*⁻ probada en este estudio, muestra un abatimiento total de la infección del fago mEp021. Es importante recalcar que este fenómeno no se reprodujo en otras mutantes de proteínas pertenecientes a la superfamilia de transportadores como *livJ* y *livH*, (Fig. 13), lo que sugiere que esta proteína podría ser el receptor principal de este fago a nivel de membrana externa. Sin embargo es imprescindible comprobar por medio de la complementación de las mutantes, la restauración de la función.

El gen *srIB* codifica para el componente IIA del sistema de fosfotransferasa de glucitol/sorbitol, que se encarga de fosforilar y transportar estas

azúcares, (Lengeler, 1975). Los sistemas de fosfotransferasa se encuentran dispuestos a lo largo de la membrana interna y son específicos para cada tipo de azúcar. Anteriormente dos sistemas específicos de transporte fueron reportados como proteínas indispensables para la infección del fago λ , que utiliza el sistema de fosfotransferasa de manosa (Esquinas-Rychen & Erni, 2001) y del fago HK97 que utiliza el sistema de fosfotransferasa de glucosa (Cumby et al., 2015). De acuerdo a lo anterior, el sistema de fosfotransferasa podría estar siendo utilizado mayoritariamente en el proceso de infección de diversos fagos, aunque aún no se sabe si la especificidad del azúcar que transporta pudiera ser un punto clave en la selectividad del fago que lo utiliza.

En este estudio sólo se realizó el ensayo de infección utilizando la mutante deletada en el componente IIA del sistema de fosfotransferasa que transporta sorbitol/glucitol, resulta importante, realizar el mismo ensayo en otros componentes del mismo sistema o de sistemas homólogos que transporten otros tipos de azúcares, esto para elucidar el papel de las mismas en el proceso de infección del fago mEp021.

El gen *livG* codifica para un transportador ABC de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina, valina) (Anderson & Oxender, 1977), ya que también es una proteína integral de membrana interna, al igual que otras que funcionan como receptores para algunos fagos, este elemento podría ser importante para facilitar el paso del material genético a través de la envoltura.

Las mutantes *srIB*⁻ y *livG*⁻ tienen una resistencia parcial a la infección por el fago mEp021, mostrando un ligero halo de crecimiento, dos logaritmos por debajo del crecimiento que mostró la cepa control BW25113, (Fig. 13). Este resultado podría sugerir que el fago mEp021 es capaz de utilizar ambas vías para facilitar la entrada de su genoma a nivel de membrana interna, y que podría estar utilizando indistintamente cualquiera de estos elementos,

sin embargo, será necesario realizar más pruebas que ayuden a esclarecer este proceso.

Otro elemento importante en este proceso es la participación de los LPS, Reyes y cols. en el 2012, reportó que los LPS son indispensables en la infección por el fago mEp021, que es congruente con lo reportado por (Parent et al., 2014) en donde resalta la importancia de la hidrólisis primaria

de los lipopolisacáridos (LPS), seguida por una interacción con las porinas OmpA y OmpC, para promover la infección del podofago sf6.

Se propone un modelo de infección del fago mEp021, donde OmpA y los lipopolisacáridos en la membrana externa serían los primeros elementos de contacto con el fago y posteriormente LivG y/o SrlB en la membrana interna actuarían como receptores internos y/o proteínas helper para finalmente liberar el material genético del fago al interior de la bacteria. Sin embargo es necesario realizar más pruebas para validar el modelo propuesto, (Fig. 15).

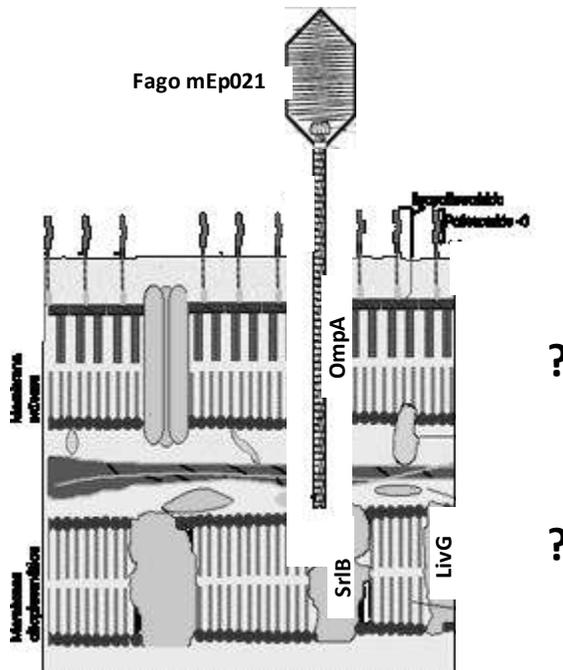


Figura 20. Modelo de infección del fago mEp021. El fago hace contacto inicialmente con la porina OmpA y los LPS en la membrana externa, los componentes de membrana interna LivG y SrlB pueden estar haciendo contacto con la cola del fago o actuar como proteínas helper para el paso del genoma al interior de la célula.

CONCLUSIONES

1. Se tienen identificados los putativos componentes de membrana interna SrlB (componente IIA del sistema de fosfotransferasa de glucitol/sorbitol), LivG (transportador tipo ABC de aminoácidos), y al componente de membrana externa OmpA (porina), implicados en la infección del fago mEp021.
2. Se ha confirmado parcialmente la identidad de la mutante *srlB*⁻.
3. Se han estandarizado las condiciones de mutagénesis utilizando el fago λ NK1316.

PERSPECTIVAS

1. Clonar los genes *srlB* y *livG*
2. Comprobar la participación de las tres proteínas identificadas, en el proceso infeccioso del fago mEp021.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, J. J., & Oxender, D. L. (1977). *Escherichia coli* Transport Mutants Lacking Binding Protein and Other COmponents of the Branched-Chain Amino Acid Transport Systems. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 130(1), 384–392.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2, 2006.0008. <http://doi.org/10.1038/msb4100050>
- Babu, M., Díaz-Mejía, J. J., Vlasblom, J., Gagarinova, A., Phanse, S., Graham, C., ... Emili, A. (2011). Genetic Interaction Maps in *Escherichia coli* Reveal Functional Crosstalk among Cell Envelope Biogenesis Pathways. *PLoS Genet*, 7(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002377>
- Bachmann, B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 525–557.
- Bae, H.-W., & Cho, Y.-H. (2013). COmplete Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Podophage MPK7, Which Requires Type IV Pili for Infection. *Genome Announcements*, 1(5). <http://doi.org/10.1128/genomeA.00744-13>
- Böhm, J., Lambert, O., Frangakis, A. S., Letellier, L., Baumeister, W., & Rigaud, J. L. (2001). FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: A cryo-electron tomography study. *Current Biology*, 11(15), 1168–1175. [http://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00349-9](http://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00349-9)
- Braun, V. (2009). FhuA (TonA), the career of a protein. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3431–3436. <http://doi.org/10.1128/JB.00106-09>
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews. Genetics*, 4(6), 471–477. <http://doi.org/10.1038/nrg1089>
- Camprubí, S., Merino, S., Benedí, V.-J., & Tomás, J. M. (1991). Isolation and characterization of bacteriophage FC3-10 from *Klebsiella* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 83(3), 291–297. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037810979190491R>
- Chang, C. Y., Kemp, P., & Molineux, I. J. (2010). Gp15 and gp16 cooperate in translocating bacteriophage T7 DNA into the infected cell. *Virology*, 398(2), 176–186. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2009.12.002>
- Chatterjee, S., & Rothenberg, E. (2012). Interaction of bacteriophage λ with Its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses*, 4(11), 3162–3178. <http://doi.org/10.3390/v4113162>
- Chaturongakul, S., & Ounjai, P. (2014). Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. *Frontiers in*

- Microbiology*, 5, 442. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00442>
- Confer, A. W., & Ayalew, S. (2013). The *OmpA* family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. *Veterinary Microbiology*, 207–222. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.019>
- Cumby, N., Reimer, K., Mengin-Lecreulx, D., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2015). The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of *E. coli* phage HK97. *Molecular Microbiology*, 96(January), n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/mmi.12918>
- Davies, G. E. (1963). Periplasmic quality control in biogenesis of outer membrane proteins. *Immunology*, 6(6), 561–568. <http://doi.org/10.1042/BST20140217>
- Esquinas-Rychen, M., & Erni, B. (2001). Facilitation of bacteriophage *Lambda* DNA injection by inner membrane proteins of the bacterial phosphoenol-pyruvate: carbohydrate phosphotransferase system (PTS). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(3), 361–370.
- Hancock, R. W., & Braun, V. (1976). Nature of the energy requirement for the irreversible adsorption of bacteriophages T1 and phi80 to *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 125(2), 409–15. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=236097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hannahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol. Biol.*, 1983, Jun 5;166(4):557-80
- Hannavy, K., Barr, G. C., Dorman, C. J., Adamson, J., Mazengera, L. R., Gallagher, M. P., ... Higgins, C. F. (1990). TonB protein of *Salmonella typhimurium*. A model for signal transduction between membranes. *Journal of Molecular Biology*, 216(4), 897–910. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(99\)80009-6](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(99)80009-6)
- Hans-W., A. (1999). Tailed bacteriophages: the order caudovirales, 51.
- Heller, K., & Braun, V. (1979). Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *Journal of Bacteriology*, 139(1), 32–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=216823&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Heo, Y. J., Chung, I. Y., Choi, K. B., Lau, G. W., & Cho, Y. H. (2007). Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. *Microbiology*, 153(9), 2885–2895. <http://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007260-0>
- Hernández-Sánchez, J., Bautista-Santos, A., Fernández, L., Bermúdez-Cruz, R.

- M., Uc-Mass, A., Martínez-Peñañiel, E., ... Kameyama, L. (2008). Analysis of some phenotypic traits of feces-borne temperate *Lambdoid* bacteriophages from different immunity groups: A high incidence of cor+, FhuA-dependent phages. *Archives of Virology*, 153(7), 1271–1280. <http://doi.org/10.1007/s00705-008-0111-0>
- Islam, S. T., Lam, J. S., & Joseph Lam, C. S. (2013). Topological mapping methods for a-helical bacterial membrane proteins – an update and a guide. *Institutes of Health Research MicrobiologyOpen*, 2(2), 350–364. <http://doi.org/10.1002/mbo3.72>
- Kleckner N., Bender J., Gottesman S., (1991), Uses of transposons with emphasis on Tn10, *Methods in Enzymology*, Vol 204, 139-180.
- Kameyama, L., Fernandez, L., Bermudez, R. M., Garcia-Mena, J., Ishida, C., & Guarueros, G. (2001). Properties of a new coliphage group from human intestinal flora. *Recent Research Developments in Virology*, 3, 297–303. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14594117>
- Kameyama, L., Fernández, L., Calderón, J., Ortiz-Rojas, a, & Patterson, T. a. (1999). Characterization of wild *Lambdoid* bacteriophages: detection of a wide distribution of phage immunity groups and identification of a nus-dependent, non*Lambdoid* phage group. *Virology*, 263(1), 100–111. <http://doi.org/10.1006/viro.1999.9888>
- Killmann, H., Videnov, G., Jung, G., Schwarz, H., & Braun, V. (1995). Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 694–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=176645&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Koskella, B., Thompson, J. N., Preston, G. M., & Buckling, A. (2011). Local Biotic Environment Shapes the Spatial Scale of Bacteriophage Adaptation to Bacteria. *The American Naturalist*, 177(4). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.5061/dryad.8178>.
- Labrie Simon J., Samson Julie E., M. S. (2010). Bacteriophage resistance mechanism. *Microbiology*, 8. Retrieved from <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n5/pdf/nrmicro2315.pdf>
- Lengeler, J. (1975). Mutations Affecting Transport of the Hexitols D-Mannitol, D-Glucitol, and Galactitol in *Escherichia coli* K-12: Isolation and Mapping. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 124(1), 26–38.
- Lenski, R. E. (1984). Two-step resistance by *Escherichia coli* B to bacteriophage T2. *Genetics*, 107(1), 1–7.
- Mahony, J., & van Sinderen, D. (2012). Structural aspects of the interaction of dairy phages with their host bacteria. *Viruses*, 4(9), 1410–24.

<http://doi.org/10.3390/v4091410>

- Marti, R., Zurfluh, K., Hagens, S., Pianezzi, J., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2013). Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize *Salmonella OmpC*. *Molecular Microbiology*, *87*(4), 818–834. <http://doi.org/10.1111/mmi.12134>
- Martínez-Peñañiel, E., Fernández-Ramírez, F., Ishida, C., Reyes-Cortés, R., Sepúlveda-Robles, O., Guarneros-Peña, G., ... Kameyama, L. (2012). Overexpression of Ipe protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death. *Biochimie*, *94*(6), 1262–1273. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.02.004>
- Molineux, I. J. (2001). No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Molecular Microbiology*, *40*(1), 1–8. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02357.x>
- Morona, R., Klose, M., & Henning, U. (1984). *Escherichia coli* K-12 Outer Membrane Protein (*OmpA*) as a Bacteriophage Receptor: Analysis of Mutant Genes Expressing Altered Proteins. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *159*(2), 570–578.
- Orlova, E. V. (2009). How viruses infect bacteria? *The EMBO Journal*, *28*(7), 797–798. <http://doi.org/10.1038/emboj.2009.71>
- Pajunen, M., Kiljunen, S., & Skurnik, M. (2000). Bacteriophage phiYe03-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *Journal of Bacteriology*, *182*(18), 5114–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=94659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Papanastasiou, M., Orfanoudaki, G., Koukaki, M., Kountourakis, N., Sardis, M. F., Aivaliotis, M., ... Economou, A. (2013). The *Escherichia coli* peripheral inner membrane proteome. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *12*(3), 599–610. <http://doi.org/10.1074/mcp.M112.024711>
- Parent, K. N., Erb, M. L., Cardone, G., Nguyen, K., Gilcrease, E. B., Porcek, N. B., ... Casjens, S. R. (2014). *OmpA* and *OmpC* are critical host factors for bacteriophage Sf6 entry in *Shigella*. *Mol Microbiol*, *92*(1), 47–60. <http://doi.org/10.1111/mmi.12536>
- Plank Max. (1994). Alterations of Receptor specificities of coliphages of the T2 family. *Molecular Biology*, 105–110.
- Polissi, A., & Sperandio, P. (2014). The lipopolysaccharide export pathway in *Escherichia coli*: Structure, organization and regulated assembly of the Lpt machinery. *Marine Drugs*, *12*(2), 1023–1042. <http://doi.org/10.3390/md12021023>
- Porcek, N. B., & Parent, K. N. (2015). Key Residues of *S. flexneri OmpA* Mediate Infection by Bacteriophage Sf6. *Journal of Molecular Biology*, *427*, 1964–1976. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.03.012>

- Postle, K., & Skare, J. T. (1988). *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of its amino terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 263(22), 11000–11007.
- Randall-Hazelbauer, L., & Schwartz, M. (1973). Isolation of the bacteriophage Lambda receptor from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 116(3), 1436–46. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=246503&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Reyes-Cortés, R., Martínez-Peñañiel, E., Martínez-Pérez, F., de la Garza, M., & Kameyama, L. (2012). A novel strategy to isolate cell-envelope mutants resistant to phage infection: Bacteriophage mEp213 requires lipopolysaccharides in addition to FhuA to enter *Escherichia coli* K-12. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(12), 3063–3071. <http://doi.org/10.1099/mic.0.060970-0>
- Roof, S. K., Allard, J. D., Bertrand, K. P., & Postle, K. (1991). Analysis of *Escherichia coli* TonB membrane topology by use of PhoA fusions. *Journal of Bacteriology*, 173(17), 5554–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=208271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rossmann, M. G., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F., & Leiman, P. G. (2004). The bacteriophage T4 DNA injection machine The bacteriophage T4 DNA injection machine, (MAY). <http://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.02.001>
- Rossmann, M., & Rao, V. (2012). Viral molecular machines. *Saponins Used in Food and Agriculture Plenum Press. ...*, 1–687. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9>
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., & Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(10), 675–87. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3096>
- Samsonov, V. V., Samsonov, V. V., & Sineoky, S. P. (2002). DcrA and dcrB *Escherichia coli* genes can control DNA injection by phages specific for BtuB and FhuA receptors. *Research in Microbiology*, 153(10), 639–646. [http://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)01375-X](http://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)01375-X)
- Schaechter Moselio. (2001). *Escherichia coli* and Salmonella 2000: the View from here. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 119–130. <http://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.119-130.2001>
- Shin, H., Lee, J.-H., Kim, H., Choi, Y., Heu, S., & Ryu, S. (2012). Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PloS One*, 7(8), e43392. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043392>
- Silverman, J. A., & Benson, S. A. (1987). Bacteriophage K20 requires both the *OmpF* porin and lipopolysaccharide for receptor function. *Journal of Bacteriology*, 169(10), 4830–3. Retrieved from

[http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=213862
&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=213862&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)

- Uc-Mass, A., Loeza, E. J., De La Garza, M., Guarneros, G., Hernández-Sánchez, J., & Kameyama, L. (2004). An orthologue of the cor gene is involved in the exclusion of temperate *Lambdoid* phages. Evidence that Cor inactivates FhuA receptor functions. *Virology*, *329*(2), 425–433. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.005>
- Strauch, MA, Spiegelman, GB, Perego, M., Johnson, WC, Burbulys, D., y Hoch, JA (1989). El regulador de la transcripción del estado de transición AbrB de *Bacillus subtilis* es una proteína de unión a ADN. *The EMBO Journal*, *8* (5), 1615-1621.
- Wang, Y. (2002). The Function of *OmpA* in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6657>
- Yu, F., & Mizushima, S. (1982). Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein *OmpC* of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *Journal of Bacteriology*, *151*(2), 718–22. Retrieved from [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=220313
&tool=pmcentrez&rendertype=abstract](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=220313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract)
- Yu, S.-L., Ko, K.-L., Chen, C.-S., Chang, Y.-C., & Syu, W.-J. (2000). Characterization of the Distal Tail Fiber Locus and Determination of the Receptor for Phage AR1, Which Specifically Infects *Escherichia coli* O157:H7. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, *182*(21), 5962–5968.

APÉNDICE 1

Preparación de medios de cultivo

Stab Agar

REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA PARA 1L
Caldo nutritivo	10gr
NaCl	5gr
Agar bacteriológico	6gr
Cisteína	10mg
Timina (alternativo)	10mg

Medio Luria Bertani (LB)

REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA PARA 1L
Bacto-triptona	10gr
Extracto de levadura	5gr
NaCl	5gr
Agar bacteriológico (para preparación de cajas con medio solido)	15gr

Medio T ϕ

REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA PARA 1L
Triptona	10gr
Agar	10gr
NaCl	2.5gr
NaOH	Cantidad necesaria para 2M
MgSO ₄ 1M (solo para T ϕ suave)	10ml

Medio TMG

REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA PARA 1L
NaCl	11.7gr
Gelatina	1gr
Tris HCl 1M, pH 8.0	1ml
MgSO ₄ 1M	0.5ml
KOH	Cantidad para ajustar el pH a 7.4

ANEXO1

Cepas, bacteriófagos y plásmidos

	Genotipo o marcador importante	Referencia
Bacteriófagos		
λ	Fago silvestre	CSH Collection
<i>mEp021</i>	Fago temperado	(Kameyama et al, 2001)
λ NK1316	Λ (miniTn10::km ^R cl ₈₅₇ Pam ₈₀)	(Kleckner, et al, 1991)
	nin5 b522 att ⁻)	
Plásmidos		
pKQV4	Vector de bajo número de copias Amp ^R	(Strauch et al, 1989)
pJET	Vector de transición Amp ^R	
Bacterias		
W3110	F ⁻ λ -rph ⁻	(Bachmann, 1972)
LE392	F ⁺ , e14 ⁺ , hsdR514(r ⁻ m ⁻) supE44 supF58 lacY1	(Silhavy, et al, 1984)
DH5 α	endA1 hsdR17(r ⁻ m ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 Δ (lacIZYA-argF) U169 deoR (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)	(Hanahan 1983)
<i>jw3996 (lamB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2385 (glk)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw0580 (fepC)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2001 (hisG)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw0130 (panB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2155 (fruK)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw0665 (nagE)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw0794 (glnQ)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw0795 (glnP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw1001 (putP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw1699 (btuD)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw1888 (araG)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw1895 (tyrP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw3700 (bglF)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw3992 (malG)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw3993 (malF)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw3995 (malK)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw4072 (proP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw4081 (melB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw4201 (mgtA)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2303 (hisP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2409 (ptsI)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2673 (srIB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2772 (fucP)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw2955 (pitB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)
<i>jw3372 (feoB)</i>	Keio collection	(Baba et al, 2006)

<i>jw3420 (livG)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw3422 (livH)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw3538 (xylF)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw3573 (mtlA)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw3628 (gltS)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw1887 (araH)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0406 (nusB)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw3425 (livJ)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw4248 (fecD)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0565 (pheP)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw2774 (fucK)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw2910 (galP)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw5560 (kdgT)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw5946 (gntr)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0334 (lacY)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw1807 (manY)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw2304 (hisM)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw5857 (rbsD)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw5859 (dgoT)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0740 (galK)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw1087 (ptsG)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0306 (betT)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0940 (ompA)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)
<i>jw0146 (fhuA)</i>	Keio collection	(Baba et al., 2006)

Repeticiones por triplicado de los ensayos de infección de los fagos λ y mEp021 en la cepa wild-type BW25113 y en las cepas mutantes, *srlB*-, *livG*-, y *ompA*-.

Cepas	Fago λ				Fago mEp021			
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
BW25113	+	+	+	1	+	+	+	1
JW2673 (<i>srlB</i>)	+	+	+	-	+	+	2	-
JW2673 (<i>srlB</i>)	+	+	+	1	+	+	-	-
JW2673 (<i>srlB</i>)	+	+	+	3	+	+	1	-

Cepas	Fago λ				Fago mEp021			
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
BW25113	+	+	+	2	+	+	+	1
JW3420 (<i>livG</i>)	+	+	+	1	+	+	-	-
JW3420 (<i>livG</i>)	+	+	+	2	+	+	-	-
JW3420 (<i>livG</i>)	+	+	+	1	+	+	8	-

Cepas	Fagoλ				Fago mEp021			
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
BW25113	+	+	+	+	+	+	+	+
JW0940 (<i>ompA</i>)	+	+	+	6	-	-	-	-
JW0940 (<i>ompA</i>)	+	+	+	+	-	-	-	-
JW0940 (<i>ompA</i>)	+	+	+	+	-	-	-	-