



CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

“El bacteriófago mEp021 y su control sobre el destino celular:
doble fenotipo de placa en la misma progenie”

Tesis

que presenta

Biólogo Celular Gerson Isaac Caraballo Hernández

Para obtener el Grado de

Maestría en Ciencias

En la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de la tesis
PhD Luis Y. Kameyama K.

CIUDAD DE MEXICO, MEXICO

Agosto, 2017

ASESORES

PhD Omar A Sepúlveda Robles.
Catedrático CONACYT
Laboratorio de Genética,
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

PhD Javier Hernández Sánchez.
Coordinador académico.
Departamento de Genética y Biología Molecular,
CINVESTAV-ZACATENCO

PhD Gabriel Guarneros Peña.
Profesor Emérito.
Departamento de Genética y Biología Molecular,
CINVESTAV-ZACATENCO

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN, en el laboratorio número 5 bajo la dirección del Doctor (PhD) Luis Yoshio Kameyama Kawabe.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría: número de registro *curriculum vitae* único 705045, número de registro de becario 597645, número de apoyo 433530. Así como con apoyo económico para gastos de instalación por el programa establecido entre la Organización de Estados Iberoamericanos para la Educación, la Ciencia y la Cultura (OEI), el Banco Santander y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Con todas las personas especiales que han hecho este proyecto tan interesante como divertido para mí, faltaran palabras y tiempo para expresar mi mayor agradecimiento. Con el riesgo de olvidar a algunos, mencionare solo una lista breve:

A mi amada esposa, gracias por ser mi cómplice... a mi hijo que es mi mayor estímulo para dar lo mejor de mí aunque las circunstancias fueran desfavorables... a mi hermosa familia, que me dieron el patrón a seguir, su amor y sus oraciones son mi mayor privilegio... a mis amigos que han estado conmigo a pesar de la distancia y ausencia: Juancho, Rosel, Dorylú, Álvaro, Charlie, Karla, Aida, Ulises, Noé, Fernando, Natie... a mis amigos que le dan fuerza a mis principios: Keyla, Giancarlo, Natalia, Moisés, Lucia y María-Lucia... a mis hermanos más cercanos Fermín, Jonathan, Jehú, Ezequiel, David, Ricardo y Richie... a mis profesores, gracias por su enseñanza y por su tiempo... a mis compañeras de laboratorio por aguantar mis impertinencias: Elissa Paulina, Guadalupe, Roxi, Carlos, Honorio y Rosi... también a Irais, Sandy, Marco C. y Marco M., Ricardo, José B... Gracias también al arduo trabajo y dedicación Raúl Montano (Biblioteca) de Guadalupe Aguilar (Secuenciación), Arturo (Cocina) y Gabriela Mora (Secretaría) porque hicieron mi estancia mucho más productiva...

Gracias en especial a mis asesores Dr. G. Guarneros, Dr. O. Sepúlveda, Dr. J. Hernández y Dra. E. Martínez-Peñañiel, he tratado de capturar sus consejos y dechado para hacer mi propio camino, gracias por ser un ejemplo a seguir.

Este trabajo no sería posible sin la mención del Dr. Luis Kameyama, estimado profesor, gracias por tomarme en cuenta, por su instrucción y por soportar mis inquietudes, Ud. es de las personas que hacen este mundo mejor.

Finalmente, este trabajo está dedicado a Jehová Dios, quien es mi única herencia constante, inamovible, creador del universo y de las leyes universales, quien se ha acordado de mí en mis momentos de angustia y por su bondad inmerecida me ha permitido seguir viviendo la vida que vale la pena vivir. Sin él no tendría ningún propósito, ningún futuro... A él vayan toda honra, la gloria y la fuerza y el poder para siempre jamás, amén.

INDICE

<u>INDICE</u>	i
<u>INDICE DE FIGURAS</u>	iii
<u>INDICE DE TABLAS</u>	v
<u>RESUMEN</u>	vi
<u>ABSTRACT</u>	vii
<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
<u>Bacteriófagos</u>	2
<u>Estrategias de explotación de hospederos</u>	5
<u>Interruptor genético viral para la decisión del destino celular</u>	6
<u>Inestabilidad genómica</u>	11
<u>Bacteriófago mEp021</u>	13
<u>JUSTIFICACIÓN</u>	18
<u>HIPÓTESIS</u>	19
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	19
<u>OBJETIVOS ESPECIFICOS</u>	19
<u>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARTE 1</u>	20
<u>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARTE 2</u>	21
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	22
<u>Crecimiento de bacterias y bacteriófagos</u>	22
<u>Propagación de bacteriófagos en cajas de cultivo.</u>	22
<u>Propagación de bacteriófagos en medio líquido.</u>	23
<u>Protocolo para titulación de bacteriófagos.</u>	23
<u>Protocolo para distinción de fenotipo de bacteriófagos.</u>	24
<u>Protocolo para pases de fagos de una sola placa.</u>	24
<u>Protocolo para extracción de DNA genómico de fago.</u>	25
<u>Protocolo experimental para preparación de células competentes.</u>	25
<u>Protocolo para transformación de células competentes.</u>	26
<u>Protocolo para extracción de DNA plasmídico.</u>	26
<u>Obtención y comprobación de lisógenas.</u>	27
<u>Producción de bacteriófagos en sobrenadante</u>	28
<u>Análisis de resistencia a la infección</u>	28
<u>Análisis <i>in silico</i>.</u>	28
<u>Reacción de Restricción.</u>	29
<u>Reacción de ligación.</u>	29
<u>Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa</u>	30
<u>Condiciones de PCR</u>	32
<u>Electroforesis de DNA</u>	32

<u>Secuenciación del producto de PCR.</u>	32
<u>RESULTADOS</u>	34
1. Comprobación del doble fenotipo de placa de mEp021	34
2. Obtención de <i>E. coli</i> W3110 lisógenas de mEp021	35
3. Análisis del patrón de restricción del genoma de una selección de bacteriófagos de mEp021	38
4. Análisis de estabilidad a distintas temperaturas de crecimiento	49
5. Análisis de estabilidad del fenotipo y obtención de nuevas lisógenas	51
6. Análisis de lisógenas del bacteriófago Lambda	53
7. Selección y caracterización de cepas mEp021 de fenotipo de placa clara	56
8. Evaluación de mEp021 en cepas <i>E. coli</i> de distinto contexto genético	59
9. Clonación de genes candidatos posiblemente relacionados al cambio de fase	62
10. Evaluación de las construcciones en pKQV4 del gen <i>rep</i> y <i>ant</i>	64
11. Evaluación de las construcciones en pKQV4 del gen <i>dam</i> y <i>dcm</i>	69
<u>DISCUSION</u>	71
<u>CONCLUSIONES</u>	78
<u>PERSPECTIVAS</u>	79
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	80
<u>ANEXOS</u>	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de ciclos de vida de bacteriófagos (A) lítico y (B) lisogénico.	6
Figura 2. Evolución de la virulencia en bacteriófago λ durante una epidemia.	9
Figura 3. Distribución de los grupos de la inmunidad de la colección de colifagos de Kameyama et al, (1999).	14
Figura 4. Estructura de mEp021.	16
Figura 5. Fenotipo hemolítico de <i>E. coli</i> MC4100 (hlyE+) con el profago mEp021.	17
Figura 6. Representación de la forma de seleccionar cepas a partir de una sola placa viral.	25
Figura 7. Goteo del bacteriófago mEp021 sobre un tapiz de la cepa <i>E. coli</i> W3110.	34
Figura 8. Fenotipo de cepas que dan placa turbia (A) y cepas que dan placa clara (B) de mEp021.	35
Figura 9. Gel de electroforesis de los productos de PCR del gen <i>rep</i> de las cepas <i>E. coli</i> W3110 candidatas de lisógenas de mEp021.	36
Figura 10. Titulación de cepas claras y turbias sobre la cepa <i>E. coli</i> W3110.	38
Figura 11. Electroforesis de DNA genómico de distintas cepas de mEp021 digerido con <i>Nde</i> I.	39
Figura 12. Mapa de restricción teórico del genoma de mEp021 con las enzimas <i>Nde</i> I y <i>B</i> l <p><i>l</i></p> .	41
Figura 13. Electroforesis de DNA genómico de distintas cepas de mEp021 digerido con <i>Nde</i> I o <i>B</i> l <p><i>l</i></p> .	41
Figura 14. Comparación de la secuencia correspondiente a la banda de 4934pb del genoma de mEp021 con la secuencia del profago FHI99	42
Figura 15. Mapa de restricción teórico de la doble digestión del genoma de mEp021 con las enzimas <i>Nde</i> I y <i>B</i> l <p><i>l</i></p> .	43
Figura 16. Electroforesis de DNA genómico de la doble digestión del genoma de mEp021 con las enzimas <i>Nde</i> I y <i>B</i> l <p><i>l</i></p> .	44
Figura 17. Esquema de localización del fragmento con posible eliminación de ~1 Kb en el genoma de mEp021.	45
Figura 18. Gel de proteínas estructurales de mEp021 de las cepas ϕ T1 y ϕ T2.	45
Figura 19. Análisis de comparación de la secuencia de la proteína estructural J de mEp021 con la base de datos de NCBI.	46
Figura 20. Análisis de la búsqueda de dominios funcionales de la proteína estructural J.	47
Figura 21. Representación esquemática de la estrategia de amplificación y secuenciación del gen de la proteína estructural J.	47
Figura 22. Electroforesis de la amplificación de los productos D, D1, D2, D3 y D4 de las cepas ϕ T1 y ϕ T2.	49
Figura 23. Alineamiento de la secuencia del fragmento D obtenida con el cebador JprotrV3 de las cepas ϕ T1 y ϕ T2.	49
Figura 24. Análisis de crecimiento y fenotipo de mEp021 a 32, 37 y 42°C.	50
Figura 25. Gráfica del análisis estadístico para comparar la proporción de claras versus turbias en lisógenas de W3110 para mEp021 y lambda	55
Figura 26. Fenotipo del goteo de las cepas de segunda generación de mEp021 sobre tapiz de <i>E. coli</i> W3110.	56

Figura 27. Alineación de las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen <i>ant</i> de las cepas ϕ^{2C} 1-4	57
Figura 28. Alineación de las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen <i>rep</i> de las cepas ϕ^{2C} 1-4	57
Figura 29. Alineación de las secuencias aminoacídicas obtenidas del gen <i>rep</i> de las cepas ϕ^{2C} 1-4	58
Figura 30. Gel de electroforesis para comprobación de las construcciones en el vector pKQV4.	64
Figura 31. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa <i>E. coli</i> DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-REP e incubadas a 32, 37 y 42°C.	65
Figura 32. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa <i>E. coli</i> DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-ANT.	67
Figura 33. Alineación de las secuencias del vector pKQV4 con las clonaciones de los genes <i>rep</i> , <i>dam</i> , <i>dcm1</i> , y <i>ant</i> respectivamente.	67
Figura 34. Esquema del arreglo del genoma de mEp021 cerca del gen <i>ant</i> .	68
Figura 35. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa <i>E. coli</i> DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-ANT2 y pKQV4-ANT-5X.	69
Figura 36. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa <i>E. coli</i> DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-DAM y pKQV4-DCM.	70
Figura 37. Modelo de regulación del interruptor molecular de mEp021.	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores y condiciones de amplificación.	31
Tabla 2. Contabilización del número de placas turbias y claras provenientes del sobrenadante de lisógenas W3110 [mEp021] de 24 horas.	37
Tabla 3. Ubicación de los cebadores y tamaños esperados de la amplificación y secuenciación del extremo C terminal del gen que codifica la proteína estructural J de fibra de la cola de mEp021	47
Tabla 4. Contabilización de placas para la caracterización de fenotipo de fagos turbios en pase sucesivos.	52
Tabla 5. Contabilización de placas para la caracterización del fenotipo de progenie de lisógenas W3110 [mEp021] de segunda generación (LSG ²).	53
Tabla 6. Contabilización de placas para la caracterización del fenotipo de progenie de lisógenas W3110[Lambda].	54
Tabla 7. Valores referenciales de placas claras versus turbias para 6 cepas E coli W3110 lisógenas para lambda y mEp021.	55
Tabla 8. Cepas de <i>E. coli</i> con distinto contexto genético para la evaluación de fenotipo de placa de mEp021.	60
Tabla 9. Caracterización del gen <i>rep</i> y <i>J</i> de cepas claras y turbias seleccionadas de lisógenas <i>E. coli</i> [mEp021] con distinto contexto genético.	62
Tabla 10. Descripción de genes clonados y las construcciones y tamaños esperados en el vector pKQV4. nt = nucleótidos.	65

RESUMEN

En este proyecto se estudió la biología molecular del doble fenotipo de placa (turbia y clara) producido por el bacteriófago mEp021 y ciertos aspectos de su fisiología. Para entender esta característica intrínseca de mEp021, se evaluó si el fenómeno está relacionado a un interruptor genético que le permite decidir el destino celular en las formas líticas y lisogénica. En los análisis realizados, se encontró que mEp021 produce un fenotipo variable de placa, turbio o claro, con una tasa promedio de 0,5% (claro vs turbio) cuando se caracteriza la progenie de una célula *E. coli* W3110 lisógena. La aparición de estas placas claras se comparó con otras cepas de *E. coli* con distinto contexto genético, así como con el bacteriófago lambda y los resultados sugieren que el fenómeno es intrínseco de mEp021. Como parte de la caracterización del interruptor molecular de mEp021 fueron clonados en el vector pKQV4 los genes *ant*, *rep*, *dam* y *dcm1* y el operón del antirepresor (5 ORFs). Se encontró que los genes *rep* y *ant* inhiben la infección de mEp021, aunque la construcción con el operón de anti-represión incrementa la virulencia de mEp021 y al parecer también la del bacteriófago lambda. La causa del fenotipo claro en cepas aisladas de mEp021 son consecuencia de mutaciones encontradas en la región codificante del gen *rep* (una mutación no sinónima, una eliminación de 11pb y la eliminación de 120pb en 2 aislados). La variabilidad genética de mEp021 no parece ser exclusiva del gen *rep*, ya que se identificó la pérdida de material genético en el gen de la proteína estructural J (sin aparente significancia fenotípica). Las eliminaciones nucleotídicas del gen represor y del gen de la proteína estructural J están flanqueadas por repetidos directos de 12 y 35 pb respectivamente, lo que sugiere la función de posibles recombinasas sitio-específicas. Los hallazgos de este trabajo resaltan la necesidad de la identificación y caracterización de los procesos moleculares que median la variación del genoma de mEp021.

SUMMARY

In this project we investigated the molecular biology of the double plaque phenotype (clear and turbid) produced by the bacteriophage mEp021 and some aspects of its physiology. To understand this intrinsic characteristic of mEp021, it has been evaluated if this phenomenon is related to a genetic switch that allows to choose the destination of cellular fate in lytic and lysogenic forms. As results, mEp021 was found to produce a variable, turbid or clear plaque phenotype with an average rate of 0.5% (clear vs. turbid) when the progeny of a lysogenic *E. coli* W3110 are characterized. The appearance of these clear plaques was compared with other strains of *E. coli* with different genetic context as well as with bacteriophage lambda and the results suggest that the phenomenon is intrinsic to mEp021. As part of the molecular switch characterization of mEp021, the *ant*, *rep*, *dam* and *dcm1* genes and the antirepressor operon (5 ORFs) were cloned into the vector pKQV4. It was found that gene products of *rep* and *ant* inhibit mEp021 infection, although construction with the anti-repression operon increases the virulence of mEp021 and also of the bacteriophage lambda. The cause of the clear phenotype in strains isolated from mEp021 resulted from mutations found in the coding region of the *rep* gene (a punctual mutation, a deletion of 11bp and other deletion of 120bp.) The genetic variability of mEp021 does not appear to be exclusive of the *rep* gene, since the loss of genetic material in the structural protein J gene (without significant phenotypic significance) was also identified. Deletions of the gene *rep* and *J* may be product of site-specific recombination because they are flanked by direct repeats of 12 and 35 bp respectively. The findings of this work highlight the need for the identification and characterization of the molecular processes that mediate the genome variation of mEp021.

INTRODUCCION

Desde el punto de vista biológico, los virus pueden ser definidos como parásitos intracelulares obligatorios, auto-replicantes, sin metabolismo inherente. Esto significa que son bioquímicamente inertes en el entorno extracelular, donde se encuentran en forma de partículas que contienen un ácido nucleico (ARN o ADN) que codifica la información necesaria para su replicación y multiplicación ([Domingo-Calap et al, 2016](#)).

Los virus utilizan las mismas macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, que los organismos celulares para la expresión y replicación de la información genética. En cuanto a sus genomas, los virus son las únicas entidades que pueden contener genomas de ARN o ADN, en una gran complejidad de conformación, tamaño y diversidad. El ciclo replicativo de los virus consta de dos fases características: una fase extracelular, donde el genoma viral permanece inactivo dentro de una partícula viral (virión) hasta que encuentra una célula susceptible a la infección; y una fase intracelular, en la que el genoma viral puede permanecer temporalmente en quiescencia (como un cromosoma libre o integrado en el cromosoma celular) o ser expresado y replicado activamente en la célula infectada. Al salir de la quiescencia, estos procesos acoplados conducen a la producción de viriones infecciosos o partículas virales maduras, que sirven como vehículos para la difusión de los genomas virales. En los viriones, el genoma viral está encerrado dentro de una capa de proteína, que pueden diferir en complejidad entre los virus, algunos de ellos pueden estar rodeados por una envoltura lipídica y otros pueden estar decorados con polisacáridos ([Hulo de Castro et al, 2011](#), [Forterre, 2016](#)).

La naturaleza y definición de virus, especialmente su estado "vivo", han sido objeto de intensos debates entre los biólogos durante décadas. En un reciente trabajo de Forterre ([Forterre, 2016](#)) se discute por qué estos debates se han agudizado y en parte es por estas tres importantes evidencias:

- En primer lugar, en términos de diversidad y cantidad, se ha demostrado que las partículas virales superan en número a las células en uno o dos órdenes de magnitud y que los genes virales son mucho más numerosos que los genes celulares ([Kristensen et al, 2010](#); [Suttle, 2013](#)). A su vez, los genes virales también se integran y modifican de forma masiva a los genomas celulares, lo cual influye en gran medida a la evolución celular ([Forterre y Prangishvili, 2013](#)).
- En segundo lugar, la distinción clara entre virus que infectan a células procariotas y eucariotas se ha enriquecido por el descubrimiento de los virus que infectan a las células relacionadas a las arqueas, es decir que existen virus que se asocian a los tres dominios de la vida, bacterias, arqueas y eucariotas ([Abrescia et al, 2012](#)).
- Por último, la visión tradicional de los virus como entidades submicroscópicas ha sido cuestionada por el descubrimiento de virus gigantes al infectar a las amebas, tales como los Mimivirus y Pandoravirus ([Philippe et al., 2013](#); [Raoult et al., 2004](#); [Claverie & Abergel, 2016](#)).

Bacteriófagos

Los virus de procariotas, bacteriófagos, han transformado la opinión de los microbiólogos de ser simplemente *modelos experimentales convenientes* a ser un componente importante de la biosfera ([Krupovic et](#)

al, 2011). Los bacteriófagos son los líderes mundiales de la diversidad, constituyen la mayoría de los “organismos” en el planeta, juegan un importante papel en los ecosistemas, ejercen y son tal vez la fuerza evolutiva más dominante de sus hospederos, ya que han estado haciendo esto miles de millones de años, posiblemente durante el mismo tiempo en que se han producido las células (Krupovic et al, 2011).

El cambio en como entendemos ahora la influencia de los bacteriófagos en los distintos ecosistemas, probablemente se deba a los siguientes avances:

1. El tamaño de las poblaciones de estos virus es sorprendentemente grande. Una estimación sobre la base de estas mediciones es que hay tantos viriones de cola en la biosfera global que se podría alcanzar una distancia de 200 millones de años luz si se colocaran uno tras otro (Hendrix, 2002; Suttle, 2007). Números como éstos inciden profundamente en las formas en que nos imaginamos la dinámica de poblaciones virales y el papel que juegan en la ecología mundial. Por otra parte, en estos valores no se incluyen otros numerosos grupos de virus bacterianos (no caudovirales) y arqueas o incluso a los genomas virales que se encuentran en la mayoría de las células procariotas como provirus (Krupovic et al, 2011).
2. Los avances en la tecnología de la secuenciación masiva de ADN han dado lugar a mejoras dramáticas en la forma de comprender la estructura genética de las poblaciones virales, sus mecanismos de evolución y diversidad. La mayoría de las secuencias de genes y de proteínas recién determinados no tienen secuencias con homología detectables en las bases

de datos de las secuencias públicas. A su vez, el análisis de los datos de metagenómica, proporciona una fuerte evidencia de que existe una mayor diversidad genética en los genes de los virus de procariotas considerando cualquier compartimento de la biosfera ([Krupovic et al, 2011](#)).

3. Facilitado por los avances conceptuales y técnicos, han florecido los estudios de los virus bacterianos y arqueas como componentes importantes de la biología global. Estos virus a su vez son actores importantes en el ciclo de carbono y de energía en los océanos y otros entornos naturales y son los principales agentes en la ecología y la evolución de sus hospederos celulares ([Canchaya, et al, 2004](#); [Danovaro, et al. 2011](#); [Rohwer & Thurber, 2009](#)).
4. El aislamiento y la caracterización de nuevos virus se ha acelerado especialmente para los virus de arqueas, donde el descubrimiento de nuevos virus y de nuevos tipos había quedado atrás del descubrimiento de bacteriófagos. Para los bacteriófagos, el aislamiento de los virus recién descubiertos ha ayudado a mejorar la cobertura de información; sin embargo, sigue siendo extremadamente escasa en la diversidad de secuencias, la estrecha gama filogenética de hospederos y naturalmente en las complejas redes de interacción y regulación ([Krupovic et al, 2011](#)).
5. La determinación de estructuras de alta resolución para proteínas de la cápside y otras proteínas del virión, junto con la información de los mecanismos de ensamblaje del virión, han permitido sorprendentes inferencias acerca de y sus proteínas en la divergencia, hasta el punto de que ya no son detectable los rastros ancestrales. Sin embargo, esto ha

abierto posibilidades para su estudio, ya que antes no estaban disponibles para la comprensión de la historia temprana de los virus ([Bamford et al, 2005](#)).

Estrategias de explotación de hospederos

Algunos patógenos explotan a su hospedero durante un período de tiempo limitado. Por ejemplo, en los vertebrados, la duración de la infección viral está generalmente limitada por la acción de la inmunidad del hospedero, aunque también puede producirse la muerte del hospedero infectado. Por el contrario, otros patógenos pueden permanecer en su huésped durante mucho tiempo en un estado latente. Por lo tanto, la latencia puede garantizar la persistencia en el curso de la vida de la infección ([Gandon, 2016](#)). Sin embargo, la adopción de un ciclo de vida latente es una característica específica y compleja que requiere de factores del hospedador y del virus.

Los bacteriófagos, pueden adoptar estrategias muy diferentes en sus procesos de infección. Se extienden generalmente de acuerdo a su ciclo de vida, a estado lítico y a estado lisogénico ([Figura 1](#)), aunque en ambos casos la infección comienza con la adsorción de una partícula de virus libre por una bacteria susceptible ([Gandon, 2016](#)). El ciclo de vida lítico (como el de los colífagos T) en forma enunciada, se caracteriza por la adsorción bacteriana, inyección del genoma, la replicación del genoma del fago, la síntesis de nuevas partículas virales, y la lisis bacteriana. La lisogenia fue descubierta por Bail y Bordet hace 90 años ([Lwoff, 1953](#)). Se caracteriza por la integración del genoma del virus como un profago en el genoma bacteriano y la persistencia indefinida de la infección ([Gandon, 2016](#)). En fagos temperados, además del ciclo lítico,

el ciclo de vida es lisogénico también (como el del bacteriófago λ), la infección puede dar lugar a la integración del profago en el genoma bacteriano (con probabilidad Φ) o bien a la lisis (con probabilidad $1 - \Phi$). A su vez, el profago bien puede transmitirse verticalmente con la replicación de la bacteria lisogénica o reactivar la lisis (con una tasa α) y liberar partículas libres de virus (Gandon, 2016). Las bacterias que llevan profago son inmunes a la infección lítica por otros fagos libres de dicha especie y adicionalmente, pueden ser inducidas o pasar al ciclo lítico a una tasa α distinta, dependiendo de condiciones específicas (Stewart & Levin, 1984).

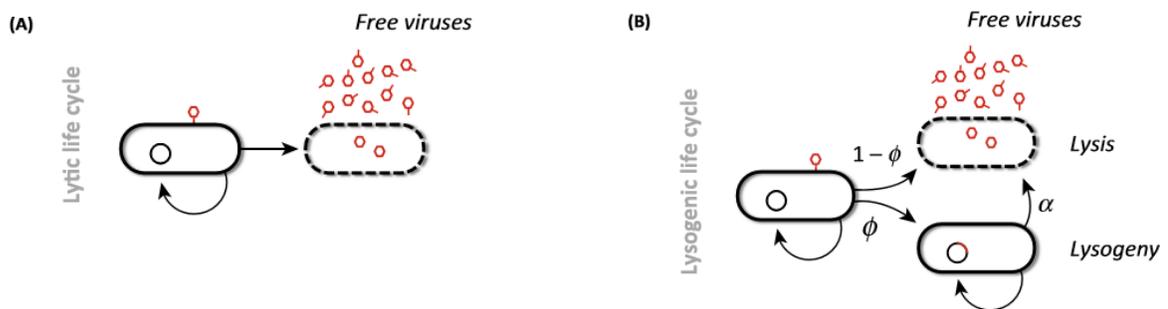


Figura 1. Representación esquemática de ciclos de vida de bacteriófagos A) lítico y (B) lisogénico. (tomado de Gandon, 2016).

Interruptor genético viral para la decisión del destino celular

Dado que los bacteriófagos y sus hospederos son ubicuos y abundantes en todos los nichos estudiados hasta ahora en el planeta (Davies et al, 2016; Roux et al, 2015), el estudio de los mecanismos por los cuales los fagos temperados pueden lisogenizar y/o lisar a sus hospedadores ha resultado de gran interés en las últimas décadas (Mittler, 1996).

En el caso del bacteriófago λ , probablemente el bacteriófago más estudiado, los mecanismos de la decisión lisis-lisogenia se comprenden muy bien, así como sus genes específicos, las moléculas de interacción, los sitios de unión, etc. Esta maquinaria ha sido comparada con un interruptor genético que determina si un fago lisa a la célula o forma una lisógena relativamente estable (Dove, 1971; Ptashne, 1992).

La inducción del profago lambda de una lisógena, también se produce de una manera similar a un interruptor. Una vez que las condiciones internas hacen que la densidad de dímeros del represor de lambda (CI) disminuya, el fago inicia una serie irreversible de pasos que conducen a la lisis del huésped (Mittler, 1996).

Existen mecanismos equivalentes en otros fagos temperados, tales como P1 (Yarmolinsky y Sternberg, 1988) y Mu (Howe y Bade, 1975). Pero, a pesar del gran aumento en la información de las bases moleculares, para la toma de decisión lisis-lisogenia, el progreso que se ha alcanzado es relativamente poco en lo referente al desarrollo de los desafíos ambientales y poblacionales que enfrentan los fagos. El destino de un fago temperado que existe como profago puede reducirse a dos parámetros: la tasa de la inducción y la probabilidad de continuar como profago. Las bajas tasas de inducción espontánea que se observan en la mayoría de los fagos temperados reportados son presumiblemente ventajosas en un entorno donde se presentan pocas células sensibles. Si hay más células sensibles a la infección, los profagos de las bacterias lisógenas que tienen tasas de inducción más altas pueden ser favorecidos. Del mismo modo, las bajas probabilidades de lisogenia presumiblemente permiten al fago infectar nuevas células cuando la

densidad de las células sensibles es alta, pero puede imponer un costo cuando la densidad de las células sensibles es baja (Mittler, 1996).

Una placa viral es una estructura circular visible formada dentro de un cultivo homogéneo de células, tal como los observados en cultivos bacterianos crecidos en un medio semisólido con nutrientes. Los virus de bacterias o bacteriófagos se replican y se dispersan generando regiones de destrucción de células, conocidas comúnmente como *placas*. La aparición de la placa depende de la cepa hospedera, del virus y de las condiciones de infección. Cepas altamente virulentas o líticas dan *placas claras* mientras que las cepas que sólo matan a una fracción de sus hospedadores (debido a la resistencia o lisogenia parcial) dan *placas turbias*. También, algunos fagos “parcialmente temperados” dan placas con manchas o anillos de crecimiento en el medio de las regiones claras de lisis completa. Por lo tanto, podemos decir que la adopción de un ciclo de vida latente es una característica específica que requiere de adaptaciones puntuales de los virus. Estas adaptaciones permiten al virus decidir cuando deberían adoptar las estrategias de vida latente, y cuándo deberán reactivarse para llegar a otro hospedador (Gandon, 2016).

En el caso del bacteriófago λ , los niveles de expresión de CI en relación a los de Cro controlan el interruptor genético, lo que permite a λ decidir su destino (lisogenia o lisis). Así, células genéticamente idénticas infectadas con el mismo virus pueden dar lugar a resultados distintos; esta variabilidad binomial puede ser explicada por el ruido bioquímico espontáneo durante el desarrollo de la infección. Sin embargo, este hecho no implica que el destino celular sea exclusivamente estocástico (Berngruber et al, 2015; Figura 2):

- En primer lugar, se sabe que varias mutaciones pueden alterar la propensión a la lisogenización. Por ejemplo, la mutante cI857 (termosensible) del represor CI disminuye la probabilidad de lisogenia, Φ , y aumenta la tasa de inducción, α .
- En segundo lugar, se conocen varios factores ambientales que afectan la lisogenización y la inducción. El fago λ temperado de tipo silvestre tiene una alta tasa de lisogenización ($\Phi \sim 0,5$) y una tasa de inducción de baja ($\alpha \sim 10^{-4}$). En contraste, el fago λ cI857 es un mutante termosensible con una baja tasa lisogenización ($\Phi < 0,1$) y una tasa de inducción de alta ($\alpha > 10^{-3}$).

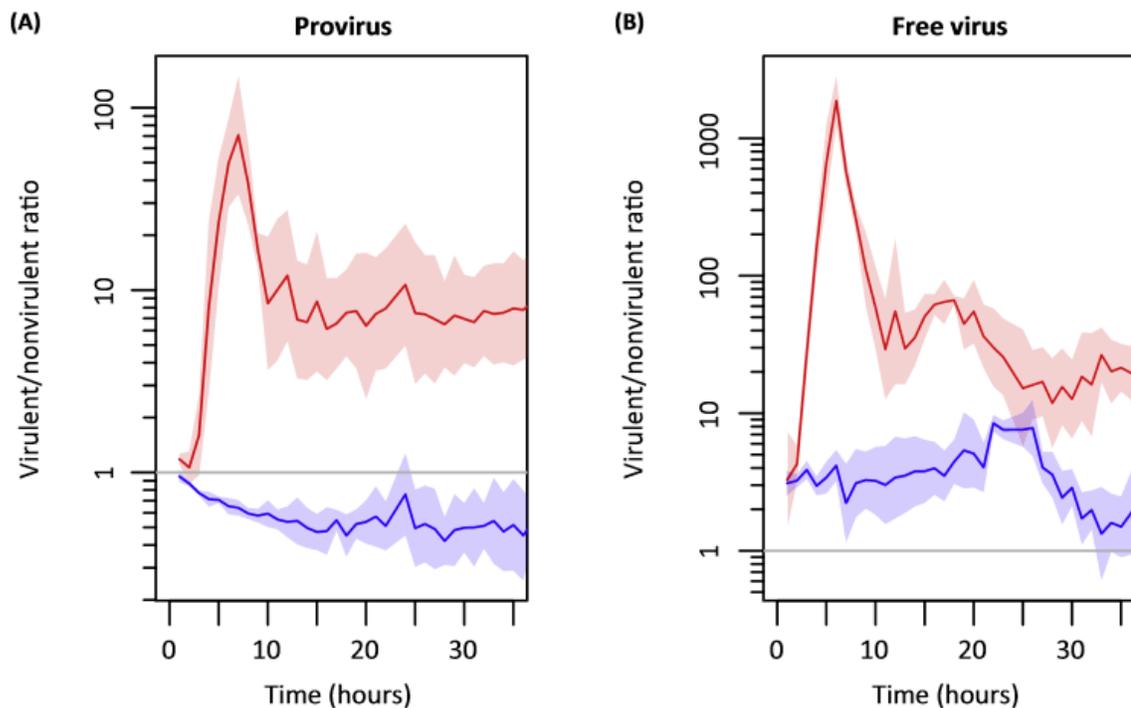


Figura 2. Evolución de la virulencia en bacteriófago λ durante una epidemia. (A) Cambio en la relación virulento/ no virulento en la etapa de profago. (B) Cambio en la relación virulento/no virulento en la fase libre de virus. El valor inicial de la relación virulento/no virulenta (λ cI857 / λ) en el profago fue de 1: 1, y la competencia se inició a partir de dos diferentes valores iniciales de prevalencia: 1 % (rojo) y 100 % (azul). Las líneas indican la media sobre cuatro replicas, y también se muestran los intervalos de confianza del 95% de los datos transformados logarítmicamente. (tomado de Gandon, 2016).

El bacteriófago λ puede presentar estrategias de vida con gran plasticidad. La eficacia de lisogenización y la tasa de inducción del profago pueden variar también con cambios en el medio ambiente. Estas estrategias condicionales son bien conocidas a nivel molecular, pero su naturaleza adaptativa de esta plasticidad a menudo se pasa por alto. Dos aproximaciones relacionadas con el beneficio fisiológico de lisogenización de λ pueden resumirse de la siguiente manera (Gandon 2016):

Escape ante un ambiente desfavorable: Uno de los ejemplos más estudiados de plasticidad, es el efecto del estrés sobre la tasa de inducción (α) del profago λ . Cada vez que una lisógena sufre daño en el ADN, debido a la irradiación UV u otro estrés químico, se activa la proteína RecA. RecA está implicada en la inactivación por clivaje del represor LexA y en la activación de la respuesta SOS y de diferentes mecanismos de reparación del ADN. Similarmente, RecA también está implicado en la inactivación por clivaje del represor CI y por lo tanto en la puesta en marcha del ciclo lítico de λ (Gandon 2016).

Lisogenización o no en un entorno variable: La probabilidad para lisogenizar (Φ), es otro rasgo del ciclo de vida de λ que se modula por variaciones en el medio ambiente. En particular, esta probabilidad aumenta cuando el número de partículas de virus es mayor que las células hospedadoras disponibles. El hecho de que varios virus traten de entrar o entren en la misma célula indica que muy pocos hospedadores están disponibles y en este caso, puede ser ventajoso para el mantenimiento del hospedador. La lisogenización puede ser, por lo tanto, una manera de permanecer en el hospedador y evitar los peligros de la etapa de vida libre del virus. Pero otras señales también modulan la lisogenización: en particular, la escasez de nutrientes, que se sabe que

aumenta la probabilidad de lisogenización. La inanición es un buen indicador del estado del medio ambiente de la población porque señala que puede existir muy poco crecimiento bacteriano. Así en un entorno donde la disponibilidad de nutrientes varía, será mejor para el virus permanecer en las células infectadas (lisogenización) y durante una posible “hambruna” evitar los riesgos asociados con el estado de vida libre ([Gandon 2016](#)).

Inestabilidad genómica

Los genomas bacterianos son notablemente estables desde una generación a la siguiente, pero aun así, conservan cierta plasticidad en escalas de tiempo evolutivo. La variación en el genoma bacteriano está definida por la aparición de mutaciones, por la transferencia horizontal de genes, rearrreglos genómicos, y la actividad de los elementos móviles de ADN. Esto implica la existencia de un delicado equilibrio entre el mantenimiento de la estabilidad del genoma y la tolerancia de la inestabilidad dada por los cambios mencionados ([Darmon & Leach, 2014](#)). Como los bacteriófagos dependen de la maquinaria molecular de la bacteria podemos decir que son susceptibles igualmente al mantenimiento y equilibrio en la estabilidad del genoma bacteriano así como del suyo propio. De hecho, la notable capacidad de algunos virus para adaptarse a nuevos hospedadores y entornos, es altamente dependiente de su capacidad para generar diversidad *de novo* y en un corto período de tiempo ([Sanjuán & Calap, 2016](#)).

Las tasas de mutación espontánea de los virus varían ampliamente. Por ejemplo, los virus de ARN mutan más rápido que los virus de ADN, si son de una sola hebra mutan más rápido que el virus de doble hebra, y

adicionalmente el tamaño del genoma parece correlacionarse negativamente con la tasa de mutación ([Sanjuán & Calap, 2016](#)).

Ahora bien, las tasas de mutación viral son moduladas a diferentes niveles, incluyendo la fidelidad de la polimerasa, complejidad intrínseca de la secuencia, estructura secundaria, microambiente celular, mecanismos de replicación, factores de corrección y sistemas de reparación. Adicionalmente, algunos virus pueden introducir cantidades masivas de mutaciones por contener factores que modifican el ADN o afectan la función de proteínas reparadoras. La diversidad genética viral está determinada por múltiples procesos dependientes del huésped, y que las tasas de mutación evolucionan en respuesta a presiones selectivas específicas ([Sanjuán & Calap, 2016](#)).

Algunas de estas presiones selectivas podrían afectar la forma de explotación de la cepa hospedero, o el intercambio entre ciclos replicativos diferentes. Por ejemplo, en 1991 se reportó por Shieh et al, la aparición de mutantes que generaban un fenotipo de placa claras (Cf1c) aislados del fago filamentoso temperado Cf1t, con una frecuencia de aproximadamente 10^{-3} . La secuenciación nucleotídica de aislados de Cf1c reveló mutaciones puntuales y una eliminación que se situaban en la región río arriba de un marco de lectura (ORFII) que podría codificar una proteína de 18,2 kDa. Sus observaciones sugieren que el ORFII puede participar en la formación de placas turbias. Sin embargo, para el momento de este estudio, el ORFII no mostró homología significativa con las secuencias de otras proteínas de fagos conocidos ([Shieh et al 1991](#)).

Por otra parte, Kim & Ryu ([Kim & Ryu, 2013](#)) informaron de un sistema antirepresión asociado con un interruptor genético en el fago temperado SPC32H (Podoviridae). La aparición de placas claras en estos fagos puede

explicarse por una sola mutación en la secuencia del sitio de unión para el represor bacteriano LexA, que se solapa con el promotor antirepresor. Entonces, la mutación conlleva la síntesis constitutiva del antirepresor y por consiguiente SPC32N entra en el ciclo lítico (Kim & Ryu, 2013).

Bacteriófago mEp021

Kameyama y colaboradores (Kameyama et al, 1999) reportaron una colección de colifagos temperados aislados a partir de muestras fecales humanas frescas. Uno de los objetivos en que encauzaron sus estudios en esta colección fue la identificación de fagos lambdoides, los cuales requieren de la actividad de anti-terminación de la transcripción para crecer. Por tanto, los putativos fagos lambdoides fueron seleccionados por la facultad de crecer en las bacterias Nus+, pero no en Nus-. Aproximadamente 100 lisógenas independientes (de fagos Nus-dependientes) se construyeron en la cepa silvestre *E. coli* W3110 y se les realizó ensayos cruzados de superinfección con los fagos del mismo grupo. Dichos fagos Nus-dependientes se clasificaron en 20 grupos de inmunidad relacionada al represor (Figura 3, Kameyama et al, 1999 y 2001).

El grupo de inmunidad más grande incluyó 50 miembros, o sea, más de la mitad de la colección de fagos. El genoma de los fagos de este grupo no hibridó con las sondas de ADN de lambda y tampoco fueron reconocidos por anticuerpos acoplados a perlas anti- λ . Adicionalmente, La mayoría de ellos no son inducidos con luz ultravioleta, varios no se desarrollan a 32 °C, y no se obtuvieron recombinantes cuando se cruzaron ya sea con λ o λ BLK20. En consecuencia, este grupo de fagos Nus-dependientes representó una nueva familia de fagos denominándola en forma particular *no lambdoide* (Kameyama et al, 1999 y 2001).



Figura 3. Distribución de los grupos de la inmunidad de la colección de colífagos de Kameyama et al, (1999). Fueron construidas las lisógenas, de los fagos Nus-dependientes aisladas originalmente. Sobre estas, los autores probaron 95 fagos diferentes. Los fagos que representan el mismo grupo de la inmunidad fueron identificados por la exclusión sobre la superinfección. (editado de Kameyama et al, 1999).

El ADN de varios fagos correspondientes a los distintos grupos de inmunidad se restringieron con la enzima *HindIII* y resultó en diferentes patrones de restricción indicando que son diferentes genomas, pero algunos fagos tomados al azar del grupo de inmunidad I (no lambdaoide) no fueron digeridos por esta enzima.

El colífago temperado mEp021, pertenece al grupo de inmunidad I, no fue restringido por las enzimas *BglI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacII*, *Sall*, *SphI* y *XhoI*. Sin embargo, en el momento en que se obtuvieron estos resultados (Kameyama et al, 2001) no existía información sobre la secuencia de genoma de mEp021, y se argumentó que la resistencia a estas enzimas podría ser debido a la ausencia de cada uno de los sitios de restricción o por posible modificación de los nucleótidos en sus sitios de

reconocimiento de la enzima. Hoy en día, 53.887 nucleótidos de mEp021 se han secuenciado y las anotaciones correspondientes están por ser publicadas. De esta secuencia se ha inferido que el genoma de mEp021 de hecho contiene sitios de restricción para *EcoRI* (2), *KpnI* (2), *PstI* (1), lo que sugiere que estos sitios podrían estar modificados.

El fago mEp021 pertenece a la orden Caudovirales (Figura 4a), a la familia Siphoviridae (no envueltos, con cola no contráctil, larga y flexible, con ADN de doble cadena lineal). Las partículas virales de mEp021 muestran una cola de aproximadamente 150 nm y una cápside icosaédrica con un diámetro de 60 nm aproximadamente. Por análisis de electroforesis de las proteínas estructurales principales de mEp021 (Figura 4b), se pueden distinguir al menos cinco, y dos de ellas parecen ser los componentes principales (peso molecular de ~40 kDa y ~16 kDa, flechas azules en la Figura 5).

Una característica atractiva para el estudio de este grupo de fagos es que un 20% (10 de 50) de células lisógenas tiene la capacidad de inducir un fenotipo hemolítico en su huésped *E. coli* K-12 (Kameyama et al, 1999 y 2001). De hecho, se ha demostrado que la expresión de la ORF 4.3 de mEp021, ahora reportado como Inductor de Efectos Pleiotrópicos (IPE), tiene la facultad de producir el fenotipo hemolítico en una cepa con el gen nativo *hlyE* (que codifica para una hemolisina), pero no en la cepas mutante *hlyE*⁻, lo que indica que el efecto de IPE es indirecto, es decir, permite que HlyE salga al espacio extracelular y lise los eritrocitos (Figura 5, Martínez- Peñafiel et al, 2012). Como fue referido, la sobreexpresión de IPE genera varios efectos pleiotrópicos, tales como: la inhibición del crecimiento y la desregulación de la división, alteración de la membrana

celular, producción de vesículas que sugieren que contienen HlyE, y, finalmente, la muerte celular (Martínez- Peñafiel et al, 2012).

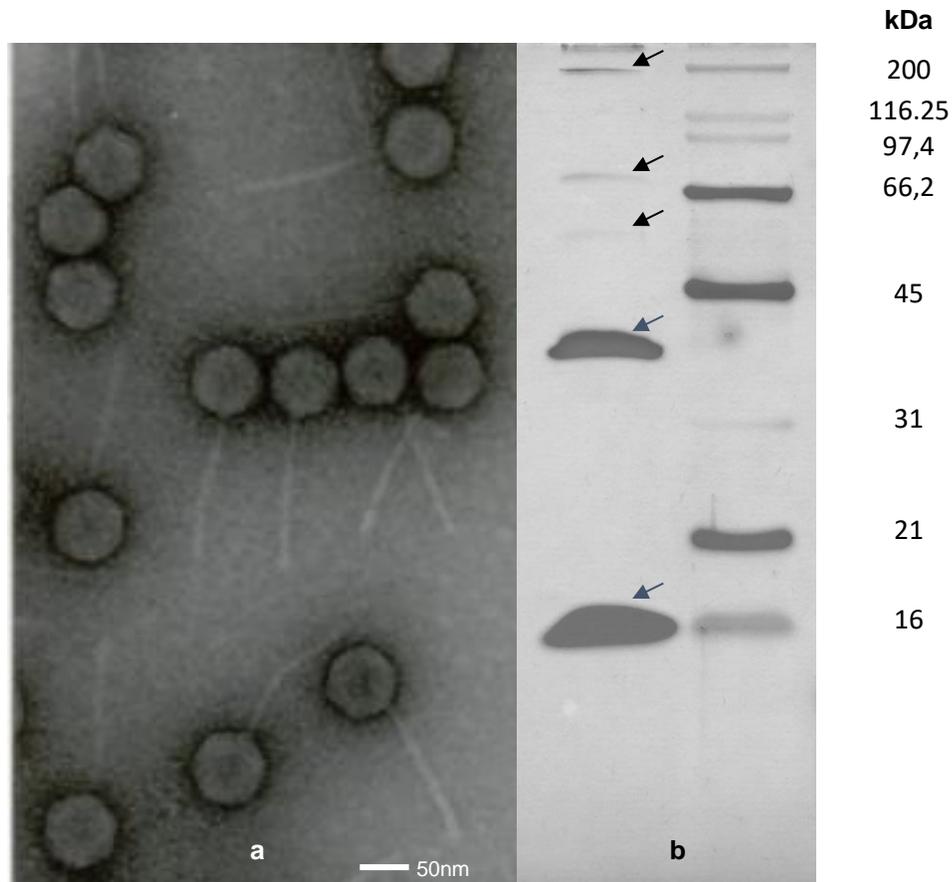


Figura 4. Estructura de mEp021. **a.** Microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago mEp021 (tinción negativa con acetato de uranilo). **b.** electroforesis de proteínas estructurales de mEp021 en gel de Tricina-SDS (teñido con plata). kDa = kilo Daltons. (realizado por los Doctores Omar Sepúlveda y Eva Martínez-Peñafiel, resultados no publicados)

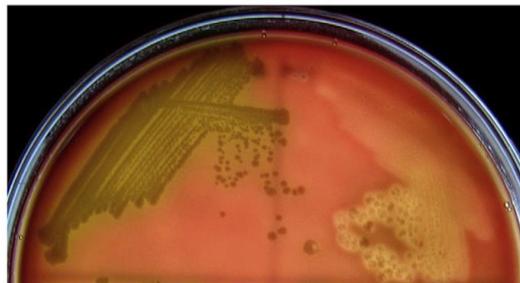


Figura 5. Fenotipo hemolítico de *E. coli* MC4100 (hlyE+) con el profago mEp021. A la izquierda, la cepa CFP201 (hlyE-) con el profago mEp021 donde no se evidencia hemólisis. A la derecha, la cepa lisógena MC4100 (hlyE+), que contiene el profago mEp021, y muestra el fenotipo hemolítico.

Un estudio sobre el represor de mEp021, fago temperado, fue desarrollado por la MSc. Leonor Lastra Vargas (2013, resultados no publicados) y consistió en encontrar el factor responsable del mantenimiento del estado lisógeno, la proteína represora. Utilizando la mutagénesis química y la complementación, y con un abordaje bioinformático inicial, encontró que la mayoría de los mutantes con fenotipo de placa clara, estaban afectados en el mismo gen: una proteína de 215 aminoácidos derivado del ORF 17 con dominio hélice-giro-hélice (HTH) tipo 3, un dominio peptidasa, y un dominio de hebras β , todos los cuales son característicos de los represores de fagos ya reportados. En 12 de ellos se encontró un único cambio nucleotídico que genera, ya sea un cambio de aminoácido o bien una señal de terminación en el represor putativo; específicamente, los cambios se encontraron en los dominios HTH y de dimerización, lo que permitió llegar a la conclusión de que el ORF 17 es el gen represor de fago, y su proteína podría estar actuando en el proceso de lisogenización (Leonor Lastra, 2013).

Además de los resultados obtenidos por Leonor Vargas Lastra, una observación interesante fue que mEp021 puede generar espontáneamente un doble fenotipo de placa. Esto es, puede mostrar placas claras, así como placas turbias en el mismo tapiz de células inoculada con una alícuota apropiada de virus.

JUSTIFICACIÓN

El fenotipo de placa de un determinado virus, puede aportar información relacionada con la virulencia, a estrategias de explotación del hospedero, adaptaciones a microambientes e incluso al condicionamiento del destino celular. Esto se puede asociar a la existencia y control de un interruptor molecular.

A nivel molecular, se ha reportado complejos sistemas de regulación de interruptores en fagos prototipos como λ , P22, A2, tp901, 186 y otros. Cada uno presenta sofisticados mecanismos para aprovechar el máximo beneficio de sus hospedadores, que incluyen al menos tres protagonistas principales: las proteínas represoras, las anti-represoras, y los elementos genéticos reguladores (promotores y regiones operadoras).

La clasificación funcional de los virus está basada en la evidencia del ciclo de vida de los virus, por lo que la mayoría de ellos se pueden incluir en ciclos de vida estándar como lítico y lisogénico. Pero con estas consideraciones, resulta complejo analizar el desarrollo del ciclo de vida de mEp021, debido a la aparición de un doble fenotipos de placas: claras y turbias.

Por tanto, nos hemos propuesto entender esta característica intrínseca de mEp021, y estudiar si está relacionado a un interruptor genético que le permite decidir el destino celular en las formas lítica y lisogénica.

HIPÓTESIS

La transición de fase del fenotipo de placa turbia a placa clara en mEp021 es consecuencia de la alteración de la actividad del represor.

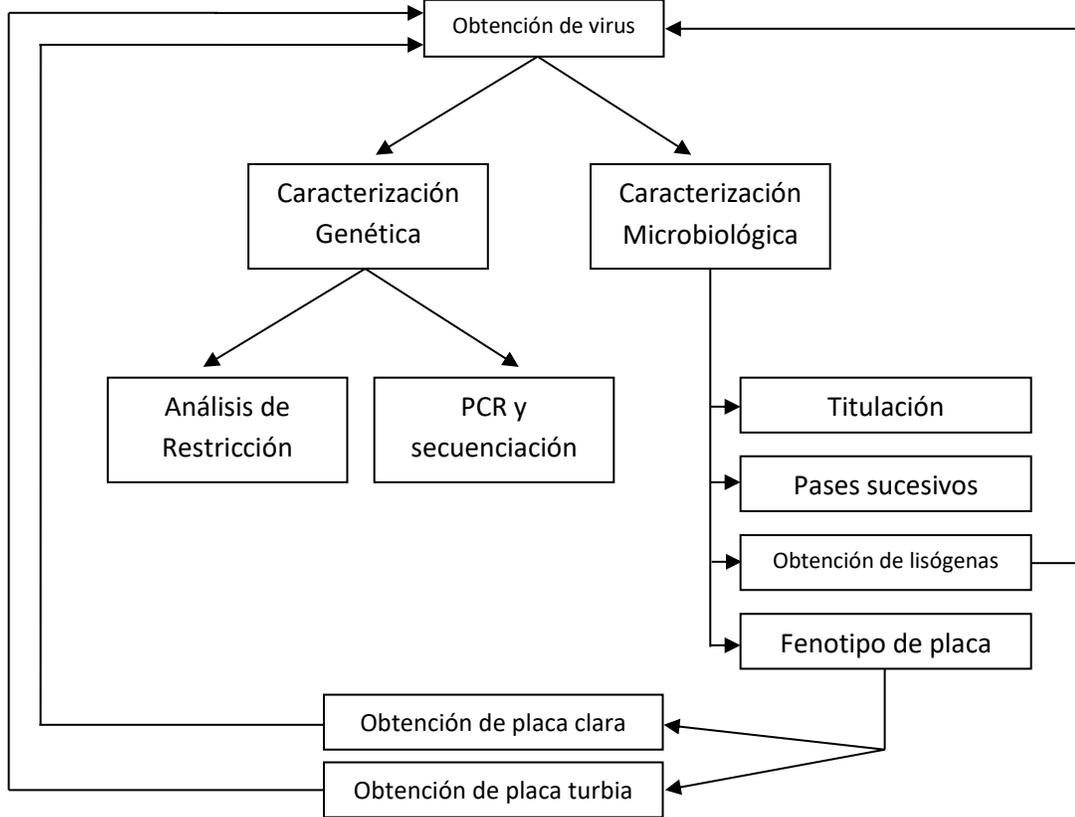
OBJETIVO GENERAL

Demostrar que el desarrollo hacia la fase lítica de una cierta proporción de fagos de mEp021 es debido a la disminución de la actividad del represor.

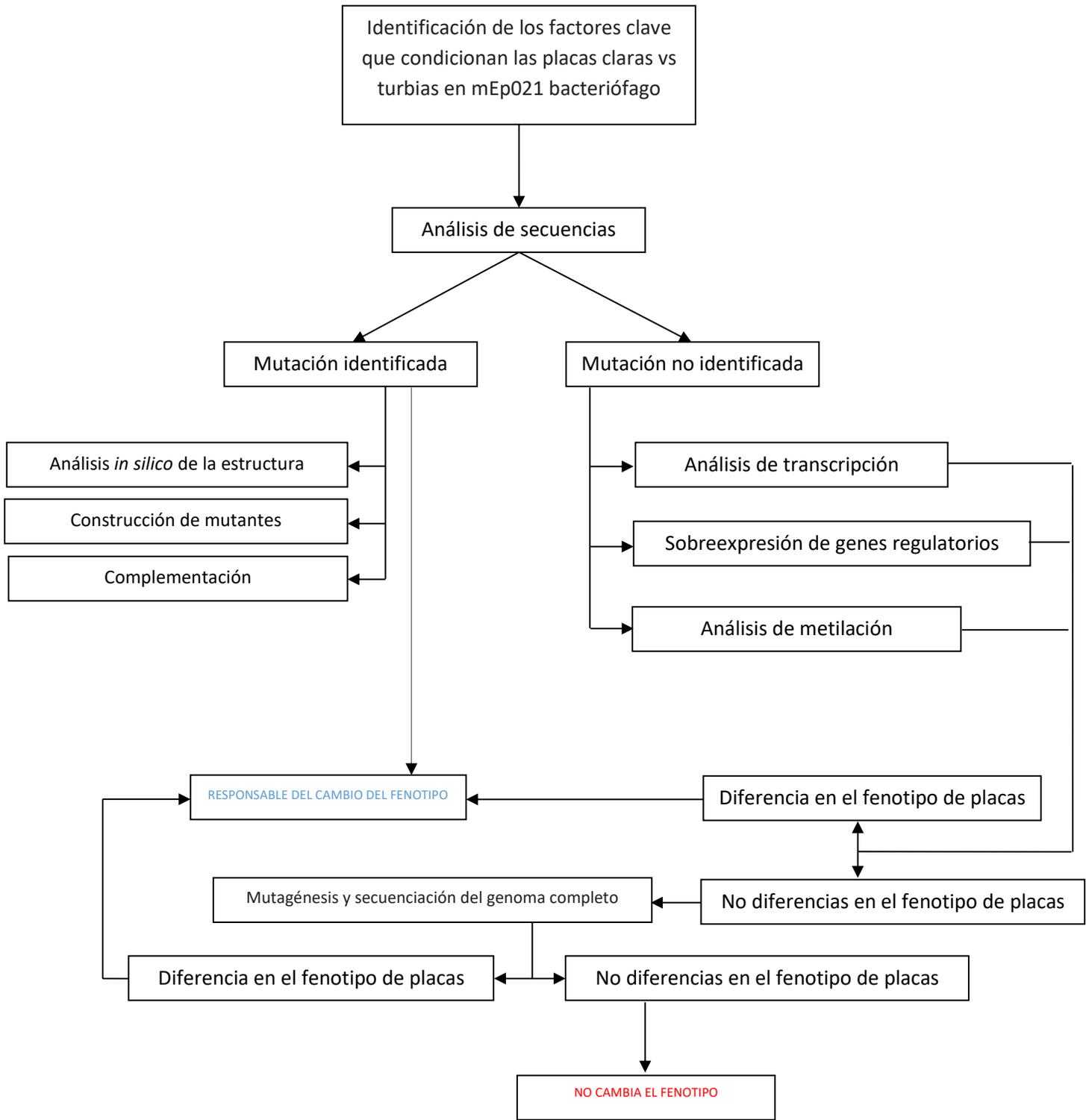
OBJETIVOS SPECIFICOS

1. Comprobar que la biología del fenotipo de placa de mEp021 es un fenómeno intrínseco del fago.
2. Análisis *in silico* de las secuencias de los genes del represor, del putativo antirepresor, así como de sus putativas secuencias regulatorias.
3. Analizar el genoma viral por el patrón de restricción enzimática para cada fago, obtenido a partir de placa clara o turbia.
4. Obtener una selección de placas claras para amplificar y secuenciar el gen *rep*.
5. Clonar el gen del represor, y del antirepresor, y analizar los efectos de sobreexpresión en distintas condiciones fisiológicas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARTE 1



ESTRATEGIA EXPERIMENTAL PARTE 2



MATERIALES Y METODOS

Crecimiento de bacterias y bacteriófagos

Los reactivos, soluciones y medios utilizados se encuentran en la sección de anexos de este trabajo. Para el crecimiento de las cepas *E. coli* se utilizó el medio LB, y para las bacterias transformadas con plásmido pKQV4 o pJET2.1 se utilizó el medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Para los medios sólidos, se incubó a 32°C, 37°C o 42°C y en el caso de medios de cultivo líquido se incubó a 37°C y 250 rpm de agitación.

Propagación de bacteriófagos en cajas de cultivo.

Se preparó la infección con el bacteriófago de interés en tubos de vidrio de 10 mL con tapa. De un cultivo de células *E. coli* pre-crecidas en medio líquido LB por 18 horas, se tomó 300 µL de células pre-crecidas y se agregó 5 µL de bacteriófagos con un título mayor de 10^{10} unidades formadores de placa por mililitro (ufp/mL), luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (~25°C) se agregó 3,5 mL de medio TØ disuelto (~40°C) y se mezcló hasta homogeneizar para luego vaciar el contenido en cajas de medio TØ sólido. Luego de dejar solidificar a temperatura ambiente (~10 minutos), se incubó a 37°C por 18 horas.

A las cajas resultantes con placas confluentes incontables, se le agregó 5 mL de solución TMG y se dispersó sobre toda la caja. Luego se pasó el sobrenadante de la caja y la película de TØ superpuesta a un tubo plástico de 15 mL, se agregó 1 mL de cloroformo (CHCl_3) y se mezcló con vórtex por 2 minutos. Para clarificar el sobrenadante con los bacteriófagos se centrifugó a 4400g por 5 minutos, el volumen del sobrenadante con los fagos se transfirió a un tubo estéril y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso, sin exposición a la luz.

Propagación de bacteriófagos en medio líquido.

Se preparó la infección con el bacteriófago de interés en tubos de plástico estériles de 50 mL de capacidad. De un cultivo de células de *E. coli* pre-crecidas en medio líquido LB por 18 horas. Por cada 300 μ L de células pre-crecidas se agregó 100 μ L de bacteriófagos con un título mayor de 10^{10} ufp/mL (en el caso de seleccionar las placas según su fenotipo, se seleccionó 1-10 placas aisladas y fueron tomadas con puntas de 10 μ L para micropipetas). Se agregó 50 μ L de solución de CaCl_2 0,1M y se dejó a temperatura ambiente por 15 minutos para facilitar absorción/infección. Luego se llevó a un volumen final de 30 mL con medio de cultivo LB y se suplementó con MgCl_2 para una concentración final de 10 mM y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm durante 6 horas (con algunos fagos de fenotipo turbios de mEp021 a las 6 horas no se observó lisis o restos celulares; con fagos de fenotipo claro de mEp021 en aproximadamente 5 horas se observó lisis completa).

Luego de la incubación para lisis se agregó 400 μ L de cloroformo (CHCl_3) y mezcló con el vórtex por 2 minutos para luego centrifugar a 4400g por 5 min y recuperar el sobrenadante y almacenar a 4°C, sin exposición a la luz.

Protocolo para titulación de bacteriófagos.

Se preparó la infección con el bacteriófago de interés en tubos de vidrio de 10 mL con tapa. De un cultivo de células de *E. coli* pre-crecidas en medio líquido LB por 18 horas. Se tomó 300 μ L de células y 3,5 mL de agar TØ bien disuelto (~40°), se mezcló en vórtex cuidadosamente y se vertió el volumen en cajas de TØ sólido, esparciendo bien sobre toda la caja y sin dejar burbujas. Luego de dejar solidificar a temperatura ambiente ~10

minutos, se agregaron gotas de 5 μ L de diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} ; preparados con diluciones 1/100 de 5 μ L en 495 μ L de solución TMG) de la solución de bacteriófagos.

Protocolo para distinción de fenotipo de bacteriófagos.

Se preparó la infección con el bacteriófago de interés en tubos de vidrio de 10 mL con tapa. De un cultivo de células de *E. coli* pre-crecidas en medio líquido LB por 18 horas, se agregó a cada tubo 300 μ L de células pre-crecidas y una alícuota de bacteriófagos en la dilución adecuada para obtener de 20-100 placas en caja (para titulación, selección de placas y distinción del fenotipo).

Posterior a 15 minutos de incubación (bacterias y bacteriófagos) a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) para facilitar la absorción/infección, se agregó a cada tubo 3,5 mL de medio TØ disuelto ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) y se mezcló hasta homogeneizar para luego servir el contenido en cajas de medio TØ sólido. Luego de dejar solidificar a temperatura ambiente (~ 10 minutos), se incubó a 37°C por 18 horas. Al día siguiente, se contabilizó el número de placas y describió el fenotipo claro versus turbio.

Protocolo para pases de fagos de una sola placa.

A partir de una caja de reciente preparación con placas aisladas de bacteriófagos (ver protocolo para distinción de fenotipo de bacteriófagos), se seleccionó de la caja, placas debidamente aisladas o separadas según el fenotipo deseado (e.g. bordes, tamaño y turbidez) que fueran claramente diferenciables. Con una punta estéril, de capacidad 10 μ L para micropipeta, se tocó sólo una vez la placa seleccionada gentilmente sin hundir completamente la punta en el agar como se indica en la figura 6.

El contenido de la punta (fagos y restos de TØ sólido) se disolvió en un tubo de 1,4 mL con 50 µL de solución TMG. El fago obtenido ($\sim 10^6$ ufp/mL) se empleó para titulación y amplificación.

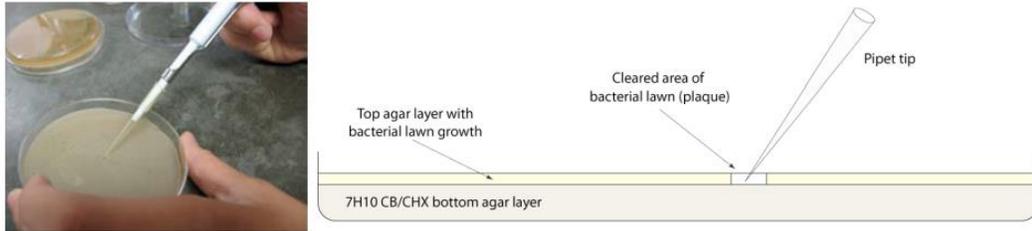


Figura 6. Representación de la forma de seleccionar cepas a partir de una sola placa viral.

Protocolo para la extracción de ADN genómico de fago.

A partir de una solución matriz de bacteriófagos con título mayor o igual a 10^{10} ufp/mL se separó una alícuota 600 µL en tubo de 1,4mL. Para eliminar células, ADN y ARN libre se agregó un volumen igual de solución de DEAE celulosa y mezcló por inversión del tubo unas 30 veces. Para eliminar la celulosa se centrifugó a 12,000g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.4mL. Las particular virales fueron lisadas con 500 µL de una solución de fenol:Cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y vórtex. Luego, el ADN genómico viral en la fase acuosa fue recuperado y purificado por precipitación con etanol y dos lavados subsiguientes con etanol al 70% después de incubar con el etanol a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugar a 12,000g por 5 minutos. El DNA genómico sin restos de etanol fue resuspendido en 50 µL de agua ultra pura o solución TRIS 10mM (pH 8) y almacenado a -20°C hasta su uso.

Protocolo experimental para la preparación de células competentes.

De un cultivo de células *E. coli* pre-crecidas en medio sólido LB por 18 horas, se seleccionó una colonia aislada para inocular 5 mL de medio LB, luego se incubó a 37°C por 18 horas con agitación de 250rpm. Al día siguiente se preparó una dilución 1/50 en medio LB y se creció por 3h a 37°C con agitación de 250rpm (o hasta alcanzar una $DO_{600}=0,4$). Luego de la incubación las células se colocaron en hielo por 30 minutos para luego centrifugarlas a 4,400g por 10 minutos a 4°C. El agregado celular fue resuspendido con 10mL de solución de $CaCl_2$ 100mM y dejado a 4°C por 15 minutos, el paso anterior se repitió para finalmente recuperar un volumen de 1mL de solución $CaCl_2$ 100mM 40% glicerol para almacenarlo en congelación a -70°C hasta su uso.

Protocolo para la transformación de células competentes.

Un volumen de 50 μ L las células competentes fue descongelado a 4 °C, a lo cual se agregó la mezcla de ligación o plásmido (5-15 μ L y hasta 100ng de ADN) para transformar. Luego de incubar a 4°C por 20 minutos se dio un choque térmico de 40 segundos a 42°C y se volvió a colocar la muestra a 4°C para agregar 1 mL de medio SOC e incubar durante 1 hora a 37°C con agitación de 250rpm. Finalmente se centrifugó a 12,000g por 5 minutos y las células recuperadas en 50 μ L fueron sembradas en cajas de agar LB suplementado con antibiótico de selección.

Protocolo para la extracción de ADN plasmídico.

De un cultivo de células de *E. coli* (transformadas con el plásmido) en cajas de medio LB, se seleccionó una colonia aislada para crecimiento en 5 mL suplementado con el antibiótico de selección por 18h a 37°C con agitación de 250rpm. Se recuperó el agregado celular por centrifugación a 12,000g por un minuto a 4°C para resuspender en 100 μ L de solución I

(Tris Clorhidrato 50mM y EDTA 10mM a pH 8), luego se agregó 200 μ L de la solución II (SDS 0,1% y NaOH 0,2N) y luego de disolver y mezclar se agregó 150 μ L de solución III (Acetato de potasio 3M). Después de mezclar por inversión 5 veces se centrifugó a 12,000g por 5 minutos a 4°C para recuperar el sobrenadante. Luego se agregó 3 μ L de RNAsa 20 μ g/mL y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para eliminar el ARN.

A la solución restante se agregó 500 μ L de una solución de fenol:Cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclo con el vórtex. Luego ,el ADN plasmídico en la fase acuosa fue recuperado y purificado por precipitación con etanol y dos lavados subsiguientes con etanol al 70% después de incubar con el etanol a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugar a 12,000g por 5 minutos. El ADN plasmídico sin restos de etanol fue resuspendido en 50 μ L de agua ultra pura o solución TRIS 10mM (pH 8) y almacenado a -20°C hasta su uso.

Obtención y comprobación de lisógenas.

De un cultivo de células de *E. coli* pre-crecidas en medio líquido LB por 18 horas, se preparó la infección con el bacteriófago de interés en tubos de vidrio de 10 mL con tapa. Para ello, se agregó a cada tubo 300 μ L de células pre-crecidas y una alícuota de bacteriófagos en la dilución adecuada para obtener de 20-100 placas en caja. En esterilidad, con la punta de un asa estéril se tocó sólo una vez la placa seleccionada gentilmente (sin hundir completamente la punta en el agar). El asa con bacterias lisógenas candidatas se extendió suavemente sobre una caja Petri con medio agar LB y se estrió de la manera tradicional para diluir las bacterias y poder observar colonias independientes. Para cada cepa de bacteriófago se seleccionó al menos 4 colonias independientes y se dejaron incubando a 37°C por 18 horas. Para cada caso se seleccionó una colonia y se replicó 4 veces por aislamiento de colonias en medio

agar LB. Después del cuarto pase se inoculó 4 mL de medio LB líquido y se dejó incubando a 37°C por 18 horas con 250rpm de agitación constante. La comprobación de cada candidata lisógena se realizó de dos maneras: por resistencia a la infección con el mismo bacteriófago y por producción de bacteriófagos en el sobrenadante.

Producción de bacteriófagos en sobrenadante.

Se tomó 1ml del cultivo de cada lisógena candidata, y se agregó 100 µL de cloroformo para eliminar las células, luego se centrifugó a 12,000g por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante con las posibles particular virales. Al sobrenadante obtenido se le realizó una titulación de bacteriófagos según el protocolo descrito anteriormente. En caso de obtener ufp, es un indicativo de que la candidata es lisógena.

Análisis de resistencia a la infección

Por otro lado, se tomaron 300 µL del cultivo de cada lisógena candidata para hacer el análisis de susceptibilidad a la infección del bacteriófago, ello por goteo de diluciones seriadas de una solución matriz de manera similar al protocolo de titulación de bacteriófagos. Si la bacteria del tapiz es resistente, es indicativo de que la candidata es lisógena.

Análisis *in silico*

El análisis del genoma y los distintos genes putativos de mEp021, fueron analizados a nivel de nucleótidos y aminoácidos en los siguientes servidores: BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Altschul, *et al.*, 1990) y el InterProScan

(Quevillon, *et al.*, 2005) perteneciente a EMBL-EBI, *The European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Se utilizó el servidor I-TASSER (Zhang, 2008; Roy, 2010) y PRALINE (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>) para predecir la estructura secundaria y terciaria en caso de que fuera requerido se usó el programa PyMOL v3.30 (Schödinger, LLC. <http://www.pymol.org/>) para visualizar el modelo de la estructura terciaria de las proteínas de interés.

Reacción de Restricción

Las reacciones de digestión se realizaron por incubación a 37°C y por al menos 4 horas con ~1 µg/ml de ADN. Según cada caso se emplearon las enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *BlnI* o *NdeI* (3U de enzima por cada µg de ADN) para un volumen de reacción final de 20 µL.

Reacción de ligación

En este trabajo se utilizaron dos vectores para las distintas construcciones. Para la clonación de transición se utilizó la construcción de los insertos de interés en el plásmido pJET1.2/blunt (CloneJet PCR cloning kit de Thermo Scientific); de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial para un volumen final de reacción de 10 µL y empleando una relación inserto:vector de 4:1. Para el vector de expresión se utilizó el plásmido pKQV4 (un derivado de pKK223-3 de Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, OH). En este caso se obtuvo insertos derivados de la digestión enzimática con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (directo de producto de PCR o bien de clonaciones en pJET1.2), los productos purificados se clonaron en pKQV4 con la T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) empleando las siguientes condiciones: 50 ng de vector previamente digerido con las mismas

enzimas y purificado, 4 veces la cantidad en ng de inserto, mezcla de reacción 1X, 1U de enzima ligasa y agua (para biología molecular) hasta un volumen final de 15 μ L, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente por incubación de 1 hora a 25 °C. Los productos de ligación se utilizaron directamente para transformación en las cepas de interés.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa

La amplificación del gen candidato se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) usando el producto comercial Dream Taq (Thermo Scientific, USA) con las siguientes condiciones: solución *buffer* 1X, cebador sentido 10 pmol, cebador antisentido 10 pmol, dNTPs 0,2 μ M cada uno, ADN de 10-100ng y 1,25u de Dream Taq ADN polimerasa para un volumen final de 20 μ L.

Los cebadores fueron diseñados con el programa Oligo7 (*Primer Analysis Software*, Wojciech & Piotr Rychlik v7.6) y revisados en la página en internet *Primer design too - NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Todos los cebadores fueron comprados a la empresa Oligo T4 (México, <http://t4oligo.com>). Una vez adquiridos los cebadores fueron re-suspendidos a una concentración de almacenamiento de 1 mM y diluidos a una concentración de 10 μ M para la alícuota de uso. La lista de los cebadores empleados así como las condiciones de amplificación se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1)

Tabla1. Cebadores y condiciones de amplificación.

Tipo	Blanco	Secuencia	Amplición (pb)
Sentido	Rep	CCGG` AATTC ATGAAAACAAAATGGTATGACTTAGC	664
Antisentido	Rep	CCCA` AGCTT ATGGCAGGTTTACGATCTTCGCATC	
Sentido	Antirep	CGG` AATTC AAGGATATGGAAATTCTTGC	377
Antisentido	Antirep	CCCA` AGCTT ATTATTAGCGCCAAAACCTC	
Sentido	Antirep5x	TCACACAGGAAACAG` AATTC ATGGATGATAAGGTGTGGAGG	1233
Antisentido	Antirep5x	CATCCGCCAAAACAGA` AGCTT GCGGGGTTTTCTTGTGTCAGTAG	
Sentido	Antirep2	TCACACAGGAAACAG` AATTC ATGGCACGGCGTAATCAC	293
Antisentido	Antirep2	CATCCGCCAAAACAGA` AGCTT CACCTATAAGTATCACGCAGG	
Sentido	DAM	CCGG` AATTC GGCGTAATGAAAAATGATTTTGGAG	612
Antisentido	DAM	CCCA` AGCTT CCTCTTTGCTCAATTGTTTC	
Sentido	DCM	CCGG` AATTC TAGAAAATGAGCAGGGGTAAACATTG	855
Antisentido	DCM	CCCA` AGCTT TGGATACATCAGAACAAGGTGAATAGC	
Sentido	DCM2	CGG` AATTC ATGAGGCAACATAATG	766
Antisentido	DCM2	CCCA` AGCTT AATTTGCCTCATGGTTAG	
Antisentido	Antireg	GGGTTTATCGATCATCCACGGAATCAATAATC	
Sentido	jprot-fw	CCGG` AATTC CACGAAACAGGGGGTTTATATG	
Antisentido	jprot-rv	CCCA` AGCTT CACTTCTGCAACTGGTGAC	
Sentido	jprot-fw2	CCGG` AATTC ATGATTAGCGACATTAAGATC	
Sentido	jprot-fw4	CCGG` AATTC CGAAAGTGTCTGAAGTATCAAC	
Antisentido	jprot-rv2	CCCA` AGCTT CTATTTTCGAGCGTTGAC	
Sentido	jprot-fw3	CCGG` AATTC AGCGGTGTAATGCTTCG	
Antisentido	jprot-rv3	CCCA` AGCTT GACCATTCTGTAATACTTGAG	

Nota: Sitio *EcoRI* **G`AATTC** y sitio *HindIII* **A`AGCTT** (el símbolo ` denota el sitio de corte)

Condiciones de PCR

Se utilizó el termociclador T100 Thermal Cycler de Bio-Rad.

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	96°C	2'00''	
Desnaturalización	96°C	20''	
Hibridación	56-58°C	20''	35
Polimerización	72°C	1'	ciclos
Polimerización final	72°C	5'	
	4°C	∞	

Electroforesis de ADN

El análisis de los fragmentos de ADN se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% en solución Tris-Acetato-EDTA 1X (Tris 40mM, ácido acético 20mM, y EDTA 1mM). Las corridas se realizaron a 85V por tiempos de 1 hora para geles pequeños y 2 horas para geles grandes. Como marcador de tamaño molecular se empleó el producto *Gene Ruler DNA Ladder* (Thermo Scientific) con marcadores de 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, y 100 pares de bases.

Secuenciación del producto de PCR.

Se utilizó el kit de secuenciación BigDye Terminator V1.1 bajo las siguientes condiciones: 100 ng de ADN (producto de PCR purificado), 10 pmol de cebador sentido o antisentido, mezcla de reacción 1X y agua grado

biología molecular hasta 10 μ L de volume final de reaccion. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94°C	5´	
Desnaturalización	94°C	20´´	
Hibridación	55°C	20´´	25
Extención	60°C	4´	ciclos
	4°C	∞	

La reacción se purificó por precipitación con EDTA/Etanol. La reacción de PCR de secuenciación se transfirió a un tubo de 1.5mL, se agregaron 5 μ L de EDTA 125mM pH8.0 y 60 μ L de etanol absoluto, para luego incubar a -20°C por 18 horas. Luego de la precipitación del ADN, se centrifugó a 1,000g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, luego se realizó dos lavados similares con 250 μ L de etanol al 70%, pero con incubaciones de 5 minutos. Finalmente, se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente (25 °C). Las muestras fueron enviadas a analizar a la Unidad de Ácidos Nucleicos del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Para visualizar el resultado del electroferograma resultante, se utilizó el programa Chromas v2.6 (www.technelysium.com.au) y para alinear las secuencias se utilizó el programa SeaView v4.6.1 (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>).

RESULTADOS

1. Comprobación del doble fenotipo de placa de mEp021

El modelo de estudio de este trabajo es el bacteriófago mEp021. El primer análisis consistió en obtener la cepa original sobre la cual se caracterizó el fenómeno de aparición del doble fenotipo de placa. Primeramente, de una semilla original de mEp021, se realizó ensayo de titulación, por medio de goteo de diluciones seriadas sobre el tapiz bacteriano de la cepa *E. coli* W3110. El análisis se realizó por 4 réplicas y en todos los casos se observó un título de $\sim 1 \times 10^{10}$ ufp/mL (unidades formadoras de placa por mililitro). La **figura 7** muestra una ampliación fotográfica del goteo por duplicado de 5 μ L de la dilución 10^{-8} de la semilla original de mEp021, por la escasa resolución de la imagen se resalta con flechas color rojo las placas claras en medio de múltiples placas turbias.

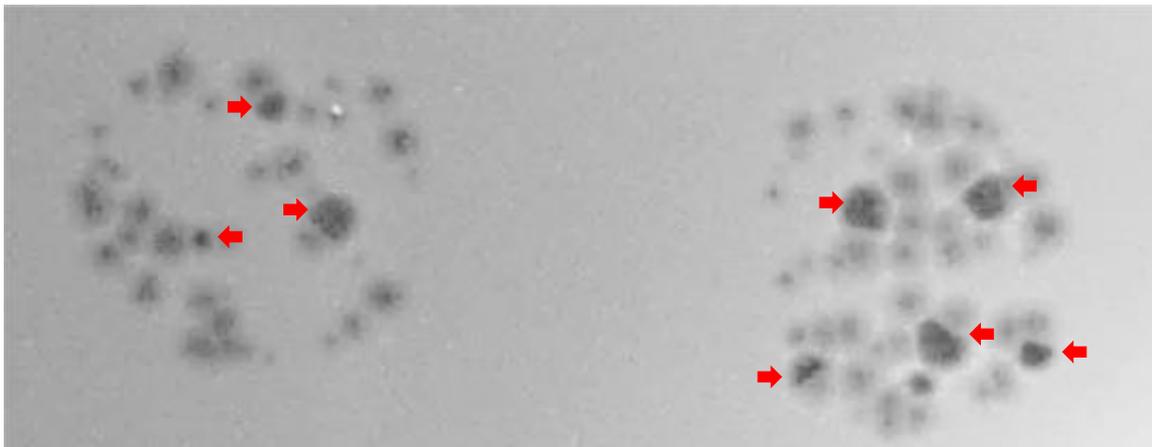


Figura 7. Goteo del bacteriófago mEp021 sobre un tapiz de la cepa *E. coli* W3110. La fotografía es una ampliación del goteo de 5 μ L de una dilución 10^{-8} de la semilla original de mEp021. Se destaca con flechas en color rojo las placas de fenotipo claro rodeadas de placas turbias.

Con base en este resultado, fue necesario descartar la posibilidad de una contaminación en la cepa original, bien sea con algún fago lítico o

con alguna mutante espontánea del mismo fago. Para ello se realizó una purificación por selección de placas según su fenotipo, una posterior propagación por lisado en caja, para observar el fenotipo en las placas confluentes y luego una propagación por lisado en medio líquido según los protocolos descritos en la sección de Materiales y métodos.

A partir de la observación de placas en caja completa (20-100 placas) se seleccionaron 4 placas claras y 4 placas turbias. Cada una fue resuspendida en solución TMG para luego propagarlas. Al observar las placas confluentes en caja en el primer pase, el fenotipo se preservó predominantemente claro o turbio según el caso. A cada una de estas cepas se les realizó propagación, titulación y corroboración de fenotipo en placa; tanto las placas claras como las turbias tuvieron títulos similares de $\sim 10^{10}$ ufp/mL, y preservaron su fenotipo claro o turbio, según cada caso (**figura 8**). Con estos resultados, se pudo afirmar que en la semilla original de mEp021 efectivamente existen al menos dos poblaciones de bacteriófagos, unos que dan fenotipo de placa clara y otros que dan fenotipo de placa turbia. En consecuencia, se requirió descartar la posibilidad de una contaminación con otro bacteriófago y se propuso obtener nuevas lisógenas de los fagos temperados obtenidos.



Figura 8. Fenotipo de cepas que dan placa turbia (A) y cepas que dan placa clara (B) de mEp021.

2. Obtención de *E. coli* W3110 lisógenas de mEp021

La obtención de lisógenas se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección Materiales y Métodos, se seleccionó 10 bacterias candidatas (de placas independientes) luego de 4 pases sucesivos por aislamiento en agar LB y fueron corroboradas por resistencia a la infección con el mismo bacteriófago, por producción de bacteriófagos en el sobrenadante y por

amplificación por PCR del gen *rep* de mEp021 a partir de DNA genómico bacteriano (producto de amplificación de 664 pb, **figura 9**). Las candidatas fueron identificadas con las letras LSG seguidas de un número consecutivo del 1 al 10. De las 10 candidatas solo LSG3 y LSG4 resultaron no lisógenas para mEp021, pero sí resistentes espontáneas a la infección por mEp021 (estas cepas no amplifican por PCR el gen *rep* de mEp021). Seguidamente se realizó la caracterización de la progenie viral de las candidatas positivas por comprobación del fenotipo en caja completa, a partir de los primero 4 pases sucesivos y también en un noveno pase para evaluar la estabilidad de las lisógenas, los resultados se muestran en la **tabla 2**.

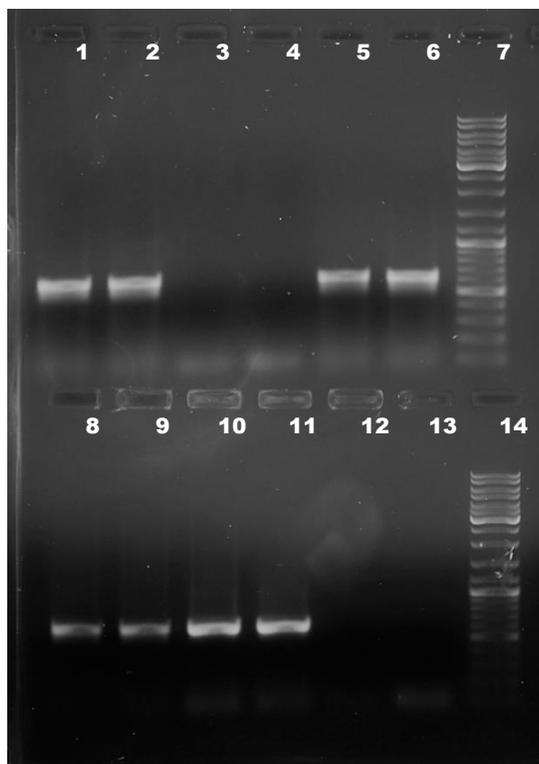


Figura 9. Gel de electroforesis de los productos de PCR del gen *rep* de las cepas *E. coli* W3110 candidatas de lisógenas de mEp021. El gel es 1% agarosa y se cargó 5 μ L de cada muestra, el mismo fue corrido por 1 hora a 100V. Carriles 1 al 6 cepas LSG1 a LSG6; carriles 8 al 11 cepas LSG7 a LSG10 respectivamente; carriles 7 y 14 marcador de tamaño molecular *Gene Ruler*; carril 13 control negativo de PCR.

Tabla 2. Contabilización del número de placas turbias y claras provenientes del sobrenadante de lisógenas W3110 [mEp021] de 24 horas. Las diferentes cepas obtenidas fueron nombradas como LSG seguidas de un número (1-10). Las columnas 1-10 corresponden a la caracterización de la progenie viral del sobrenadante de las cepas lisógenas al cuarto pase. Del pase número nueve sólo se muestra el valor final de contabilización (columna 11). N=número, μL =microlitros, mL=mililitros, C/T=relación de placas claras entre placas turbias en porcentaje.

Cepa W3110 [mEp021]	N de placas turbias	N de placas claras	Volum en μL	factor de dilución	turbias por μL	turbias por mL	claras por μL	claras por mL	C/T pase4	C/T pase 9
LSG1	87	0	10	100	870	8.7×10^5	0	0.00	<1/87	0%
LSG2	36	0	10	1000	3600	3.6×10^6	0	0.00	<1/36	0%
LSG3				Resistente sin profago (comprobado por PCR)						
LSG4				Resistente sin profago (comprobado por PCR)						
LSG5	414	6	10	4	165.6	1.7×10^5	2.4	2.4×10^3	1%	2%
LSG6	105	10	25	1	4.2	4.2×10^3	0.4	4.0×10^2	10%	0%
LSG7	76	11	25	1	3.04	3.0×10^3	0.44	4.4×10^2	14%	3%
LSG8	90	10	25	1	3.6	3.6×10^3	0.4	4.0×10^2	11%	13%
LSG9	105	12	25	1	4.2	4.2×10^3	0.48	4.8×10^2	11%	2%
LSG10	40	9	25	1	1.6	1.6×10^3	0.36	3.6×10^2	23%	3%

Como se observa en la tabla 2, en el pase número 4 el título de la progenie entre las cepas lisógenas es entre 10^3 y 10^5 ufp/mL; las que tienen mayor título, LSG1 y LSG2, tienen una proporción no identificada de placas claras (1-4 claras en placas confluentes en una caja, 10^5 turbias aproximadamente). Por otro lado, la mayor proporción de placas claras se observó en LSG10, la cual tiene también el menor título. Evaluando la estabilidad de las lisógenas en la producción de progenie se puede notar que los porcentajes C/T difieren entre los pases 4 y 9, aunque algunos se mantienen similares como los de las cepas LSG1, LSG2, LSG5 y LSG8. Se puede concluir con estos resultados que la progenie de fagos temperados de mEp021 provenientes de cepas lisógenas, contiene una subpoblación de bacteriófagos que generan fenotipo de placa clara (tal como los bacteriófagos virulentos) y que la proporción de placas claras con relación a las turbias, así como las tasas de inducción del profago (producción total de virus a partir de células lisógenas) varía entre lisógenas de aislados diferentes, incluso comparando pases sucesivos.

3. Análisis del patrón de restricción del genoma de una selección de bacteriófagos de mEp021

Aunque en la comprobación de las lisógenas se analizó por PCR la secuencia específica del gen *rep* de mEp021, se propuso indagar sobre la estabilidad e integridad del genoma por análisis de restricción del DNA obtenido a partir de virus aislados de estas cepas lisógenas.

Para este análisis, se seleccionaron distintas cepas de mEp021. A partir de la progenie de cada lisógena diferente, se obtuvo una placa aislada turbia y una placa aislada clara. Estas cepas seleccionadas se nombraron con el prefijo ϕ T ó ϕ C (para fago con fenotipo turbio o claro, respectivamente), seguido de una numeración que corresponde al número de la cepa lisógena de la que proviene. Estas fueron propagadas una vez por placa confluyente y luego por lisado en medio líquido y finalmente revisadas por fenotipo de placa sobre tapiz de W3110. El perfil del goteo para la titulación de una selección de cepas turbias y claras se muestra en la **figura 10**, donde se puede notar el título de cada una, así como la preservación de su fenotipo. El título promedio para las cepas propagadas fue de $\sim 1 \times 10^{11}$ ufp/mL, sin diferencias entre claras y turbias; además, luego de los dos pases consecutivos, las turbias siempre dan fenotipo turbio y las claras preservan su fenotipo claro.

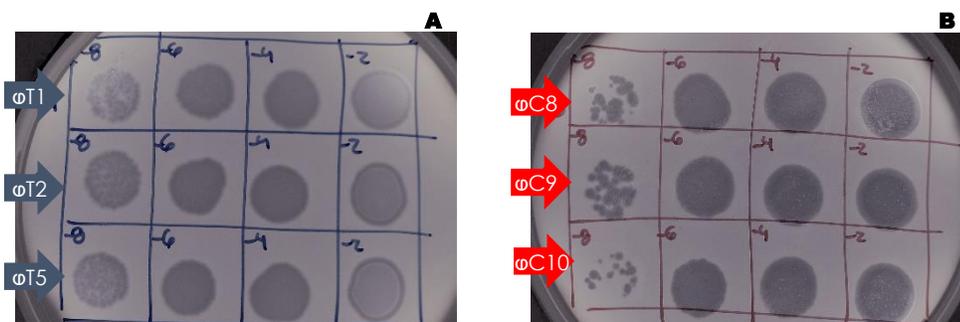


Figura 10. Titulación de cepas claras y turbias sobre la cepa *E. coli* W3110. En la parte A se muestra el goteo de diluciones seriadas 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} y 10^{-2} de las cepas de fenotipo turbio de mEp021 ϕ T1,

ϕ T2, ϕ T5, que se seleccionaron de las lisógenas LSG1, LSG2 y LSG5 respectivamente. En la parte B se muestra el goteo de diluciones seriadas 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} y 10^{-2} de las cepas de fenotipo claro de mEp021 ϕ C8, ϕ C9, ϕ C10, que se seleccionaron de las lisógenas LSG8, LSG9 y LSG10 respectivamente.

Una vez confirmada la preservación del fenotipo, se realizó la extracción de DNA genómico para su caracterización. El primer análisis consistió en corroborar por restricción el genoma de las distintas cepas aisladas con la enzima *Nde*I. Se seleccionaron 7 cepas claras provenientes de lisógenas diferentes y dos turbias también provenientes de lisógenas diferentes (**figura 11**).

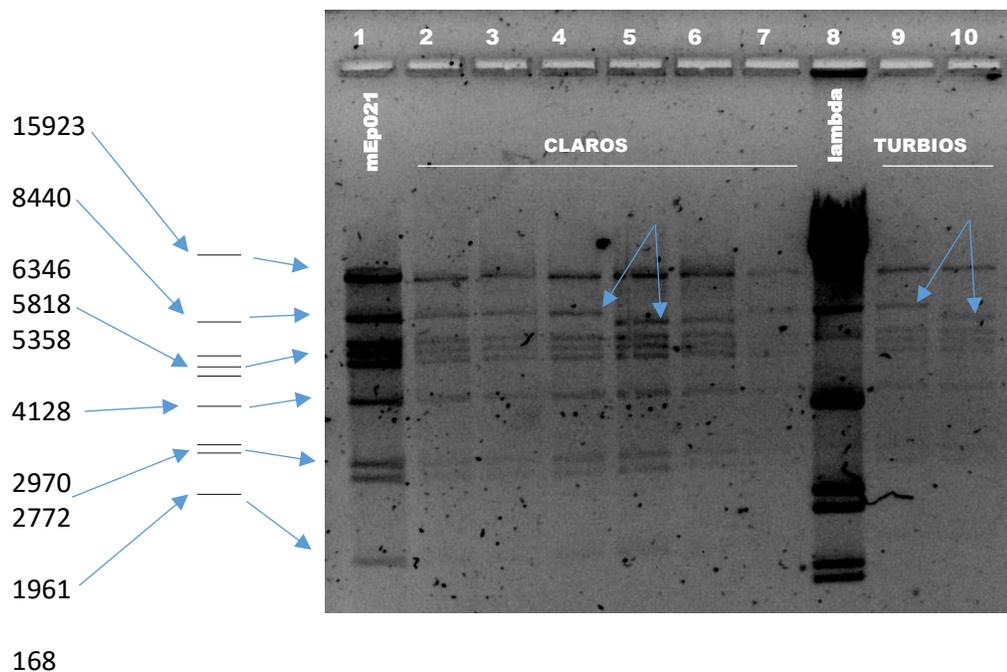


Figura 11. Electroforesis de DNA genómico de distintas cepas de mEp021 digerido con *Nde*I. Carril 1 genoma de la cepa original mEp021. Carriles 2 al 7, cepas de fenotipo claro de provenientes de las cepas LSG5 a LSG10 respectivamente. Carril 8 DNA genómico del bacteriófago lambda digerido con *Nde*I. Carriles 9 y 10, cepas de fenotipo turbio provenientes de las cepas LSG1 y LSG2 respectivamente. Esquema a la izquierda, tamaño de los fragmentos esperados. Las flechas con color azul indican las bandas con migración diferencial.

El análisis de restricción muestra que el DNA genómico de las cepas analizadas es similar a la muestra de referencia y concuerda a lo esperado al realizar análisis teórico, aunque con algunas excepciones. El DNA genómico de las cepas ϕ C8 y ϕ C9 así como de la cepa ϕ T2 (**figura**

11, carriles 5, 6 y 10 respectivamente), muestran diferente migración en la banda que debería ser de 8,840 pares de bases.

Dado que no se observa diferencia en ninguna otra banda, la diferencia en la migración la banda de 8,840pb, sugiere que se ha eliminado un fragmento de DNA. Sin embargo, la resolución del gel no permite inferir con certeza el tamaño del fragmento eliminado o si alguna otra banda ha ganado el correspondiente tamaño, en cuyo caso la variación correspondería a la inversión o traslocalización de una porción de DNA a otra posición en el genoma. Como esta condición está presente en solo 2 de los 6 bacteriófagos de fenotipo claro y además en uno de los dos fagos turbios analizados, podemos decir que no es la causa de la variación de fenotipo del bacteriófago mEp021.

Para identificar la región de cambio del genoma en estas cepas de mEp021, se escogió la enzima de restricción *B*l*p*I (**figura 12**), que pudiera generar un corte en la banda de 8,440pb. Los geles obtenidos de la digestión simple se muestran en la **figura 13**.

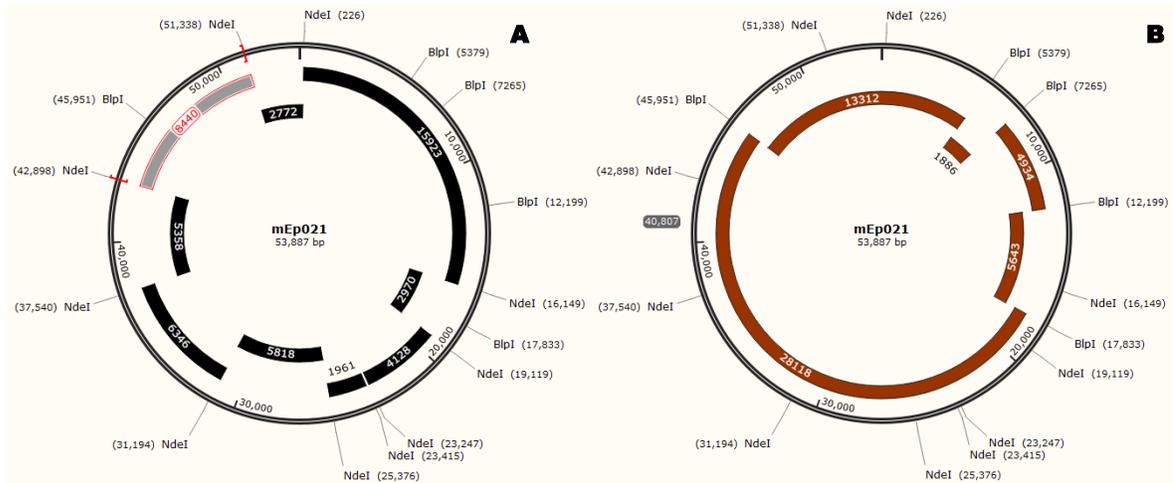


Figura 12. Mapa de restricción teórico del genoma de mEp021 con las enzimas *Nde*I y *B*l*p*I. En la parte **A** se muestra el análisis de los fragmentos esperados con la digestión con la enzima *Nde*I, y se resalta el fragmento donde aparece una migración diferente en algunas cepas. En la parte **B** se muestra el análisis de los fragmentos esperados con la digestión con la enzima *B*l*p*I. Nota: Ambos

mapas corresponden al arreglo circular del genoma de mEp021, se presume que en el virión se debe encontrar de forma lineal, unido por apareamiento por los sitios "cos" (*cohesive end sites*); sin embargo, los análisis de restricción concuerdan con estos mapas, es decir, con un arreglo circular.

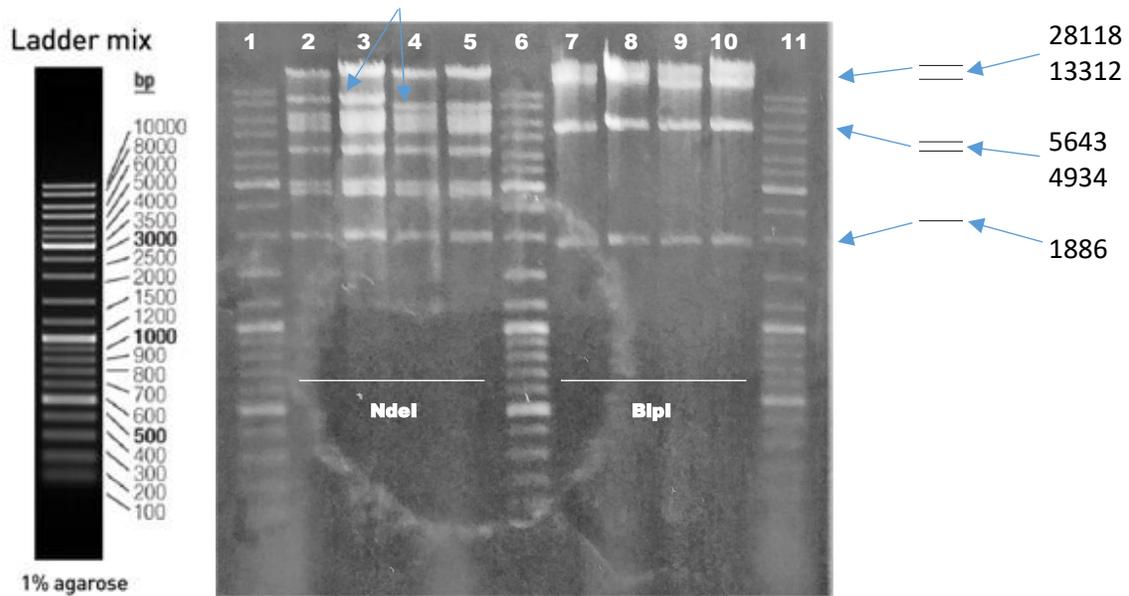


Figura 13. Electroforesis de DNA genómico de distintas cepas de mEp021 digerido con *NdeI* o *BlnI*. En los carriles 1, 6 y 11 se encuentran marcador de tamaño molecular (*Gene Ruler*); carriles 2 y 3 ϕ T1 digerido con *NdeI*; en los carriles 4 y 5 ϕ T2 digerido con *NdeI*; carriles 7 y 8 ϕ T1 digerido con *BlnI*; carriles 9 y 10 ϕ T2 digerido con *BlnI*. Esquema a la derecha, tamaño de los fragmentos esperados.

De la digestión con *NdeI* del DNA genómico de las cepas ϕ T1 y ϕ T2 podemos decir que se repite el resultado, por lo que probablemente existe una pérdida de material genético en el genoma de la cepa ϕ T2. Aunque la resolución del gel nuevamente dificulta deducir el tamaño del fragmento, se puede decir que la diferencia entre la migración de las bandas corresponde a unos 1000 pares de bases aproximadamente (**Figura 11**, carriles 5,6 y 10).

Por otro lado, la digestión con la enzima *BlnI* arroja dos diferencias significativas. Primeramente, la banda de 13,312 pares de bases parece migrar diferente en ϕ T2, es decir presenta un menor tamaño del esperado. En segundo lugar, la banda esperada de 4,934 pares de bases

está ausente en las cuatro muestras. Respecto a esta última, se podría deducir que existe una incongruencia con el patrón teórico esperado, de acuerdo al genoma de mEp021 (aun sin publicar); esta región incluye un segmento de alta complejidad ya que contiene repetidos que han dificultado el ensamblaje (**figura 14**). Es probable que el fragmento de 4,934pb pueda incluir una secuencia extra y su tamaño sea similar a 5,643pb por lo que en el gel se verían superpuestas.

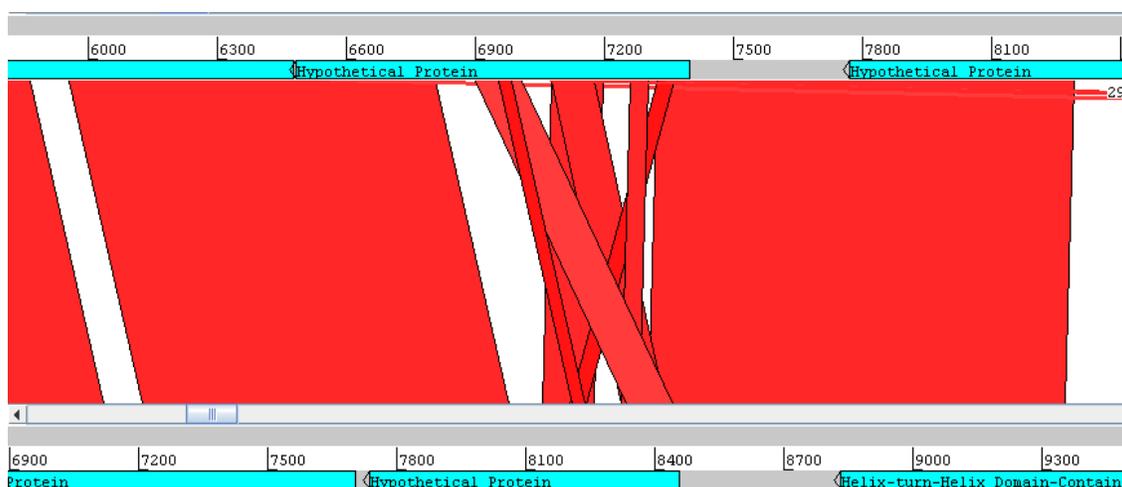


Figura 14. Comparación de la secuencia correspondiente a la banda de 4,934pb del genoma de mEp021 con la secuencia del profago FHI99. Las barras de color rojo indican los segmentos de alta similitud, las barras azules indican los ORFs anotados en estos segmentos. En la parte de arriba la secuencia de FHI99 y abajo la secuencia de mEp021. El entrecruzamiento de las barras de color rojo en el centro de la figura es indicativo de repetidos en las secuencias. La figura fue generada con el programa *Artemis Comparison Tool* (ACT, Sanger Institute).

Respecto a las bandas que migran diferente, se puede decir que con *NdeI* la banda que corresponde las coordenadas 42,673-51,113 en el genoma de mEp021 aparece más pequeña; igualmente, aparece más pequeña o con mayor migración con *BlnI* la banda que corresponde las coordenadas 45,726-5,354 (considerando el mapa circular del genoma de 53,887 nucleótidos). Por tanto, con estos resultados se infiere que el fragmento ausente debe encontrarse entre los nucleótidos 45,951 (sitio *BlnI*) y 51,338 (sitio *NdeI*). Para afinar un poco más la localización, se realizó

una doble digestión con las enzimas *NdeI* y *BlnI*, como se muestra en la **figura 15**, considerando que la región con pérdida de material genético se encuentre en la barra destacada con color verde (**figura 15**, banda de 5,387 nt).

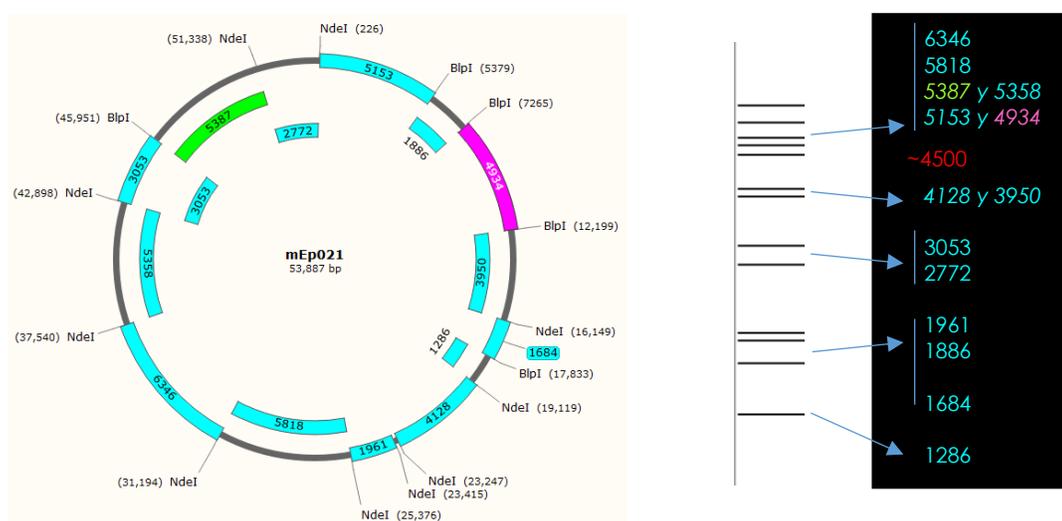


Figura 15. Mapa de restricción teórico de la doble digestión del genoma de mEp021 con las enzimas *NdeI* y *BlnI*. En color azul claro se muestran los fragmentos que se esperan sin ninguna diferencia. En color verde, el fragmento de 5,387pb que podrían variar en tamaño respecto a la estimación teórica y en color lila la banda teórica no encontrada en el análisis de restricción con la enzima *BlnI*.

A partir del resultado de la doble digestión enzimática, solo se puede decir que aparece una banda de aproximadamente 4,500 pb (**figura 16**, carriles 12 y 14), la banda esperada de tipo silvestre es de 5,387pb, que se ubica en una región difícil de definir por la superposición con otras bandas de tamaño similar. Aun así, al realizar la diferencia de 5,387 menos 1,000pb (tamaño aproximado del fragmento que se pierde) es igual a 4,387, lo que coincide de forma parcial con la banda que aparece diferencialmente entre las cepas $\phi T1$ y $\phi T2$ (carriles 11 y 12 además de 13 y 14 en la **figura 16**). De lo anterior se puede inferir que el fragmento modificado se encuentra entre las posiciones 45,276 y 51,113 en el genoma de mEp021, que abarca casi completamente el gen que codifica a la proteína estructural J de la cola (**figura 17**).

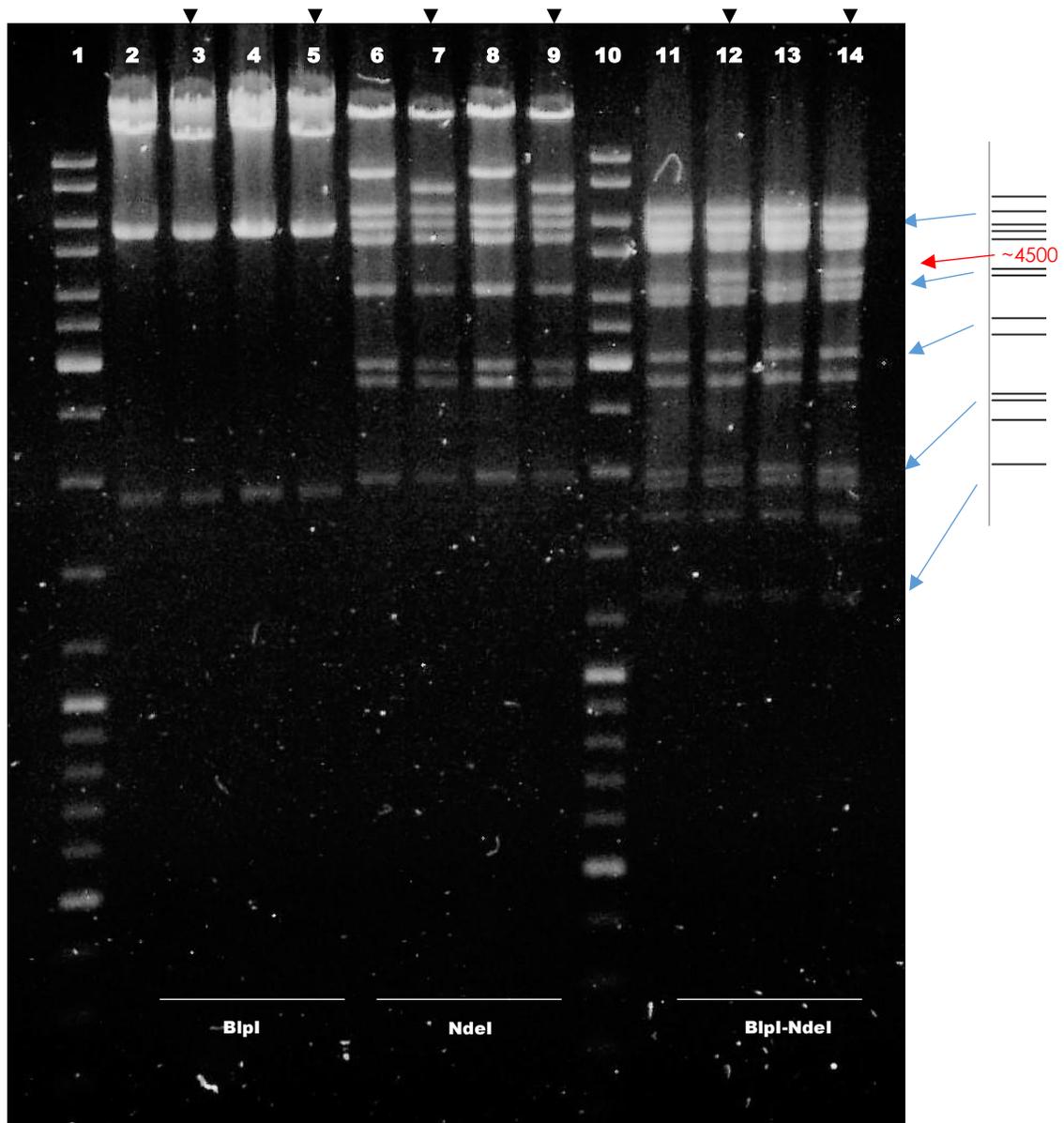


Figura 16. Electroforesis de DNA genómico de la doble digestión del genoma de mEp021 con las enzimas *NdeI* y *BlnI*. Carriles 2-5 digestión con *BlnI*; carril 6 al 9 digestión con *NdeI*; carriles 11-14 digestión doble con *NdeI* y *BlnI*. Carriles 1 y 10 marcador *Gene Ruler*; Carriles 2, 4, 6, 8, 11 y 13 con DNA genómico de ϕ T1; Carriles 3, 5, 7, 9, 12 y 14 con DNA genómico de ϕ T2. Esquema a la derecha, tamaño de los fragmentos esperados; se destaca en color rojo una banda extra de ~4,500 pb

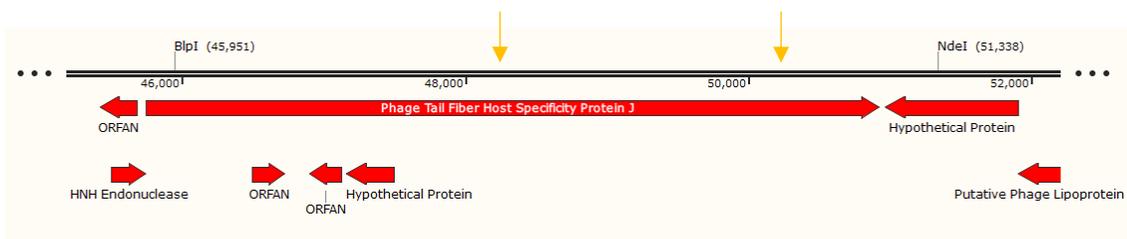


Figura 17. Esquema de localización del fragmento con posible eliminación de ~1 Kb en el genoma de mEp021. En color rojo se muestran los marcos de lectura, el más grande corresponde a la proteína estructural J que abarca casi completamente las coordenadas de los sitios *BlnI* 45,951 y *NdeI* 51,338. Las flechas indican secuencias iguales de 35 pb (ver **figura 23**)

La pérdida de este segmento en el gen J fue confirmada por un gel de proteínas estructurales empleando las cepas ϕ T1 y ϕ T2 realizado por los Doctores Eva Martínez-Peñañiel y Omar Sepúlveda (**figura 18**, datos no publicados).

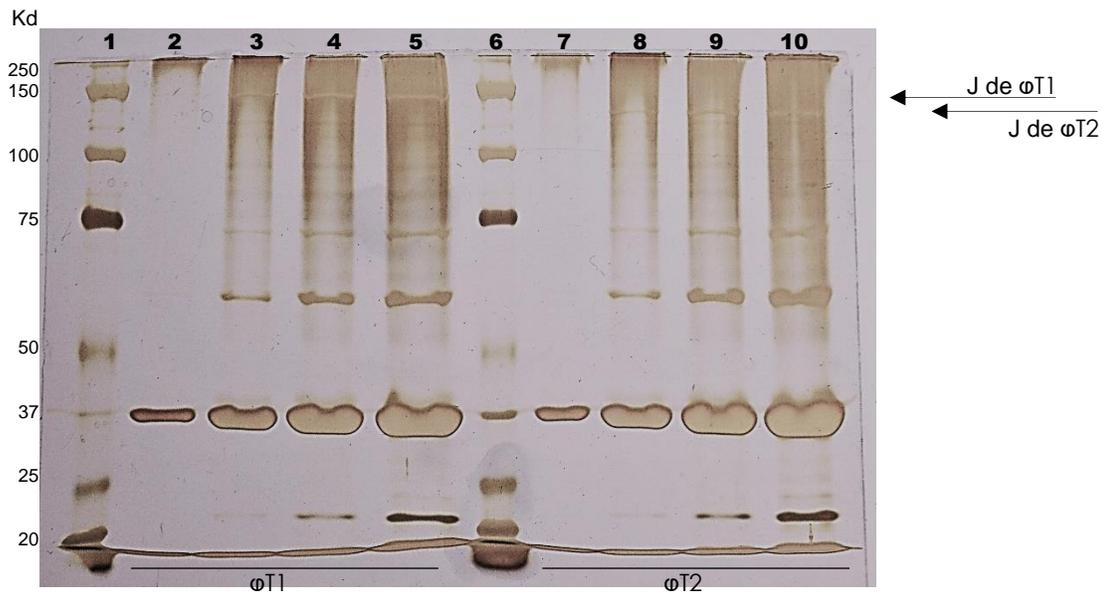


Figura 18. Gel de proteínas estructurales de mEp021 de las cepas ϕ T1 y ϕ T2. Carriles 1 y 6 patrón de tamaño molecular, carriles 2-5 proteínas estructurales de ϕ T1, volúmenes de carga 5, 10, 15 y 20 respectivamente. Carriles 7-10, proteínas estructurales de ϕ T2, volúmenes de carga 5, 10, 15 y 20 respectivamente. A la izquierda se identifica los tamaños del marcador utilizado (*Precisión Plus Protein, Dual Xtra Standards* de BioRad).

Para comparar la secuencia de la proteína J con otros bacteriófagos pertenecientes a putativos profagos similares a mEp021, se realizó el análisis del alineamiento con la herramienta en internet Blastp de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>, **figura 19**). En los resultados se puede notar que la región amino terminal es notoriamente conservada en relación al extremo carboxilo terminal, lo que es esperado por su función esencial. Entonces, se puede inferir que el fragmento que se elimina podría estar en el segmento carboxilo terminal.

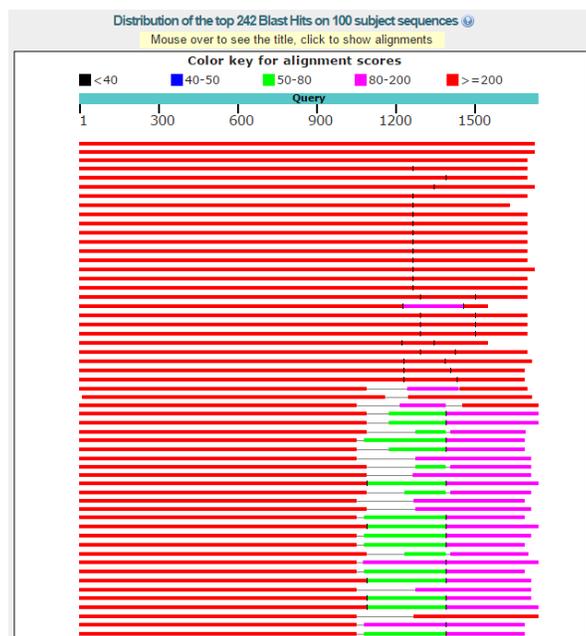


Figura 19. Análisis de comparación de la secuencia de la proteína estructural J de mEp021 con la base de datos de NCBI. Para este análisis se empleó el portal Blastp de NCBI, la proteína total es de 1728 aminoácidos, de los cuales los primeros 1000 aproximadamente son mucho más conservados que los del extremo carboxilo terminal (colores verde y rosa).

Adicionalmente, al analizar la proteína para búsqueda de dominios comunes reportados en el portal CDD de NCBI (CDD, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), se logró identificar tres dominios: 1) dominio putativo de cola de bacteriófago; 2) dominio N terminal RecF/RecN/SMC, que está relacionado al mantenimiento estructural y dinámica de cromosomas eucariotas pero también con proteínas involucradas con el metabolismo y recombinación del DNA; 3) dominio de función desconocida (DUF1983) tal como se denota en la **figura 20**.

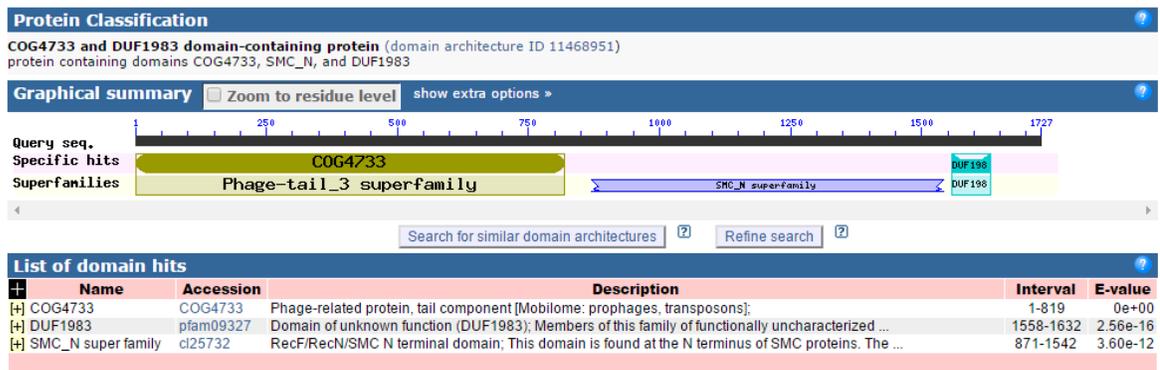


Figura 20. Análisis de la búsqueda de dominios funcionales de la proteína estructural J. Para este análisis se empleó el portal CDD de NCBI. El dominio COG4733 corresponde al dominio estructural de cola de bacteriófago, el dominio SMC a las superfamilia de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC por sus siglas en ingles) y el dominio DUF198 de función no asignada.

Para determinar la región variable se diseñaron cebadores para amplificar y secuenciar el gen que codifica para la proteína J, específicamente para la región carboxilo terminal como lo muestra el esquema de la **figura 21 y la tabla 3**.



Figura 21. Representación esquemática de la estrategia de amplificación y secuenciación del gen de la proteína estructural J. Para identificar el fragmento eliminado en este gen, se escogió amplicones que se sobreponen entre sí y que se localizan al extremo derecho del gen (C- terminal), cada uno de los fragmentos se identificó con la letra D (extremo derecho) seguido de un número consecutivo 1 al 3.

Tabla 3. Ubicación de los cebadores y tamaños esperados de la amplificación y secuenciación del extremo C terminal del gen que codifica la proteína estructural J de fibra de la cola de mEp021. La secuencia de los cebadores se encuentra registrada en Materiales y métodos.

Nombre del producto	Tamaño	Coordenadas	Cebadores
Gen J	5,652 pb	45,720 a 51,371	JprotFW y JprotRV
D	3,164 pb	48,208 a 51,371	JprotFW2 y JprotRV
D1	1,238 pb	48,208 a 49,445	JprotFW2 y JprotRV2
D2	1,064 pb	49,282 a 50,345	JprotFW3 y JprotRV3
D3	1,159 pb	50,213 a 51,371	JprotFW4 y JprotRV

Para determinar el fragmento de DNA que se elimina, se comprobaron las cepas ϕ T1 y ϕ T2 por amplificación de los productos D, D1 D2 y D3 respectivamente (**figura 22**). Como se muestra en la figura, la amplificación del fragmento D de 3,164pb en la cepa ϕ T1 (control) genera una banda con el tamaño esperado, mientras que la cepa ϕ T2 genera un producto más pequeño cerca de 2,000pb (**figura 22**). Con ello se confirmó que efectivamente hay una eliminación de \sim 1,000pb en el extremos C-terminal del gen que codifica la proteína J. Por otro lado, la amplificación de los fragmentos D1, D2 y D3 generó resultados diferentes, los tres fragmentos amplificaron de acuerdo a los tamaños esperados para la cepa ϕ T1; sin embargo, con la cepa ϕ T2 solo el fragmento D3 amplificó del tamaño esperado. Esto indica que la región que se elimina se encuentra entre los fragmentos D1 y D2.

Para identificar la secuencia de esta región de la cepa ϕ T2, el producto D fue purificado y secuenciado con los cebadores JprotFW2, JprotRV y JprotRV3. En los análisis de electroferogramas y alineamiento con la secuencia silvestre del gen J se confirmó la eliminación de 1002 nucleótidos. Sorprendentemente, este fragmento en la secuencia silvestre se encuentra flanqueados por dos repetidos de 35 nucleótidos cuya secuencia es GCTATTGCAGACGAAACGAAGGCACGCACTGACGC como se observa en la **figura 23** (ver **figura 17** para ubicación de los repetidos en el gen).

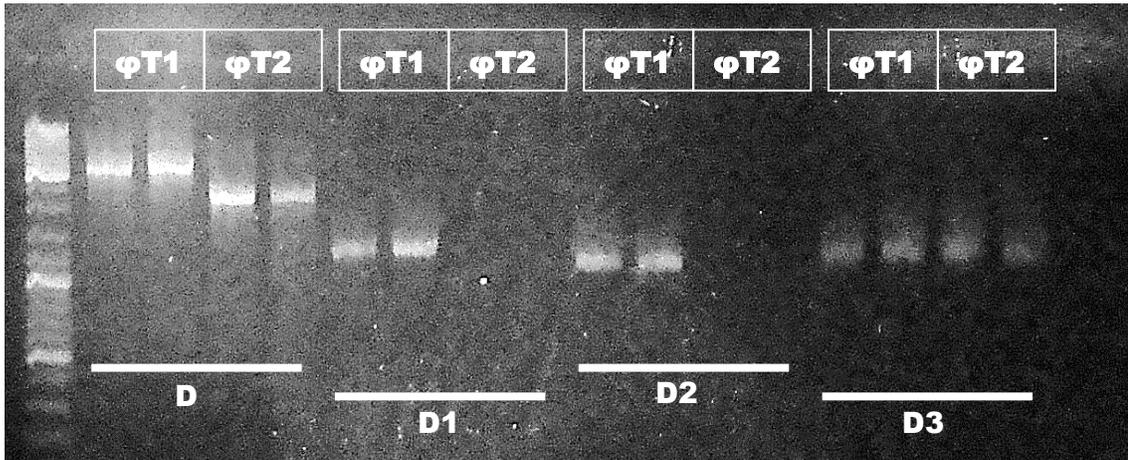


Figura 22. Electroforesis de la amplificación de los productos D, D1, D2, D3 y D4 de las cepas $\phi T1$ y $\phi T2$. En el primer carril se muestra el marcador Gene Ruler, los fragmentos D1 y D2 no amplificaron en la cepa $\phi T2$. Para el patrón del marcador, ver figura 13.

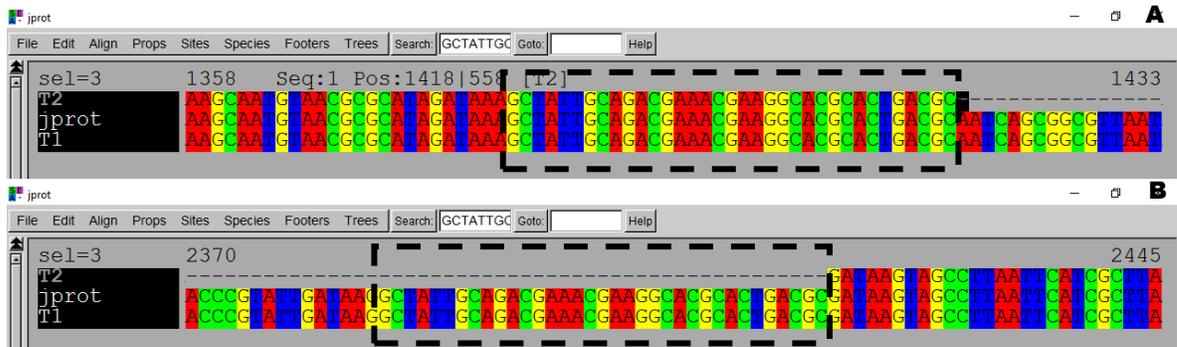


Figura 23. Alineamiento de la secuencia del fragmento D obtenida con el cebador JprotRV3 de las cepas $\phi T1$ y $\phi T2$. En la parte A se muestra el alineamiento de la región río arriba donde comienza la eliminación de los 1,002pb y en la parte B el alineamiento río abajo. En recuadros punteados se destaca los repetidos de 35 nt. T2: cepa $\phi T2$, T1: cepa $\phi T1$, jprot: secuencia silvestre. (En anexos, Electroferogramas 1)

4. Análisis de estabilidad a distintas temperaturas de crecimiento

En la caracterización inicial del bacteriófago mEp021 se había determinado que no presenta viabilidad a 32°C de incubación (Kameyama et al 1999), y además en los resultados preliminares de este trabajo se encontró que fluctuaciones en la temperatura parecían influir en la aparición de placas claras en la infección de la cepa *E. coli* W3110. Por tanto, se realizó un ensayo de goteo de distintas cepas de mEp021

(claras y turbias) sobre esta cepa bacteriana, con incubaciones a 32 °C, 37 °C y 42 °C; el goteo se realizó con 5 μ L de distintas diluciones de cada semilla (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8}), y los resultados se resumen en la **figura 24**.

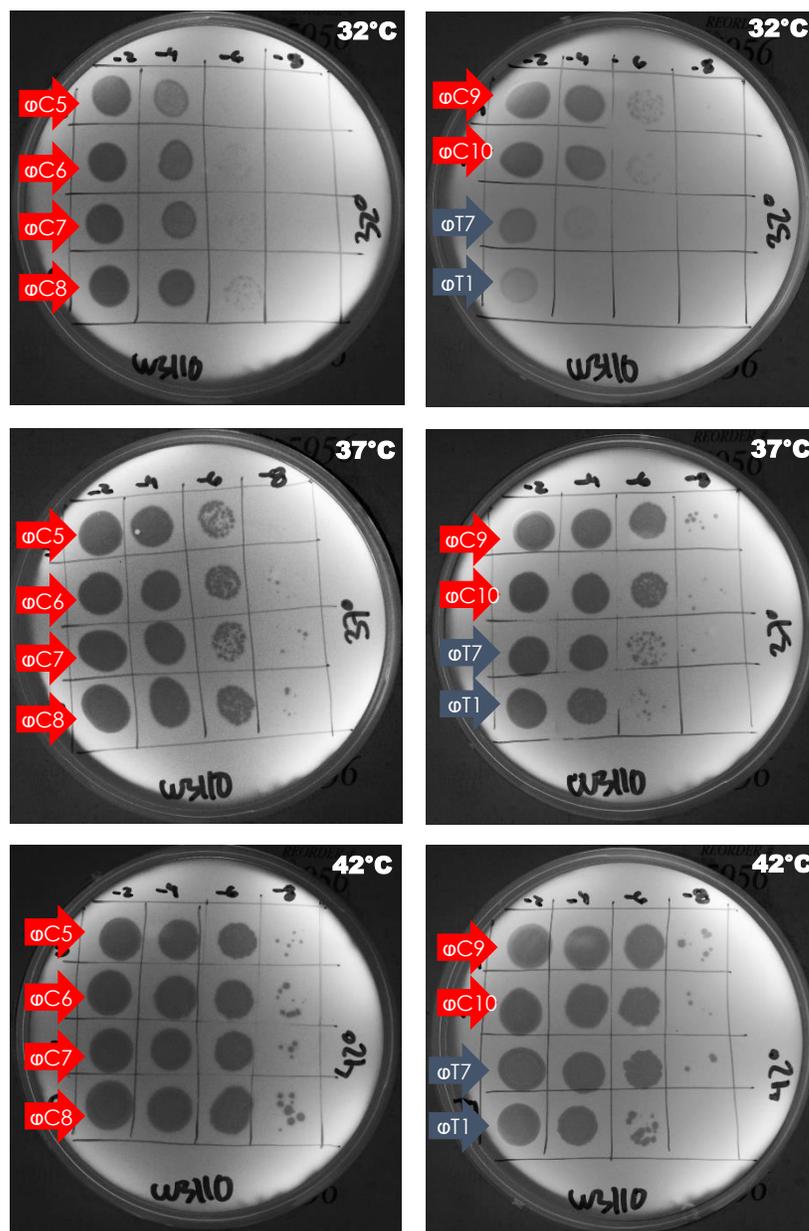


Figura 24. Análisis de crecimiento y fenotipo de mEp021 a 32, 37 y 42°C. Para este ensayo se escogió cepas de mEp021 de fenotipo claro y turbio respectivamente, de cada una se goteo 5 μ L de diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} sobre la cepa *E. coli* W3110 y se incubo por 18 horas a la temperatura indicada. Las cepas de fenotipo claro se indican con flechas de color rojo, de fenotipo turbio con color azul.

Como se observa en la **figura 24**, a 32°C el crecimiento es limitado pero parecen afectarse menos las cepas claras, hay infección hasta la dilución 10^{-6} aunque fenotípicamente se observan como si fuesen placas turbias. En el caso de las cepas turbias, solo se ve infección en las diluciones más bajas 10^{-2} y 10^{-4} . A 37°C se observa el título de cada cepa así como su fenotipo control claro o turbio. El hallazgo más importante ocurre a 42°C, donde todas las cepas utilizadas alcanzan su título equivalente a 37°C y son notoriamente claras. Este resultado resalta la adaptación funcional de mEp021 para ser más eficiente, o replicativo, o bien más virulento a temperaturas mayores a 37°C y la opuesta restricción o impedimento a 32°C. Aun así, es de notar que las cepas claras parecen tener menos impedimento a 32°C, ya que disminuye el título 2 órdenes de magnitud en vez de casi 4 órdenes de magnitud como en el caso de las cepas turbias. De esto se puede inferir que fagos que producen placas claras tienen mayor ventaja en su desarrollo a temperaturas menores a 37°C.

5. Análisis de estabilidad del fenotipo y obtención de nuevas lisógenas

Con la finalidad de discernir si la aparición de placas claras se debe a mutaciones espontáneas en el genoma de mEp021, se realizaron pases sucesivos a partir de 4 cepas: mEp021 (semilla original), ϕ T1, ϕ T2 y ϕ T10, considerando que ϕ T2 tiene la variación del gen de la proteína J y que ϕ T10 proviene de la lisógena que arrojó la mayor proporción de placas claras versus turbias (23%). De las cepas ϕ T1, ϕ T2 y ϕ T10 (cada una proveniente de una placa aislada) se dio un primer pase por amplificación por placa confluyente y un segundo pase por lisado en medio líquido. Para los pases 2 y 3 se seleccionó solo una placa turbia debidamente aislada.

En la siguiente tabla (**tabla 4**) se muestra la contabilización de placas en cada pase sucesivo, para lo que se preparó infección sobre *E. coli* W3110 estimando la cantidad de virus para contabilizar ~100-200 placas por caja. En los pases 2 y 3 se realizó observación en placas confluentes, y se contabilizó el número, el cual se muestra en la tabla para cada una. Se puede concluir que luego del primer pase (el bacteriófago original proviene de propagación por lisado en cultivo líquido) el fenotipo es invariablemente turbio, incluso en la observación de placas confluyente sobre tapiz de W3110, o más apropiadamente podemos decir que existe menos de una placa clara en $\sim 1 \times 10^5$ placas turbias.

Tabla 4. Contabilización de placas para la caracterización de fenotipo de fagos turbios en pase sucesivos. En cada casilla se muestra el número de placas contabilizadas, luego del símbolo “;” el número de placas claras contabilizadas y entre paréntesis la estimación por observación en placas confluentes. Para los pases, cada placa aislada fue tomada y resuspendida en 50 μ L de TMG. Para conteo de placas aisladas se goteó 5 μ L de una dilución 1/100, para observación en confluyente se empleó 15 μ L sin diluir; el título promedio para cada placa en 50 μ L de TMG fue del orden $\sim 10^6$ ufp/mL.

cepa	Pase #1	Pase #2	Pase #3
mEp021	1344;10	1257 (<1:10 ⁵)	929 (<1:10 ⁵)
ϕ T1	1278;0	791 (<1:10 ⁵)	861 (<1:10 ⁵)
ϕ T2	1752;1	899 (<1:10 ⁵)	736 (<1:10 ⁵)
ϕ T10	1283;0	785 (<1:10 ⁵)	445 (<1:10 ⁵)

Con los bacteriófagos ϕ T1, ϕ T2 y ϕ T10 seleccionados estrictamente de una sola placa turbia, se realizó un cuarto pase, para luego hacer el procedimiento para obtención de lisógenas W3110 [mEp021]; luego se caracterizó la progenie para contabilizar placas claras versus turbias. Para ello se preparó una incubación de cada cepa por 24 horas a 37°C a 250 rpm. A 1 mL de sobrenadante, se agregó 150 μ L de cloroformo y se mezcló por 10 segundos para eliminar células, luego se centrifugó a 12,000g por 5

minutos, se conservó el sobrenadante con las partículas virales a 4°C hasta su uso.

Para facilitar la enumeración de las placas y de visualización del fenotipo se preparó la infección para obtener sobre el tapiz entre 100-200 placas por caja (**tabla 5**).

Tabla 5. Contabilización de placas para la caracterización del fenotipo de progenie de lisógenas W3110 [mEp021] de segunda generación (LSG²). En cada casilla se muestra el número de placas contabilizadas, luego del símbolo “;” el número de placas claras contabilizadas.

cepa	5 µL de sobrenadante	50 µL de sobrenadante	% C/T
LSG ² 1	688;8	10X;n	1.2%
LSG ² 2	469;1	10X;5	0.2%
LSG ² 10	652;0	10X;2	0.03%

Con estos resultados podemos confirmar que la aparición de placas claras no depende de la pérdida de un fragmento del gen de la proteína J, además que la proporción de placas claras con respecto a las turbias es variable y oscila en estas lisógenas entre 1.2 y 0.03% con 0.48% en promedio. Es decir, al menos una placa clara por cada 200 placas turbias, lo que es significativo considerando que en pases consecutivos se obtuvo el valor referencial de <1 en 100,000. Este hallazgo es indicativo de que la aparición de cepas con fenotipo claro se podría deber a una atípica frecuencia de mutaciones o alteraciones, asociada probablemente a la inducción del profago o salida del estado de lisogenia.

6. Análisis de lisógenas del bacteriófago Lambda

Para demostrar que la aparición de placas claras en mEp021 es un fenómeno intrínseco de mEp021, o bien de la cepa hospedero, o de ambos, se decidió estudiar este fenómeno en comparación con el

bacteriófago Lambda, que es también temperado e infecta a la misma célula huésped *E. coli*. Siguiendo los mismos procedimientos que para mEp021, se obtuvo 6 cepas lisógenas W3110(Lambda) y se caracterizó su sobrenadante (**tabla 6**)

Tabla 6. Contabilización de placas para la caracterización del fenotipo de progenie de lisógenas W3110[Lambda].

cepa	5 µL sobrenadante	C/T
LSG1 lambda	250;0	0.00%
LSG2 lambda	260;0	0.00%
LSG3 lambda	451;0	0.00%
LSG4 lambda	357;0	0.00%
LSG5 lambda	759;1	0.13%
LSG6 lambda	765;0	0.00%

En la evaluación de la progenie de lisógenas de lambda encontramos una sola placa clara, aunque no se descartó una posible contaminación. Igualmente se debe notar la diferencia numérica en la cantidad de placas contabilizadas para cada cepa, aunque se emplearon 6 en este caso para incrementar la significancia. Ello se debe en parte, a que la frecuencia de inducción del profago lambda es menor que la de mEp021, lo que se traduce en progenies con menos virus. Podemos afirmar que la frecuencia de aparición del fenotipo claro es mucho mayor para mEp021 que para lambda, (que podríamos considerar en promedio 0.02% o una placa clara por cada 5,000). También, con este ensayo se puede inferir que el fenómeno de aparición de posibles mutantes no se debe a la tasa de mutación intrínseca de la cepa hospedadora *E. coli* W3110.

Con la finalidad de dar soporte estadístico a esta aseveración, se compararon los valores referenciales obtenidos, sobre la proporción de claras y turbias para cepas lisógenas W3110, tanto para mEp021 como para lambda respectivamente (**tabla 7**). Asumiendo una distribución normal en las frecuencias (claras/turbias) para cada cepa de fago, se realizó el análisis T de Student con el programa *GraphPad Prism* (version 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). La **figura 25** muestra la distribución de las frecuencias (C/T) encontradas, así como los intervalos de confianza (95%). Se encontró que la diferencia en las frecuencias para las cepas lisógenas de mEp021 en comparación con las de lambda, es estadísticamente significativa ($p < 0.05$), aun cuando se elimina los valores más grandes (W3110[mEp021] cepas LSG 4 y 5 respectivamente; **figura 25, derecha**).

Tabla 7. Valores referenciales de placas claras versus turbias para 6 cepas E coli W3110 lisógenas para lambda y mEp021. Con esta selección de valores se realizó análisis estadístico con el programa *GraphPad Prism* v 6.0 para deducir que las diferencias encontradas son estadísticamente significativas.

cepa	30 μ L sobrenadante	C/T	cepa	5 μ L sobrenadante	C/T
LSG1 lambda	250;0	0,00%	LSG1 mEp021	300;1	0,33%
LSG2 lambda	260;0	0,00%	LSG2 mEp021	498;2	0,40%
LSG3 lambda	451;0	0,00%	LSG3 mEp021	422;1	0,24%
LSG4 lambda	357;0	0,00%	LSG4 mEp021	92;1	1,09%
LSG5 lambda	759;1	0,13%	LSG5 mEp021	688;8	1,16%
LSG6 lambda	765;0	0,00%	LSG6 mEp021	469;1	0,21%

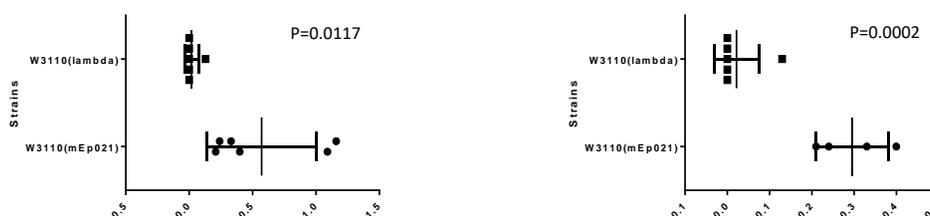


Figura 25. Gráfica del análisis estadístico para comparar la proporción de claras versus turbias en lisógenas de W3110 para mEp021 y lambda. Los gráficos muestran los valores de 6 cepas lisógenas obtenidas para cada bacteriófago, con el valor promedio e intervalos de desviación estándar

para cada una, y el valor p. En la parte izquierda se muestra el análisis global para 6 cepas de cada bacteriófago, y en la parte derecha se eliminó los valores de las LSG 5 y 6 de mEp021.

7. Selección y caracterización de cepas mEp021 de fenotipo de placa clara

Dado que el fenotipo claro de cepas seleccionadas a partir de una sola placa de mEp021 se preserva en los pases sucesivos, se procedió a comprobar si existiese alguna mutación en los genes *ant* (antirepresor) y *rep* (represor). A partir de las nuevas cepas lisógenas, se seleccionó 4 cepas que dan fenotipo claro (**figura 26**) y se les amplificó por PCR y luego secuenció los genes candidatos (estas fueron nombradas de forma similar a los anteriores pero con el superíndice 2 indicativo de segunda generación). En el caso de la región codificante del gen *ant* no se encontró ninguna mutación (**figura 27**) pero el gen *rep* presentó mutaciones en las 4 cepas seleccionadas (**figura 28**).

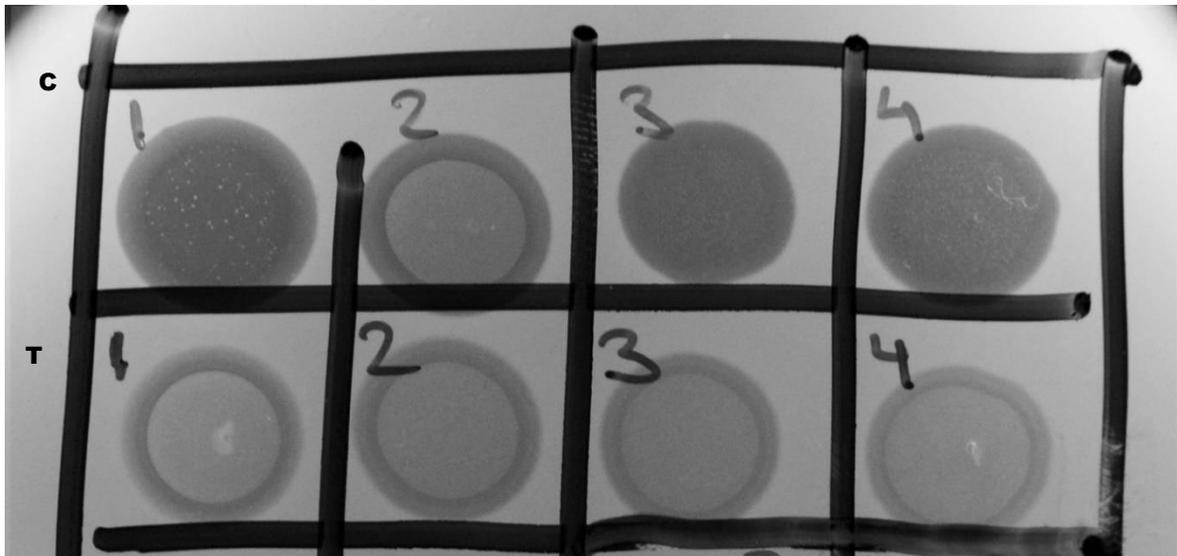


Figura 26. Fenotipo del goteo de las cepas de segunda generación de mEp021 sobre tapiz de *E. coli* W3110. La foto es una ampliación del goteo de 5 μ L de cada cepa (con título $\sim 10^{11}$ ufp/mL); En la parte de arriba se goteó fagos claros (ϕ^2C 1-4) y en la parte de abajo fagos turbios (ϕ^{2T} 1-4). Los números 1 y 2 son fagos que provienen de la cepa LSG²¹ y los numero 3 y 4 números son fagos que provienen de la cepa LSG²². A pesar de que el goteo de la cepa ϕ^2C2 es similar al fenotipo de los fagos turbios, se puede observar un halo traslucido por lo que fue clasificado como claro.

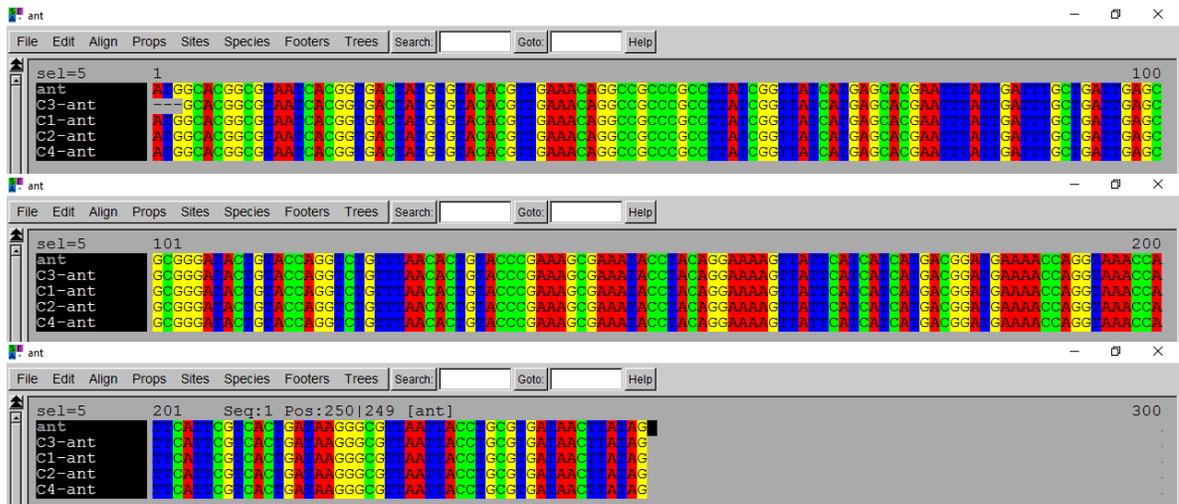


Figura 27. Alineación de las secuencias nucleofídicas obtenidas del gen *ant* de las cepas ω^2C 1-4. (En anexos, Electroferogramas 2)

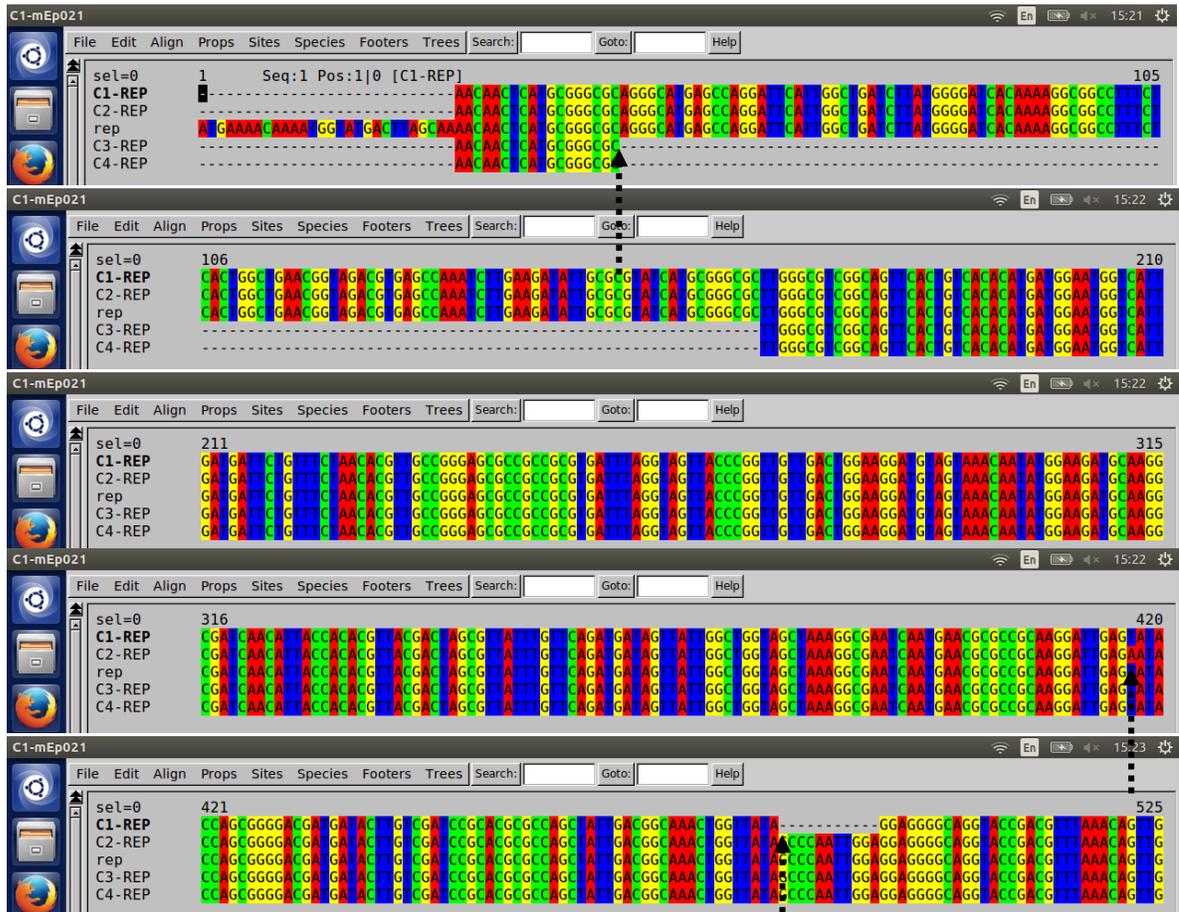


Figura 28. Alineación de las secuencias nucleofídicas obtenidas del gen *rep* de las cepas ω^2C 1-4. (en anexos, Electroferogramas 3)

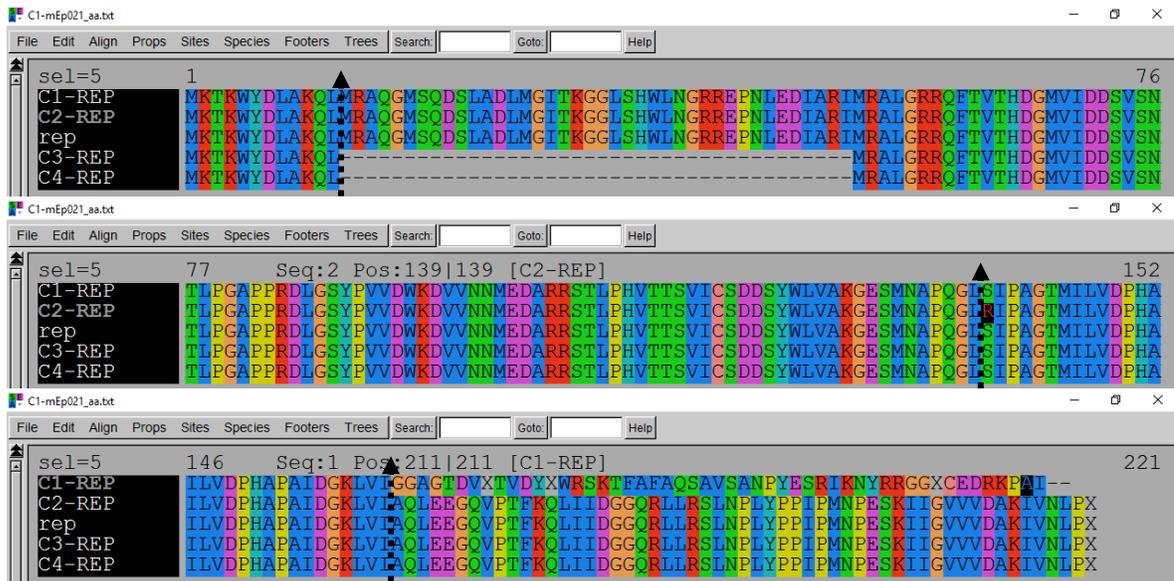


Figura 29. Alineación de las secuencias aminoacídicas obtenidas del gen rep de las cepas φ^2 C 1-4

Del análisis de la secuencia del gen represor de los cuatro fagos con fenotipo claro, se encontraron cambios importantes en cada uno: la cepa φ^2 C1 tiene una eliminación de 11 nucleótidos que interrumpe el marco de lectura en el extremo carboxilo terminal; la cepa φ^2 C2 tiene un cambio de una Timina por una Adenina que a su vez genera una el cambio del aminoácido en la posición 139 de Serina por Arginina; las cepas φ^2 C3 y φ^2 C4 tienen una pérdida de 120 nucleótidos, aun así se preserva el marco de lectura para generar una proteína con 40 aminoácidos menos teóricamente (**Figura 29**). Estos cambios concuerdan con el fenotipo de placa encontrado para los fagos aislados.

Es importante destacar que la mayoría de cambios espontáneos o inducidos para conseguir variantes virulentas en bacteriófagos temperados, corresponden generalmente a mutaciones puntuales que afectan la interacción con el DNA en la región operadora o bien en los dominios de interacción de la proteína represora para formar homodímeros. De los resultados obtenidos, dos de las variantes presentan

pérdidas importantes en el gen *rep*, y la más grande de 120 nucleótidos está flanqueada por una secuencia repetida de 12 nucleótidos: TCATGCGGGCGC. Esta secuencia se encuentra solamente en este gen, pero es de destacar que la secuencia de 8 nucleótidos GCGGGCGC se encuentra 7 veces en mEp021. Esta evidencia podría ser indicativa que exista una posible recombinasa secuencia específica, que podría ser la responsable de la pérdida de material genético en el genoma de mEp021; sin embargo ninguna de estas dos secuencias se encuentra en el gen de la proteína J.

8. Evaluación de mEp021 en cepas *E. coli* de distinto contexto genético

Con dos regiones variables ya definidas, en el gen que codifica para la proteína represora y la proteína estructural J, fue necesario evaluar si las mutaciones encontradas son consecuencia de factores propios de la cepa hospedadora o del virus; en segundo lugar, dado que constituyen eliminaciones definidas de DNA, descartar la posibilidad de que se deba específicamente a una enzima recombinasa del huésped; y finalmente, evaluar si la proporción de placas claras en relación a placas turbias es afectado por el contexto genético de la cepa *E. coli*.

El abordaje consistió en la caracterización de la progenie de lisógenas obtenidas de una cepa de mEp021 silvestre. Las cepas utilizadas fueron las anotadas en la **tabla 8a**, y fueron escogidas considerando sus mutaciones en los sistemas de recombinación y metilación prioritariamente. Los resultados obtenidos en la contabilización de placas se describen en la **tabla 8b**.

Tabla 8a. Cepas de *E. coli* con distinto contexto genético para la evaluación de fenotipo de placa de mEp021.

Cepa	Genotipo relevante
<i>E. coli</i> W3110	F- λ - IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph1</i>
<i>E. coli</i> BW25113	F- λ - <i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} <i>rph1</i>
<i>E. coli</i> JW2669	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recA</i>
<i>E. coli</i> JW2788	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recB</i>
<i>E. coli</i> JW2790	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recC</i>
<i>E. coli</i> JW2787	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recD</i>
<i>E. coli</i> DH5a	F- λ - <i>endA1 glnV44 thi-</i> <i>1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K-m_K</i> ⁺),
<i>E. coli</i> BL21	F- <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B</i> ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-</i> <i>T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)
<i>E. coli</i> GM271	F-, <i>dcm6, hsdR2, ara14, leuB6, tonA31, lacY1, tsx78,</i> <i>supE44, galK2 hisG4, rpsL136, xyl5, mtl1, thi1</i>
<i>E. coli</i> GM2163	F-, <i>dam13, dcm6, hsdR2, ara14, lacY1, galK2, galKT22,</i> <i>xyl5, mtl1, rpsL136, tonA31, tsx78, supE44, mcrA, mcrB</i>

Tabla 8b. Contabilización y caracterización de la progenie de cepas *E. coli* [mEp021] con distinto contexto genético. Las cepas lisógenas progenitoras se identifica en la primera columna. Las columnas 6 y 7 corresponden a la caracterización de la progenie viral del sobrenadante de las cepas lisógenas al cuarto pase, después del símbolo "+" se enumera la cantidad de placas claras en ese sobrenadante. N=numero, μ L=microlitros, mL=millilitros, C/T=relación de placas claras entre placas turbias en porcentaje.

Cepa	Placas promedio	Factor de dilución	Vol μ L	titulo ufp/mL	Conteo 1	Conteo 2	Proporción C/T
W3110	400	100	5	8×10^6	300+1	498+2	0,4%
GM2163	21.5	1	30	7×10^2	17+2	22+4	15%
GM2163	15	1	30	5×10^2	10+1	18+1	8%
GM271	5	1	30	$1,67 \times 10^2$	5+0	5+0	0
GM271	5.5	1	30	$1,83 \times 10^2$	6+0	5+0	0
GM271	1	1	30	$3,3 \times 10^1$	1+0	0+1	50%?
GM271	2.5	1	30	$8,3 \times 10^1$	1+0	3+0	0
JW2669	5	1	30	$1,67 \times 10^2$	+	+	+
JW2788	77	1	30	$2,57 \times 10^3$	90+0	85+0	0
JW2790	5	1	30	$1,67 \times 10^2$	+	+	+
JW2787	9.5	1	30	$3,17 \times 10^2$	20+1	11+1	7%
JW2787	2.5	1	30	$8,33 \times 10^1$	4+0	1+0	0
JW2787	8	1	30	$2,67 \times 10^2$	11+0	11+0	0
JW2787	11.5	1	30	$3,83 \times 10^2$	9+0	11+3	14%
W3110	400	100	5	8×10^6	422+2	92+1	0,8%
DH5	394	100	5	$7,88 \times 10^6$	379+2	406+1	0,4%

Como se observa en la **tabla 8b**, la proporción de placas claras versus turbias parece ser variable en las cepas *E. coli* analizadas. Pero ello puede ser subjetivo, si se considera que la contabilización estuvo limitada a la tasa de inducción del virus en cada cepa, es decir, a la cantidad de progenie obtenida en el periodo de incubación.

Todos las 13 cepas de fenotipo claro fueron seleccionadas y amplificadas para caracterización del gen represor, así como del gen de la proteína J, también se seleccionó un fago turbio de cada cepa para caracterizar el gen J (**tabla 9**). Aun así, de los resultados obtenidos se puede concluir que el fenómeno de aparición de placas claras al parecer no está restringido a los genotipos de las cepas hospedadoras probadas, lo que sugiere que el factor responsable se encuentre en el bacteriófago mEp021. La hipótesis de que sea una recombinasa, pareciera corresponder con algunos genes putativos candidatos que se encuentran

en el genoma de mEp021, tales como: 3 posibles endonucleasas tipo *homing* (buscadoras de blanco, HNH), 2 homólogas al sistema de recombinación de lambda (*ninB* y *ninG*), una proteína esencial de recombinación (ERF), una posible resolvasa (RusA) y la proteína IPE que también tiene homología con una posible recombinasa de bacteriófago que no ha sido caracterizada.

Tabla 9. Caracterización del gen *rep* y *J* de cepas claras y turbias seleccionadas de lisógenas *E. coli* [mEp021] con distinto contexto genético. Las cepas progenitoras se indican en la primera columna. Las columnas 6 y 7 corresponden a la caracterización de la progenie viral del sobrenadante de las cepas lisógenas. (*) En esta cepa, la secuencia del gen *rep* fue de baja calidad por lo que no fue analizada. (En anexos, Electroferogramas 4)

ϕC	Amplicón Rep	proteína J	Cepa de origen	ϕT	Amplicón proteína J	Cepa de origen
C5	Δ1 pos 44	largo	LSG5	-	-	-
C6	Δ120nt	largo	LSG6	-	-	-
C7	V69G	largo	LSG7	-	-	-
C15	Δ120nt	largo	W3110-2	T15	largo	W3110-1
C16	Δ120nt	largo	W3110-2	T16	largo	W3110-2
C17	WT	largo	W3110-2	T17	largo	GM2163-1
C18	124stop	largo	GM2163-1	T18	largo	GM2163-2
C19	174stop	largo	GM2163-1	T19	largo	GM271-1
C20	*	largo	GM2163-1	T20	largo	GM271-2
C21	L56P	largo	GM2163-1	T21	Δ1002nt	GM271-4
C22	P10S	largo	GM2163-2	T22	largo	JW2788
C23	Δ120nt	largo	GM271-3	T23	largo	JW2787-1
C24	WT	largo	JW2787-4	T24	largo	JW2787-2
C25	Δ120nt	largo	JW2787-4	T25	largo	JW2787-3
C26	Δ120nt	largo	JW2787-4	T26	largo	JW2787-4
C27	WT	Δ1002nt	JW2787-1	T27	largo	GM271-3

9. Clonación de genes candidatos posiblemente relacionados al cambio de fase

Se seleccionaron los genes *dam*, *dcm*, *dcm2*, *rep* y *ant* de mEp021 como posibles candidatos relacionados con el cambio de fase de

mEp021. Para clonar estos genes, las construcciones se llevaron a cabo con métodos clásicos de restricción y ligación enzimática. El producto de PCR de cada gen fue clonado en el vector de transición pJET2.1, transformado en células competentes DH5a y seleccionadas en cajas de agar LB con ampicilina. Se obtuvieron plásmidos de las candidatas seleccionadas y fueron caracterizados por PCR gen-específico así como por análisis de restricción. Los plásmidos construidos y confirmados fueron cortados con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y luego purificados para clonación dirigido en el vector pKQV4 con los mismos sitios de restricción.

Las construcciones de pKQV4 con los genes de interés también se llevaron a cabo con métodos de rutina de restricción y ligación enzimática, transformando células competentes DH5a y seleccionadas en cajas de agar LB con ampicilina. Se obtuvieron plásmidos de las candidatas y fueron comprobados por PCR con cebadores dirigidos a los sitios adyacentes al sitio de clonación, así como por análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y luego fueron confirmadas por secuenciación tipo Sanger. Solo la construcción de pKQV4-DCM2 no se secuenció porque a pesar de dar positivo por PCR, no se logró obtener una clara y reproducible digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Los genes *dam* y *dcm* fueron clonados en colaboración con el estudiante de la licenciatura de QFB Noé Hernández de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN.

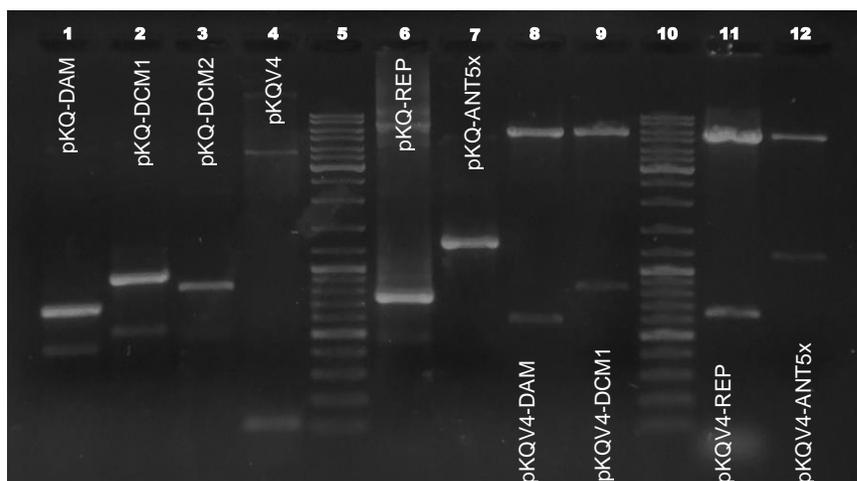


Figura 30. Gel de electroforesis para la comprobación de las construcciones en el vector pKQV4. Carriles 5 y 10 marcador de tamaño molecular (*Gene Ruler*); carriles 1,2,3,4,6,7 amplificación con cebadores de la región adyacente del sitio de clonación; carriles 8,9,11,12 digestión de los plásmidos con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*.

Tabla 10. Descripción de genes clonados y las construcciones y tamaños esperados en el vector pKQV4. nt = nucleótidos.

<u>Construcción</u>	<u>Vector</u>	<u>Inserto</u>	<u>Tamaño del gen (nt)</u>	<u>Tamaño Amplicón (pb)</u>	<u>Tamaño fragmento E-H (pb)</u>
pKQV4-DAM	pKQV4	DAM	540	698	600
pKQV4-DCM1	pKQV4	DCM1	759	941	843
pKQV4-DCM2	pKQV4	DCM2	738	853	755
pKQV4-REP	pKQV4	REP	648	750	652
pKQV4-ANT5x	pKQV4	ANT5x	1178	1296	1198
control	pKQV4	no	no	128	30

10. Evaluación de las construcciones en pKQV4 del gen *rep* y *ant*

Las construcciones obtenidas de los genes *rep* y *ant* fueron evaluadas con las cepas de mEp021 de fenotipo claro o turbio que se obtuvieron de W3110 lisógenas. En primer lugar, se goteó sobre la cepa DH5a transformada con el plásmido pKQV4-REP en presencia del inductor IPTG, pero tras probar varias concentraciones se encontró que incluso con 0,05 de IPTG se inhibe el crecimiento de la cepa bacteriana lo que impide la correcta formación del tapiz. Aun así, la fuga transcripcional del gen *rep* en el plásmido, resultó suficiente para observar el efecto de inhibición de la infección por mEp021 (datos no mostrados), por lo que se procedió a realizar un ensayo de infección a distintas temperaturas con las distintas cepas (**figura 31**).

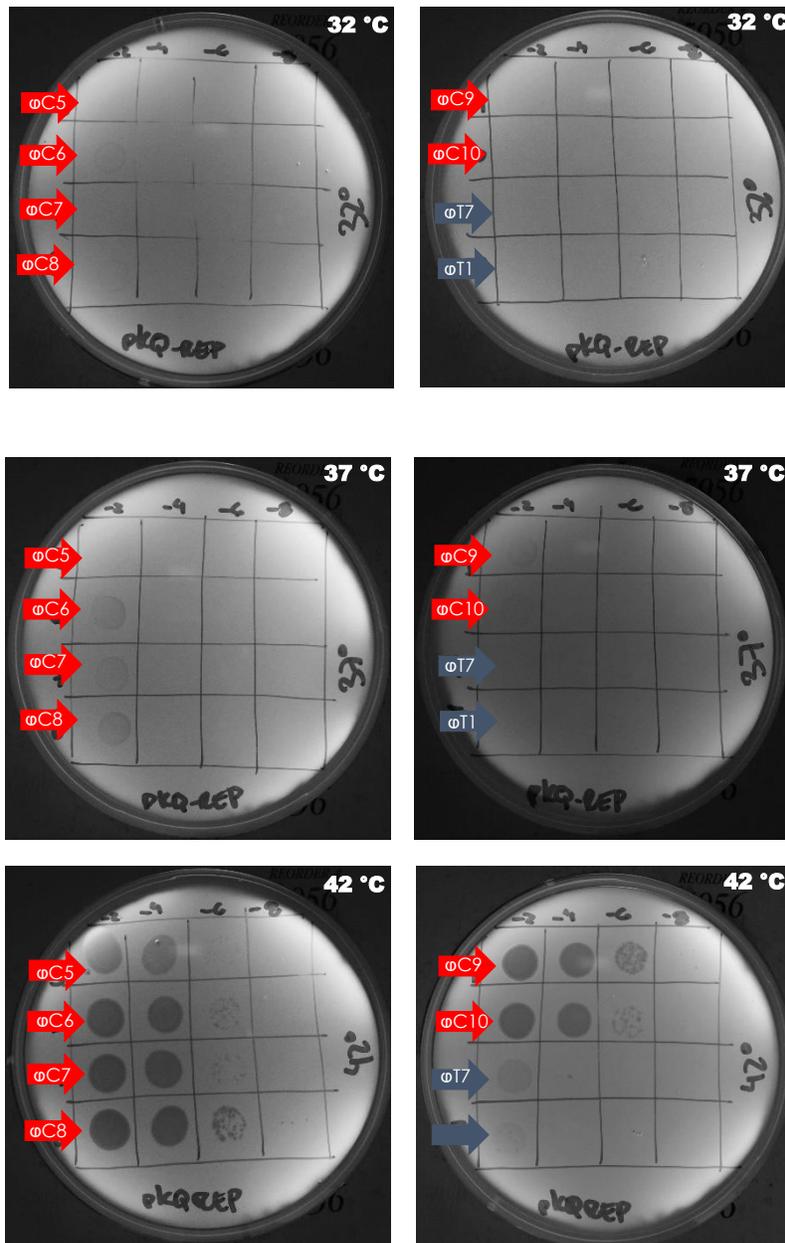


Figura 31. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa *E. coli* DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-REP e incubadas a 32, 37 y 42°C. De forma similar al ensayo de temperatura, para este ensayo se escogió cepas de mEp021 de fenotipo claro y turbio, de cada una se goteo 5 μ L de diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} sobre la cepa *E. coli* DH5-a con el plásmido pKQV4-REP y se incubo por 18 horas a la temperatura indicada. Las cepas de fenotipo claro se indican con flechas de color rojo, de fenotipo turbio con color azul. No se usó IPTG para este ensayo por el efecto en el crecimiento de la bacteria.

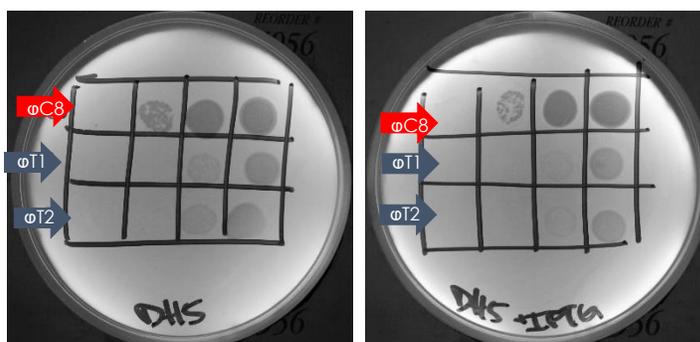
Como era de esperar, a 32°C como a 37°C no hay infección tanto de las cepas claras como de las cepas turbias. Sin embargo, a 42°C las cepas claras aún pueden replicarse aunque las cepas turbias

prácticamente no. Este hallazgo es inesperado, el represor no es termosensible ya que inhibe las cepas turbias utilizadas y por otro lado una explicación es que las cepas de fenotipo claro pudieran tener mutaciones y asociarse como heterodímeros disfuncionales permitiendo la infección de estas cepas, pero a 37°C este fenómeno debería verse igual que a 42°C, por lo cual la hipótesis es débil. Otra explicación, es que a 42°C se expresa el antirepresor de tal forma que contrarresta la actividad del represor y permite la infección.

Se puede concluir que el gen *rep* es el represor de mEp021 ya que cepas virulentas tiene este gen mutado, es responsable de la inmunidad, que el represor no es termosensible y que a 42°C existe alguna propiedad en las cepas de fenotipo claro que las hace insensibles a la actividad del represor natural.

Por otra parte, a la clonación del gen *ant* se le realizó goteo de fagos claros y turbios, donde se esperaba que el fenotipo de todas las cepas fuera de tipo claro ya que debería actuar antagónicamente al represor. Los resultados en la **figura 32** dan evidencia de que no hubo ninguna diferencia en el fenotipo de las cepas con respecto al control.

Cuando se analizó detalladamente la construcción y la secuencia del gen *ant*, se pudo distinguir que existe un segundo posible codón de inicio de traducción, y la proteína resultante tendría un segmento de 22 aminoácidos adicionales que podría afectar su funcionalidad (**figura 33**).



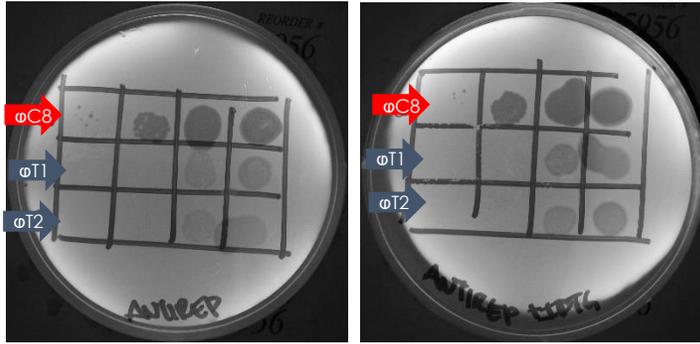


Figura 32. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa *E. coli* DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-ANT. Se goteo cepas de mEp021 de fenotipo claro y turbio sobre la cepa *E. coli* DH5-a con el plásmido pKQV4-ANT. De cada una se goteo 5 μ L de diluciones seriadas 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} y se incubo por 18 horas a la temperatura indicada. Las cepas de fenotipo claro se indican con flechas de color rojo, de fenotipo turbio con color azul. Se utilizó IPTG 0.5mM para la inducción.

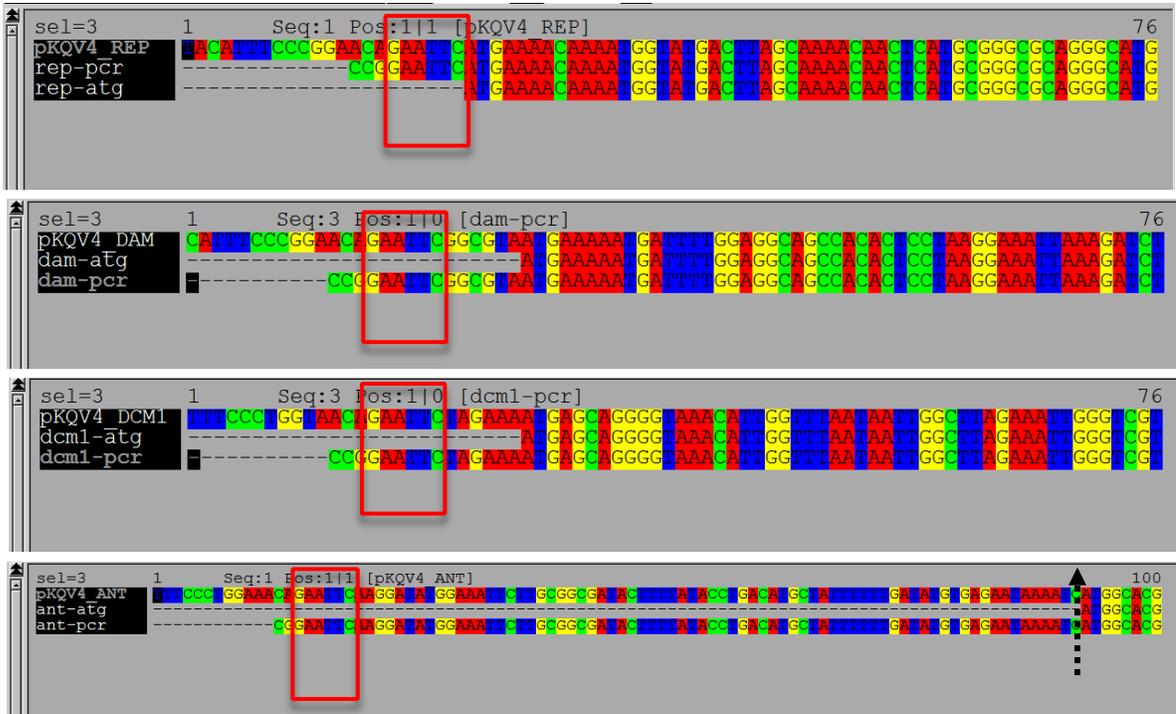


Figura 33. Alineación de las secuencias del vector pKQV4 con las clonaciones de los genes *rep*, *dam*, *dcm1*, y *ant* respectivamente. En cada caso se muestra la alineación de la secuencia del vector con inserto, luego la secuencia del gen desde el codón de inicio (ATG) y luego la secuencia del producto de PCR utilizado para la clonación. El recuadro color rojo muestra el sitio de restricción *EcoRI* (GAATTC) y la flecha color negro el codón de inicio del gen *ant*, distante del sitio de clonación y por tanto de las secuencias regulatorias para su expresión. (en anexos, Electroferogramas 5)

La secuencia clonada del gen *ant* fue seleccionada desde un sitio de inicio anterior al correcto, pero en el mismo marco de lectura. Por tanto, el producto esperado de la traducción contendría 22 aminoácidos extras en el extremo amino terminal que podrían afectar la función de la proteína.

Sin embargo, a pesar de tener una secuencia extra la proteína pudiera ser funcional y su aparente disfunción se deba a que requiriese de algún otro cofactor o proteína para su correcto funcionamiento. En consecuencia, se analizó la organización del gen y los circundantes, y se determinó que el gen *ant* se ubica dentro de una probable unidad transcripcional u operón, y que además está adyacente a una segunda putativa región operadora divergente (**figura 34**). Por estas razones, se decidió indagar sobre la función del antirepresor clonando nuevamente el gen *ant* desde el codón de inicio correcto y adicionalmente clonar el operón completo.

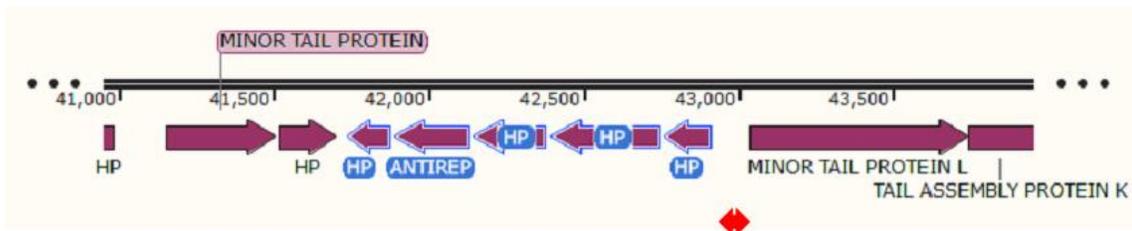


Figura 34. Esquema del arreglo del genoma de mEp021 cerca del gen *ant*. Los marcos de lectura seleccionados en azul corresponden a la putativa unidad transcripcional del gen *ant* que incluye 5 genes probables. HP: Proteínas hipotéticas. En flechas bidireccionales color rojo una putativa región operadora (otra putativa se encuentra adyacente al represor como en otros fagos temperados).

Una vez obtenidas las construcciones con la corrección del marco de lectura, se procedió a los ensayos microbiológicos por goteo sobre la cepa *E. coli* DH5a con el plásmido pKQV4-ANT2 (gen *ant* con codón de inicio corregido) y también con el plásmido pKQV4-ANT5x (operón completo, con 5 genes putativos).

Con el plásmido pKQV4-ANT2 y se encontró que aún sin inducción con IPTG existe inhibición del crecimiento de cepas de mEp021 de fenotipo claro o turbio (**Figura 35**). Contrariamente, cuando se realizó el goteo sobre la cepa DH5a con el plásmido pKQV4-ANT5x (operón completo, con 5 genes putativos) el fenotipo de las cepas de tipo turbio se cambió a claro (**Figura 35**).

Con estos resultados podemos inferir que el producto del gen *ant* de mEp021 puede funcionar como un regulador transcripcional que se asocia a una putativa región operadora importante para el desarrollo del bacteriófago, por lo que inhibe por sí solo la replicación del mismo, quizás entorpeciendo la regulación transcripcional. Por otra parte, la evidencia de que la expresión del operón completo genere el cambio de fenotipo de turbio a claro, puede indicar que existe otro producto que afecte directamente la función de Ant, permitiendo su función antagónica al represor como su nombre lo indica.

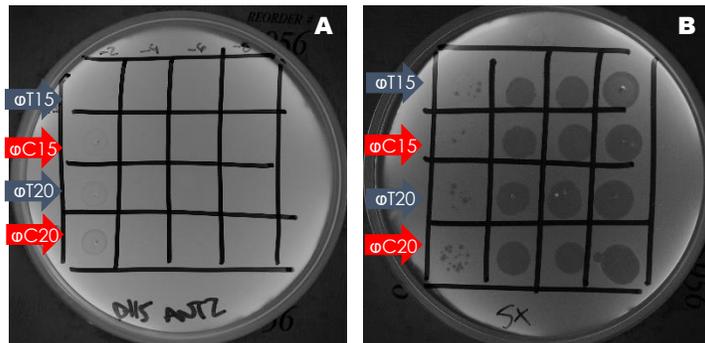


Figura 35. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa *E. coli* DH5- α transformada con el plásmido pKQV4-ANT2 y pKQV4-ANT-5X. En la parte A se muestra el goteo de las cepas turbias y claras con diluciones seriadas 10^{-2} a 10^{-8} sobre la cepa DH5- α transformada con el plásmido pKQV4-ANT2. En la parte B se muestra el goteo de las cepas turbias y claras con diluciones seriadas 10^{-8} a 10^{-2} sobre la cepa DH5- α transformada con el plásmido pKQV4-ANT-5X. No se realizó inducción con IPTG para fines comparativos; Aparentemente, la fuga transcripcional de los genes clonados en el vector pKQV4 pudiera producir efecto en la infección con mEp021.

11. Evaluación de las construcciones en pKQV4 del gen *DAM* y *DCM*

Al realizar el goteo sobre la cepa DH5a con el plásmido pKQV4-DAM así como con el plásmido pKQV4-DCM1 encontramos que con inducción con IPTG existe inhibición del crecimiento bacteriano (**Figura 36**). Aun así, considerando la fuga transcripcional intrínseca del plásmido, se realizó goteo de cepas de mEp021 de fenotipo claro y turbio. Con ambas construcciones pareciera que se restringe el crecimiento de mEp021, y las cepas de fenotipo claro se ven turbias.

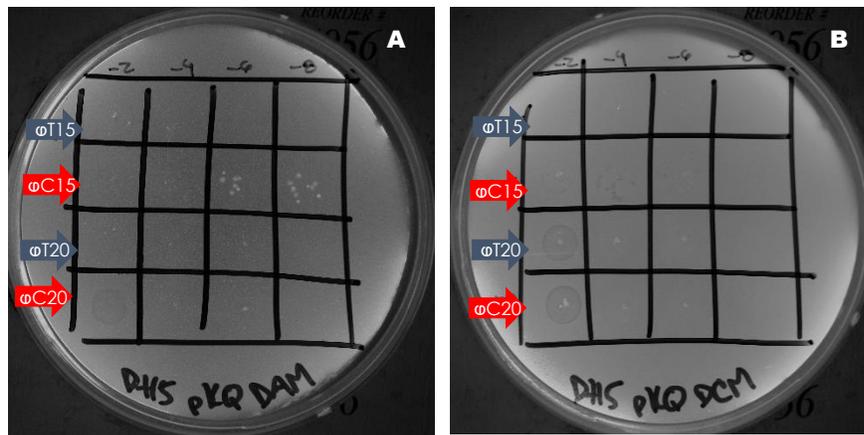


Figura 36. Goteo de cepas claras y turbias de mEp021 sobre cepa *E. coli* DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-DAM y pKQV4-DCM. Se muestra el goteo de las cepas turbias y claras con diluciones seriadas 10^{-2} a 10^{-8} sobre la cepa DH5-a transformada con el plásmido pKQV4-DAM (A) y con el plásmido pKQV4-DCM1 (B). No se realizó inducción con IPTG por la toxicidad sobre la cepa bacteriana.

DISCUSION

Con el bacteriófago mEp021, la contabilización de la progenie espontánea proveniente de una cepa lisógena, nos permitió encontrar un fenómeno inusual: la aparición de progenie virulenta, sin cambiar ninguna variable o emplear ningún estímulo. El primer abordaje de este proyecto fue demostrar que la aparición de esta progenie virulenta era reproducible y cuantificable.

De un primer análisis empírico, se encontró que distintas lisógenas producían proporciones variables de bacteriófagos de fenotipo de placa clara con valores de 0-23% y en promedio 3% (después de 9 pases sucesivos). Posteriormente, cuando se analizó pases sucesivos (de purificación) de cepas aisladas de fenotipo turbio, se encontró que no aparecieron placas claras en la contabilización, luego de un primer pase de selección o purificación del fenotipo. Numéricamente, podemos decir que en la replicación o pase sucesivo de una placa turbia, aparecen menos de $1:10^5$ placas claras.

Como la preservación de fenotipo en pases sucesivos de cepas claras o turbias se mantuvo, era probable que el fenómeno observado se debiera a la aparición espontánea (no inducida intencionalmente) de mutaciones en la región operadora, o bien mutaciones que inactivaran el represor o mutaciones de activación constitutiva del antirepresor. Pero la diferencia fue notable cuando se compararon la aparición de placas claras en la progenie proveniente de cepas lisógenas, con relación a la caracterización de placas de virus obtenidos por pases sucesivos (realizados por selección de placas y no a partir de lisados); por lo que, si fuera una elevada tasa de mutación intrínseca del virus, se debería encontrar frecuencias similares en ambos casos.

Con la finalidad de demostrar que este fenómeno es específico de mEp021, se comparó con el bacteriófago lambda. En este caso, se realizaron pases sucesivos para la purificación del fenotipo turbio y se obtuvieron nuevas cepas lisógenas de mEp021. Adicionalmente, la contabilización de la progenie fue más rigurosa tomando en cuenta: la reproducibilidad en los tiempos de incubación, la temperatura, identificación del fenotipo y en el número de placas contadas (>400 para cada cepa, antes se había contabilizado ~100 placas). Para mEp021 se obtuvo el promedio de 0.48% placas claras sobre turbias, es decir, al menos una placa clara por cada 200 placas turbias. Para el bacteriófago lambda se encontró solamente una placa clara en toda las lisógenas, en promedio 0.03% o una placa clara por cada 3,000 turbias. Con esto se puede concluir que la aparición de placas claras es mucho mayor para mEp021 que para Lambda y además que el fenómeno de aparición de mutantes parece no deberse a la tasa de mutación intrínseca. Por ejemplo, para lambda ha sido estimada en 5.8×10^{-7} (número de sustituciones por nucleótido por célula infectada, [Sanjuan & Calap 2016](#)). La comparación estadística arrojó resultados significativos ($p=0.0117$) para una diferencia entre ambos bacteriófagos de casi 2 órdenes de magnitud (**figura 25 y tabla 7**)

Por otro lado, cuando se analizaron las secuencias del gen represor y antirepresor de las cepas claras de mEp021 se encontró únicamente que existían mutaciones en el gen del represor. Fueron tres mutaciones diferentes: una mutación puntual, una eliminación de 11 nucleótidos y una eliminación de 120 nucleótidos (**figura 28**). La diversidad en las mutaciones encontradas en el gen represor resulta muy controversial ya que frecuentemente se reportan mutaciones puntuales, de las que existen: espontáneas (muy infrecuentes), y las inducidas que se generan

con agentes mutagénicos o presión selectiva (Refardt & Rainey, 2010; Meyer et al, 2012; Gandon, 2016). En el caso de mEp021 no solo la frecuencia fue notoriamente alta, sino que además incluyo la pérdida de un segmento de 11 pb así como de otro de 120 pb que además esta flanqueado por dos repetidos directos con la secuencia 5`-TCATGCGGGCGC-3` y que solo se encuentra 2 veces en el genoma de mEp021. La probabilidad de encontrar una secuencia específica de 12 nucleótidos es de 5.9×10^{-8} , y en un genoma de mEp021 (54,6Kb) es de 0.00325 (calculado de N/n^k , donde N=longitud del genoma, n= número de nt posibles en esa posición con igual probabilidad de aparición y k= longitud de la secuencia de interés).

Con la finalidad de descartar que los procesos de recombinación no eran factores de la cepa hospedadora, se obtuvieron lisógenas de ciertas cepas mutantes de *E. coli*, específicamente en aquellas mutantes relacionadas con los sistemas de metilación-restricción y recombinación-reparación (*dam*⁻, *dcm*⁻, *recA*⁻, *recB*⁻, *recC*⁻, y *recD*⁻). Cuando se analizó la progenie viral, se encontró que estas bacterias lisógenas producen una progenie mucho menor que la cepa de tipo silvestre. Además, en la mayoría de ellas se encontró diferentes proporciones de placas claras. En el caso particular de la cepa *E. coli* DH5- α [mEp021] la progenie viral fue de magnitud similar a la cepa *E. coli* W3110[mEp021] y también la proporción de placas claras en relación a turbias fue de 0.4%. Esto sugiere que la aparición de placas claras en el genoma de mEp021 pudiera deberse a un efecto intrínseco de mEp021 sobre la bacteria (o viceversa) durante los procesos asociado a la lisogenia.

Aunado a este hallazgo, los resultados de análisis del gen represor (de cepas de mEp021 de fenotipo claro provenientes de las cepas *E. coli* mutantes, **tabla 8**) por análisis de secuenciación muestran que la

eliminación de una región parece ser independiente del contexto genético de las cepas *E. coli* mutantes que se emplearon. Más aún, y en adición al estudio del cambio de fase del ciclo de vida de mEp021, se encontró otra región del genoma que parece variar con una frecuencia atípica, el gen que codifica para la proteína J. Es necesario evaluar si mutaciones de este tipo pudieran ocurrir en otras regiones del genoma del bacteriófago, así como también en el genoma de su hospedero.

La pérdida de un fragmento de 1002 pb en el gen *J*, parece ser consecuencia de una mutación frecuente, probablemente llevada a cabo por una enzima recombinasa. Aunque no genera ningún efecto fisiológico aparente (cepas mutadas y silvestres producen el mismo título de $\sim 1 \times 10^{11}$ en pases sucesivos, y tampoco afectan la selectividad por el putativo receptor, resultados no mostrados) puede existir alguna razón adaptativa para este fenómeno. Resulta interesante el hecho de que en el análisis informático se evidencia la existencia de múltiples repetidos en este gen en la región que codifica el extremo carboxilo terminal (**figura 32**). La región que se elimina también está flanqueado por dos repetidos directos con la secuencia 5`-GCTATTGCAGACGAAACGAAGGCA CGCACTGACGC-3` que solo se encuentra 2 veces en el genoma de mEp021 (con una probabilidad aparición en un genoma de 54,6Kb de $4,62 \times 10^{-20}$).

La caracterización de los genes *rep*, *ant*, *dam* y *dcm1* de mEp021 permitió confirmar su participación en la regulación del fenotipo del bacteriófago. El represor, como clásicamente se ha descrito, es el responsable del mantenimiento del estado lisogénico y de la inmunidad a la super-infección. El antirepresor actúa antagónicamente al represor probablemente uniéndose sobre la misma región operadora e impidiendo la interacción del represor, como puede deducirse de los

ensayos de infección de mEp021 sobre la cepa *E. coli* DH5a transformada con pKQV4-ANT2 (**figura 35**). Por su parte, la posible región regulatoria solo se logró identificar por su ubicación y organización del genoma de mEp021, el modelo propuesto de regulación de estas regiones sería el representado en la **figura 34**.

Otro hallazgo importante en la aparición del fenotipo de placa clara fue la infección con cepas turbias sobre la cepa *E. coli* DH5a transformada con pKQV4-ANT-5x, que notoriamente cambiaron a fenotipo de placa clara. Ello abre la posibilidad de que alguno de los otros genes putativos sea requerido para la función antagónica sobre el represor o sobre la lisogenia. Igualmente resulta llamativo el fenómeno de temperatura sobre el fenotipo de placa de mEp021, siendo de crecimiento restrictivo a 32°C pero aparentemente virulento a 42°C.

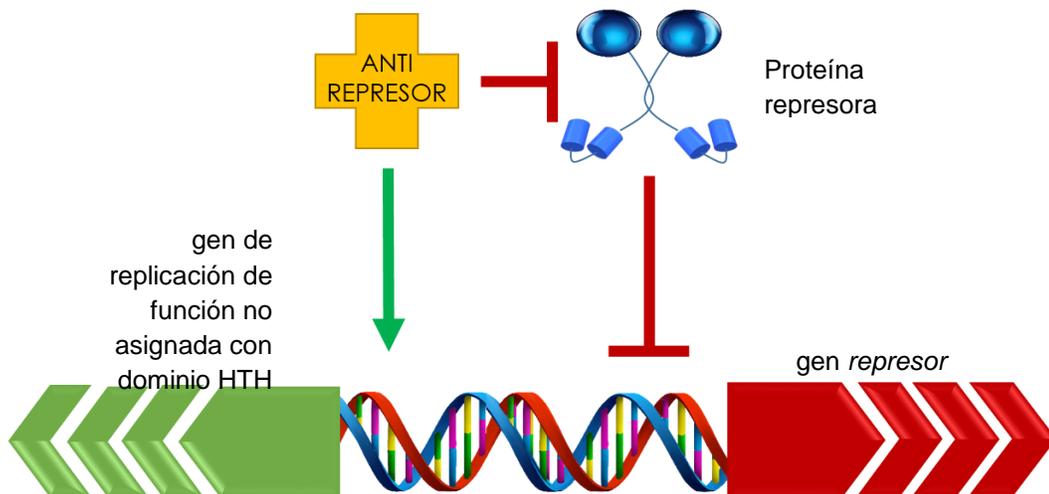


Figura 37. Modelo de regulación del interruptor molecular de mEp021.

En relación a la participación de Dam y Dcm1, solo se logró la clonación y expresión de estos genes, que por ser tóxicos para la bacteria pudieran serlo también para el bacteriófago mEp021, ya que en los ensayos de goteo restringen el crecimiento tanto de cepas claras como

turbias del virus (**figura 36**). El hecho de que produzcan dichos efectos, podría destacar su función como enzimas modificadoras del DNA. Estas enzimas son necesarias para la diferenciación del DNA propio o intruso así como de secuencias de regulación transcripcional (epigenética microbiana). Quedará para ensayos futuros la caracterización precisa de la función de estas enzimas así como de Dcm2.

En la búsqueda de algunos factores que podrían ser responsables de la variabilidad de mEp021, se logró identificar por búsqueda de dominios funcionales así como de homología de secuencias al menos 8 genes de interés tales como: 3 posibles endonucleasas tipo *homing* (buscadoras de blanco, HNH), 2 homólogas al sistema de recombinación de Lambda (ninB y ninG), una proteína esencial de recombinación (ERF), una posible resolvasa (RusA) y la proteína IPE que también tiene homología con una posible recombinasa de bacteriófago que no ha sido caracterizada. Aun así, la búsqueda fue limitada ya que alrededor de 2/3 partes de los marcos de lectura del genoma de mEp021, no tienen homología por lo que no se puede asignar ninguna función teórica.

El bacteriófago mEp021 pertenece al grupo de inmunidad mayoritario de una colección de virus aislados de intestino de personas mexicanas. El arsenal molecular de este virus podría esconder las razones por la que su genoma prevalece con esta frecuencia en el microbioma humano. Parte de su éxito biológico puede ser que subyace en los mecanismos de variabilidad genómica, por lo que los hallazgos de este trabajo resaltan la necesidad de la identificación y caracterización de los procesos moleculares que median la variación del genoma de mEp021.

La frecuencia atípica de aparición de mutaciones, la identificación de al menos 3 regiones de variabilidad así como la identificación de otros

posibles protagonistas moleculares en el genoma de mEp021 dejan un campo abierto para el entendimiento de la dinámica genómica de este virus. Esta evidencia no solo nos explicaría los mecanismos de adaptación de este bacteriófago sino que podrían expandirse a otros modelos biológicos incluso en el desarrollo de moduladores poblacionales en microambientes naturales o controlados.

CONCLUSIONES

- El bacteriófago mEp021 produce un fenotipo variable de placa, turbio o claro, con una tasa de ~0.5% (claro vs turbio) cuando se caracteriza la progenie de una célula *E. coli* W3110 lisógena.
- La aparición de estas placas claras se comparó con otras cepas de *E. coli* con distinto contexto genético, y los resultados sugieren que el fenómeno no depende de los genes asociados a reparación/recombinación de la cepa hospedadora.
- Este fenómeno solo se observa en progenie proveniente de células lisógenas de mEp021; la progenie de pases directos no genera esta proporción ($1 < 10^5$); las lisógenas de Lambda no generaron esta misma proporción (<0.03%).
- Se identificó la pérdida de material genético en al menos 2 regiones diferentes del genoma de mEp021, una en el gen represor (causante del fenotipo de placa clara) y otro en el gen de la proteína estructural J (sin aparente significancia fenotípica).
- Se encontró diversidad en las mutaciones encontradas en las cepas aisladas de fenotipo claro. Los fagos que generan placas claras tiene variaciones diferentes en región codificante del gen *rep* (mutaciones no sinónimas, eliminación de 1, 11 y 120pb en varias cepas).
- Las construcciones en el vector pKQV4 con los genes *rep*, *dam* y *dcm1* son tóxicas al inducir con IPTG; los genes *rep* y *ant2* inhiben la infección de mEp021, sin embargo, la construcción con el operón de anti-represión (pKQV4-ANT-5x) incrementa la virulencia de mEp021 y al parecer también la del bacteriófago lambda.

PERSPECTIVAS

Como complemento y consecución de este proyecto se recomiendan los siguientes:

- La caracterización de la región operadora principal y secundaria adyacentes al represor y antirepresor respectivamente.
- La identificación, clonación y caracterización de las posibles recombinasas o sistemas de recombinación del bacteriófago mEp021
- La evaluación de la variabilidad genética a lo largo de todo el genoma de mEp021 e identificar posibles factores que median la modulación de esta variabilidad.
- La caracterizar de los posibles sistemas de inmunidad y exclusión que podrían estar asociados a la función de los genes de recombinación y modificación del DNA.
- El estudio de la relevancia adaptativa de mEp021 relacionados con la interacción bacteriófago-hospedero, estrés, fluctuación poblacional y otros factores que podrían asociarse con el beneficio de su estabilidad o dinámica genómica.

BIBLIOGRAFÍA

Abrescia, N., Bamford, D., Grimes, J., & Stuart, D. (2012). **Structure unifies the viral universe**. Annual Review of Biochemistry, 81, 795-822.

Bamford D., Grimes J., Stuart D. **What does structure tell us about virus evolution?** Curr Opin Struct Biol. 2005 Dec;15(6):655-63.

Berngruber T., Lion S., Gandon S. (2015). **Spatial structure, transmission modes and the evolution of viral exploitation strategies**. PLoS Pathog. 2015 Apr 21;11(4):e1004810.

Canchaya C., Fournous G., Brüßow H. **The impact of prophages on bacterial chromosomes**. Mol Microbiol. 2004 Jul;53(1):9-18.

Claverie J., Abergel C. (2016). **Giant viruses: The difficult breaking of multiple epistemological barriers**. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2016 Mar 10. [Epub ahead of print]

Danovaro R., Corinaldesi C., Dell'anno A., Fuhrman J., Middelburg J., Noble R., Suttle C. (2011). **Marine viruses and global climate change**. FEMS Microbiol Rev. 2011 Nov;35(6):993-1034.

Darmon E., Leach D. R. F., (2014). **Bacterial Genome Instability**. Microbiol Mol Biol Rev. 2014 Mar;78(1):1-39.

Davies E., Winstanley C., Fothergill J., James C. (2016). **The role of temperate bacteriophages in bacterial infection**. FEMS Microbiol Lett. 2016 Mar;363(5).

Domingo-Calap P, Georgel P. and Bahram S. (2016) **Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools**. HLA. 2016 Mar;87(3):133-40.

Dove, W. (1971). **Biology inference, in: The Bacteriophage Lambda**. (A. D. Hershey, ed.), pp. 297-312, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY, 1971.

Forterre, P.(2016) **To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life**. Stud Hist Philos Biol Biomed Sci. 2016 Mar 17. [Epub ahead of print].

Forterre, P., & Prangishvili, D. (2013). **The major role of viruses in cellular evolution: facts and hypotheses.** *Current Opinion in Virology*, 2013. 3, 558-565.

Gandon S. (2016). **Why Be Temperate: Lessons from Bacteriophage λ .** *Trends Microbiol.* 2016 May;24(5):356-65.

Hendrix R. (2002). **Bacteriophages: evolution of the majority.** *Theor Popul Biol.* 2002 Jun;61(4):471-80.

Howe M., Bade E. (1975). **Molecular biology of bacteriophage μ .** *Science.* 1975 Nov 14;190(4215):624-32.

Hulo de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., & Le Mercier, P. (2011). **ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity.** *Nucleic Acids Research*, 2011, 39, D576eD582.

Kameyama L., Fernández L., Calderón J., Ortiz-Rojas A., Patterson T. (1999). **Characterization of wild lambdoid bacteriophages: detection of a wide distribution of phage immunity groups and identification of a nus-dependent, nonlambdoid phage group.** *Virology.* 1999 Oct 10;263(1):100-11.

Kameyama, L., Fernández, L., Bermúdez, R., García-Mena, J., Ishida, C., Guarneros G. (2001). **Properties of a new coliphage group from human intestinal flora,** in: *Recent Research Developments in Virology-II* (P. S. G. Ed.). Transworld Research Network, India, 2001, pp. 297e303.

Kim M, Ryu S. (2013). **Antirepression system associated with the life cycle switch in the temperate podoviridae phage SPC32H.** *J Virol.* 2013 Nov;87(21):11775-86.

Kristensen, D. M., Mushegian, A. R., Dolja, V. V., & Koonin, E. V. (2010). **New dimensions of the virus world discovered through metagenomics.** *Trends in Microbiology*, 18, 11-19.

Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix R, Bamford D. (2011). **Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere.** *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Dec;75(4):610-35.

Lastra L. (2013) thesis to obtain Master in Science degree. **Caracterización del Gen del Represor del Bacteriofago mEp021 de Escherichia Coli.** Mentors: Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe and Dr. Gabriel Guarneros Peña. Cinvestav. México, September, 2013

Lwoff A. (1953). **Lysogeny.** Bacteriol Rev. 1953 Dec;17(4):269-337.

Martínez-Peñañiel E, Fernández-Ramírez F, Ishida C, Reyes-Cortés R, Sepúlveda-Robles O, Guarneros-Peña G, Bermúdez-Cruz RM, Kameyama L. (2012). **Overexpression of Ipe protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death.** Biochimie. 2012 Jun;94(6):1262-73.

Martinez-Peñañiel, E., Fernandez Ramirez F. and Kameyama L. (2015). **The use of bacteriophages in the development of new alternatives in therapy. In: The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science.** (A. Méndez-Vilas Ed.) Volume 1. Technological Advances and Educational Programs. Publisher: Formatex Research Center. Spain, 2015.

Meyer J., Dobias D., Weitz J., Barrick J., Quick R., and Lenski R. (2012) **Repeatability and Contingency in the Evolution of a Key Innovation in Phage Lambda.** Science. January 27; 335(6067): 428–432.

Mittler J. (1996). **Evolution of the genetic switch in temperate bacteriophage. λ. Basic theory.** J Theor Biol. Mar 21;179(2):161-72.

Philippe, N., Legendre, M., Doutre, G., Couté, Y., Poirot, O., Lescot, M., et al. (2013). **Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes.** Science, 341, 281-286.

Ptashne M. (1992). In: **A Genetic Switch: Phage λ and Higher Organisms.** Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications.

Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., et al. (2004). **The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus.** Science, 306, 1344-1350.

Refardt D., Rainey P. (2010). **Tuning a genetic switch: experimental evolution and natural variation of prophage induction.** Evolution. Apr 1;64(4):1086-97

Rohwer F., Thurber R. (2009). **Viruses manipulate the marine environment.** Nature. May 14;459(7244):207-12.

Roux S., Enault F., Hurwitz B., Sullivan M. (2015). **VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data.** PeerJ. 2015 May 28;3:e985.

Sanjuan R., Domingo-Calap, P. (2016). **Mechanisms of viral mutation.** Cell. Mol. Life Sci. (2016) 73:4433–4448

Scott J. (1968). **Genetic Studies on Bacteriophage P1.** Virology, 36 pp 564-574.

Shieh G., Chang Y., Yang B., Jenn-Tu, Bau H., Kuo T. (1991). **Identification and nucleotide sequence analysis of an open reading frame involved in high-frequency conversion of turbid to clear plaque mutants of filamentous phage Cf1t.** Virology. 1991 Nov;185(1):316-22.

Stewart F., Levin B. (1984). **The population biology of bacterial viruses: why be temperate.** Theor Popul Biol. 1984 Aug;26(1):93-117.

Suttle C. (2007). **Marine viruses--major players in the global ecosystem.** Nat Rev Microbiol. 2007 Oct;5(10):801-12.

Suttle, C. (2013). **Viruses: unlocking the greatest biodiversity on Earth.** Genome, 56, 542-544.

Yarmolinsky & M. B. & Sternberg N. (1988). **Bacteriophage P1. In: The Bacteriophages** (Calender, R., ed.), pp. 291–438. New York: Plenum Press.

ANEXOS

Antibióticos

- Ampicilina: solución de almacenamiento de 40 mL con una concentración de 25 mg/mL (1g Ampicilina en 40 mL de ddH₂O). Filtrado y almacenado a -20°C. Concentración de uso en medio de cultivo 100 µg/mL.
- Cloranfenicol: solución de almacenamiento de 40 mL con una concentración de 7,5 mg/mL (300mg Cloranfenicol en 40 mL de etanol al 50% v/v). Almacenado a -20°C. Concentración de uso en medio de cultivo 30 µg/mL.
- Kanamicina: solución de almacenamiento de 40 mL con una concentración de 7,5 mg/mL (300mg Kanamicina en 40 mL de ddH₂O). Filtrado y almacenado a -20°C. Concentración de uso en medio de cultivo 30 µg/mL.
- Ácido Nalidíxico: solución de almacenamiento de 30 mL con una concentración de 30 mg/mL (900mg Acido Nalidíxico y 360mg NaOH y 30 mL de ddH₂O). Filtrado y almacenado a -20°C. Concentración de uso en medio de cultivo 30 µg/mL.

Medios de cultivo:

- medio LB (1L): 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g NaCl , disolver y llevar a 1 litro con agua bidestilada.
- LB agar (1L): 15g de agar, 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g NaCl , disolver y llevar a 1 litro con agua bidestilada.
- Agar suave(1L): 7,5g de agar, 10g de triptona, 5g de extracto de levadura, 10g NaCl , disolver y llevar a 1 litro con agua bidestilada.

Cepas bacterianas y plásmidos.

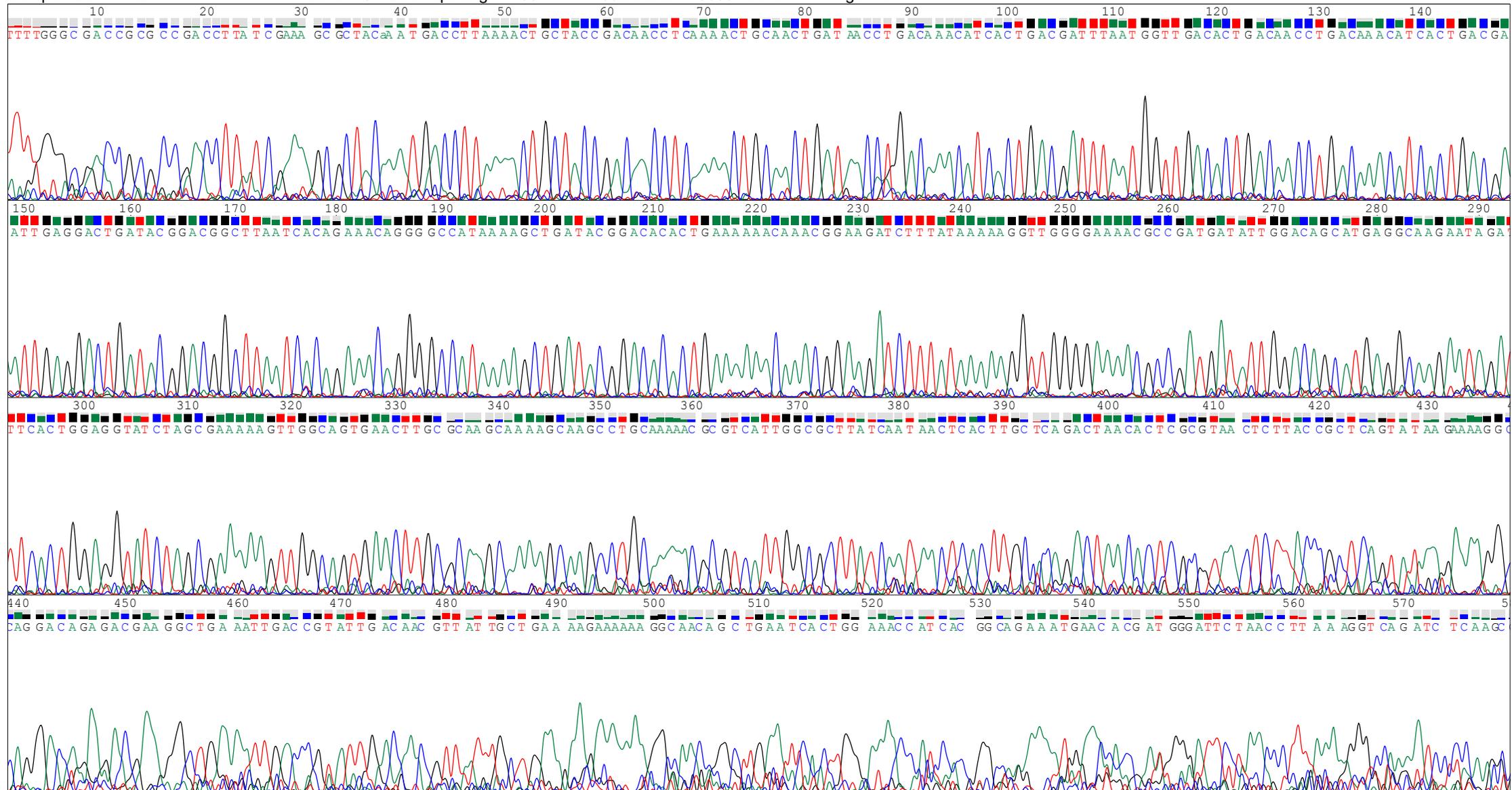
Cepa	Genotipo relevante
E. COLI W3110	F- λ - IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 <i>rph1</i>
E. COLI BW25113	F- λ - <i>lacI</i> ⁺ <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78} <i>rph1</i>
E. COLI JW2669	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recA</i>
E. COLI JW2788	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recB</i>
E. COLI JW2790	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recC</i>
E. COLI JW2787	<i>E. coli</i> BW25113 Δ <i>recD</i>
E. COLI DH5-A	F- λ - <i>endA1 glnV44 thi-1, recA1, relA1, gyrA96, deoR, nupG, purB20, ϕ80d, lacZΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169, hsdR17(<i>r_K-m_K</i>)⁺,</i>
E. COLI BL21	F- <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B-m_B-)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S)
E. COLI GM271	F-, <i>dcm6, hsdR2, ara14, leuB6, tonA31, lacY1, tsx78, supE44, galK2 hisG4, rpsL136, xyl5, mtl1, thi1</i>
E. COLI GM2163	F-, <i>dam13, dcm6, hsdR2, ara14, lacY1, galK2, galKT22, xyl5, mtl1, rpsL136, tonA31, tsx78, supE44, mcrA, mcrB</i>

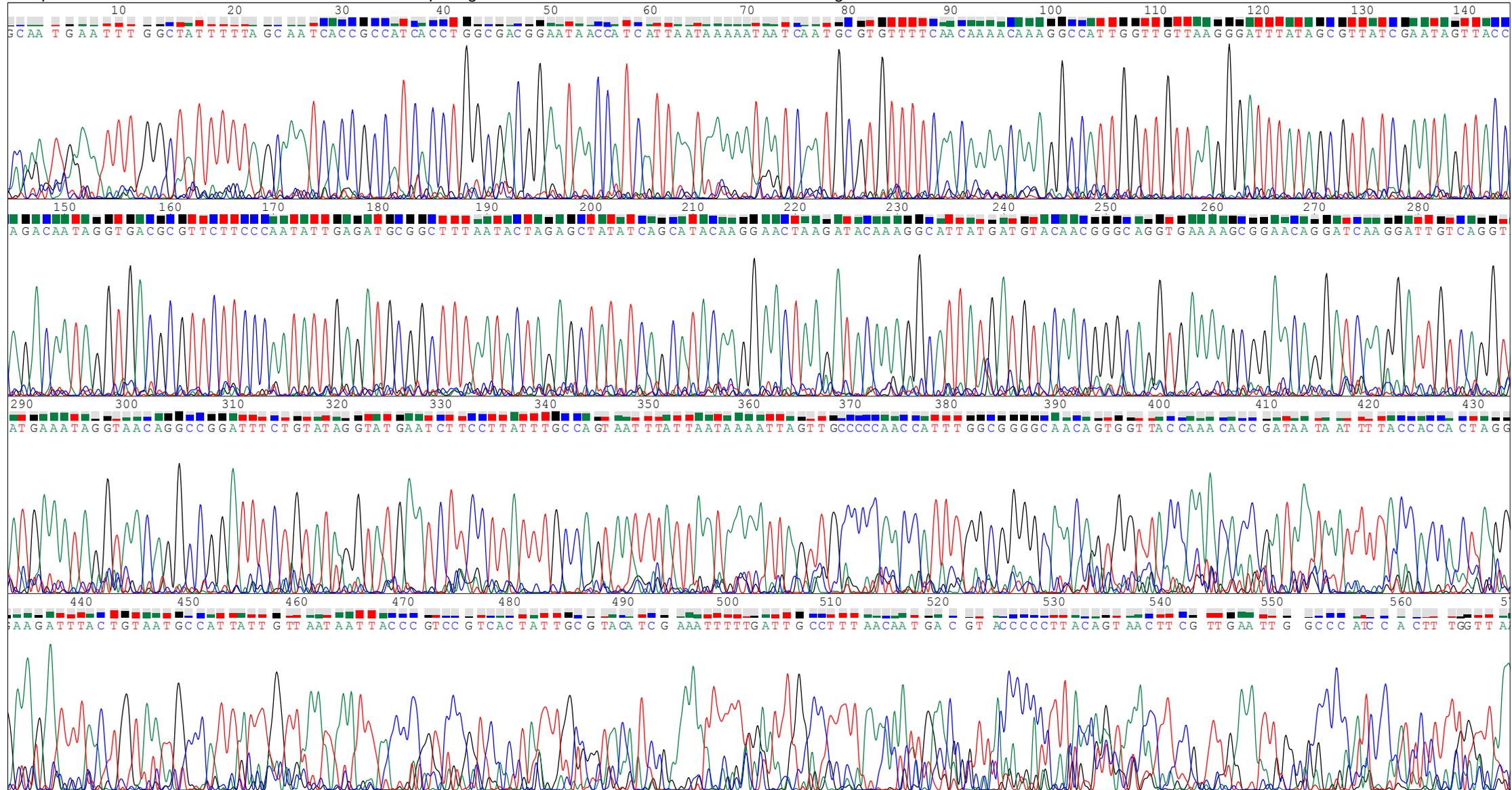
PLASMIDOS	Genotipo relevante	origen
PKQV4	ori pBR322, bla (ApR), promotor TAC, <i>lacI</i> ^q , <i>rrnB</i> -T1 y <i>rrnB</i> -T2.	Derivado de pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, OH),
pJet 2.1	rep (pMB1), bla (ApR), co471R, PlacUV5, T7 promoter	Thermo Scientific ®
PKQV4-REP	gen <i>rep</i> de mEp021	Este estudio, en pKQV4
PKQV4-ANT	gen <i>ant</i> de mEp021	Este estudio, en pKQV4

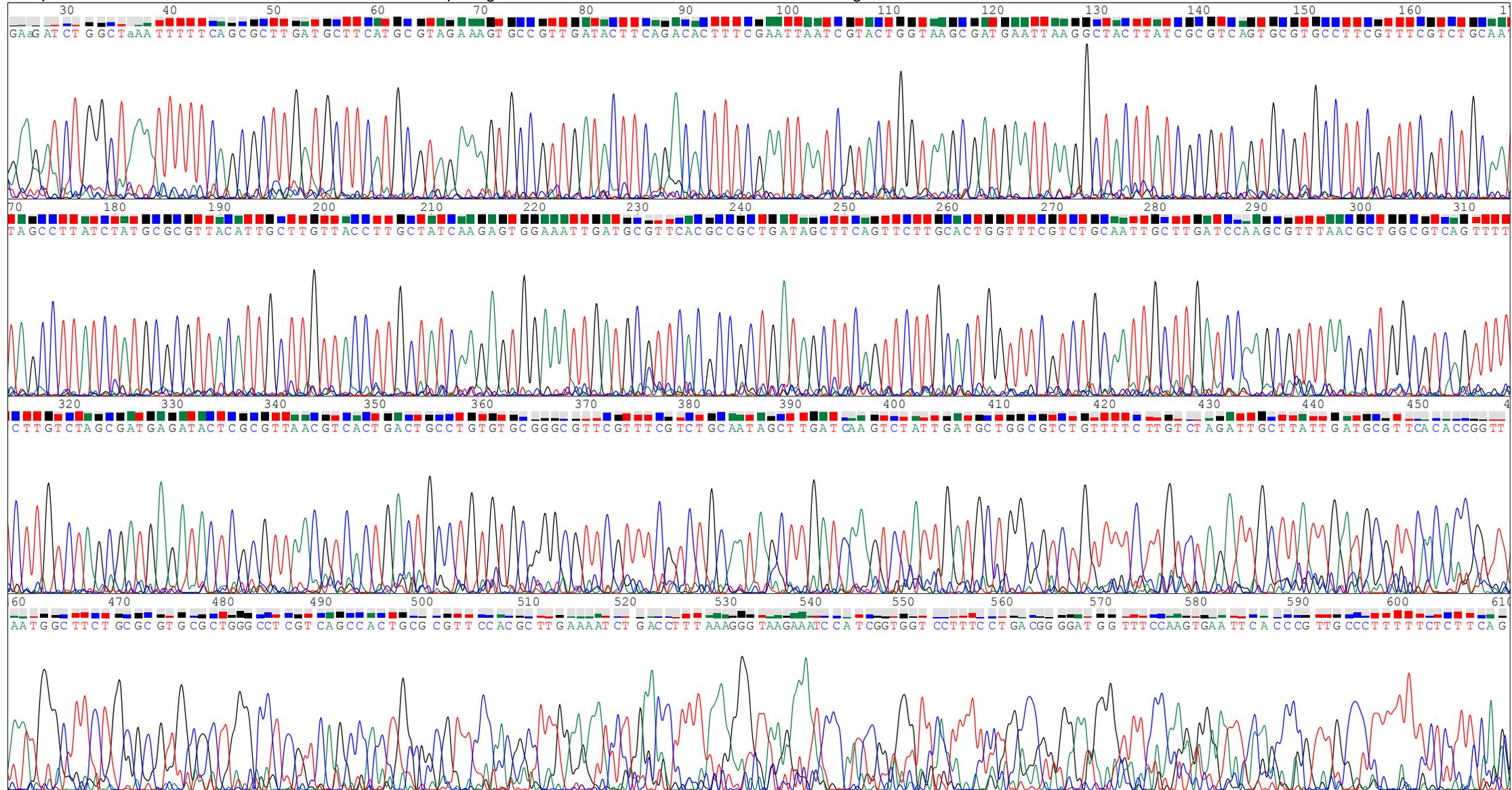
PKQV4-ANT2	gen <i>ant2</i> (segundo sitio ATG) de mEp021	Este estudio, en pKQV4
PKQV4-ANT5X	operon <i>ant</i> (5 ORFs) de mEp021	Este estudio, en pKQV4
PKQV4-DAM	gen <i>dam</i> de mEp021	Este estudio, en pKQV4
PKQV4-DCM1	gen <i>dcm1</i> de mEp021	Este estudio, en pKQV4
pJet 2.1-ANT2	gen <i>ant2</i> de mEp021	Este estudio, en pJet 2.1
pJet 2.1-DAM	gen <i>dam</i> de mEp021	Este estudio, en pJet 2.1
pJet 2.1-DCM1	gen <i>dcm1</i> de mEp021	Este estudio, en pJet 2.1
pJet 2.1-DCM2	gen <i>dcm2</i> de mEp021	Este estudio, en pJet 2.1

Electroferogramas 1

Secuenciación del gen de la proteína estructural J de la cepa ϕ T2, con los cebadores fw2, rv y rv3 (Figura 23). Con la flecha se indica la posición de eliminación de 1002 nt y con la línea roja la secuencia del repetido de 35 pb.

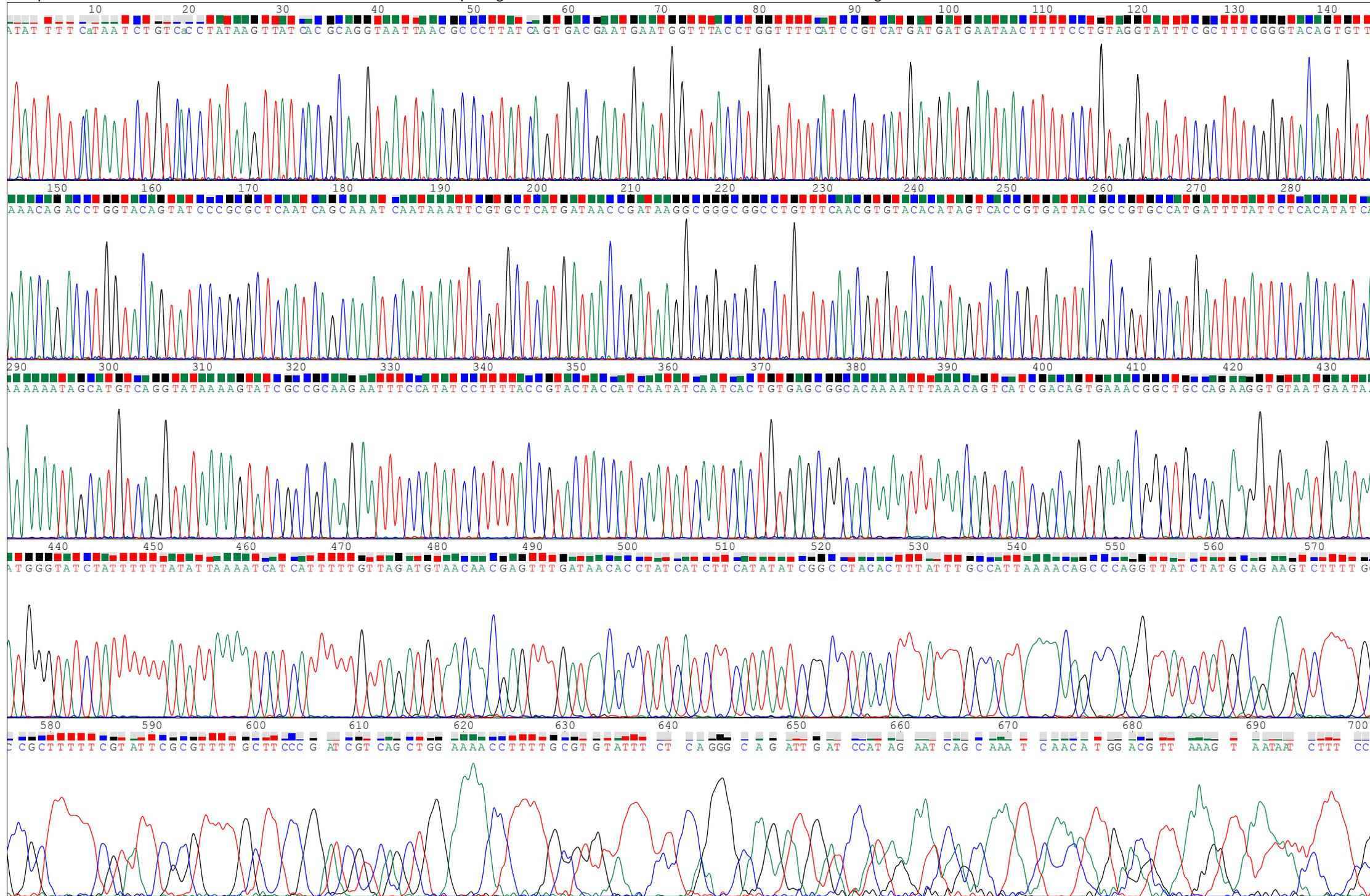


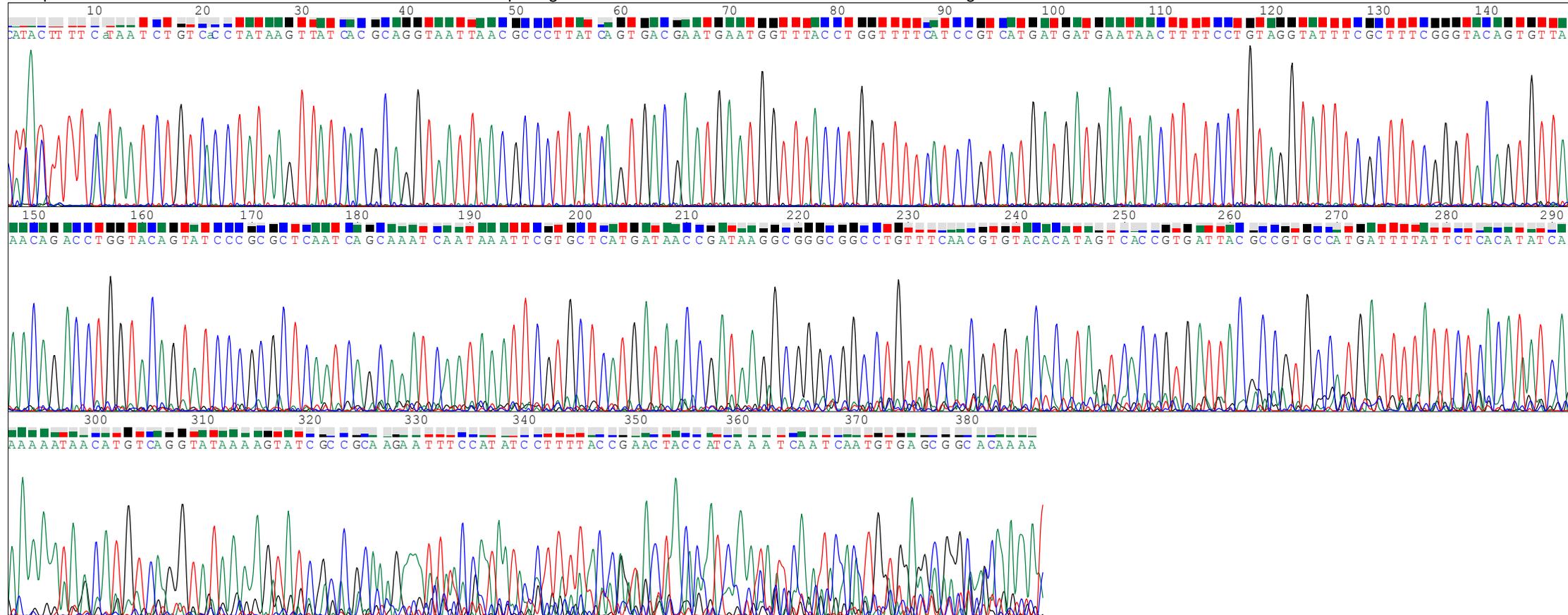


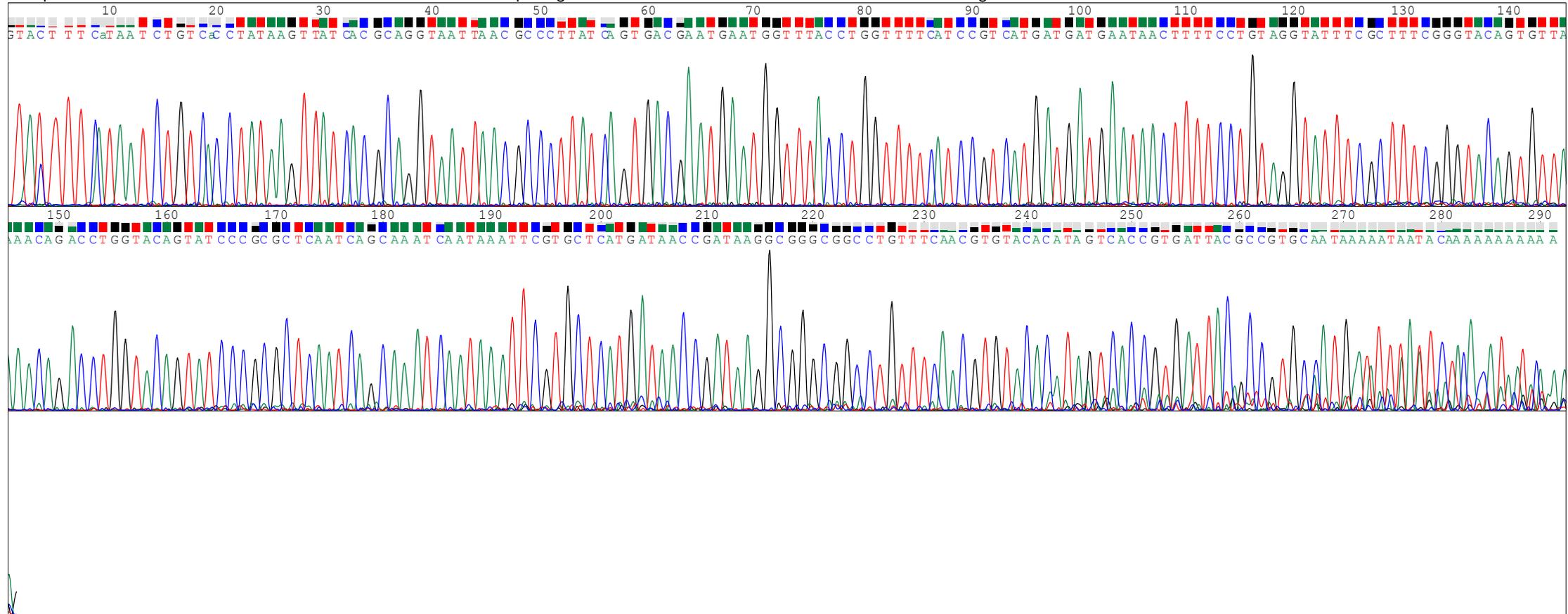


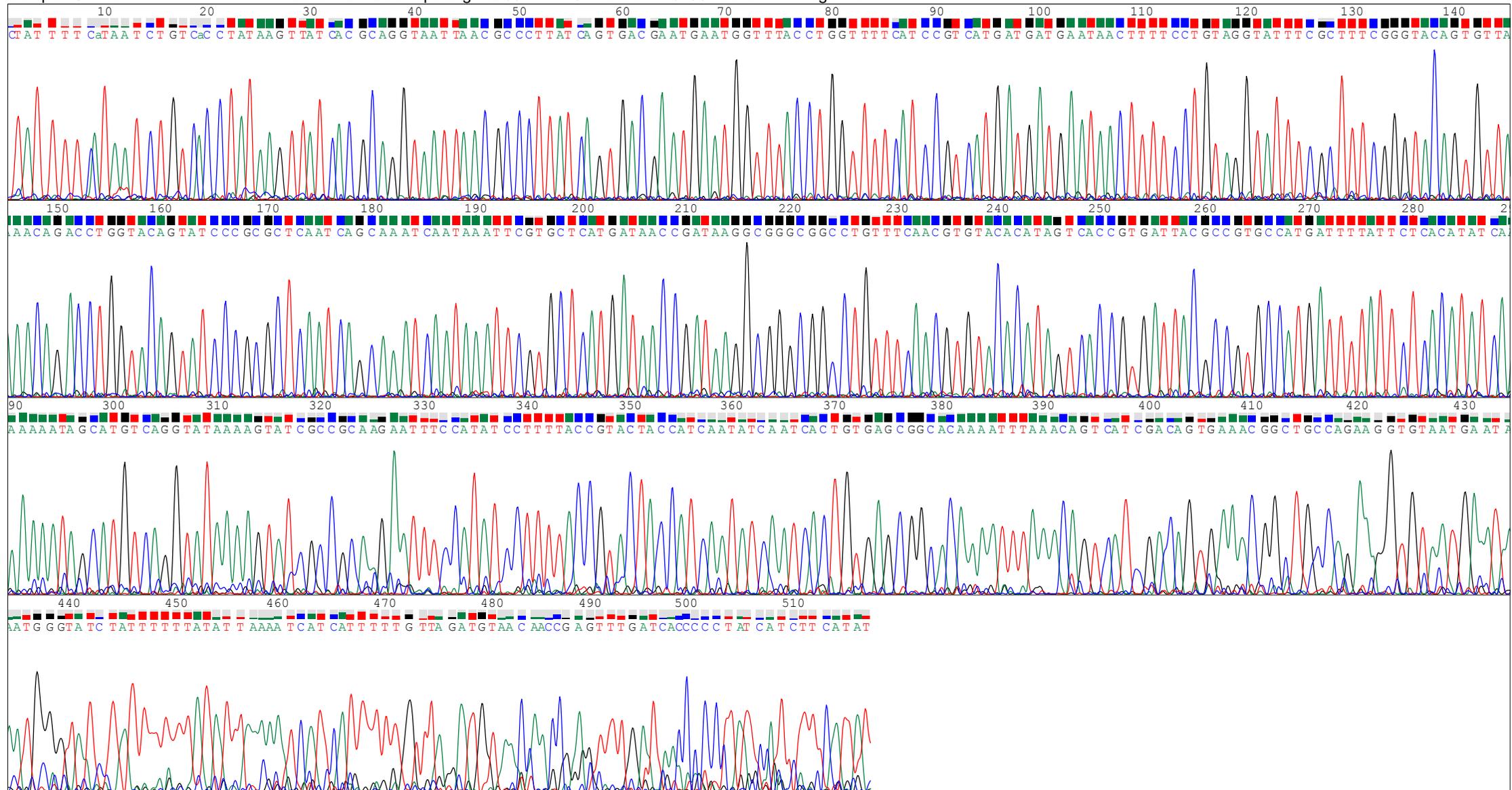
Electroferogramas 2

Secuenciación del gen *ant* de las cepas ϕc^{21} , ϕc^{22} , ϕc^{23} y ϕc^{24} (Figura 27).



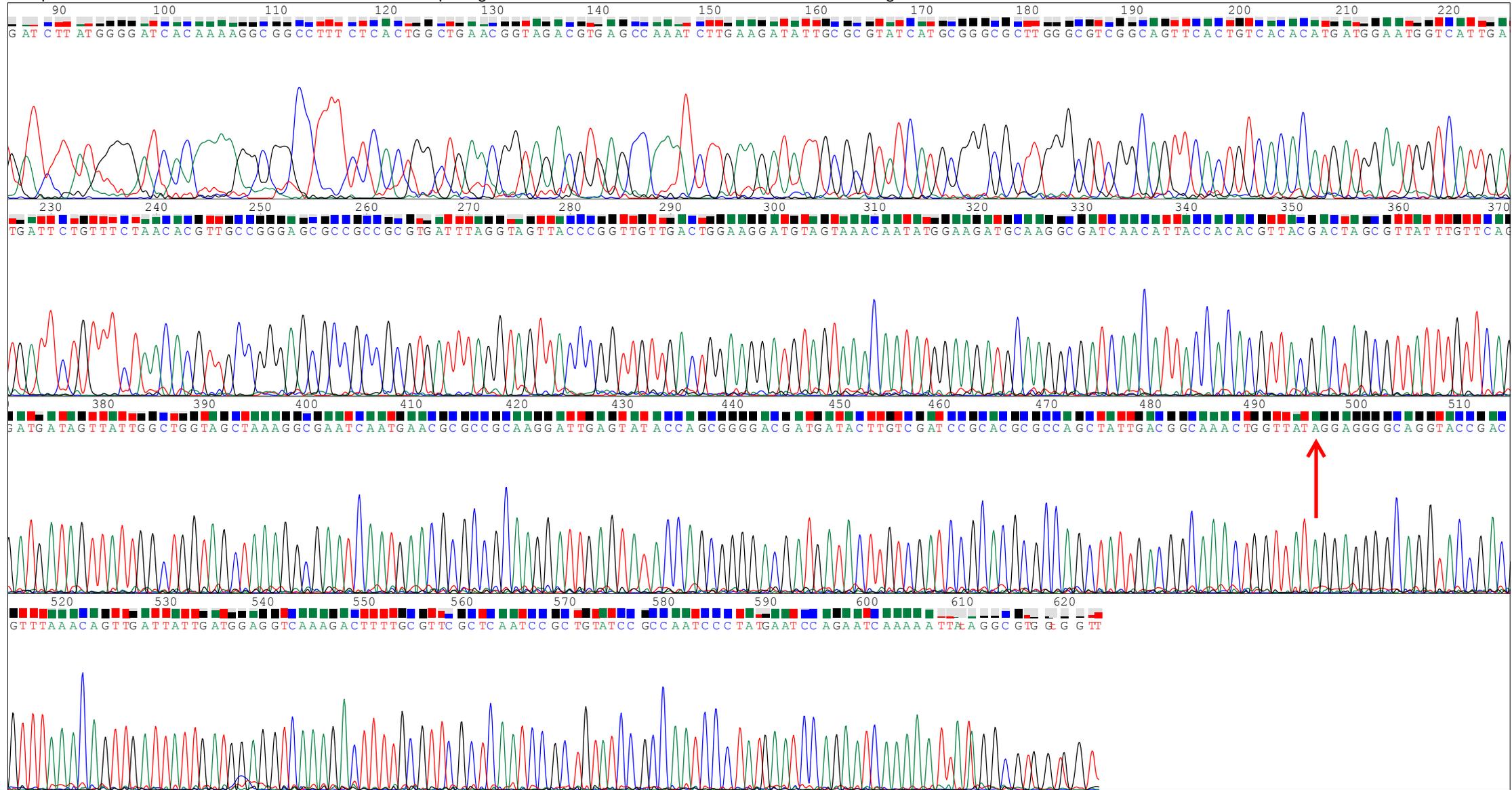


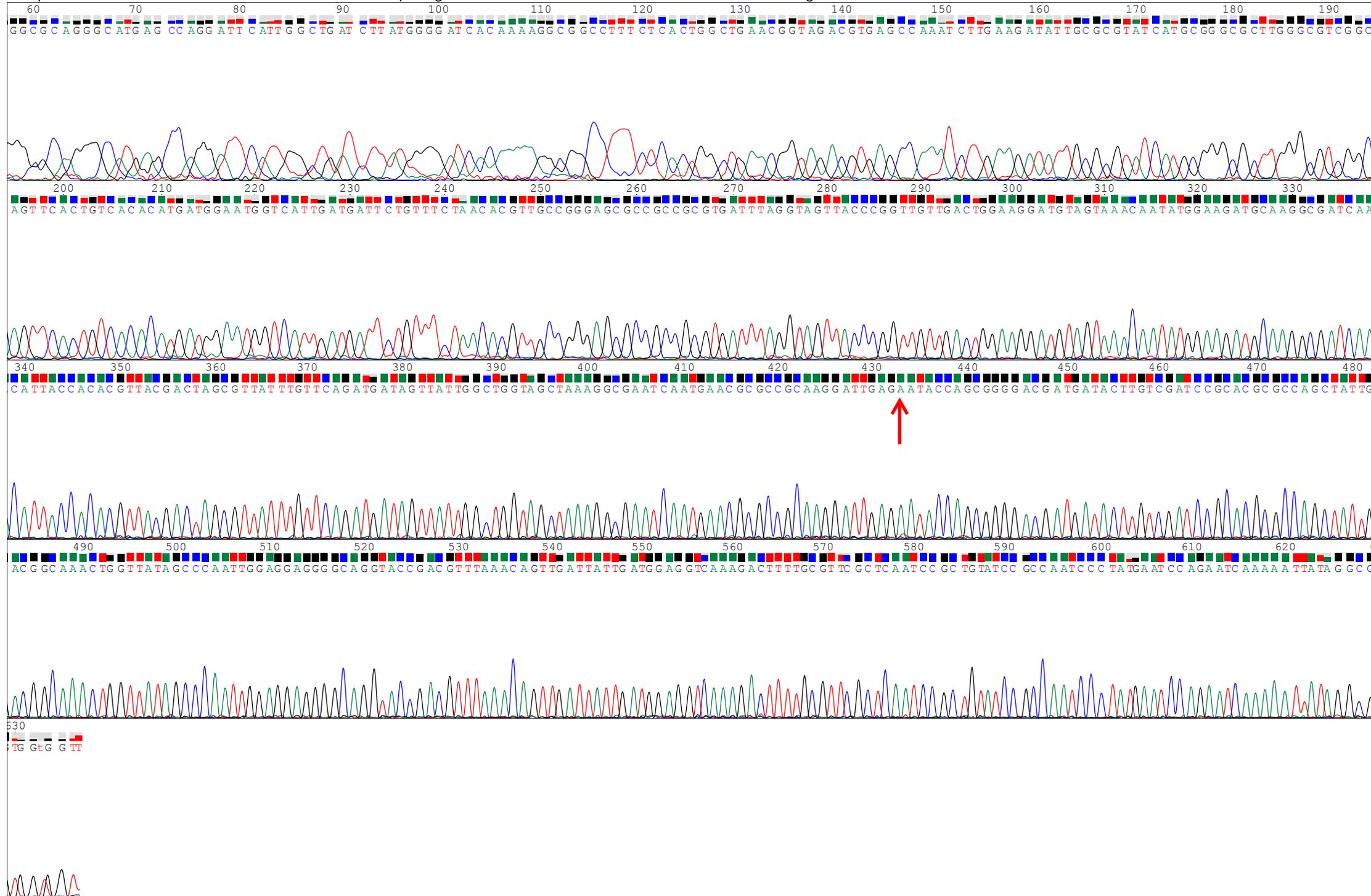


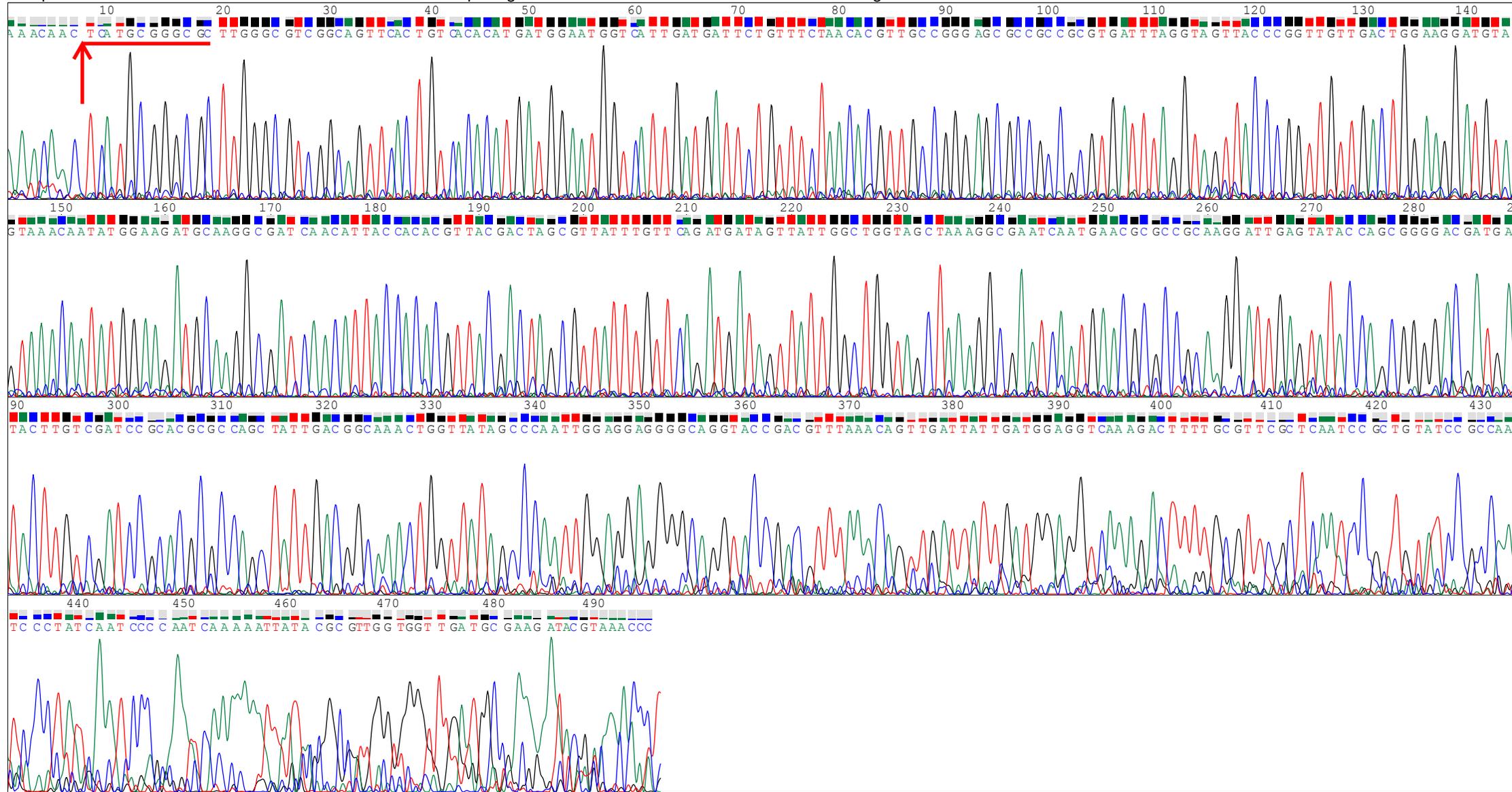


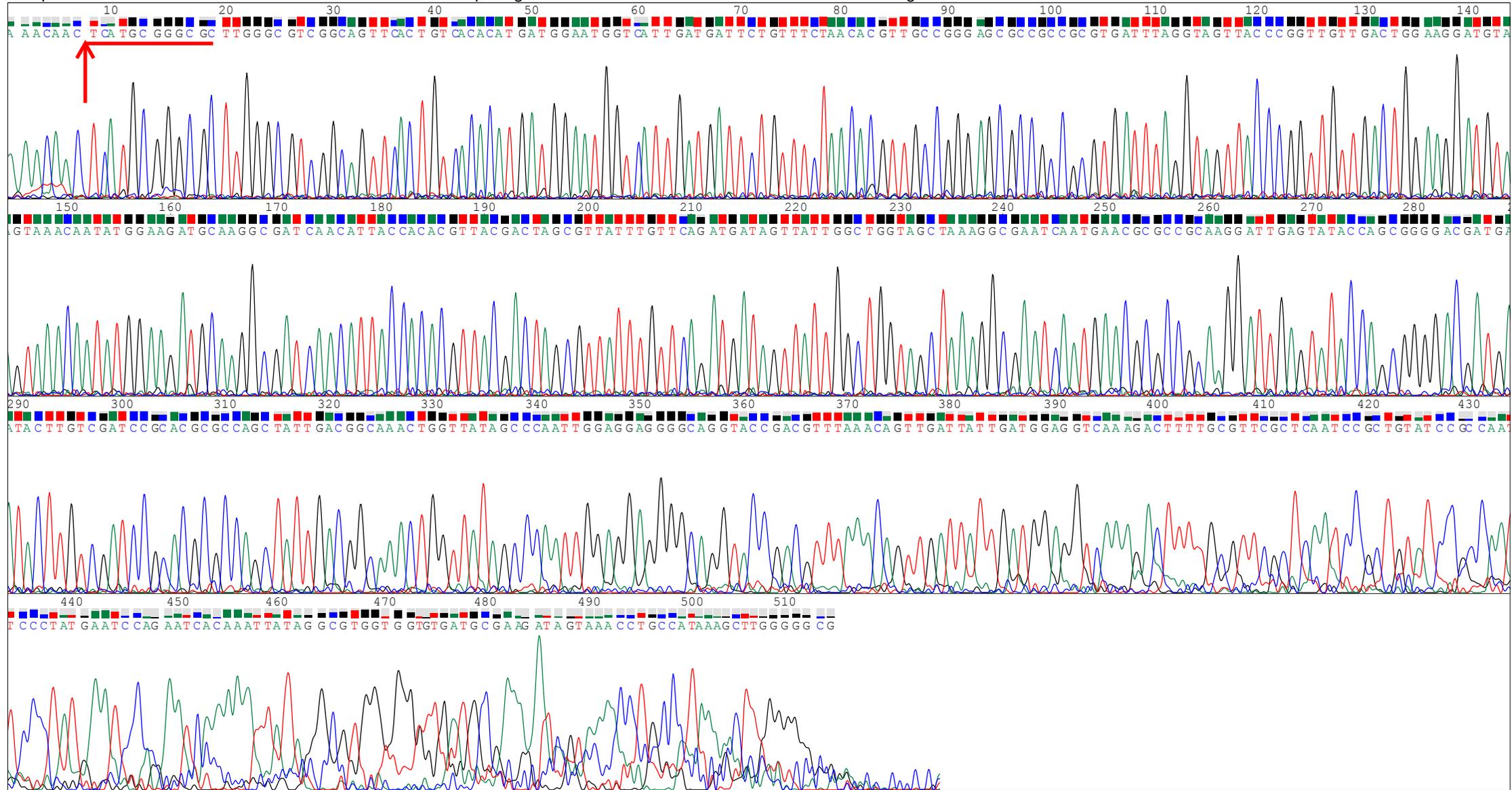
Electroferogramas 3

Secuenciación del gen *rep* de las cepas ϕc^{21} , ϕc^{22} , ϕc^{23} y ϕc^{24} (Figura 28).



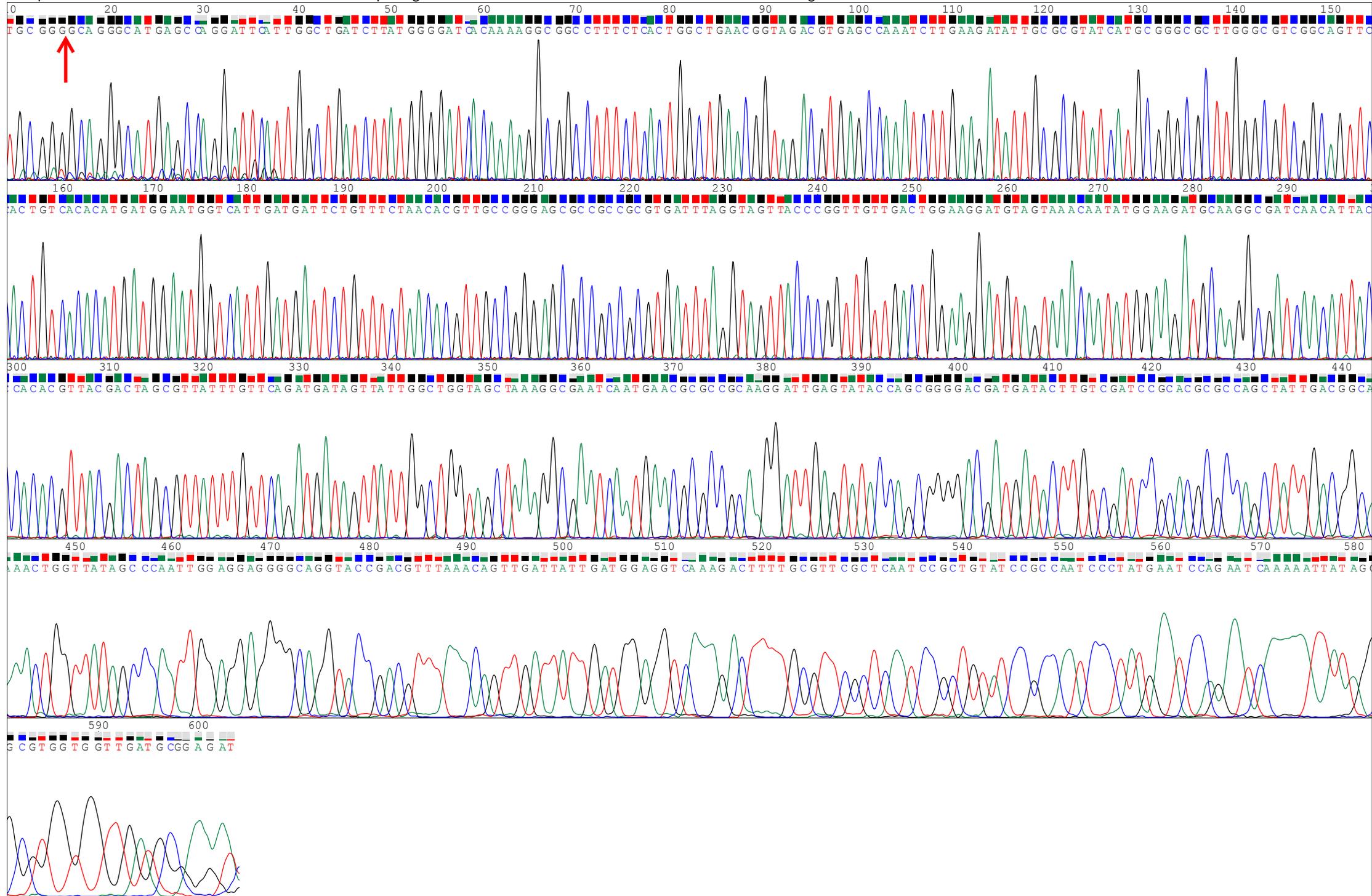


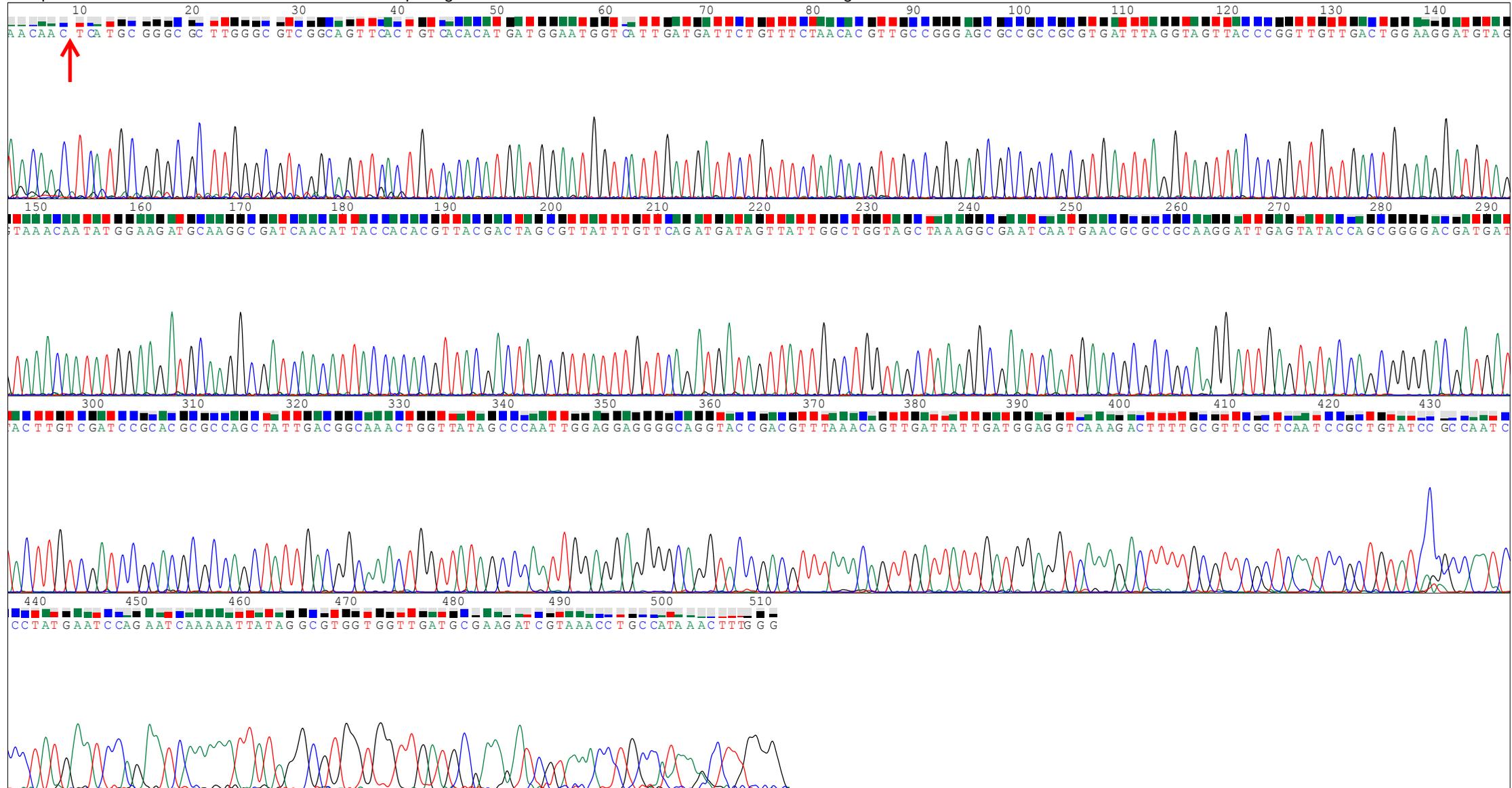


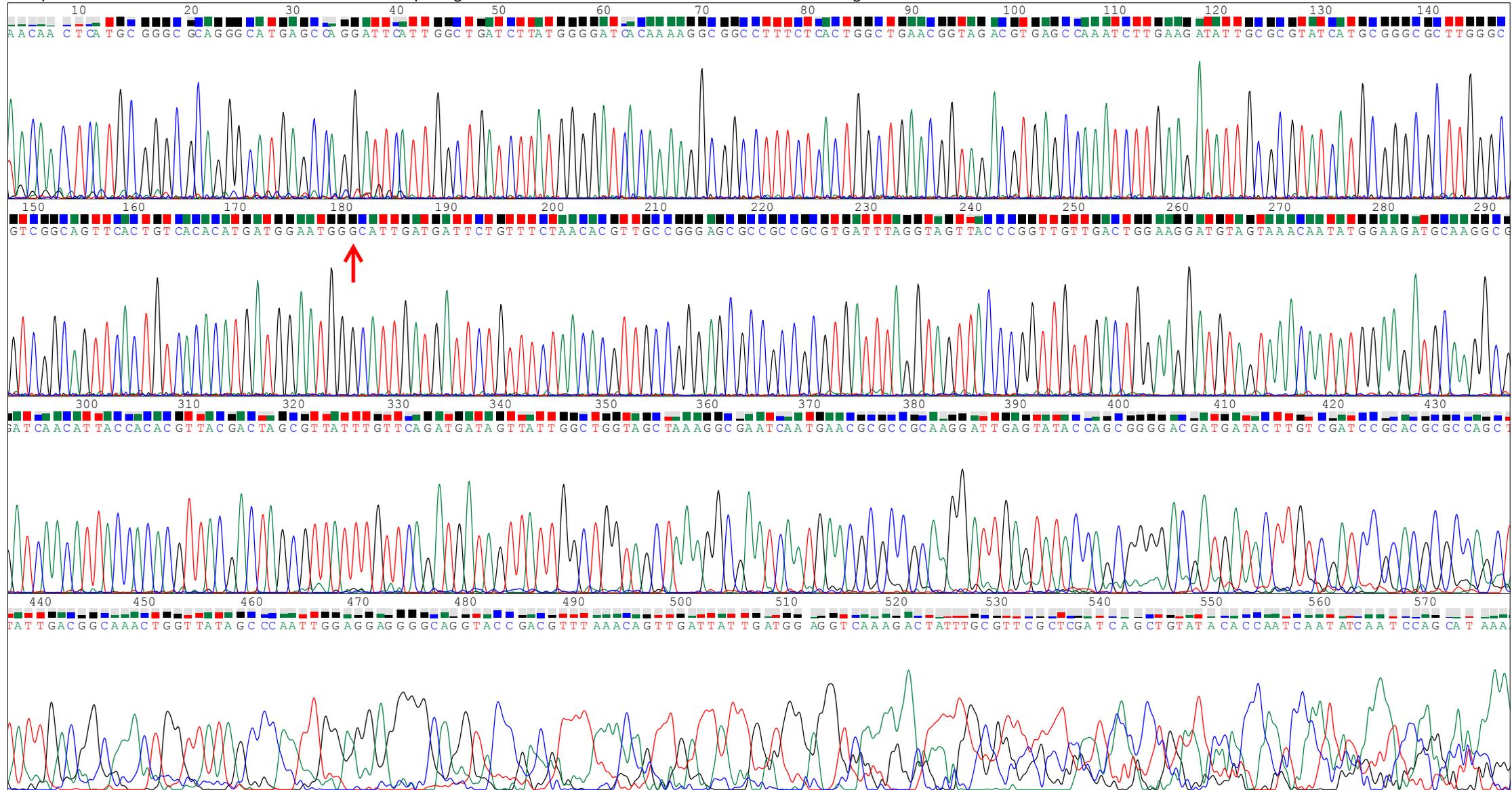


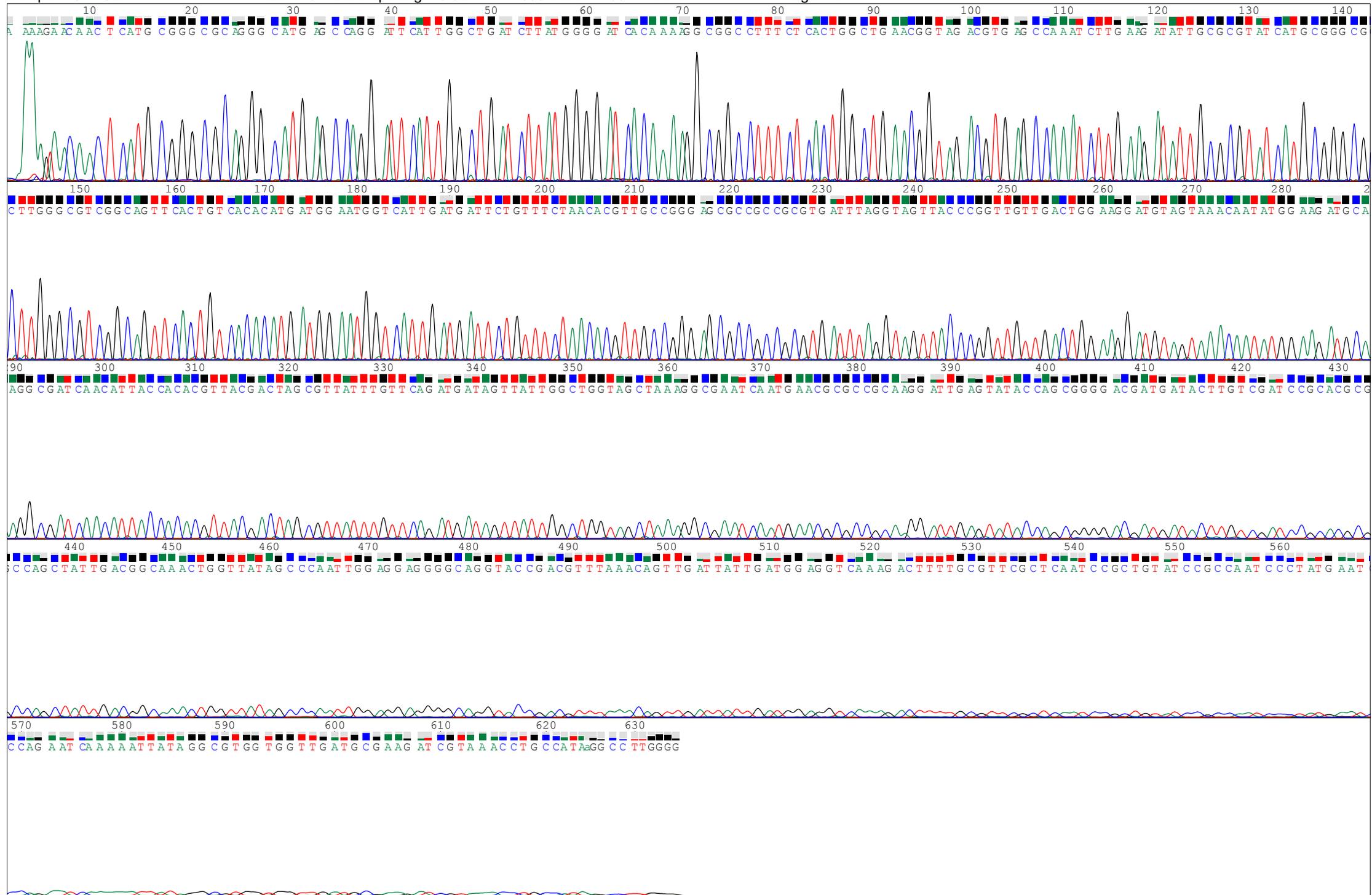
Electroferogramas 4

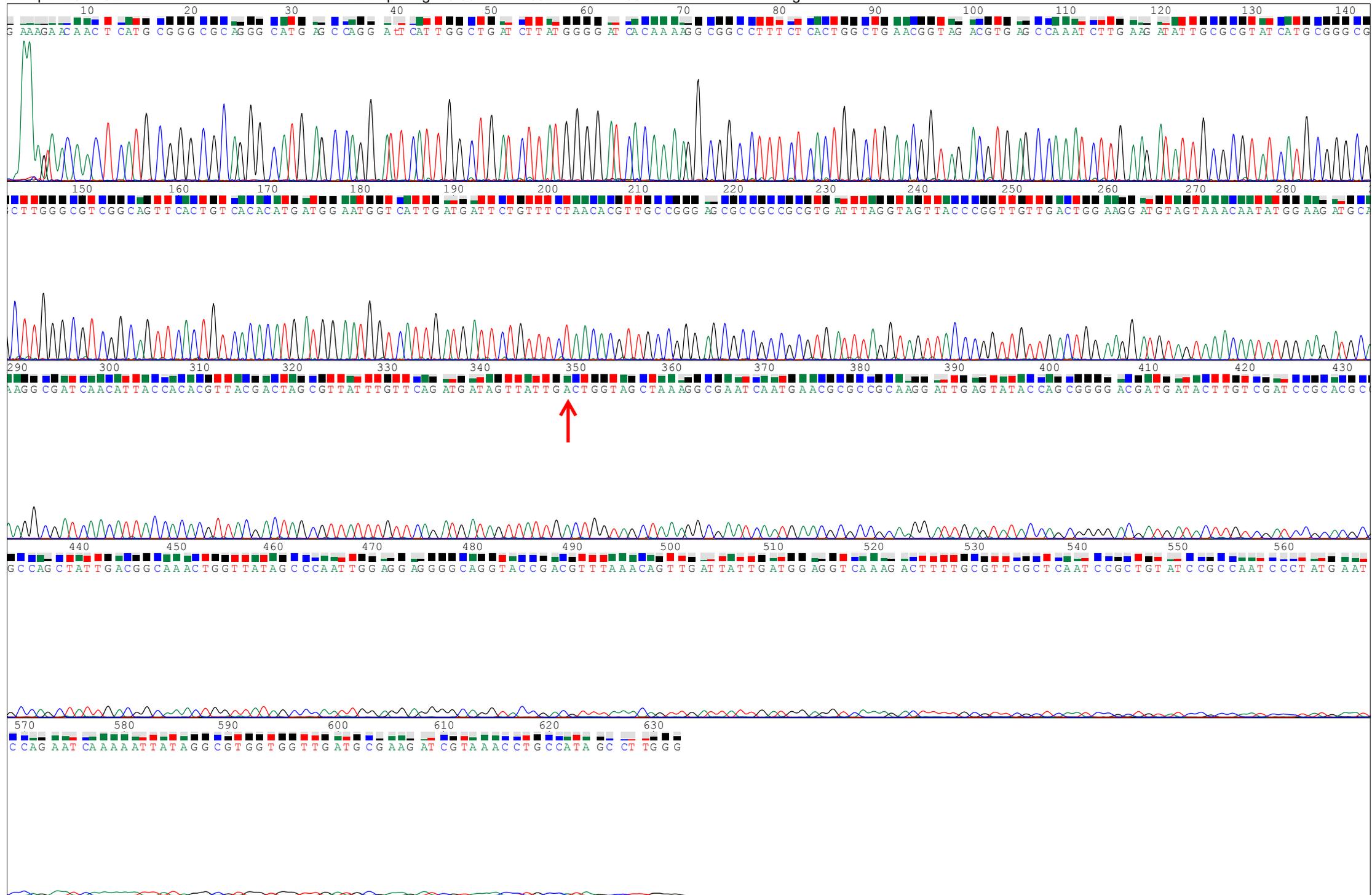
Secuenciación del gen *rep* de las cepas ϕ c5- ϕ c7 y ϕ c17- ϕ c22, ϕ c24 y ϕ c27 (Tabla 8).

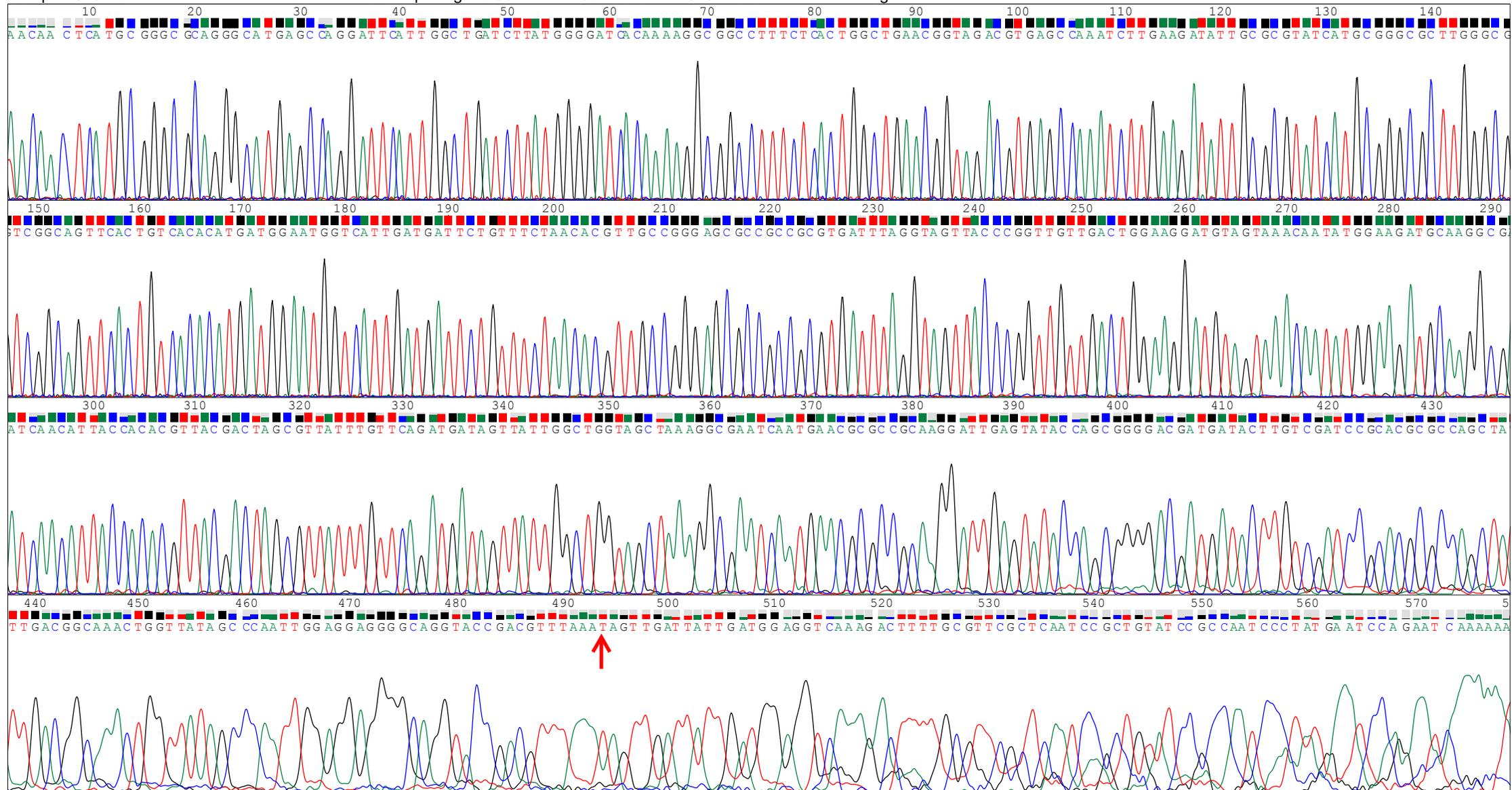


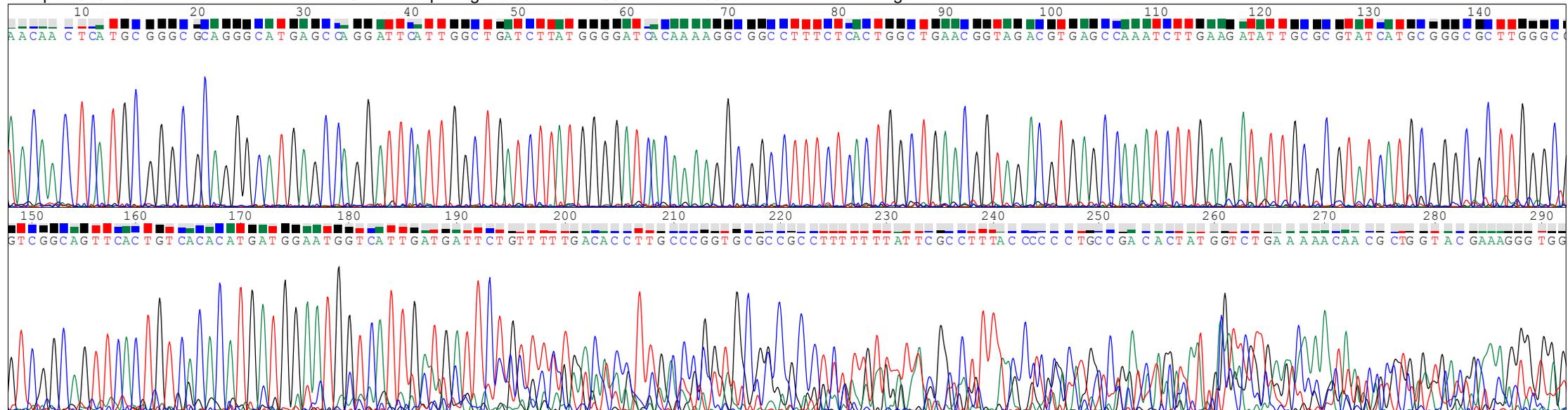


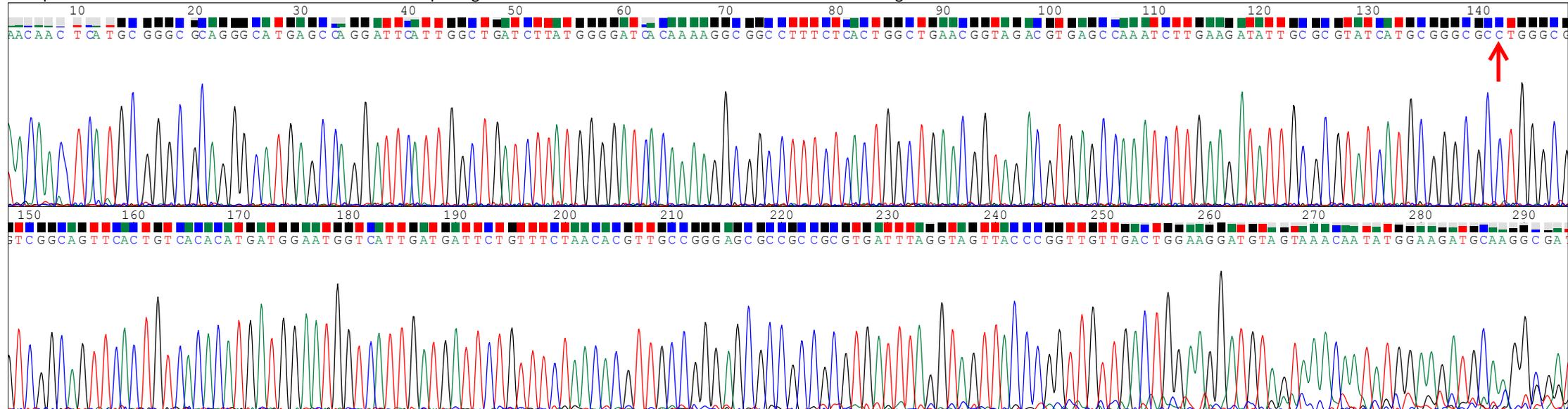


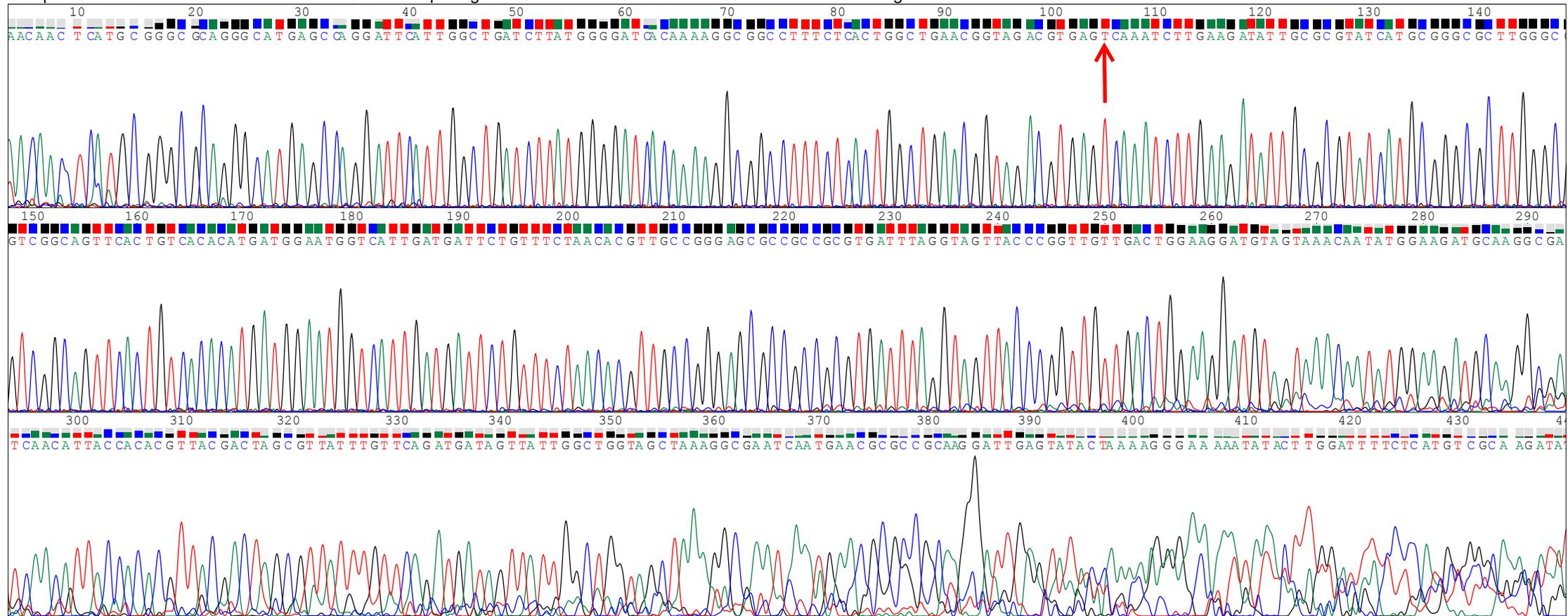


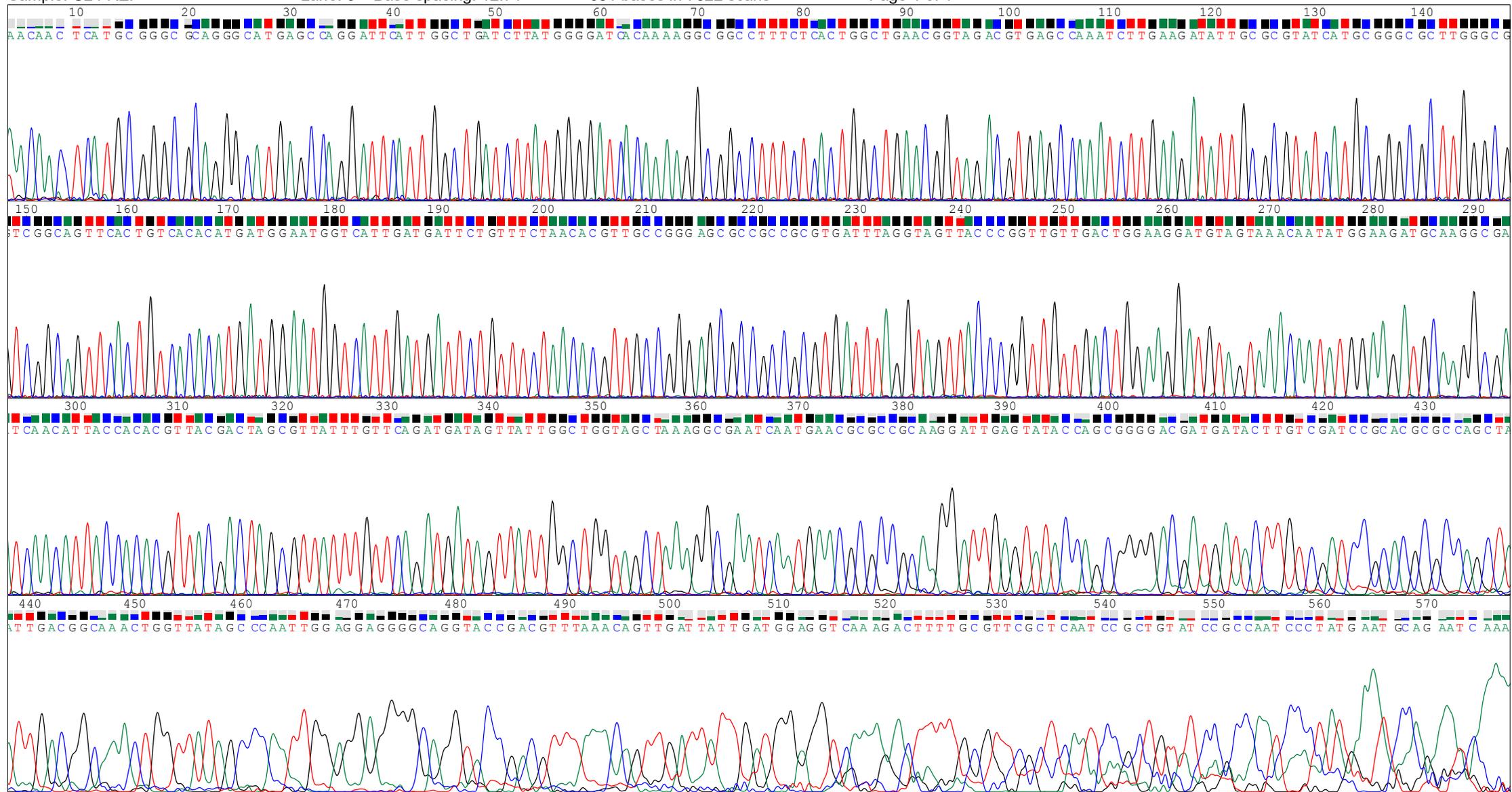


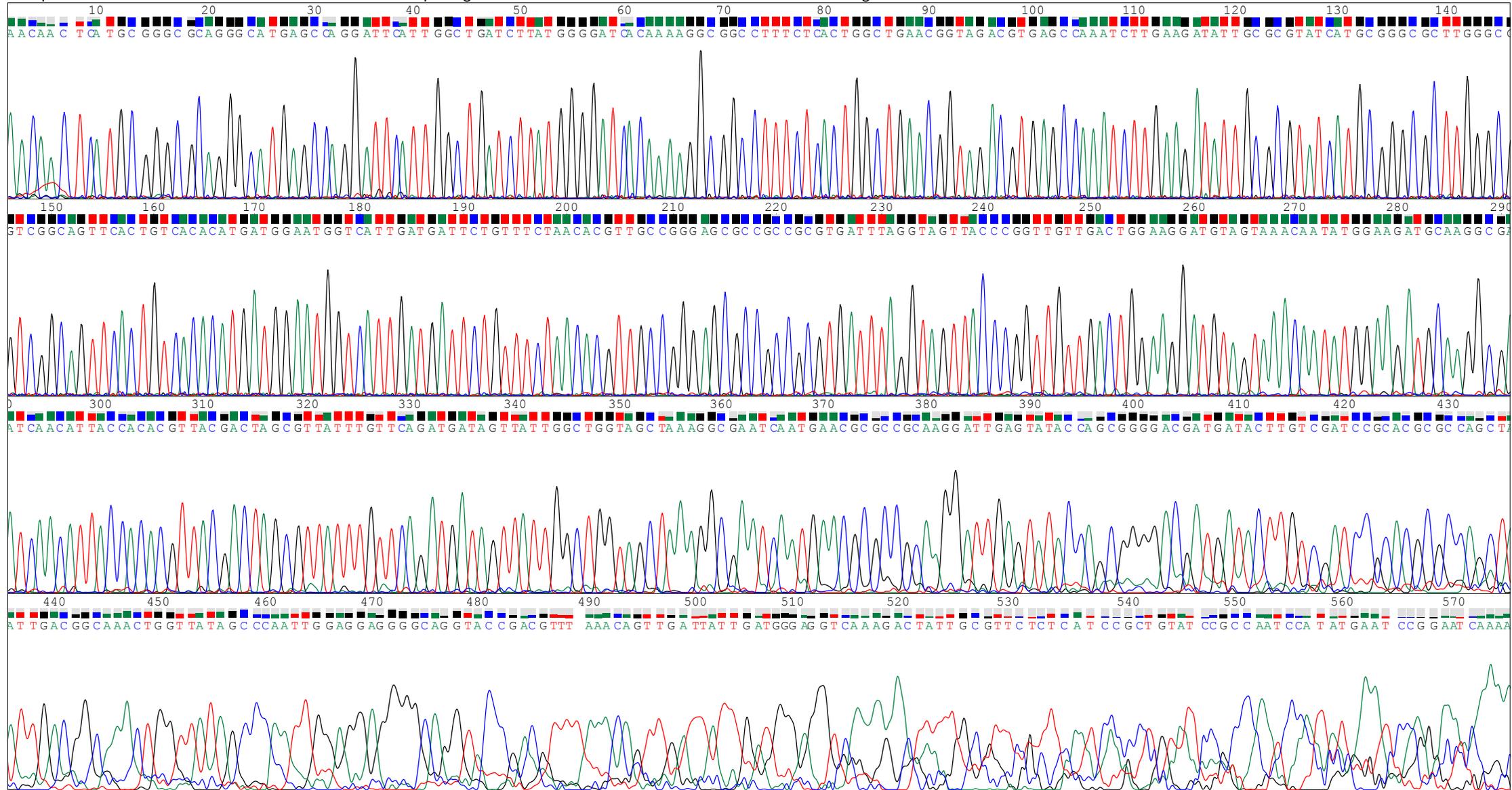












Electroferogramas 5

Secuenciación del plásmido pKQV4 con las clonaciones de los genes rep, ant, dam, dcm1 y ant-5x (figura 33).

