



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Estudio de la región operadora-promotora del gen
represor del bacteriófago mEp021”**

TESIS

Que presenta:

QFB. ESMERALDA VÁSQUEZ PACHECO.

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS.

En la especialidad de:

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.

Director de tesis:

Dr. LUIS YOSHIO KAMEYAMA KAWABE.

Ciudad de México

Noviembre 2019

ASESORES

Dr. Gabriel Guarneros Peña.

Departamento de Genética y Biología Molecular.

Dr. Javier Hernández Sánchez.

Departamento de Genética y Biología Molecular.

FINANCIAMIENTO:

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe en el Laboratorio número 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de una beca de maestría durante el periodo Septiembre 2017-Agosto 2019, número de becario 768005.

Así también se contó con el Apoyo para curso propedéutico y Obtención de grado proporcionado por el CINVESTAV-IPN.

DEDICATORIAS

A mi Papá German Vásquez Pérez, gracias por verme con tanto amor, gracias por tu cuidado, gracias por el tiempo que estuviste conmigo, si en esta vida no nos tocó seguir juntos al menos en mi construcción lo estamos, siempre te llevo en mi mente y corazón. Me diste alas y raíces, te extraño y amo mucho.

A mi mamá Cristina Luisa Pacheco, gracias por ser tan valiente y darnos lo mejor de ti, gracias por todo el amor, apoyo y paciencia. Admiro la tremenda fortaleza que tienes para salir de las dificultades. Gracias por brindarme tranquilidad en los momentos difíciles. Gracias por no escatimar en mi formación. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guardar y prosperar mi camino.

A mi jefe, el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, por escogerme como miembro de su laboratorio y por permitirme aprender y desarrollarme en esta etapa.

A la Dra. Bermúdez, al Dr. Javier Hernández y al Dr. Gabriel Guarneros por sus importantes comentarios y sugerencias así como el tiempo dedicado en la revisión de esta tesis.

A los mejores hermanos que me pudieron haber tocado en esta tierra, mi hermana favorita Cris (te admiro demasiado), Quique y Ger, gracias por siempre cuidar de mí, amarme y apoyarme en todos los sentidos, gracias por darme a mis bendiciones, Cami , Caleb, Vany y Victoria. ¡Los amo mucho!

A mi adorada abue Rosa, eres lo más cercano que tengo de papá, gracias por todo el apoyo que me has brindado así como tu amor y buen ejemplo.

Al Dr. Cabrera, por iniciarme en el mundo de la ciencia y al Dr. Bellusci porque aún sin conocerme me permitió aprender de él y me brindó su apoyo.

A mis amibos buapos Vale, Adrián y Nany por la ayuda durante los cursos, por las salidas, platicas (demasiado intercambio de información) y comidas, gracias por brindarme su amistad, los quiero mucho.

A Roberto, por las tan divertidas pláticas y comidas, por alegrarme mis días con sus ocurrencias.

A mis compañeros de generación MaryTere, Karen y David por su ayuda en los cursos y por hacer más amenas las clases.

A mis amigos de Inglés, Charly, Esaú, Oscar, Luis y Adrián, por los momentos divertidos en clases que me ayudaban a relajarme, a Charly por hacerme retomar la bici y por los largos y bonitos paseos.

A mis queridos compañeros de Lab., Eli#BeliJoker, Lupita, Honi, Carlitos y Jajairo (por tan buenos cumbiones en el lab), gracias por su paciencia y por enseñarme todas las técnicas que en este proyecto se emplearon, fue un gusto aprender de ustedes, agradecimiento especial a EliBeli que sin sus ojitos bien educados y calibrados hubiera sido más difícil obtener las construcciones.

A la Dra. Eva Martínez, por su paciencia y ayuda durante mis primeros meses en el Lab.

A Javi-Niko, Erick, Eli, Noé y Lalo, gracias por sus ánimos y los comentarios graciosos durante su tiempo en el lab.

A Don Arturo, Blanca, Bianca, Rosy y Lupita Aguilar, gracias por estar comprometidos con su trabajo lo cual favoreció al desarrollo de mi proyecto, gracias también por las pláticas y consejos.

A Gaby Mora, porque desde la primera vez que le hable por teléfono pidiendo informes fue tan paciente, por ser tan servicial y diligente.

A mis amigos Mirii y Raúl por motivarme, venir a verme y no dejarme a pesar de la distancia. ¡Los quiero mucho!

A mis Químicas guapas, Sai, Jaz y Amy, por hacerme ver las cosas buenas de mi partida de Oaxaca, por #prayforEsme durante toda la maestría, por los ánimos en mis días malos y por la alegría compartida cuando las cosas salían bien. ¡Las quiero mucho!

A mis primeros compañeros de piso, Nare, Carlitos, Astrid, Roberto y Jonathan, por el ambiente familiar y por ser buenas personas conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS.....	3
I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 El bacteriófago λ	6
1.2 El bacteriófago P22	8
1.2.1 Vía lítica	9
1.2.2 Vía lisogénica.....	9
1.3 El bacteriófago Mu	11
II. ANTECEDENTES DIRECTOS	14
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVO GENERAL.....	20
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	22
8.1 Bacterias, plásmidos y bacteriófagos.....	22
8.2 Cultivos bacterianos	23
8.3 Propagación del bacteriófago mEp021	23
8.4 Obtención del lisado fágico.....	23
8.5 Titulación del bacteriófago mEp021	23
8.6 Generación de lisógenas	24
8.7 Extracción del ADN del bacteriófago mEp021 mediante el protocolo DEAE-celulosa (Silhavy,1984).....	24
8.8 Ensayo de restricción del ADN del bacteriófago mEp021.....	25
8.9 Análisis <i>in silico</i> de la región operadora promotora del gen represor del bacteriófago mEp021	25
8.10 Amplificación de la región operadora promotora del gen represor	26
8.11 Diseño de los oligonucleótidos y amplificación mediante la PCR de los genes utilizados....	26
8.11.1 Amplificación del ORF 15 (represor)	26
8.11.2 Amplificación del ORF 14	26
8.11.3 Amplificación del gen mCherry	26

8.12 Corte y purificación de las bandas	28
8.13 Clonación de los genes en el vector de transición pJET1.2/blunt.....	28
8.14 Selección de candidatas con el inserto de interés	29
8.15 Clonación de los genes de interés en el vector de expresión p _{KQV4} GFP o pACYC184c.....	29
8.16 Preparación de bacterias quimiocompetentes	30
8.17 Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico	30
8.18 Extracción del ADN plasmídico mediante el método de Miniprep.....	31
8.19 Reacción de secuenciación.....	32
8.20 Purificación de la reacción de secuenciación.....	32
8.21 Comprobación de la funcionalidad del Represor y del Represor (Δ 120)	33
8.22 Curva de crecimiento y expresión del represor	33
8.23 Preparación del gel de proteínas	33
8.24 Purificación del represor	34
8.24.1 Clarificado.....	34
8.24.2 Purificación en <i>batch</i> con agarosa NI-NTA.....	34
8.25 Western-blot	35
8.26 Ensayo de Fluorescencia	36
8.27 Ensayo de viabilidad y crecimiento bacteriano.....	37
8.28 Ensayo de infección.....	37
IX. RESULTADOS	38
9.1 Análisis <i>in silico</i> de la región operadora-promotora del gen represor del bacteriófago mEp021	38
9.1.1 Predicción de promotores.....	38
9.1.2 Búsqueda de secuencias palindrómicas y repetidos directos.....	40
9.2 Construcción de p _{KQV4} RepE.....	44
9.2.1 Amplificación del gen represor del bacteriófago mEp021.....	44
9.2.2 Clonación del gen del represor en el vector de transición pJET1.2 blunt.....	45
9.2.3 Comprobación de candidatas en el vector de transición con el gen del represor.....	45
9.2.4 Clonación del gen del represor-6xHis en el vector pKQV4	46
9.2.5 Obtención y comprobación de candidatas con el gen del represor	47
9.3 Comprobación de la funcionalidad de la proteína recombinante del Represor	48
9.3.1 Efecto de la presencia del represor sobre el crecimiento de la cepa W3110.....	49
9.4 Expresión e Inmunodetección del represor	50

9.5 Purificación del represor	51
9.6 Clonación del gen represor mutado en el vector pKQV4.....	52
9.6.1 Comprobación de la candidata con el gen del represor mutado.....	52
9.7 Diseño y construcción del vector con la región operadora-promotora flanqueada por dos genes reporteros: p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP.....	56
9.7.1 Construcción de p _{KQV4} OP-GFP.....	56
9.7.2 Clonación de la región operadora-promotora en el vector de transición pJET1.2 blunt.	57
9.7.3 Clonación de la región operadora-promotora en el vector p _{KQV4} GFP	58
9.7.4 Comprobación de las candidatas de p _{KQV4} OP-GFP	58
9.8 Evaluación de la fluorescencia: p _{acyc184c} OP-GFP	59
9.9 Construcción de p _{KQV4} mCh-OP-GFP	61
9.9.1 Amplificación del gen de mCherry.	61
9.9.2 Clonación del gen mCherry en el vector de transición pJET1.2 blunt.....	62
9.9.3 Clonación del gen mCherry en el vector p _{KQV4} OP-GFP	62
9.9.4 Comprobación de candidatas que tuvieran el fragmento mCh-OP-GFP	63
9.10 Clonación de mCh-OP-GFP en el vector pACYC184c.....	64
9.10.1 Comprobación de candidatas con el fragmento mCh-OP-GFP	65
9.10.2 Evaluación del crecimiento, viabilidad y fluorescencia del plásmido p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP en presencia y ausencia del represor	65
9.10.3 Evaluación del crecimiento y la viabilidad	65
9.10.4 Ensayo de infección.....	67
9.10.5 Ensayo de fluorescencia: p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP	68
9.10.6 Evaluación de la fluorescencia de la proteína GFP.....	68
9.10.7 Ensayo de fluorescencia de la proteína mCherry.....	71
X. DISCUSIÓN.....	73
XI. CONCLUSIONES	83
XII. PERSPECTIVAS	84
XIII. REFERENCIAS.....	85
XIV. APÉNDICE	89
XV. ANEXOS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genes implicados en la cascada lítica y lisogénica de λ , simplificado.	6
Figura 2. Mapa genético del bacteriófago P22.	8
Figura 3. Mapa genético del bacteriófago Mu.	12
Figura 4. Organización de la región del operador temprano del bacteriófago Mu.	13
Figura 5. Visión general de los promotores predichos por los distintos programas empleados... 38	
Figura 6. Localización de las secuencias palindrómicas y los repetidos directos traslapados con los promotores.	41
Figura 7. Secuencia consenso de los probables operadores palindrómicos de mEp021.	42
Figura 8. Secuencia consenso de los probables operadores repetidos directos.	43
Figura 9. Comparación de las probables Box A y Box B encontradas en mEp021 con las de otros fagos.	44
Figura 10. Amplificación del gen del represor + 6 codones de Histidinas.	45
Figura 11. Comprobación de candidatas portadoras del gen del represor en el vector de transición.	46
Figura 12. Doble digestión de los vectores p _{KQV4} GFP y p _{JET1.2blunt} R3.	47
Figura 13. Amplificado del gen del represor + 6 codones de His.	47
Figura 14. Alineamiento del gen del Represor + 6 codones de Histidinas vs Represor (C3).	48
Figura 15. Comprobación de la funcionalidad del represor.	49
Figura 16. Expresión e Inmunodetección del represor.	51
Figura 17. Purificación del represor.	52
Figura 18. Comprobación de la candidata portadora del gen del represor mutado.	53
Figura 19. Alineamiento del represor vs el represor mutante con la bandera de Histidinas.	54
Figura 20. Pérdida de la funcionalidad del represor mutado.	55
Figura 21. Dominios del represor wild type vs el represor (Δ 120).	55
Figura 22. Amplificación de la región operadora-promotora.	56
Figura 23. Alineamiento de la región operadora-promotora wild type vs la región operadora-promotora en el vector de transición p _{JET1.2 blunt}	57
Figura 24. Mapa del vector p _{KQV4} OP-GFP y restricción del vector p _{KQV4} GFP y p _{JET} OP3.	58
Figura 25. Análisis de las candidatas a portar el plásmido p _{KQV4} OP-GFP.	59
Figura 26. Mapa in silico del vector pSEVA 227-R y amplificado del gen mCherry.	62
Figura 27. Mapa in silico del vector p _{KQV4} mCh-OP-GFP y doble restricción de las candidatas en el vector de transición con mCherry y el vector p _{KQV4}	63
Figura 28. Comprobación de las candidatas con el inserto mCh-OP-GFP.	64
Figura 29. Mapa in silico del vector p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP y doble restricción de los vectores p _{KQV4} mCh-OP-GFP y PACYC 184c.	64
Figura 30. Comprobación de las candidatas portadoras de mCh-OP-GFP.	65
Figura 31. Viabilidad bacteriana.	66
Figura 32. Ensayos de infección.	67
Figura 33. Comparación de la región operadora-promotora del gen del represor con el sistema generado en este trabajo.	68

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva de crecimiento de W3110 en presencia de p _{KQV4} RepE.	50
Gráfica 2. Evaluación de la fluorescencia de p _{ACYC184c} OP-GFP en presencia de p _{KQV4} RepE	61
Gráfica 3. Crecimiento y viabilidad de W3110 Y W3110(mEp021) en presencia de las construcciones p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP y p _{KQV4} RepE.	66
Gráfica 4. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína GFP en la construcción p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP	70
Gráfica 5. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína mCherry en la construcción p _{ACYC184c} mCh-OP-GFP	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas características de las regiones de inmunidad de distintos fagos.....	5
Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo	22
Tabla 3. Componentes de la reacción de restricción del ADN del bacteriófago mEp021.....	25
Tabla 4. Características y secuencias de los oligonucleótidos utilizados.	27
Tabla 5. Condiciones requeridas para la PCR	27
Tabla 6. Componentes de la reacción blunting.	28
Tabla 7. Componentes de la reacción de ligación.	29
Tabla 8. Componentes de la reacción de secuenciación.....	32
Tabla 9. Predicción de promotores dentro de la región operadora-promotora.....	39
Tabla 10. Secuencias palindrómicas encontradas en la región operadora-promotora del ORF 15 (represor) del bacteriófago mEp021.....	40

RESUMEN

Los bacteriófagos son los virus que infectan a las bacterias. mEp021 es un bacteriófago temperado que infecta a *E. coli*. Se han descrito mecanismos que controlan el “switch” genético entre el ciclo lisogénico y el ciclo lítico del fago lambda, de P22 y de otros fagos. En lambda, la proteína responsable del mantenimiento de la lisogenia es el represor CI, el cual se une a sus operadores, O_{R1} y O_{L1} que se encuentran traslapados a sus promotores pR y pL, respectivamente. La unión del represor impide la expresión de sus genes. En mEp021 se desconoce el mecanismo de este “switch” genético, por lo que se decidió iniciar su estudio.

Para esto, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar: 1) la región operadora promotora del gen represor, 2) el gen represor del bacteriófago mEp021 (ORF 15), 3) el ORF 14 y 4) el gen reportero mCherry. Se llevaron a cabo tres construcciones, una en la que la región operadora-promotora estuviera flanqueada por los dos genes reporteros (GFP y mCherry) y las otras dos en la que el gen represor y el ORF 14 estuvieran bajo control del promotor pTac, el cuál es inducible por IPTG. Los plásmidos fueron transformados en las bacterias W3110 y W3110(mEp021) y se cuantificó la fluorescencia (medida indirecta de la transcripción-traducción), con el equipo Synergy TMHT.

Se observó que la fluorescencia en las bacterias, emitidas por mCherry(610 nm) y GFP(510 nm) disminuyeron al ser cotransformadas con el plásmido que portaba el gen del represor. Estos resultados sugieren que hay por lo menos dos promotores divergentes en la región operadora-promotora, los cuáles se encuentran fuertemente regulados por la proteína represora. Probablemente los operadores que son reconocidos por el represor se encuentran traslapados con los promotores.

Por otro lado, el producto del ORF 14 al parecer se une a la región operadora-promotora ya que hubo un efecto en los niveles de fluorescencia de GFP en la cepa W3110 cuando se indujo GE14 con IPTG 0.5 mM. Los resultados no son claros para mCherry por lo que es difícil saber si el producto del ORF 14 presenta un papel regulador; se requerirán de más estudios para saber su participación.

ABSTRACT

Bacteriophages are viruses that infect bacteria. mEp021 is a temperate phage which infects *E. coli*. It has been described the mechanism that regulate “the genetic switch” between the lysogenic and litic pathway on lambda, P22 and other phages. In lambda phage the protein responsible for the maintenance of lysogenic state is the repressor CI. The λ repressor binds to its operators some of them are overlaid with its promoters pL and pR, by this way, their genes are repressed. The mechanism of the “genetic switch” in mEp021 is unknown, therefore, we decided to start the study of this region.

We designed primer sets to amplify 1) the operator-promoter region of the repressor gene, 2) the repressor gene of mEp021 (ORF 15), 3) the ORF 14, and 4) the reporter gene mCherry. We carried out three plasmids construction, one plasmid in which the operator-promoter region was flanked by two reporter genes (GFP and mCherry) in both sides, this was generated in several steps. The others two where the repressor gene (ORF 15) and ORF 14 were under control of the promoter p_{Tac} which is inducible by IPTG. These plasmids were transformed into the strains W3110 and W3110(mEp021). The fluorescence (an indirect measure of the transcription-translation) was measured in the Synergy™HT.

We observed that the fluorescence levels for GFP (510 nm) and mCherry (610 nm) decreased when we transformed with the plasmid that contained the repressor gene. These results suggest that there are at least two divergent promoters into the operator-promoter region, which are negatively regulated by the repressor protein. Probably the operators which are recognized by the repressor are overlaid with these promoters.

On another hand, the ORF14 seems to bind to the operator-promoter region. It produces an effect in the GFP fluorescence levels when it is induced with IPTG 0.5mM in a W3110 strain. Contrary to mCherry fluorescence levels, these results are not clear, thereby additional studies will be required to know the participation of the product of the ORF 14.

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados.
G	Gravedades.
LB	Luria Bertani.
μl	Microlitros.
Nt	Nucleótidos.
Pb	Pares de bases.
RFU	<i>Relative Fluorescence Units.</i>
RPM	Revoluciones por minuto.
UFC	Unidades Formadoras de Colonias.
UFP	Unidades Formadoras de Placas.
V	Volt

I. INTRODUCCIÓN

Los bacteriófagos ofrecen una perspectiva especial a la biodiversidad, origen y evolución de los virus y no únicamente por su tremenda abundancia, ya que se cree que hay más de 10^{31} partículas de fagos en la biosfera (Hatfull., 2008; Hendrix., 2003). El estado actual de la genómica de los bacteriófagos muestra que la diversidad de la población es muy elevada y que los fagos han evolucionado durante más de 10^9 años, con un activo intercambio genético horizontal, consecuentemente presentando un mosaicismo genómico con segmentos diferentes e historias evolutivas distintas (Hendrix *et al.*, 1999). Los genomas de bacteriófagos portan las mayores novedades genéticas, ya que la mayoría de sus genes (cerca del 80%) no están relacionados a proteínas reportadas y por lo tanto son de funciones desconocidas. Los fagos no únicamente llevan genes que contrarrestan los sistemas de protección del hospedero, tales como enzimas de reparación del ADN (Zhu *et al.*, 2004), sino también, pueden proveer genes que ofrecen protección contra otros virus, por esto, algunos codifican para sus propios sistemas de restricción, de toxina-antitoxina y de inmunidad (Pope *et al.*, 2011).

A partir del primer reporte en bacteriófagos y hasta la fecha, se han elucidado varios mecanismos del circuito regulatorio del estado lisogénico-lítico. Uno de los mejores mecanismos caracterizados es el control negativo por represores como el del fago lambda (Ptashne, 1971). Se sabe que cuando λ infecta a la célula, λ debe de elegir entre dos vías, la lisogénica ó la lítica; si la vía lisogénica es elegida, el ADN viral es generalmente integrado dentro del cromosoma de la célula huésped y los genes relacionados al ciclo lítico son reprimidos por la proteína viral CI (Degnan *et al.*, 2007). CI se une al ADN en sitios específicos llamados operadores y de esta forma evita la transcripción de los genes cercanos (Susskind y Botstein., 1975) llevando al profago a un estado estable.

Por otro lado, este estado puede cambiar al lítico, por la inducción del sistema SOS de la bacteria, al dañarse su ADN (Little y Mount., 1982; Roberts y Devoret., 1983), provocando que RecA*, la cual es una proteína que facilita la recombinación entre

moléculas de ADN, permita la escisión del represor, provocándose la autoinducción. El represor de λ es similar a LexA en estructura y función, LexA reprime a un grupo de genes cuyos productos ayudan a la bacteria a sobrevivir a la radiación. La radiación UV prende estos genes, por inactivación a LexA, a través de la acción indirecta de RecA*. RecA* promueve la escisión de LexA de la misma manera que al represor CI. El represor de λ aprovecha al máximo la respuesta SOS del huésped, el profago reprimido sensa que su huésped está siendo dañado y rápidamente empieza el ciclo lítico (Ptashne., 2004).

En general, el circuito regulatorio del estado lisogénico-lítico de los fagos temperados se centra en las propiedades de un segmento del genoma denominado región de inmunidad. En fagos lambdoides, esta región contiene dos genes que codifican para proteínas de unión a ADN, CI y Cro, y seis operadores a los cuáles se les unen ambas proteínas (Degnan *et al.*, 2007). En la Tabla 1 se muestran algunas características de las regiones de inmunidad de algunos fagos que van a ser mencionados más adelante.

Tabla 1. Algunas características de las regiones de inmunidad de distintos fagos.

Fago	Operadores	Secuencia	Promotores en esta región	Genes que están directamente regulados por los promotores
λ	O _{R1}	TATCACCG* CCAGAGGTA ATAGTGGC* GGTCTCCAT	P _M P _R .	CI y Cro represores.
	O _{R2}	TAACACCG* TGCGTGTTG ATTGTGGC* ACGCACAAC		
	O _{R3}	TATCACCG* CAAGGGATA ATAGTGGC* GTTCCCTAT		
	O _{L1}	TATCACCG* CCAGTGGTA ATAGTGGC* GGTCAACAT	P _L	N antiterminador
	O _{L2}	TAT CTCTG* GCGGTGTTG ATAGAGAC* CGCCACAAC		
	O _{L3}	TATCACCG* CAGATGGTT ATAGTGGC* GTCTACCAA		

P22	O _{mnt.}	AT-- TAGA--*--TCTA—AT TA- ATCT-- * --AGAT—TA	P _{mnt}	Mnt repositor.
	O _{arc}	AGGTCACG*GTGGACCT TCCAGGTG*CCACCTGGA	P _{ant.}	Ant y Arc antirepositor y ARN antisentido.
Mu	O1,O2 y O3	CTTTTPyA/TAANNAT GAAAAPuTTPyT/ATTNNT/A	P _{cm.} P _e	C y Ner Repositor y regulador de la transcripción

1.1 El bacteriófago λ

El circuito principal de regulación del fago λ se centra en un segmento del genoma conocido como la región de inmunidad, esta región contiene principalmente dos genes que codifican para dos proteínas de unión al ADN: CI y Cro, tres promotores: P_L, P_R y P_{RM} y seis sitios operadores: O_{R1}, O_{R2}, O_{R3}. O_{L1}, O_{L2} y O_{L3} a los cuales ambas proteínas se unen (Kameyama *et al.*, 2001).

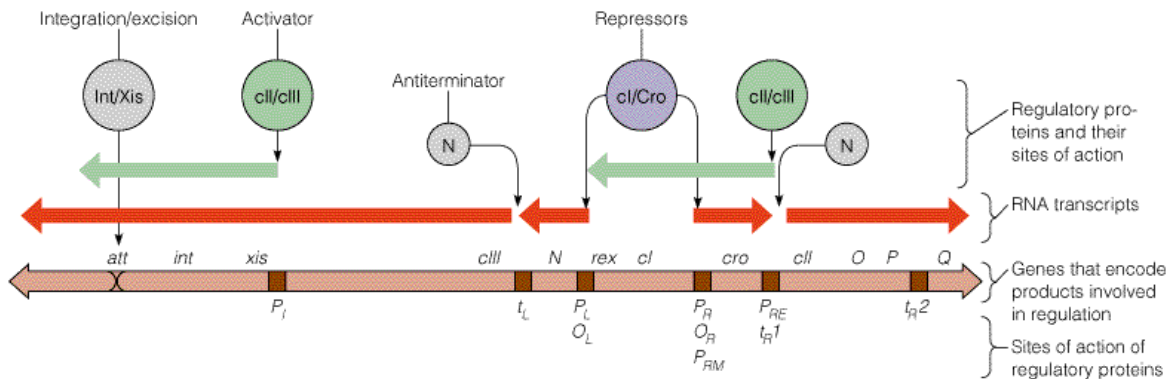


Figura 1. Genes implicados en la cascada lítica y lisogénica de λ, simplificado. Cuando el fago λ infecta a una bacteria pueden ocurrir dos cosas, el ciclo lítico o la lisogenia. En el estado lisogénico, la mayoría de los genes del fago están desactivados, pero hay un programa secuencial de activaciones que se encarga de romper la lisogenia, desencadenando la fase lítica. Fuente Mathews Digital Library.

El programa lítico empieza con la iniciación simultánea de la transcripción de dos promotores: el izquierdo p_L y el derecho p_R. El transcrito temprano de p_L termina en el terminador de la transcripción t_{L1} y produce un transcrito de ~1,000 nt. El transcrito del promotor p_R termina en t_{R1} y produce un ARNm. El transcrito

temprano de pL contiene al gen *N*, cuyo producto N suprime a los terminadores de la transcripción. El transcrito temprano de pR contiene al gen *cro*, y su producto es un represor transcripcional que regula negativamente la síntesis del represor CI, así como de los transcritos de P_L y P_R. Por otro lado si el fago λ opta por la vía lisogénica, deberá integrarse al cromosoma bacteriano, por la expresión de la integrasa (Int) y habrá de mantener reprimidos los promotores pL y pR por la expresión del represor CI (Kameyama *et al.*, 2001).

El represor CI es sintetizado a partir de los mensajeros de dos promotores diferentes: pRE y pRM. La transcripción de pRE es en contrasentido al del promotor pR y requiere del activador CII. pRE esta localizado ~400 pb a la derecha del gen *cl*, y se solapa con la región 5' terminal del gen *cII*. Una vez iniciada la transcripción del promotor pRE, estos transcritos en contrasentido a los de pR pueden complementarse y unirse con los de pR formando una doble hélice de ARN. Esta estructura deberá inhibir la expresión de Cro, así como la de CII. Para el proceso lisogénico se requiere que los niveles de Cro estén en su mínima expresión (Kameyama *et al.*, 2001).

El transcrito proveniente de P_{RE} que transcribe al gen *cl* tiene un Shine Dalgarno fuerte y CI es traducido en forma eficiente. El regulador positivo CII también actúa sobre el promotor pI que transcribe al gen *int*, y cuyo producto es necesario para que el cromosoma de λ se integre al cromosoma bacteriano. Debido a que CII es metabólicamente inestable y es degradado fácilmente por la acción de la proteasa HflA del huésped, se requiere un factor adicional del fago, la proteína CIII, que contrarresta la acción de esta proteasa (Kameyama *et al.*, 2001).

El mantenimiento de la represión es debido a la acción del represor CI, producido de la transcripción del promotor P_{RM}. Este promotor requiere de la acción del mismo represor CI para activarse. El promotor P_{RM} se solapa con uno de los sitios de la región del operador O_R, el sitio O_{R3}. Se requiere primeramente que el represor CI actúe impidiendo la transcripción de los promotores P_L y P_R, por medio de una unión en forma homodímera de CI, sobre el lado derecho en los sitios O_{R1} (el cual se solapa con el promotor pR) y O_{R2}, y del lado izquierdo a los sitios O_{L1} (que se

sobrelapa con el promotor P_L) y O_{L2}. El dímero de CI se une preferentemente a la región O_{R1} del lado derecho, y a O_{L1} del lado izquierdo. Estas uniones permiten que de manera cooperativa el siguiente homodímero de CI se una a O_{R2} y O_{L2}, respectivamente. La unión del represor al sitio O_{R2} permite que la ARN polimerasa unida al promotor P_{RM}, se active y transcriba al gen *ci*, produciéndose más represor (Kameyama *et al.*, 2001).

1.2 El bacteriófago P22

Es un fago temperado que infecta a *Salmonella serovar Typhi*.

Reconoce a la célula por la unión de Gp9 (tailspike trimer) al antígeno O del lipopolisacárido del hospedero y después se une a un segundo receptor, lo que lleva a la inyección de las proteínas E. Esto es requerido para que el ADN entre a la célula. Después de la infección puede entrar a lisis o lisogenia (Prevelige., 2006). Vía lítica: sucede inmediatamente después de la infección y termina 1 hora después con la liberación de 300-500 fagos seguida de la lisis de la célula (Prevelige., 2006).

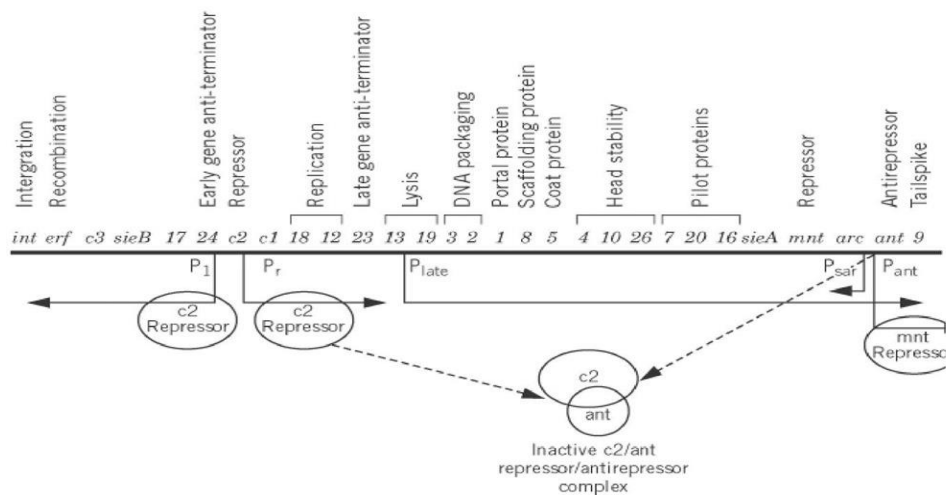


Figura 2. Mapa genético del bacteriófago P22. Los genes están posicionados encima de la línea, con sus funciones indicadas arriba. Las regiones promotoras y lugares de acción del represor están indicadas debajo de la línea. La proteína represora c2 inhibe la síntesis de los genes tempranos, P_L y P_R. La acción de los anti terminadores 24 y 23 resulta en la expresión de genes tempranos y tardíos, respectivamente. Es de notar que los genes con funciones relacionadas están agrupados. Fuente: Prevelige., 2006.

1.2.1 Vía lítica

Los primeros genes que se expresan son los “genes tempranos inmediatos” que están adyacentes al gen del represor $c2$ y son transcritos por la polimerasa del hospedero que reconoce a los promotores P_R , P_L y P_{ant} . Estos genes tempranos codifican para proteínas cuya función está involucrada en la replicación, recombinación y regulación de la expresión génica. Existen 2 genes reguladores: el gen 23 y el gen 24 cuyos productos tienen función de antiterminadores. En ausencia de la función antiterminadora-temprana del gen 24 (equivalente al gen N de λ), los transcritos iniciales de los promotores P_R y P_L terminan antes de que los genes tempranos sean transcritos; al contrario, en presencia del gen 24 ocurre una transcripción eficiente (Prevelige., 2006).

El producto del gen 23 (equivalente al gen Q de λ), proveniente del promotor P_R , antitermina la transcripción originada del promotor P_{LATE} y el producto de esta antiterminación es un transcrito de 20 mil bases que codifica para los genes requeridos para el ensamble de las estructuras del virión, y liberación de los fagos. El ADN del fago proveniente del virión es lineal y es circularizado en el citoplasma por recombinación y subsecuentemente replicado por el mecanismo del círculo rodante. El concatémero resultante es empaquetado en la cápside iniciando en un sitio específico llamado “*pac*”. Aproximadamente 43,500 pb de ADN son empaquetadas en la cápside. Los productos de los genes 2 y 3 son requeridos para el empaquetamiento y actúan formando un complejo (Prevelige., 2006).

1.2.2 Vía lisogénica

Vía lisogénica: el cromosoma del fago se integra en el cromosoma del hospedero y es pasado a las células hijas cuando la célula se replica y entra en división. El cromosoma de P22 se integra en el cromosoma de la célula hospedera en un sitio específico, llamado sitio *attB*, la integración se facilita por el producto del gen *int* y con la ayuda de factores de integración del hospedero IHF (*host-encoded Integration host factor*), aunque su función parece ser no esencial. En el estado de lisogenia pocas proteínas del profago son producidas. Los genes responsables para

evitar el crecimiento del fago y muerte del hospedero son reprimidos por medio de dos proteínas represoras, *c2* y *Mnt*.

La proteína *c2* actúa en la región de inmunidad (*immC*) de manera análoga al represor *CI* de λ , se une a O_L y O_R para evitar la transcripción de genes tempranos.

La región *immI*, incluye un antirepresor (*Ant*) y tres represores (*Mnt*, *Arc* y el ARN *sar*). *Mnt* actúa reprimiendo la transcripción del antirepresor *Ant*. Si *Mnt* se apaga, *Ant* es sintetizada, *Ant* se une e inactiva a la proteína represora *c2* lo que resulta que el profago entre a lisis (Prevelige., 2006).

El gen *ant* es transcrito a partir del promotor fuerte P_{ant} , la producción de *Ant* es regulada por si misma a través de la acción del producto del gen *arc* cuya proteína se une a P_{ant} , así inhibiendo la síntesis de *Ant*. En mutantes de *Arc*, grandes cantidades de *Ant* son producidas y estos niveles son lo suficientemente elevados para interferir con la síntesis de otras proteínas del fago (Prevelige., 2006).

El gen *ant* se encuentra río abajo del P_{LATE} y es adicionalmente transcrito durante el ciclo lítico como parte del operon tardío. A pesar de la transcripción de P_{LATE} , la proteína *Ant* no es subsecuentemente sintetizada ya que un promotor adicional P_{sar} que se encuentra dentro del gen *ant* dirige la síntesis de un ARN antisentido de 69 nucleótidos que se une al ARN mensajero de *ant* e inhibe su traducción (Prevelige., 2006).

Mnt y *Arc* han sido estudiadas como proteínas de unión a ADN, son miembros de la familia de factores de transcripción “ribbon-helix-helix”, en la cual las láminas β antiparalelas, son usadas para unirse al operador (Prevelige., 2006).

Mnt: funciona como un tetrámero y durante el estado lisogénico se une a un operador de 17 pb (O_{mnt}) el cuál se sobrelapa con el punto de inicio de la transcripción del promotor P_{ant} , de esta forma evita la transcripción, por bloquear la unión de la ARN polimerasa a P_{ant} . Por otro lado el operador de *Mnt* se encuentra adyacente a la región -35 de su promotor, P_{mnt} , cuando *Mnt* se une a O_{mnt} estimula su transcripción. *Mnt* esta compuesto de dos dominios estructurales, un dominio dimérico N-terminal, responsable de la unión al operador con especificidad y un

dominio tetramérico C-terminal el cual comprende dos hélices α antiparalelas con empaquetamiento helical asimétrico y un único giro derecho (Prevelige., 2006).

Arc: funciona como un dímero y dos dímeros unidos a un sitio operador de 21 pb (O_{arc}) en una reacción muy cooperativa (Prevelige., 2006). El gen de Arc es co-transcrito con el gen ant del promotor P_{ant} . Durante el ciclo lítico, Arc se une a O_{arc} y reprime tanto su síntesis como la del antirepresor.

En el bacteriófago P22 podemos apreciar diferentes mecanismos mediante los cuales los represores mantienen la lisogenia, a nivel de unión a operadores y ARN antisentido.

1.3 El bacteriófago Mu

La caracterización temprana del colifago Mu reveló que las lisogénas fueron con frecuencia mutantes de uno o de varios genes hospederos (Toussaint, 1987), de esto se le asignó el nombre de Mu, por mutador. Análisis detallados revelaron que las mutaciones fueron causadas por inserciones del profago dentro del gen mutado y la especificidad de la inserción de Mu era menor a la del fago lambda, el cual casi siempre inserta su ADN en un sitio específico attB en el cromosoma bacteriano (Baker., 1995).

El bacteriófago Mu es un fago temperado de *Escherichia coli* (Taylor, 1963) y replica su genoma de cadena doble lineal de 37 kb por múltiples rondas de transposición-replicación de ADN durante el crecimiento lítico. Aproximadamente a 1500 pb en el extremo izquierdo del genoma se encuentra el gen que codifica al represor *c* y el gen *ner*, los cuales son expresados de promotores opuestos y convergentes, así como también secuencias de ADN a las cuales sus productos génicos se unen.

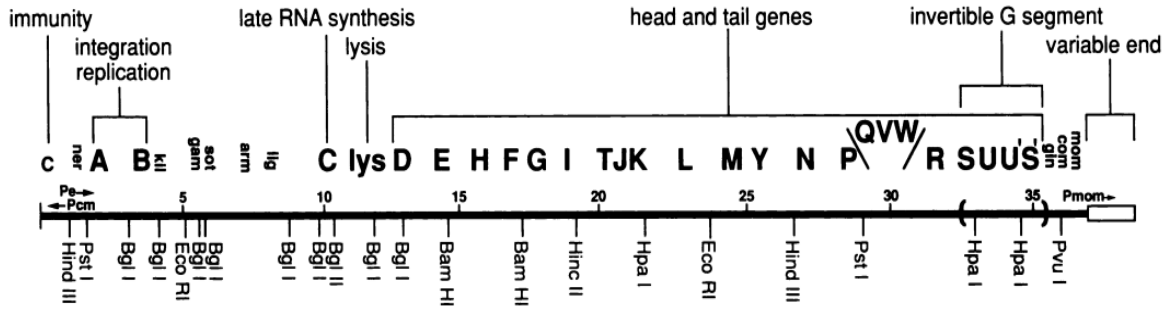


Figura 3. Mapa genético de Mu. La localización y orientación de los promotores P_e y P_{cm} están indicadas en la parte superior del mapa, en la parte inferior del mapa se encuentran las posiciones de los sitios de restricción reportadas por Marrs y Howe. Adaptado de Stoddard y Howe., 1989.

El represor *c* se une a una región de aproximadamente 200 pb localizada a 1 kb del extremo final izquierdo del genoma y está compuesta de tres sitios 01, 02 y 03, sobrelapando a dos promotores divergentes, P_e y P_c (Figura 4). La transcripción de P_e , localizado en 02, lleva a la expresión de funciones líticas tempranas incluyendo *ner*, la transposasa *pA* y la proteína accesoria *pB*, las cuales estimulan el proceso de transposición. La transcripción a partir del promotor P_c , el cual está localizado en el sitio 03 (Figura 4) lleva a la síntesis del represor *c*. Los sitios operadores 02, 01 y 03 contienen 4, 3 y 2 repetidos imperfectos de 11 pb, respectivamente (Alazard *et al.*, 1998).

El factor hospedero de integración IHF, tiene un papel complejo en la regulación de las funciones tempranas de Mu, un sitio de unión específico para esta proteína del hospedero está localizado entre 01 y 02. La unión del factor hospedero de integración IHF, a este sitio estimula la transcripción de P_e y bajo ciertas circunstancias de P_c . También estabiliza la interacción entre el represor y los sitios flanqueantes 01 y 02 (Alazard *et al.*, 1998).

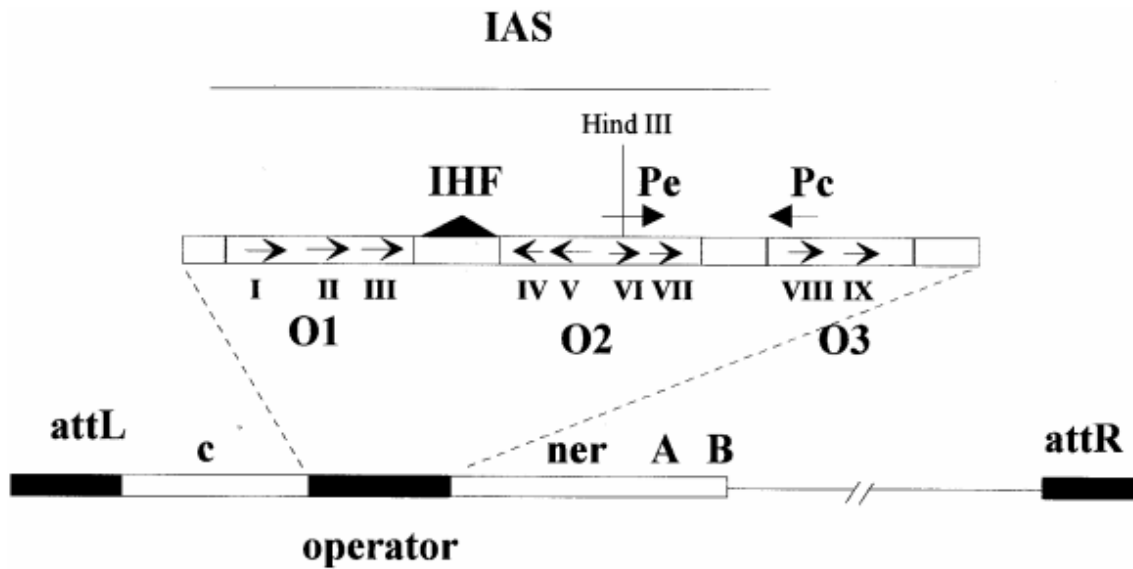


Figura 4. Organización de la región del operador temprano del bacteriófago Mu. Las cajas negras representan el extremo terminal izquierdo (attL), la región operadora y el extremo terminal derecho (attR) del genoma de Mu. Las cajas no rellenas son genes que se codifican en el operón temprano, las proteínas ner, pA y pB y el represor c. Las flechas negras y los números romanos indican los repetidos imperfectos de 11 pb encontrados en la región operadora. Alazard *et al.*, 1997

Además de su papel en el establecimiento y mantenimiento del estado lisogénico, la región que cubre O1 y O2 actúa como un potenciador, internal activating sequence (IAS) durante el ensamblaje del primer intermediario estable en transposición. Este proceso involucra la unión transitoria de la transposasa, pA a la IAS a través de su región N-terminal además de su unión a los extremos finales (attL y attR) del genoma del fago. La región N-terminal de pA tiene cerca de 44% de similitud con la del represor y se ha demostrado que el represor también inhibe el proceso de transposición por competir con el dominio N-terminal de la transposasa por el sitio de unión a IAS (Alazard *et al.*, 1998)

II. ANTECEDENTES DIRECTOS

Algunas propiedades del grupo de inmunidad I al que pertenece el fago mEp021 fueron descritas en el 2001 (Kameyama *et al.*, 2001). Este grupo de fagos fue obtenido de muestras fecales de individuos provenientes de dos ciudades del estado de Morelos. Este grupo de fagos, de inmunidad única se caracteriza por cohabitar con fagos lambdoides en el tracto intestinal y al igual que los fagos lambdoides requieren a los factores Nus del hospedero para crecer. A 32°C o a temperaturas más bajas, alrededor del 80% de un total de 50 fagos no son capaces de desarrollarse, contrario a lo que ocurre en el grupo de los fagos lambdoides donde a 32°C todos pueden crecer. Los profagos de este grupo (mEp021) son pobremente inducidas por luz UV y durante la infección exhiben un periodo de latencia más largo que los fagos lambdoides. Con respecto a su ADN, es resistente a los cortes de algunas enzimas de restricción (*BglI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacII*, *Sall*, *SphI* y *XhoI*), probablemente presentan modificaciones químicas en los nucleótidos del ADN. Por otro lado, un fragmento de 300 nts de mEp021 es capaz de conferir actividad hemolítica a la cepa de *E. coli* K-12 W3110 cuando el fragmento es clonado en un vector de expresión. A su vez cuando este fragmento fue usado como sonda en el Southern blot, el ADN de 5 fagos pertenecientes al mismo grupo de inmunidad hibridaron con él. El grupo de fagos al que pertenece mEp021 no es reconocido por anticuerpos anti-lambda.

En el 2013 la M. en C. Leonor Lastra caracterizó el gen del represor de mEp021, empezando con un análisis bioinformático y posteriormente utilizando estrategias genéticas para mutar el genoma de mEp021, con el fin de conseguir cambios en el gen represor, el lisado de mEp021 fue tratado con Clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$), de este tratamiento obtuvo 31 mutantes de mEp021 con fenotipo de placa clara y 10 con un fenotipo de placa semi-turbia. La secuenciación en estas mutantes reveló cambios en el gen del represor, lo cual justifica el fenotipo de placa clara y semi turbia. El proyecto continuó con un ensayo de “complementación” entre las diferentes mutantes generadas.

En el fago λ , el goteo de λ cl^- , cll^- y $clll^-$ produce placas claras en el tpiz bacteriano; sin embargo cuando los goteos se sobrelaparon entre las diferentes mutantes, en la intersección de las dos gotas se produce el halo turbio.

Sin embargo en mEp021, de 31 mutantes de placa clara el sobrelapamiento entre las distintas mutantes, ninguna produjo en su intersección un halo turbio. La interpretación de los resultados fue que las mutaciones son exclusivamente en un solo gen, el gen represor de mEp021. Debido a que no hubo una recuperación del fenotipo de placa turbia, estos resultados sugirieron que es solo un elemento génico el relacionado a la lisis.

Por otro lado, la M. en C. Lastra prolong el tratamiento con clorhidrato de hidroxilamina hasta 64 horas lo que generó 6 mutantes, las cuales fueron capaces de crecer en la bacteria lisogéna W3110(mEp021) produciendo placas “semi turbias”; algo de suma importancia para nuestro estudio es que la secuenciación no presentó cambios mutacionales en el gen del represor. La M en C. Lastra atribuyó que estas mutantes pudieron crecer en la lisógena debido a que posiblemente, presentaban cambios en los operadores, desafortunadamente su análisis no se realizó.

En el 2017, el M. en C. Caraballo observó que las lisógenas para mEp021 podían generar con cierta frecuencia y espontáneamente fagos con fenotipo de placas claras. Posteriormente, de los fagos de ests placas se les realizaron análisis genómicos de restricción con la enzima *NdeI* y el patrón fue similar al de mEp021 tipo silvestre, indicando así que no era por contaminación de algún otro fago lítico; interesantemente también hubo 3 muestras (dos provenientes de placa clara y una proveniente de placa turbia) que presentaron diferente migración en una banda específica, se comprobó que esto era debido a la eliminación de un fragmento de la secuencia del gen que codifica para la proteína J, en específico parte de la región del extremo C-terminal, se descartó que esta eliminación fuera la responsable de la variación del fenotipo de mEp021, ya que la eliminación había ocurrido en 2 de 6 placas de fenotipo claro y 1 de 2 placas de fenotipo turbio.

Previamente en Kameyama *et al.*, (1999) se había reportado que mEp021 no presentaba viabilidad a 32°C y en el proyecto del M. en C. Caraballo inicialmente parecía que las variaciones de la temperatura tenían relación con el fenotipo de placa clara; por este motivo el M. en C. Caraballo llevó a cabo ensayos de infección a diferentes temperaturas (32°, 37°C y 42°C) con los fagos de fenotipo de placa clara y placa turbia de mEp021; observó que a 32° el crecimiento era limitado para ambos fagos siendo menor en el fenotipo turbio; otra observación a esta temperatura (32°C) fue que el fenotipo de las placas claras parecía fenotipo “turbio”; a 37°C se observó el fenotipo correspondiente de las cepas, claro o turbio así como su título respectivo y a 42°C todas las placas presentaron un fenotipo claro.

Siguiendo con este experimento, se secuenciaron dos genes de las cepas de fenotipo claro: el gen del represor y el gen probable del antirepresor y solo se encontraron mutaciones en el gen del represor con una pérdida de 120 nts, la cual estaba flanqueada por una secuencia repetida directa de 12 nts TCATGCGGGCGC, la delección de 120 pb deja una sola secuencia de 12 pb. Posteriormente se clonaron el gen del represor y el gen del probable antirepresor y fueron transformadas a células *E. coli DH5-α*, se evaluó la infección de mEp021 a las células *E. coli DH5-α* con el plásmido con el gen del represor, presentó inhibición de la infección por mEp021. En adición se llevaron a cabo 3 ensayos de infección a diferentes temperaturas, 32°, 37°C y 42°C. El M. en C. Caraballo reportó que a 32° y 37°C no hubo infección por las cepas claras o turbias, pero a 42°C las cepas claras si pudieron infectar. El M. en C. Caraballo concluyó que el represor no es termosensible debido a que a 42° las cepas turbias no se replicaron y que a 42° existe alguna propiedad (de la cepa con fenotipo claro) que las hace insensibles a la actividad del represor natural, probablemente a esta temperatura se expresa el antirepresor.

Por otro lado se clonaron 3 regiones relacionadas al gen del antirepresor, la primera construcción abarcó un previo codón de inicio al putativo ATG correcto y en el ensayo de infección no hubo ninguna diferencia entre las cepas control y problema. Posterior a este ensayo, al analizar nuevamente esta región, se encontró que el gen

antirepresor se encontraba en una región putativa promotora, por lo que el M. en C. Carballo ideó dos construcciones más, una clonación que abarcaba el putativo codón de inicio correcto para el gen antirepresor; en el ensayo de infección se presentó inhibición del crecimiento de cepas de mEp021 de fenotipo claro o turbio y la otra construcción que abarcaba el operón completo (aproximadamente 5 genes), al realizar el ensayo de infección las placas turbias dieron un fenotipo claro. Los resultados anteriores sugieren que el producto del gen antirepresor puede funcionar como un regulador transcripcional que se asocia a una región putativa operadora y que está involucrada en el desarrollo de mEp021; en cambio, la expresión del operón completo sugiere la existencia de otro producto que esté afectando directamente la función del antirepresor, con función antagónica al represor. Sin embargo, es necesario la reproducibilidad de estos ensayos, para poder llegar a una conclusión.

III. JUSTIFICACIÓN

El fago mEp021 ha sido reportado como un fago que está en la microbiota intestinal y por haber sido aislado de heces de individuos provenientes de México. Es un fago no lambdaoide, ya que las sondas de λ no hibridan con su genoma, no es reconocido por anticuerpos anti- λ y tampoco se pudieron obtener recombinantes al cruzarlo con λ . mEp021 es pobremente inducido con luz UV.

Más aún, su genoma es inestable ya que puede presentar un doble fenotipo de placa (turbia y clara); la secuencia de ciertos fagos con fenotipo de placa clara presenta deleciones en el gen represor así como también se ha reportado que el gen de una de sus proteínas (J) pierde parte de su secuencia, probablemente por un evento de recombinación, al replicarse su genoma. mEp021 tiene comportamientos diferentes a temperaturas de 32°C y 42°C, siendo que a 42°C el fenotipo de placa turbia cambia a fenotipo de placa clara, algo muy inusual en un bacteriófago.

Estas características hacen que mEp021 sea diferente a λ , el bacteriófago mejor estudiado. Interesantemente, mEp021 es un fago temperado, y se ha comprobado que bacterias transformadas con el plásmido portador del gen del represor (ORF 15) son capaces de inhibir la infección por mEp021, esto nos lleva a hipotetizar que el represor reconoce a su(s) operador(es) de tal manera que evita la infección. Adicionalmente, la presencia de 1) la región intergénica de aproximadamente 306 pb localizada río arriba del gen del represor (ORF 15) y 2) una probable proteína con dominio de unión al ADN (ORF14) flanqueando también esta región intergénica, nos sugiere fuertemente que mEp021 tiene por lo menos una región de inmunidad. El escaso o nulo conocimiento de los componentes del fago mEp021 que intervienen en la vía de lisis o en lisogenia y siendo el represor uno de los principales componentes del circuito regulatorio, nos lleva a preguntarnos cuál es la región operadora-promotora del gen del represor y como se lleva a cabo su autoregulación. El esclarecer por lo pronto esta primera parte nos proporcionará elementos importantes para la comprensión del mecanismo de autoregulación del estado lisis-lisogenia.

IV.HIPÓTESIS

La región operadora-promotora localizada entre los genes que codifican para el ORF 14 y el ORF 15 (represor) está regulada por la proteína represora de mEp021.

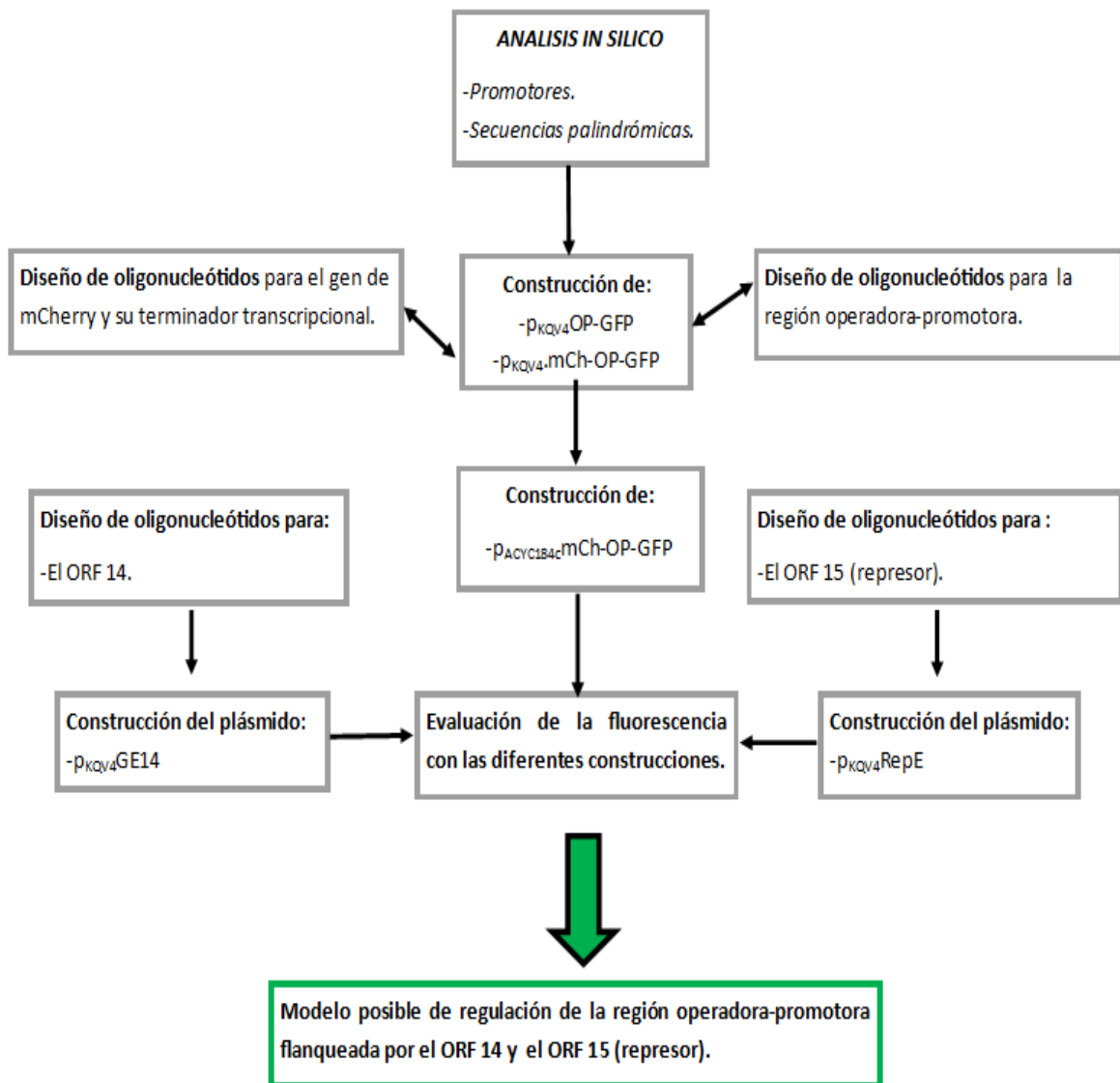
V. OBJETIVO GENERAL

Analizar la región operadora-promotora del gen del represor de mEp021.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar análisis *in silico* usando programas *BPROM*, *PALINDROMIC SEQUENCES FINDER*, *phiSITE*, entre otros, para poder localizar probables secuencias promotoras o secuencias palindrómicas de la potencial región operadora-promotora del gen represor de mEp021.
2. Diseñar y construir un plásmido: p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP, que porte la región operadora-promotora flanqueada por dos genes reporteros; mCherry y gfp, los cuales sustituirán al ORF 14 y al ORF 15 respectivamente, en el genoma de mEp021.
3. Construir el plásmido portador del gen del represor: p_{KQV4}RepE para evaluar su función sobre la región operadora-promotora (p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP) y para su posterior purificación en batch.
4. Evaluar la expresión de los dos reporteros de la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en bacterias W3110 para ver la funcionalidad de posibles promotores y W3110(mEp021) cotransformadas con el plásmido portador del gen del represor; p_{KQV4}RepE para evaluar su papel sobre la región operadora-promotora.
5. Construir el plásmido portador del ORF 14: p_{KQV4}GE14 para conocer su función sobre la región operadora-promotora (p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP).

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Bacterias, plásmidos y bacteriófagos

Las cepas utilizadas en este proyecto fueron la W3110 para los ensayos de comprobación de funcionalidad del Represor, del Represor ($\Delta 120$), del producto del ORF 14 y obtención de lisógenas, adicionalmente a esta cepa se utilizó W3110(mEp021) para los ensayos de fluorescencia. La cepa DH5 α fue empleada en la primera transformación de las distintas construcciones generadas.

Tabla 2. Plásmidos utilizados y construidos en este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pJET 1.2 blunt	Vector de transición, 2974 pb, Amp ^R .	ThermoFisher.
pKQV4	Vector de expresión, 5707 pb, Amp ^R .	Strauch <i>et al</i> , 1989.
pACYC184c	Vector de expresión, 4,245 pb, Tc ^R y Cm ^R .	BioLabs.
pSEVA 227-R	Vector de expresión, 4516 pb, Km ^R .	SEVA.
p_{KQV4}RepE	pKQV4 con el gen represor+6xHis E de mEp021, Amp ^R .	Este estudio.
p_{KQV4}RepE($\Delta 120$)	pKQV4 con el gen represor mutado (delección de 120 nt abarca desde la Arginina 15 hasta la Isoleucina 52)+6xHis, Amp ^R .	Este estudio.
p_{KQV4}GE14	pKQV4 con el gen de la proteína hipotética 14 de mEp021, Amp ^R .	Este estudio.
p_{KQV4}OP-GFP	pKQV4 con la región operadora-promotora del gen represor de mEp021 rio arriba del gen GFP, Amp ^R	Este estudio.
p_{ACYC184c}OP-GFP	pACYC184c con la región operadora-promotora rio arriba del gen reportero GFP, Cm ^R .	Este estudio.
p_{KQV4}mCh-OP-GFP	pKQV4 con la región operadora-promotora flanqueada por el gen reportero mCherry y GFP en ambos sitios, Amp ^R .	Este estudio.
p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP	pACYC184c con la región operadora promotora flanqueada por el gen reportero mCherry y GFP en ambos lados, Cm ^R .	Este estudio.

En este estudio se utilizó el bacteriófago mEp021 para la amplificación de la región operadora-promotora del gen represor, así como del ORF 14 (con dominio de unión a ADN) y el ORF 15(represor). El bacteriófago λ fue empleado como control en la comprobación de lisógenas de mEp021.

8.2 Cultivos bacterianos

Las diferentes cepas manejadas en este estudio fueron cultivadas en 5 ml de medio Luria Bertani con o sin antibiótico según correspondiera, a 37°C durante toda la noche a 180 rpm.

8.3 Propagación del bacteriófago mEp021

Tomando una caja de TΦ sólida, se goteó en un extremo 10 µl del stock de lisado de mEp021, se dejó escurrir y se dejó secar, después en un tubo de 5 ml, partiendo de un cultivo O/N de la cepa W3110, se tomaron 350 µl y se adicionaron a 3.5 ml de medio TΦ líquido (~40°C), se procedió a mezclar utilizando el vortex y se depositó en la caja de TΦ sólido, se llevó a incubación durante toda la noche a 37°C.

8.4 Obtención del lisado fágico

A partir de la obtención de placas aisladas obtenidas en la propagación del bacteriófago mEp021, se tomaron de 8 a 11 placas con la pipeta Pasteur, se adicionaron 350 µl del cultivo de W3110 y 50 µl de una solución de MgCl₂ 0.4M y CaCl₂ 0.1M con el fin de favorecer la infección de los fagos y se mezcló. Se dejó reposar durante 15 minutos, teniendo en cuenta que todas las placas quedaran cubiertas con el cultivo y la solución, transcurrido el tiempo se adicionaron 50 ml de LB y se dejó en agitación a 180 rpm a 37°C durante toda la noche. Al siguiente día, se agregaron 5 ml de cloroformo al cultivo y se mezcló en el vortex, se dejó reposando por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 4,340 x g a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se guardaron aproximadamente 15 ml en un tubo de vidrio y el resto se depositó en un tubo falcón de 50 ml. Se procedió a calcular el título fágico. Los tubos fueron almacenados a 4°C.

8.5 Titulación del bacteriófago mEp021

Partiendo del stock generado previamente, se tomaron 100 µl del lisado fágico y se resuspendieron en 900 µl de TMG, de tal manera que tuviéramos diluciones seriadas de 10⁻¹-10⁻⁸. Se tomaron 5 µl de cada dilución y se gotearon en un tápiz de

W3110, se dejaron secar, seguido de esto se incubó a 37°C durante toda la noche. Al siguiente día se calculó el título viral con la fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas} \frac{\text{UFP}}{\text{ml}} = \frac{(\# \text{ de placas en } 5 \mu\text{l})(\text{Factor de dilución})}{\text{Volumen goteado en } \mu\text{l}.}$$

8.6 Generación de lisógenas

Se utilizó medio T ϕ con un tapiz de células *E. coli* W3110, se le gotearon 5 μ l del fago de las diluciones y se incubó toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente se tomaron las células del centro de la placa de lisis y se estriaron. Se hicieron 4 pases, en cajas de cultivo con LB. Las bacterias candidatas se sembraron en medio líquido LB y se realizó un tápiz con T ϕ fundido sobre cajas de agar, donde posteriormente se gotearon las diluciones del fago que se utilizó para la construcción de las lisógenas. Para comprobar que la resistencia a la infección de los fagos detectada en ciertas lisógenas se debía al fenómeno de exclusión o de inmunidad y no a la resistencia por alguna mutación, se tomó 1 ml de cultivo bacteriano y se le adicionó 200 μ l de CHCl₃ y se centrifugó para obtener el sobrenadante, el cual se goteó (5 μ l) sobre un tápiz de una cepa bacteriana susceptible (*E. coli* W3110), de tal manera que si la candidata era lisógena, el sobrenadante debería contener viriones y por lo tanto produciría placas.

8.7 Extracción del ADN del bacteriófago mEp021 mediante el protocolo DEAE-celulosa (Silhavy,1984)

Para obtener ADN del fago se realizaron algunas modificaciones del protocolo reportado por Silhavy, 1984. Se tomó 1 mL de un lisado de 1x10¹⁰ UFP/ml de mEp021 el cuál se mezcló con 600 μ L de DEAE-celulosa (ver Apéndice). La mezcla se agitó por inversión 15 veces posteriormente se separó la DEAE-celulosa por centrifugación a 20,400 x g por 15 minutos a 4°C. Se repitió nuevamente este procedimiento para eliminar la celulosa restante y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril. A 800 μ L del sobrenadante recuperado se le adicionaron 100 μ L de NaCl 5M y 540 μ L de isopropanol, posteriormente la mezcla se incubó durante 20 min a -20°C. La mezcla se centrifugó a 20,400 x g por 5 minutos para

posteriormente descartar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 200 μ L de TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). Se adicionaron 200 μ L de fenol y se mezcló brevemente en vortex, la mezcla se centrifugó a 20,400 x g por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa, en la cual se encuentra al ADN del fago. La muestra se precipitó adicionando 15 μ L de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol al 95%. Se incubó durante 5 minutos en hielo y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se retiró y se dejó secar la pastilla hasta evaporar completamente el etanol restante. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de TE y se almacenó a -20°C hasta su posterior empleo.

8.8 Ensayo de restricción del ADN del bacteriófago mEp021

Se tomaron 10 μ l (-1 μ g) del ADN del fago y se adicionaron 10 U de la enzima *Nde*I. Los componentes de la reacción así como los volúmenes se encuentran enlistados en la Tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la reacción de restricción del ADN del bacteriófago mEp021.

Componente	Volumen (μ l)
H ₂ O	7
Buffer 4 (10x)	2
<i>Nde</i> I (10 U)	1
ADN mEp021	10
Volumen total	20

La reacción total fue incubada a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción total fue cargada en un gel de agarosa al 1% y corrida a 80 V durante 1 hora y 20 minutos.

8.9 Análisis *in silico* de la región operadora promotora del gen represor del bacteriófago mEp021

Se utilizaron 3 programas para predecir los promotores en esta región, siendo *SoftBerry*, *phiSITE* y *Berkeley Drosophila Genome Project* los seleccionados. Para la búsqueda de secuencias palindrómicas, se empleó el programa *Palindromic sequence finder*.

8.10 Amplificación de la región operadora promotora del gen represor

Posterior al análisis *in silico*, se diseñaron los oligos para amplificar esta región, los cuales incluían los codones de inicio del ORF 14 y del represor, tanto el oligonucleótido *forward* como el *reverse* tienen un cambio nucleotídico el cual modifica la Adenina del codón de inicio ATG de ambos genes. Adicional a este cambio, contienen los sitios de restricción para 5'-*Hind*III, 5'-*Sac*I, 5'-*Sph*I, 3'-*Eco*RI y 3'-*Bam*HI.

8.11 Diseño de los oligonucleótidos y amplificación mediante la PCR de los genes utilizados

8.11.1 Amplificación del ORF 15 (represor)

Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar el gen represor (ver Tabla 3), con los sitios de restricción 5'-*Eco*RI y 3'-*Hind*III, en el oligonucleótido reverso se modificó el codón de paro y se adicionaron 6 codones para Histidinas, para facilitar la posterior purificación de la proteína.

8.11.2 Amplificación del ORF 14

La característica de estos oligos es que tienen los sitios de restricción 5'-*Eco*RI y 3'-*Hind*III, en el oligonucleótido reverso se adicionó una base degenerada, W, con la cual se generaron dos amplificadas, uno en el cual se conserva el codón de paro y otro que se modifica a un codón de Arginina fusionado con los 6 codones de Histidinas.

8.11.3 Amplificación del gen mCherry

Se diseñaron oligos para amplificar el gen de mCherry (ver Tabla 4) junto con su terminador transcripcional con los sitios de restricción 5'-*Sph*I y 3'-*Eco*RV, adicionando una secuencia SD al oligonucleótido *forward*.

Tabla 4. Características y secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia 5'-----3'	Tm(°C)	Amplicón (pb)
Opprom fw.	atttcacaagcttgagctcgcgatgcaatatcaaaagccttgcgaaacgtaatacaggtttcttctc	68	424
Opprom rv.	ttggcccaggatccgaattccgcgatgagttgtttgctaagtcataccattttgttttcagatcgctac	68	424
Rep fw.	Acgcaggtggaattcatgaaaacaaaatggtatgacttagcaaaacaac	68	693
Rep rv.	caatgtcaaagcttagtgatggtgatggtgatgtggcaggtttacgatcttcgcatc	68	693
Fw g14	Acgcaggtggaattctaggagaaagaacatgtattac	50	309
Rv g14	caatgtcaaagcttagtgatggtgatggtgatgcWaaaacattaactgataaac	50	309
Fw mCh	Gcatgctaggaggaaaaacatatggtg	52	863
Rv mCh	Gatatctaattattggggaccctg	52	863

Nota: W: A o T.

La reacción de PCR para la amplificación de estos genes y la región operadora-promotora consistió en: H₂O, Buffer Taq 10x, dNTP's 10 µm, oligonucleótidos forward y reverso, Dream Taq polimerasa (2.5 U), ADN o lisado fágico, en un volumen final de 20 µl. Las condiciones para la amplificación de los genes o regiones de interés se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones requeridas para la PCR

Ciclo de reacción.	Temperatura.	Tiempo.
Desnaturalización inicial.	94 °C.	5 min.
25 ciclos.		
Desnaturalización.	94 °C.	45 s.
Alineamiento.	-*-	30 s.
Elongación.	68 °C.	1 min.
Elongación Final.	72 °C.	7 min.

Nota: -*- varía dependiendo el par de oligonucleótidos empleados, ver Tabla 4.

Los productos finales de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 80 V durante 45 minutos, posterior a esto se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

8.12 Corte y purificación de las bandas

Las bandas esperadas se cortaron y fueron purificadas con el kit Favor™ GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las bandas cortadas fueron depositadas en un tubo de microcentrífuga estéril y se le adicionaron 500 µl del buffer FADF, se mezclaron en el vortex y se procedió a la incubación por 10 minutos a 55°C. Posterior a esto, se transfirió a la columna y se centrifugó a 11,000 x g durante 30 segundos, se descartó el filtrado y se adicionaron 750 µl del Buffer de lavado a la columna, se centrifugó a las mismas condiciones y tiempo, se deshecho de nuevo el filtrado y se procedió a centrifugar por 3 minutos a máxima velocidad. La columna fue colocada en un tubo de microcentrífuga, se adicionaron 45 µl del buffer de elución (previamente calentado a 45°C) a la columna y se dejó reposar por 1 minuto. Para eluir el ADN, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min. El filtrado fue empleado para las ligaciones. Posteriormente fue almacenado a -20°C.

8.13 Clonación de los genes en el vector de transición pJET1.2/blunt

Partiendo de las bandas purificadas se procedió a utilizar el vector pJET1.2/blunt, (a excepción del represor mutado, el cual fue obtenido mediante una clonación directa en el vector pKQV4). Se modificó el protocolo del fabricante y se utilizaron los componentes de la reacción mostrados en la Tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción blunting.

Componente.	Volumen (µl)
H ₂ O.	1.5
Buffer de reacción 2x.	5
Producto de PCR (purificado).	2
Enzima DNA Blunting.	0.5
Volumen total.	9

La reacción se mezcló en vortex, se centrifugó por 5 segundos y se incubó por 5 minutos a 70°C e inmediatamente se colocó en hielo.

Posteriormente se agregaron los reactivos para la ligación, mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7. Componentes de la reacción de ligación.

Componente	Volumen(μl)
PJET1.2/blunt Cloning Vector	0.5
Ligasa T4.	0.5
Volumen total.	10

La reacción de ligación se mezcló en vortex, se dio un spin de 5 segundos y se incubó por 5 minutos a 22°C. Posteriormente, se transformaron 5 μ L de la reacción de ligación en bacterias DH5 α quimiocompetentes. Las candidatas obtenidas se sembraron en cajas de LB con ampicilina (100 mg/ml).

8.14 Selección de candidatas con el inserto de interés

Se tomaron 6 colonias transformadas con la ligación de interés y se purificaron (para extraer plásmido con la técnica de Miniprep). El plásmido extraído de las candidatas fue caracterizado por restricción con las enzimas correspondientes o mediante amplificación por PCR. Las candidatas que liberaron el fragmento esperado o amplificaron la banda esperada fueron seleccionadas para la secuenciación y clonación en el vector de expresión pKQV4.

8.15 Clonación de los genes de interés en el vector de expresión pKQV4GFP o pACYC184c

Las candidatas que fueron positivas en liberar el fragmento deseado y no presentar mutaciones en su secuencia fueron seleccionadas para su clonación en pKQV4GFP o pACYC184c, se restringieron a 37°C durante toda la noche tanto el vector de transición así como el vector de expresión con las enzimas correspondientes en un volumen final de 20 μ l, se procedió a visualizar en gel de agarosa al 1%. Se cortaron y purificaron las bandas de interés para su posterior ligación y transformación en bacterias DH5 α quimiocompetentes.

8.16 Preparación de bacterias quimiocompetentes

A partir de cultivos O/N, de las bacterias DH5 α , W3110 y W3110(mEp021) se tomaron 500 μ l y se inocularon en 50 ml de medio LB, se dejaron en agitación a 37°C en 180 rpm hasta que alcanzaron una O.D_{600nm} de 0.5. El pellet se obtuvo por centrifugación a 3,010 x g durante 10 minutos y fue resuspendido en frío con 16.6 ml de la solución TfbI, se mantuvo en hielo por 5 minutos. Posterior a esto se centrifugó a 3,010 x g durante 10 minutos, se deshecho el sobrenadante y el pellet se mantuvo en hielo y se resuspendió con 2 ml de la solución TfbII. Se mantuvo en hielo por 15 minutos para luego hacer alícuotas y almacenarlas a -70°C o se emplearon al momento.

8.17 Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico

Las bacterias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes preparadas previamente se utilizaron para transformar las reacciones de ligación. 80 μ L de bacteria se transfirieron a un tubo estéril de microcentrífuga. Se les agregó 10 μ L de la muestra de ligación y se agitaron suavemente. Se dejaron incubar durante 30 min en hielo para posteriormente dar un choque térmico a 42°C durante 40 segundos y de inmediato poner en hielo por 2 minutos. A cada tubo se le adicionó 1 mL de medio LB o SOC y se incubó a 37°C durante 1 hora. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto y se resuspendieron en 100 μ L del sobrenadante restante. Finalmente, las bacterias se espatularon sobre cajas de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) o el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las candidatas obtenidas se sembraron para posteriormente extraer plásmido y realizar ensayos de PCR o restricción, siguiendo con la secuenciación de aquellas que fueran candidatas positivas.

8.18 Extracción del ADN plasmídico mediante el método de Miniprep

Se tomaron 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) o cloranfenicol (30 mg/ml), según correspondiera. Se inoculó una colonia de bacteria y se incubó toda la noche a 37°C a 180 rpm. Al siguiente día se empastilló el cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL mediante centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto. La pastilla se resuspendió en 100 µL de solución I (ver Apéndice) .Después se adicionaron 200 µL de solución II (ver Apéndice) y se mezcló por inversión aproximadamente 5 veces. Se agregaron 150 µL de solución III (ver Apéndice) a 4°C, se agitó por vortex y se dejó reposar durante 5 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó a 20,400 x g por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml. Se adicionó 1 volumen (500 µL) de Fenol, se mezcló en vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 20,400 x g por 2 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se transfirió a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml. Posteriormente, se hicieron dos lavados con cloroformo, se adicionó 1 volumen de cloroformo, se mezcló durante 10 segundos en vórtex y se centrifugó a 20,400 x g para recuperar el sobrenadante transfiriéndolo a un nuevo tubo estéril de 1.5 ml. Se agregaron 2 volúmenes (1 ml) de Etanol absoluto grado biología molecular a temperatura ambiente, la mezcla se agitó en vortex por 10 segundos y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó a 20,400 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante. La pastilla se lavó 3 veces con 1 ml de Etanol al 70%, la mezcla se agitó en vortex hasta despegar la pastilla, se centrifugó a 20,400 x g durante 5 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. La pastilla se dejó secar al mechero hasta eliminar por completo los restos de etanol presentes en esta. La pastilla seca se resuspendió en 55 µL de H₂O y se le adicionó RNAsa, se dejó reposando por 30 minutos, posterior a esto, se almacenó a -20°C para su posterior uso.

8.19 Reacción de secuenciación

De las candidatas seleccionadas (por ensayos previos donde se observó la libreción del fragmento de interés) se extrajo el ADN plasmídico y se secuenciaron los fragmentos clonados utilizando el kit BigDye® Terminator Kit protocol (Applied Biosystems), los componentes de la reacción se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes de la reacción de secuenciación.

Componente	Volumen (μl)
H₂O.	12
Buffer 5x.	2
Oligo Fw o Rv.	1
Betaina 5%.	0.5
DMSO 5%.	0.5
ADN.	1
Mix 1.1.	2
Volumen total.	20

La reacción se llevó al termociclador bajo las siguientes condiciones; ciclo inicial de 10 minutos a 94 °C y 50 ciclos de: 94 °C por 30 seg, 55 °C por 20 seg, 60 °C por 2 minutos, y un ciclo final a 60 °C por 7 minutos.

8.20 Purificación de la reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se purificó mediante precipitación con etanol de la siguiente manera: a la reacción total se le agregaron 5 μl de EDTA (125 mM) y 60 μl de etanol absoluto, se mezcló por inversión 10 veces y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos, transcurrido el tiempo se centrifugó a 20,400 x g a 4 °C por 15 minutos, para posteriormente eliminar mediante succión con micropipeta el sobrenadante, se adicionaron 60 μl de etanol al 70%, para posteriormente centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones, el sobrenadante se eliminó y la muestra se dejó secar al mechero.

8.21 Comprobación de la funcionalidad del Represor y del Represor ($\Delta 120$)

Partiendo de un cultivo O/N de la cepa con el plásmido p_{KQV4}RepE y p_{KQV4}RepE($\Delta 120$), se realizaron tapices y se gotearon diluciones del lisado del fago mEp021 y del fago λ , se dejaron secar las gotas y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

8.22 Curva de crecimiento y expresión del represor

De un cultivo O/N de las cepas W3110, W3110/pKQV4 y W3110/pKQV4RepE, se tomaron 5 ml para inocular en 50 ml de LB+ampicilina, el cultivo se incubó a 37°C, hasta que llegó a una O.D._{600nm} de 0.2, a partir de esta densidad se indujo la expresión de la proteína con 0.1 mM de IPTG por 0.50, 1, 2, 3 y 4 horas a 37°C en cada tiempo se tomó la densidad óptica. Para la expresión del represor de cada intervalo de tiempo se tomó 1 ml, el cual fue llevado a la O.D._{600nm} inicial para posteriormente centrifugar a 4,340 x g por 1 minuto, la pastilla se resuspendió en 100 μ l de buffer de carga 2x y 100 μ l de agua destilada estéril, cada tubo fue colocado en ebullición por 10 minutos para disgregar las proteínas, después se colocó en hielo por 5 minutos y finalmente se centrifugó a 21,900 x g por 15 minutos el sobrenadante se corrió en un gel de bis-acrilamida al 16%.

8.23 Preparación del gel de proteínas

El gel se preparó al 16%. El gel separador consistió en: 3.2 ml de bisacrilamida, 1.6 ml de buffer Tris-HCl pH=8.8, 64 μ l de SDS al 10%, 1.5 ml de H₂O, 50 μ l de persulfato de amonio (BioRad) y 10 μ l de TEMED (BioRad). El gel concentrador: 0.825 ml de bisacrilamida, 1.56 ml de buffer Tris-HCl pH= 6.8, 62.5 μ l de SDS al 10%, 3.75 ml de H₂O, 50 μ l de persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED, los geles fueron cargados en la base, se dejaron polimerizar, posteriormente se cargaron 30 μ l de cada muestra y 5 μ l del marcador (Precision Plus Protein Dual Xtra standard Bio-Rad), se corrió a 80 V por 8 horas.

8.24 Purificación del represor

Se inoculó una colonia de la cepa W3110/p_{KQV4}RepE en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y se dejó en agitación durante toda la noche a 37°C a 180 rpm. Al día siguiente se realizó una dilución 1:100, los 5 ml de cultivo fueron vertidos en 150 ml de medio LB con ampicilina, se dejó crecer por 2 horas, a este tiempo se tomó una alícuota para medir la densidad óptica y se ajustó a la menor densidad para tener los cultivos uniformes respecto al número de bacterias, ya ajustados los cultivos, se indujeron con 0.1mM de IPTG durante 2 horas en agitación a 180 rpm a 37°C.

8.24.1 Clarificado

Posterior a esto, se procedió a centrifugar a 4,340 x g por 10 minutos. El pellet se resuspendió en 1 ml del buffer de lisis, se adicionaron 10 µl de PBSM 100 mM y 150 µl de inhibidores de proteasas se siguió al paso de sonicación en hielo, la sonicación consistió en un primer pulso de 30 segundos a 10 micrones x 30 segundos de reposos, un segundo pulso de 30 segundos a 8 micrones x 30 segundos de reposo, un tercer pulso de 30 segundos a 6 micrones x 30 segundos de reposo, el cuarto y último pulso de 30 segundos a 4 micrones. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó a máxima velocidad por 30 minutos.

8.24.2 Purificación en *batch* con agarosa NI-NTA

En un tubo de microcentrífuga se adicionaron 100 µl de la resina níquel y se le adicionaron 500 µl del buffer de equilibrio, se invirtió 4 veces, se centrifugó a 800 x g por 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó el clarificado, se colocó en agitación rotatoria durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 800 x g por 2 minutos, se retiró el sobrenadante y se almacenó a -20°C.

Se adicionaron 500 µl del buffer de lavado, se invirtió 4 veces y se centrifugó a 800 x g por 3 minutos, este paso se repitió 4 veces. Realizados los 4 lavados, se adicionaron 100 µl del buffer de elución y se llevó a agitación rotatoria por 30

minutos, se centrifugó a 800 x g por 2 minutos. Este paso se repitió 5 veces. La proteína purificada fue visualizada en un gel al 13% de acrilamida.

8.25 Western-blot

La transferencia a la membrana se llevó a cabo haciendo un sándwich con papel filtro, membrana, gel y papel filtro, tanto el papel filtro como la membrana fueron humedecidos con buffer de tanque (Tris-Glicina 20% metanol, 0.1% de SDS). Se colocó el sándwich en la cámara de transferencia asegurándose de colocar la membrana en dirección del cátodo y se corrió a 60 V por 1 hora. Una vez llevada a cabo la transferencia a la membrana, esta se colocó en solución de bloqueo (PBS 7% leche Svelty y 0.2% Tween20 (BioRad) y se mantuvo en agitación por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de bloqueo fue sustituida por 10 ml de una nueva solución de bloqueo adicionada con anticuerpo primario (que reconoce a 6XHis) gene tex a una dilución 1: 3000. La membrana fue incubada a 4°C con agitación durante toda la noche. Una vez realizada la incubación con el anticuerpo primario, este fue retirado y se realizaron 3 lavados a la membrana de 10 minutos cada uno con una solución de PBS 0.2%Tween. El anticuerpo secundario (anti-ratón) fue adicionado en una solución de PBS 0.2%Tween y de leche Svelty 7% y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Transcurrido el tiempo, la membrana fue lavada de la misma manera a la mencionada anteriormente, posteriormente fue colocada en 10 ml de PBS.

El revelado de la membrana se realizó colocando 600 µl del reactivo luminiscente (300 µl de Luminol + 300 µl de peroxidasa) (Thermo Scientific), se dejó actuar por un minuto, la membrana se expuso a la placa fotográfica por 5, 10 y 60 segundos, la placa se colocó en la solución reveladora, hasta observar la aparición de las bandas, se enjuagó con agua, para posteriormente colocarlo en la solución fijadora, nuevamente se enjuagó con agua y se dejó secar al ambiente.

8.26 Ensayo de Fluorescencia

Para el ensayo con los vectores p_{ACYC184c}OP-GFP y p_{KQV4}mCh-OP-GFP de la transformación, sin previa purificación se tomarón 3 candidatas diferentes en cada día para cultivar, se dejarón en agitación a 180 rpm durante toda la noche, al día siguiente, los cultivos se empastillaron y se lavarón 3 veces con PBS 1X, para después ajustar a una O.D._{600nm} de 1.

Por otro lado, a partir de las transformaciones del plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en bacterias W3110 y W3110(mEp021) y de las cotransformaciones del plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y del p_{KQV4}RepE en bacterias W3110 y W3110(mEp021), se purificaron las colonias mediante varios pases, ya purificadas, se procedió a poner cultivos de 5 ml de LB suplementado con el/los antibióticos correspondientes a 37°C a 180 rpm durante toda la noche. Para este ensayo siempre se sembraron las colonias y al día siguiente se tomaba 1 colonia para proceder a cultivarla en líquido. Al día siguiente, se ajustaron todos los cultivos a una O.D._{600nm} de 0.1 y se llevaron a agitación a 180 rpm a 37°C. El primer ensayo consistió en tomar distintas alícuotas para diferentes ensayos durante 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. Se tomó 1 ml para el ensayo de fluorescencia, 500 µl para medir la densidad óptica, 1 µl para el conteo de UFC/ml y 350 µl para el ensayo de infección.

Ensayo de fluorescencia: partiendo del mililitro tomado, se centrifugaron todas las alícuotas tomadas a máxima velocidad durante 1 minuto, se retiró con micropipeta el sobrenadante y se lavó con 900 µl de PBS 1x, se centrifugó bajo las mismas condiciones y el sobrenadante se retiró con micropipeta, las pastillas fueron resuspendidas en 800 µl de PBS 1x, se midió la densidad y se ajustaron nuevamente a 0.1. Se procedió a cargar 200 µl de cada muestra por triplicado en una placa de Microflour para su posterior medición en el Synergy™. Se blanqueó con PBS 1x.

8.27 Ensayo de viabilidad y crecimiento bacteriano

Se tomaron 500 μl de los cultivos y se midió la $\text{O.D}_{600\text{nm}}$ en cada intervalo, para posteriormente realizar la curva de crecimiento. Para el ensayo de viabilidad bacteriana, se tomó 1 μl de los cultivos y se resuspendieron en 99 μl de TMG, para realizar diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} y así poder calcular las unidades formadoras de colonia/ μl (UFC/mL).

8.28 Ensayo de infección

A las alícuotas de 350 μl tomadas de los cultivos se les adicionaron 3.5 ml de T Φ suave, se mezcló en vortex y se vació en una caja de T Φ sólido suplementada con el antibiótico correspondiente, se dejó solidificar y se gotearon diluciones del fago mEp021, se dejaron secar las gotas y las cajas se llevaron a incubación durante toda la noche a 37°C.

IX. RESULTADOS

9.1 Análisis *in silico* de la región operadora-promotora del gen represor del bacteriófago mEp021

9.1.1 Predicción de promotores

El tamaño del genoma del bacteriófago mEp021 es de 54,655 pb [reportado en el GenBank con número MH706966.1], la región operadora-promotora del gen represor comprende de la secuencia 10,860 hasta 11,165 pb, siendo la longitud de 306 pb (ver Figura 6). Se encuentra flanqueada por el ORF 14 y el ORF 15 (gen del represor).

Para predecir a los promotores en esta región se utilizaron 3 programas diferentes, siendo *Softberry* (Solovyev y Salamov., 2011), *Berkeley Drosophila Genome Project* (Mrazek y Xie.,2006) y *phiSITE* (Klucar *et al.*, 2010). En la Figura 5 se muestra la localización de los promotores predichos dentro de la región operadora-promotora del gen represor.

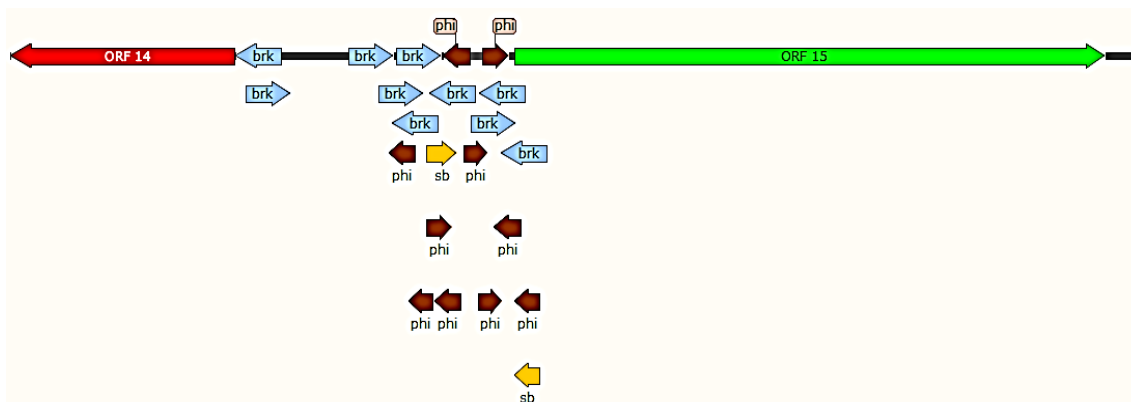


Figura 5. Visión general de los promotores predichos por los distintos programas empleados. En azul se muestran los predichos por el programa Berkeley, en café los predichos por el programa phiSITE y en amarillo los predichos por el programa Softberry.

En la Tabla 9 se muestran los programas utilizados para la predicción, el score y la secuencia de los promotores, en negrita se muestran las regiones -10 y -35 correspondientes a los promotores predichos, las secuencias subrayadas

corresponden a secuencias palíndromicas y las dobles subrayadas a repetidos directos.

Tabla 9. Predicción de promotores dentro de la región operadora-promotora.

Programa	Score	Para el ORF 14
brk	0.89	gcta <u>attggat</u> acccgcccgcgctt <u>cact</u> ctaaccataggagaaagaaa
brk	0.94	acttgctgacaaggtaaggccatagttgcaatgatgcaagaaaaagat
brk	0.87	acgtattttcaagccttgatcttaaagctccattctgtaaacttgctga
brk	1	agttgttttgctaagtcataccattttgtttcatatcgctaccctataa
brk	1	tttgtttcatatcgctaccctataaccta aaaa atttgatgcaagtc
brk	0.87	acgtatttttcaagccttgatcttaaagctccattctgtaaacttgctga
phi	2.71	<u>ttgcaat</u> gatgcaagaaaaagataagg
phi	2.82	<u>ctgaca</u> aggtaaggccatagttgcaat
phi	2.86	<u>Tgatct</u> taaagctccattctgtaaact
phi	2.74	<u>Tttca</u> agccttgatcttaaagctccatt
phi	2.74	<u>Tttcata</u> tcgctaccctataaccta aaaa
phi	2.86	<u>Ttgcta</u> agtcataccattttgtttcat
sb		<u>ttgcta</u> agtcataccattttgtttcat
Programa	Score	Para el ORF 15
brk	0.84	tatggttagagtgaacaattgggcggtatccaattagcattagatagca
brk	1	ccggatttttaagagccttttaaggatgtaccctttgtgctttccctta
brk	0.81	ttttcttgcatcattgcaactatggccttacctgtcagcaagttaca
brk	0.81	ttttgtgctttcccttatctttttcttgcatcattgcaactatggcctt
brk	0.98	tacgttttgactttgcatcaaaattttaggtatagggtagcgatat
phi	2.69	ttgtcagcaagtttacagaatggagcctt
phi	2.81	ttgaaaaatacgttttgactttgcat
phi	2.75	gtgactttgcatcaaaattttaggtt
phi	2.75	ttgcatcaaaattttaggtataggg
Sb		ttgtcagcaagtttacagaatggagccttaagat

Nota: brk: Berkeley, phi: phiSITE, sb: Softberry.

En la Tabla 9 se muestran tanto los programas utilizados para la predicción de los promotores así como su score, para el programa Berkeley valores cercanos a 1 son los que tienen mayor probabilidad de ser reales, mientras que para el programa phiSITE son los de valores cercanos a 3. Se pudo observar que los programas predijeron promotores que incluían parte de la secuencia que codifica al represor, los cuáles se encuentran en letras bastardillas. Por tal motivo los análisis posteriores se hicieron abarcando parte de la región codificante del ORF 15 y del ORF 14. En

la Tabla 9 se puede apreciar que la región de nuestro estudio es abundante en posibles promotores.

Manualmente se encontraron elementos proximales de promotores eucariontes siendo la caja CAAT y la caja GC. Por otro lado se localizaron posibles box A y box B (Figura 6).

9.1.2 Búsqueda de secuencias palindrómicas y repetidos directos

Con el fin de localizar secuencias palindrómicas las cuáles son la característica principal de los operadores los cuales son reconocidos por la proteína represora fagica, se ingresó la región al programa *Palindromic Sequence Finder*. Las secuencias palindrómicas encontradas en el programa se muestran en la Tabla 10 y en la Tabla 9 en forma subrayada se encuentran traslapadas a los promotores predichos. En el Anexo 22 se muestran los promotores predichos junto a sus cajas -10 y -35, así como todas las secuencias palindrómicas encontradas con el programa *Palindromic Sequence Finder*.

Tabla 10. Secuencias palindrómicas encontradas en la región operadora-promotora del ORF 15 (represor) del bacteriófago mEp021.

ATAT	GATC	TGCA	TGCA
ACGT	ATAT	TTGCAA	AAAATTTT
ACATGT	CCGG	TGCA	AAATTT
CATG	TTTAAA	GGCC	AATT
CGCGCG	TTAA	AGCT	TATA
GCGC	AGCT	TTAA	ATAT
CGCG	TTAA	GATC	CATG
AATT	GTAC	ACGT	

Estas secuencias fueron marcadas en la región operadora-promotora y se consideraron solo aquellas que estaban traslapadas con los promotores predichos. Los repetidos directos fueron localizados manualmente. En la Figura 6 se muestra la localización de las secuencias palindrómicas y de los repetidos directos, así como de los promotores que se encuentran traslapados a estas secuencias.

Como se puede observar en la Figura 6, se localizaron secuencias palindrómicas no perfectas las cuales correspondieron a dos secuencias diferentes de probables operadores, marcados como OP1 y OP2. El programa WebLOGO fue utilizado para predecir las secuencias consenso. En la Figura 7 a) y b) se muestran las secuencias consenso para OP1 (T T T/A X T/G X X C/A X A/T G/C X X T X X A A) y OP2 (T/A T G/T X A/T T/A A/C A A/T A/G A/C G/T T/C T T T T/G A/T G/A), respectivamente. como se aprecia en 7 a) la secuencia consenso de OP1 parece estar menos conservada que las de OP2 (7 b). A manera de comparar con secuencias ya reportadas, se presenta la secuencia consenso de los operadores del fago λ , Figura 7 c) en donde las bases conservadas son abundantes.

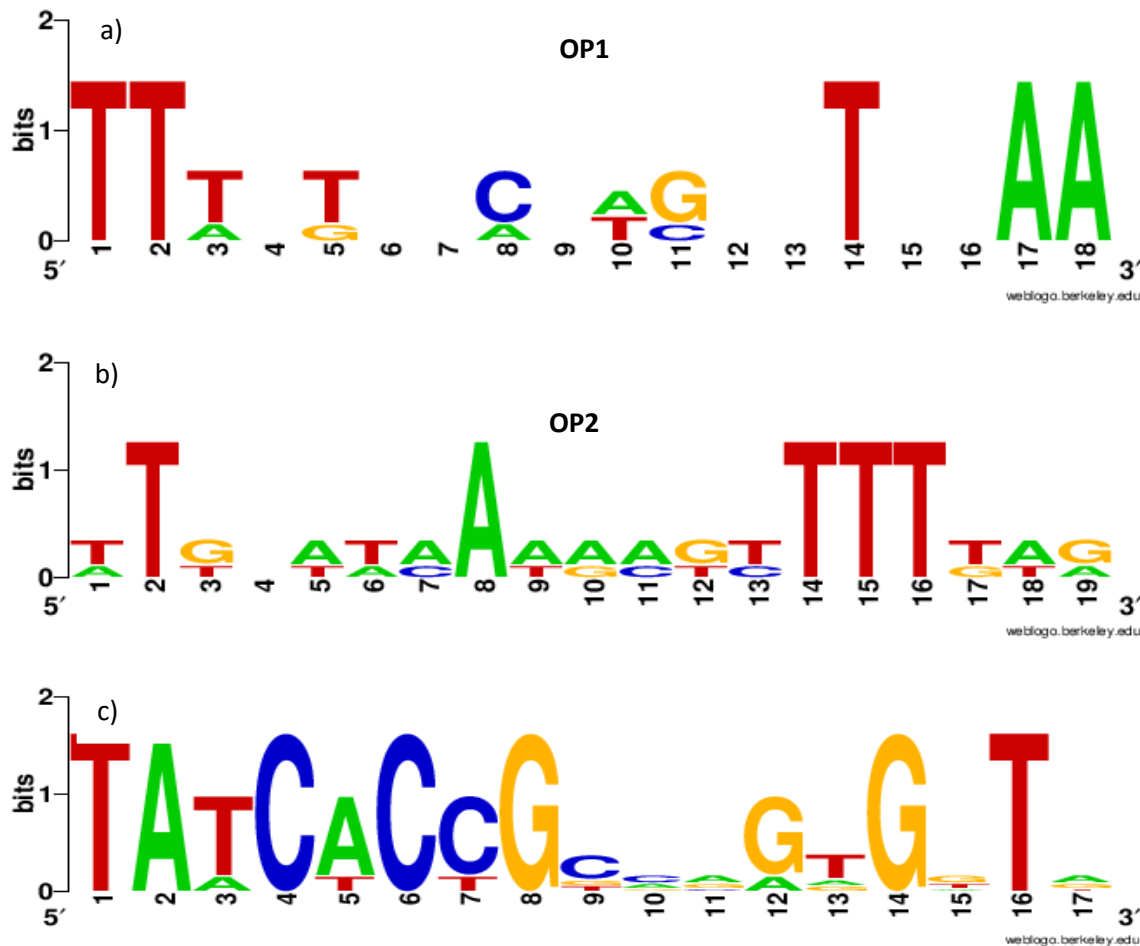


Figura 7. Secuencia consenso de los probables operadores palindrómicos de mEp021. a) secuencia consenso de los probables operadores (OP1) del represor de mEp021, b) secuencia consenso de los operadores OP2 y a manera de comparación c) la secuencia consenso de los operadores del represor de λ .

En nuestra secuencia de interés también se localizaron dos repetidos directos de 9 nt de longitud, separados por 79 pb, la secuencia consenso (CTTGCATCA) se representa en la Figura 8.



Figura 8. Secuencia consenso de los probables operadores repetidos directos.

Previamente mencionado, se pudo localizar una probable box A o sitio de unión de los factores nus y una box B o sitio nut el cual es reconocido en el transcrito por la proteína N para llevar a cabo la antiterminación. En la Figura 9 se presentan las box A y box B de los fagos λ , 21 y P22 y se comparan con las probables box A y box B encontradas en la región operadora-promotora de mEp021, como se aprecia, la box A de mEp021 es muy parecida a la de 21 y P22. Por otra parte, las box B mostradas difieren en secuencia pero conservan la característica de formar el *stem loop* (modelados con el servidor mfold. Zuker., 2003).

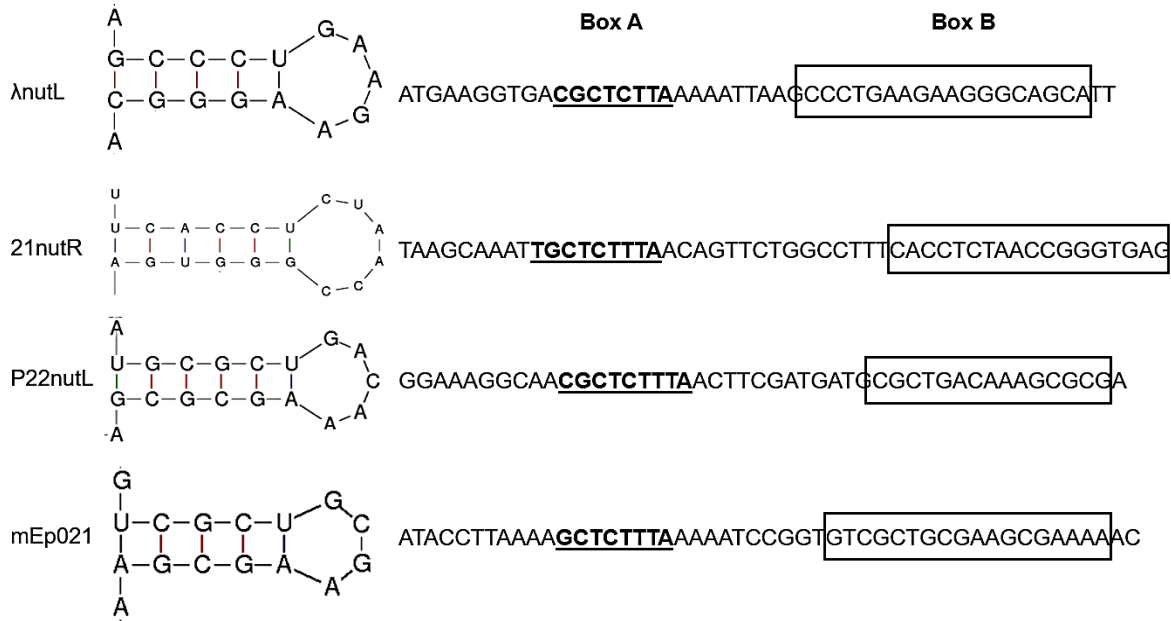


Figura 9. Comparación de las probables Box A y Box B encontradas en mEp021 con las de otros fagos. Se muestran los stem loops formados por Box B, en letras subrayadas se recalcan las secuencias Box A y en rectángulos las secuencias Box B. Adaptado de Olson et al., 1982.

9.2 Construcción de p_{KQV4}RepE

9.2.1 Amplificación del gen represor del bacteriófago mEp021

Previamente en nuestro grupo de investigación se había clonado el gen del represor en el vector pKQV4, sin embargo no se había obtenido la clonación del gen del represor fusionado con seis codones de Histidinas. Con el fin de clonar el gen del represor del bacteriófago mEp021, se diseñaron oligos los cuáles tenían los sitios de restricción para las enzimas 5'-*EcoRI* y 3'-*HindIII*, el cebador reverso posee la característica de tener la secuencia de seis codones para Histidinas, esto para facilitar su purificación. Tomando de molde 1µl de lisado de mEp021 se amplificó el gen del represor. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa, se pudo observar la banda correspondiente a 693 pb (Figura 10). La banda fue cortada y purificada, para continuar con los posteriores ensayos.

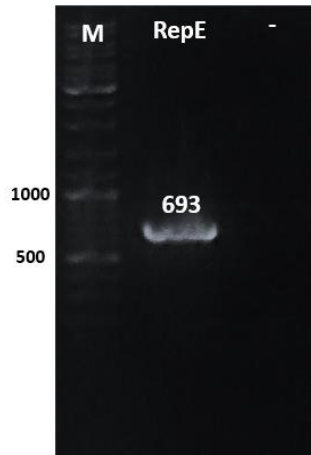


Figura 10. Amplificación del gen del represor + 6 codones de Histidinas. Gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del gen del represor, fragmento esperado de 693 pb.

9.2.2 Clonación del gen del represor en el vector de transición pJET1.2 blunt

Ya purificada la banda del gen del represor, se procedió a ligar y consecuentemente a transformar en bacterias DH5 α . Se obtuvieron varias candidatas, de las cuales 55 fueron sembradas, de estas se seleccionaron seis y se les extrajo el plásmido.

9.2.3 Comprobación de candidatas en el vector de transición con el gen del represor

El plásmido extraído fue utilizado como ADN molde para la PCR. Para comprobar que las candidatas poseían nuestro gen de interés, como se muestra en la Figura 11 a), 5 de las candidatas amplificaron el fragmento esperado de 693 pb. Para comprobar que los sitios de restricción de *EcoRI* y *HindIII* estaban íntegros, se procedió a realizar la doble digestión con las enzimas ya mencionadas, las 5 candidatas liberaron el fragmento esperado Figura 11 b).

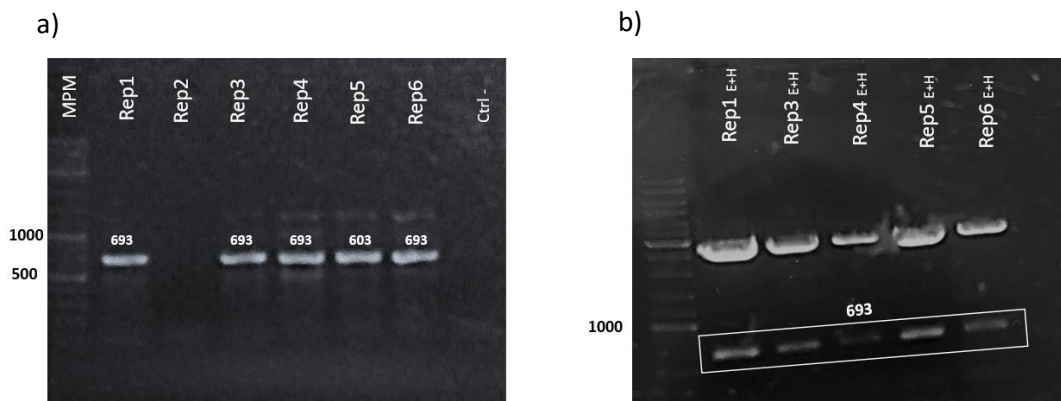


Figura 11. Comprobación de candidatas portadoras del gen del represor en el vector de transición. a) Gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del gen represor, fragmento esperado de 693 pb, b) doble restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de las candidatas en el vector *PJET1.2 blunt*, fragmento liberado de 693 pb. MPM: Marcador de peso molecular.

Con base a los resultados obtenidos en la comprobación de candidatas, se seleccionó la candidata 3 y se mandó a secuenciar. En el alineamiento (Anexo 11), se presentó una mutación puntual, la cual fue silenciosa, es decir el codón produce el mismo aminoácido. La secuencia para la bandera de seis Histidinas estaba íntegra, al igual que el codón de paro posterior a los codones de Histidina, por esto se continuó trabajando con esta candidata.

9.2.4 Clonación del gen del represor-6xHis en el vector pKQV4

Para obtener la secuencia de la proteína recombinante del represor en el vector pKQV4, se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, tanto de pJETR3 y de pKQV4GFP, como se muestra en la Figura 12, el fragmento de 693 pb fue liberado del vector de transición, se procedió a cortar y purificar las bandas. Se realizó una reacción de ligación en proporción 1:7, la reacción consistió de 2.8 µl del vector (150 ng), 5 µl del inserto (190 ng), 1 µl de la T4 DNA ligasa (80 U New England BioLabs), 2 µl del buffer de ligación 10x y 9.2 µl de H₂O en un volumen final de 20 µl, la mitad de la reacción fue transformada en bacterias DH5α quimiocompetentes.

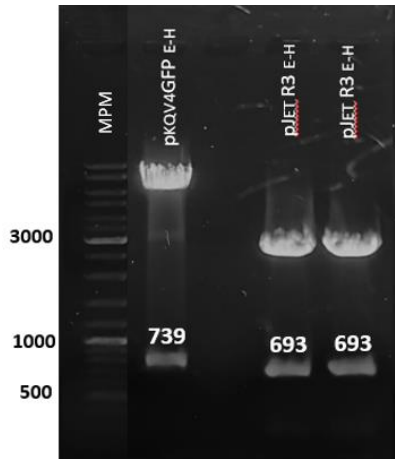


Figura 12. Doble digestión de los vectores $p_{KQV4}GFP$ y $p_{JET1.2blunt}R3$. Utilizando las enzimas *EcoRI* y *HindIII* se realizó la doble digestión del vector de expresión y transición, fragmento liberado de 693 pb . M: Marcador de peso molecular.

9.2.5 Obtención y comprobación de candidatas con el gen del represor

Al siguiente día de la transformación, se obtuvo solo 1 candidata, esta candidata fue resembrada y se le extrajo el plásmido. Con el fin de comprobar que la candidata presentará el gen del represor recombinante, se le realizó una PCR. La visualización de la banda de aproximadamente 693 pb se muestra en la Figura 13.

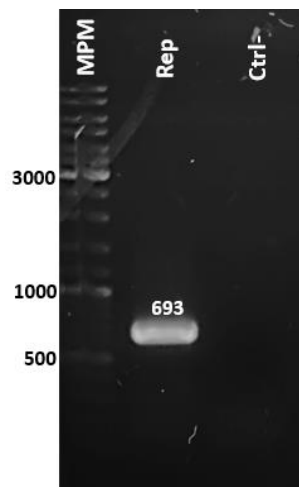


Figura 13. Amplificado del gen del represor + 6 codones de His. Gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del gen del represor + 6 codones de His de la única candidata. Fragmento esperado de 693 pb

En base al resultado anterior, se procedió a secuenciar esta candidata. Como se muestra en el alineamiento, se siguió conservando la mutación silenciosa, tanto los

codones de Histidinas como el codón de paro (posterior a los codones de Histidinas), no presentaron mutaciones (Figura 14).

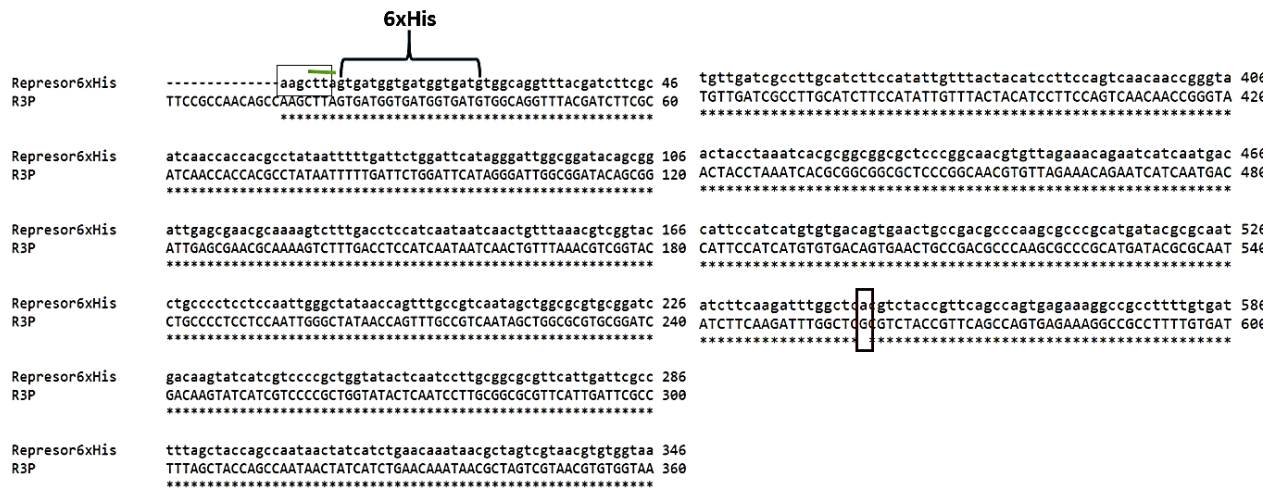


Figura 14. Alineamiento del gen del Represor + 6 codones de Histidinas vs Represor (C3). El alineamiento muestra la integridad de la secuencia, presenta un cambio de nucleótido y esto genera una mutación silenciosa. El rectángulo en rojo marca el sitio de restricción de HindIII, la línea verde, subraya el codón de paro, las llaves señalan los codones de Histidinas y el rectángulo rojo vertical muestra el cambio de nucleótido.

9.3 Comprobación de la funcionalidad de la proteína recombinante del Represor

Con el fin de conocer si la adición de la bandera de 6 Histidinas modificaba la funcionalidad del represor se llevó a cabo un ensayo de infección, el cual consistió en transformar el plásmido p_{KQV4}RepE en bacterias W3110, para posteriormente efectuar un tapiz al cual se le goteó diluciones del lisado de mEp021. Simultáneamente, se realizó un tapiz con el plásmido vacío y otro tapiz con la bacteria W3110 (como controles). En cada tapiz fueron goteadas diluciones seriadas de los lisados de mEp021 y del fago λ. Como se aprecia en la Figura 15 c el represor fue capaz de inhibir la infección de mEp021, al contrario de λ, el cual pudo infectar, esto debido a que mEp021 y λ forman parte de distintos grupos de inmunidad. El tapiz con el plásmido vacío (Figura 15 b) refuerza nuestro resultado en el que el efecto de inhibición de la infección de mEp021 es debido exclusivamente al represor y no al vector vacío. Por otro lado, cuando se indujo con IPTG [0.1, 0.25 y 0.5 mM] (Figura 15 d, e y f), el efecto de inhibición de la infección

desapareció, pareciera que la inducción resultó ser tóxica para las bacterias (el ensayo se realizó a 37°C).

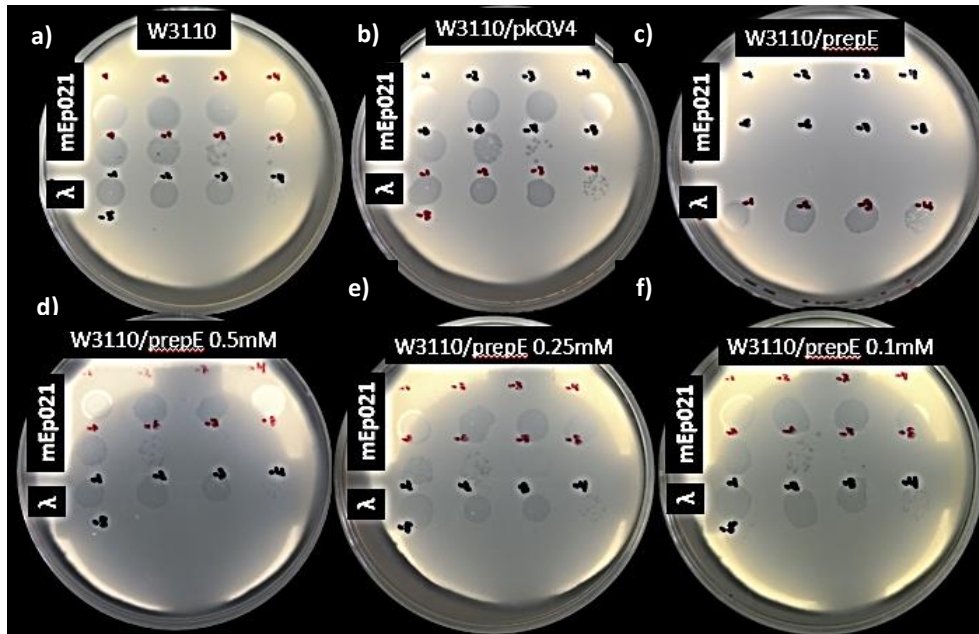
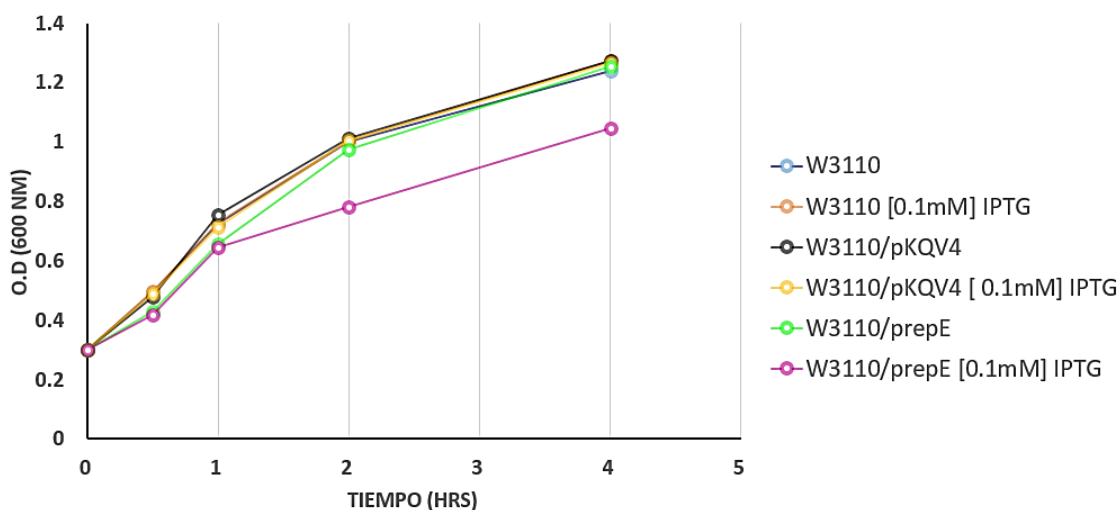


Figura 15. Comprobación de la funcionalidad del represor. Tápices bacterianos a) El control (la bacteria W3110), b) segundo control, bacteria W3110 con el plásmido vacío pKQV4, c) bacteria W3110 portadora de la construcción p_{KQV4}RepE d) bacteria W3110 portadora de la construcción p_{KQV4}RepE inducida con 0.5 mM de IPTG d) bacteria W3110 portadora de la construcción p_{KQV4}RepE inducida con 0.25 mM de IPTG e) bacteria W3110 portadora de la construcción p_{KQV4}RepE inducida con 0.1 mM de IPTG , les fue goteado diluciones seriadas del lisado fágico de mEp021 y λ. En c) se muestra que el p_{KQV4}RepE inhibió la infección de mEp021.

9.3.1 Efecto de la presencia del represor sobre el crecimiento de la cepa W3110

Para conocer acerca del comportamiento del crecimiento de la bacteria con la construcción p_{KQV4}RepE, se monitoreó el crecimiento a 37°C durante 4 horas en presencia y en ausencia del inductor IPTG a una concentración 0.1 mM, teniendo como controles dos cepas, la cepa silvestre W3110 y la cepa silvestre con el vector vacío, W3110/pKQV4. Todos los cultivos fueron ajustados a una OD_{600nm} de 0.3, se tomaron alícuotas a los 30 minutos y a las horas 1, 2 y 4 (para realizar también un gel de proteínas).

Como se muestra en la Gráfica 1, el crecimiento de la cepa W3110/ p_{KQV4}RepE con fuga transcripcional, parece retrasar ligeramente el crecimiento de la bacteria, con respecto a los controles, este efecto fue más evidente con la inducción 0.1 mM de IPTG y al transcurrir el tiempo, lo cual sugiere que p_{KQV4}RepE es tóxico para la bacteria en dosis altas.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de W3110 en presencia de p_{KQV4}RepE. Se siguió el crecimiento de la cepa silvestre W3110, W3110/pKQV4 y W3110/p_{KQV4}RepE con y sin inducción de IPTG [0.1mM] durante 4 horas a 37°C.

9.4 Expresión e Inmunodetección del represor

A partir de las alícuotas recolectadas a los 30 minutos, 1, 2 y 4 horas se procedió a tratarlas con el buffer de carga, posteriormente se depositaron en los pocillos de un gel Tris-Tricina Acrilamida al 16%. Como se muestra en el gel de proteínas, la banda correspondiente al represor de aproximadamente 24.4 KDa es mejor apreciada con la inducción, Figura 16 a). Debido a que en el tamaño de la proteína de 24 kDa se apreciaban bandas en el vector vacío y adicionalmente se quería comprobar de la presencia de la bandera de Histidinas, se realizó su inmunodetección, como resultado se tuvo que incluso con la fuga transcripcional el represor fue inmunodetectado, apareciendo una fina banda en los carriles con fuga transcripcional y en los carriles correspondientes a la inducción del represor se apreció una banda voluminosa, contrario a los controles en los cuáles no se detectó

a) b)
ninguna banda, sugiriendo que específicamente se está detectando al represor y que la bandera de Histidinas se encuentra accesible y libre. (Figura 16 b).

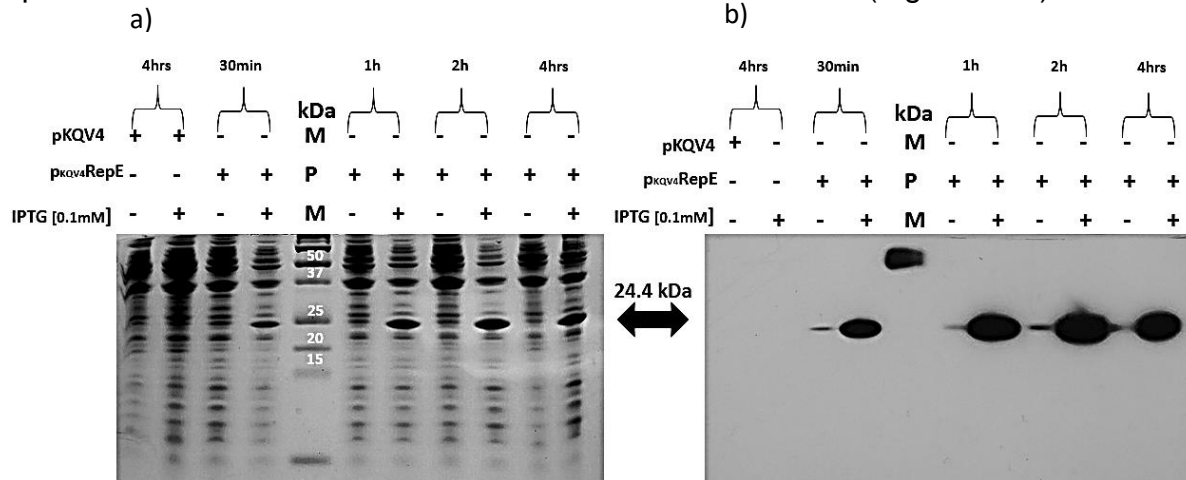


Figura 16. Expresión e Inmunodetección del represor. a) Gel de proteínas; como control en los primeros dos carriles la cepa W3110 con el vector pKQV4 vacío con y sin inducción, los siguientes carriles es la cepa W3110 con el plásmido p_{KQV4}RepE con y sin inducción de IPTG [0.1 mM] en diferentes tiempos, b) Inmunodetección del represor utilizando el anticuerpo 6xHis-tag. Peso aproximado del represor E de 24.4 kDa.

9.5 Purificación del represor

Con base a los resultados de la expresión del represor, se determinó purificarlo, dejando crecer la cepa hasta una O.D_{600nm} de 0.8, posterior a esto se indujo con 0.1 mM de IPTG durante 2 horas, para iniciar el procedimiento de purificación en Batch con agarosa Ni-NTA. Como se reporta en la Figura 17, la cantidad eluída del represor es buena, aunque también se observan bandas inespecíficas, pero son menos abundantes que la correspondiente al represor, de 24.4 kDa.

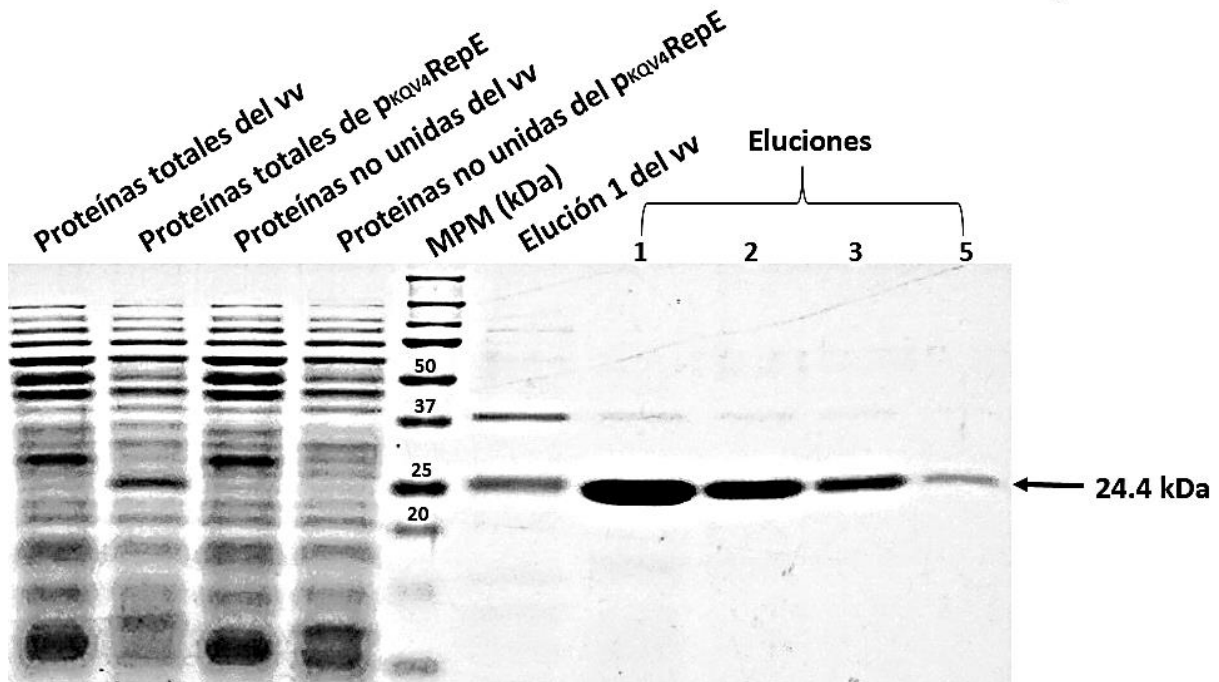


Figura 17. Purificación del represor. Mediante purificación en “batch” con agarosa Ni-NTA obtuvimos al represor, dejando crecer el cultivo hasta una $O.D_{600nm}$ de 0.8 se realizó la inducción con 0.1 mM de IPTG durante 2 horas. Peso molecular de 24.4 kDa. VV; vector vacío.

9.6 Clonación del gen represor mutado en el vector pKQV4

Para tener como control negativo en futuros ensayos, se decidió llevar a cabo la clonación del gen represor con delección de 120 nucleótidos, el cuál presenta un fenotipo de placa clara. La clonación fue en forma directa, de un producto de PCR se cortó y se purificó la banda de aproximadamente 593 pb, luego se desarrolló la reacción de ligación en una proporción 3:1 y se transformó en bacterias DH5 α quimiocompetentes. Se obtuvo solo una candidata, a la cual se le realizaron distintos ensayos.

9.6.1 Comprobación de la candidata con el gen del represor mutado

El plásmido fue extraído de la única candidata resultante, mediante una reacción de PCR se comprobó que amplificaba una banda de aproximadamente 573 pb, Figura 18 a). Adicionalmente se realizó un ensayo de restricción, en el cual se observó la liberación de la banda de aproximadamente 573 pb. Figura 18 b).

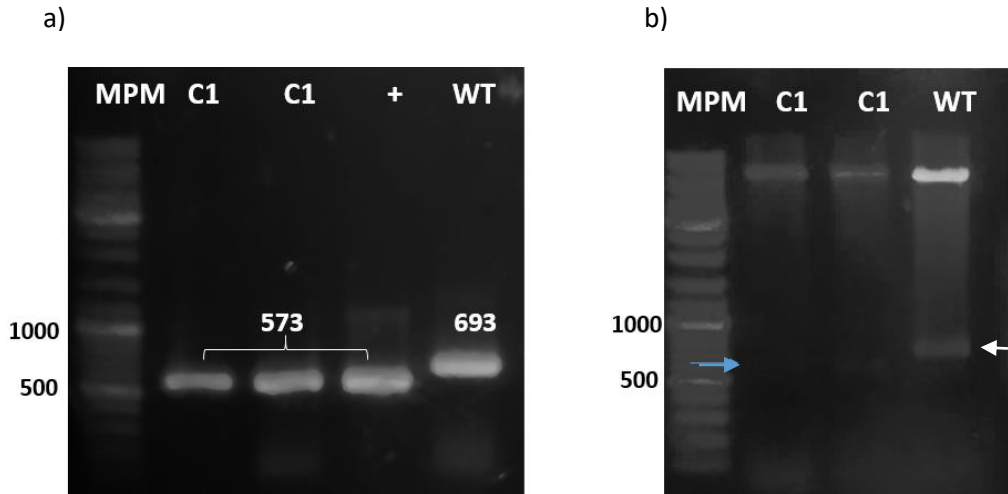


Figura 18. Comprobación de la candidata portadora del gen del represor mutado. A) gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del gen del represor mutado con la bandera de seis Histidinas, fragmento esperado de 573 pb, como control se metió al gen del represor wt con la bandera de seis Histidinas banda correspondiente a 693 pb, + es el amplificado proveniente del lisado C4 del fago mEp021 b) restricción del ADN plasmídico de la candidata con las enzimas EcoRI y HindIII, la flecha azul señala la banda de 573 pb del represor mutado y la flecha blanca señala la banda de 693 del represor wt, WT: ADN plasmídico de $p_{KQV4RepE}$.

Se procedió a secuenciar y en efecto presentó la delección de 120 nt previamente reportada por el M. en C. Caraballo, parte de esta delección se indica con un rectángulo rojo en el alineamiento (Figura 19). Comprobando la pérdida de los 120 nucleótidos del represor mutado por PCR, restricción y por secuenciación, se realizó la transformación de este plásmido a las bacterias W3110 quimiocompetentes con el fin de realizar un ensayo de infección y corroborar la pérdida de función.



Figura 19. Alineamiento del represor vs el represor mutante con la bandera de Histidinas. En el alineamiento se aprecia que se conserva el codón de paro y los codones de la bandera de Histidinas se encuentran íntegros, hay una pérdida de homología correspondiente a la delección de 120 nt que abarca el dominio H-T-H de unión al ADN señalada en los rectángulos rojos.

Como se muestra en la Figura 20 c, el represor con la delección de 120 nt fue incapaz de inhibir la infección de mEp021, dando como resultado la aparición de placas en el tapiz, lo cual fue muy semejante al tapiz de la bacteria W3110 (Figura 20 a) y a la bacteria W3110 con el vector vacío (Figura 20 b), a manera de ejemplificar el fenotipo de placa clara producido por la delección de 120 nt en el represor se gotearon diluciones seriadas del lisado fágico mutado las cuales se indican en la

figura 20 como mEp021 mut, en contraste al fenotipo de placa turbia producido por el fago *wild type* correspondiente a mEp021 wt.

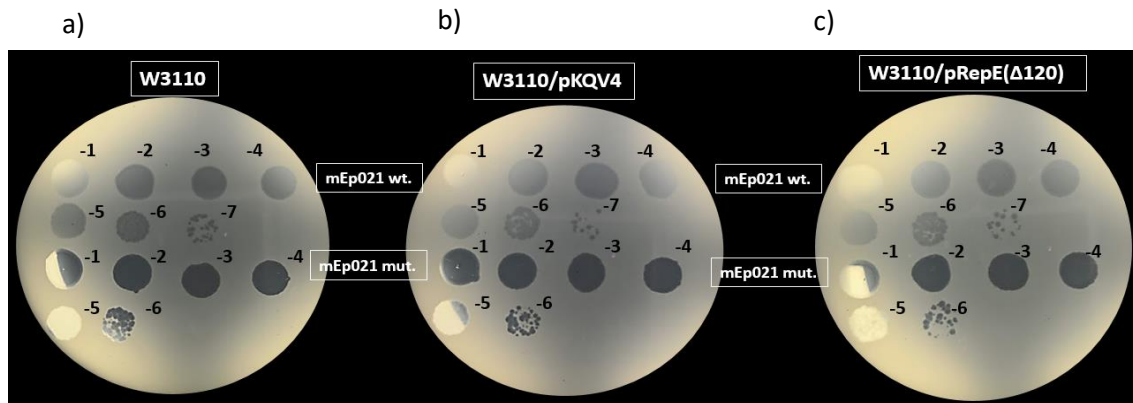


Figura 20. Pérdida de la funcionalidad del represor mutado. a) Cómo control la bacteria W3110, b) Cómo control la bacteria W3110 con el vector vacío pKQV4 c) bacteria W3110 con el plásmido portador del represor mutado, pKQV4RepE(Δ120). Se observan en todos los tapices infección por mEp021.

El represor *wild type*, presenta dos dominios, un dominio HTH (helix-turn-helix) de unión a ADN y otro dominio de peptidasa, Figura 21 a), por otro lado la delección de los 120 nucleótidos lleva a la pérdida del dominio de unión a ADN (HTH), como se muestra en la Figura 21 b), por lo que se sugiere que el represor mutado no puede llevar a cabo su unión al ADN, por esto, se permite la infección por mEp021.

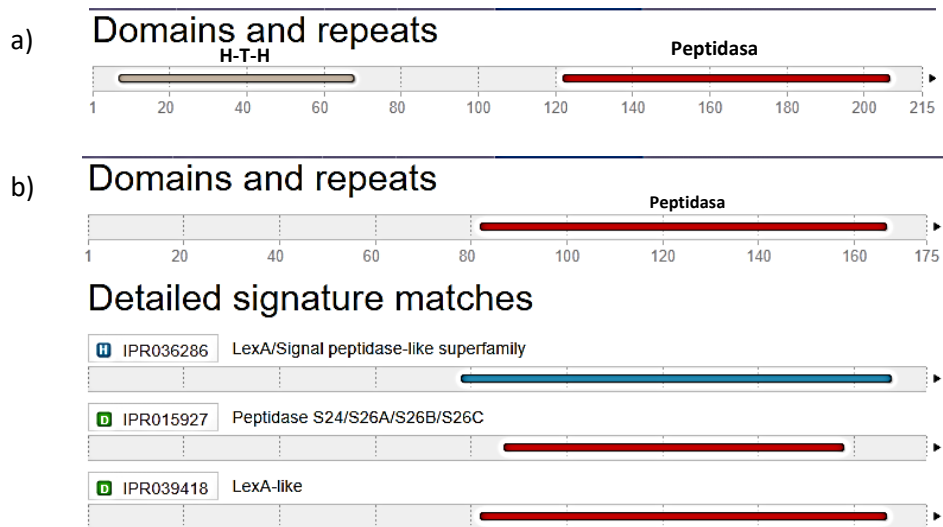


Figura 21. Dominios del represor wild type vs el represor (Δ120) a) el represor *E wild type* presenta dos dominios, un dominio de unión al ADN (HTH) y otro dominio de peptidasa, b) El represor mutado solo presenta un dominio, el dominio de peptidasa.

9.7 Diseño y construcción del vector con la región operadora-promotora flanqueada por dos genes reporteros: p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP

La construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP, se generó en varios pasos. Partiendo del vector p_{KQV4}GFP (previamente construido por la M. en C. Guadalupe Valencia Toxqui) el cual presenta un Shine Dalgarno (SD) seguido del codón de inicio y de la secuencia de GFP, esto se encuentra entre los sitios de restricción de 5'-*Eco*RI y 3'-*Hind*III; seguido del sitio de *Hind*III se localizan dos terminadores transcripcionales. Tomando ventaja de estas características, se construyó el vector p_{KQV4}OP-GFP.

9.7.1 Construcción de p_{KQV4}OP-GFP

Amplificación de la región operadora-promotora del gen represor

Diseñando oligos específicos para la región operadora-promotora (Figura 22 a), mediante PCR se amplificó la región operadora-promotora, posteriormente el producto de 424 pb fue visualizado en un gel de agarosa al 1%. Figura 22 b). La banda correspondiente al tamaño de 424 pb fue cortada y purificada.

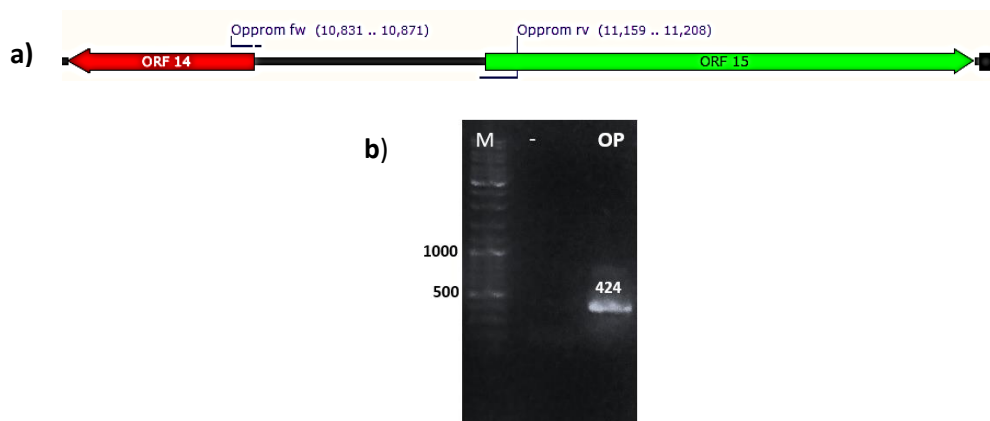


Figura 22. Amplificación de la región operadora-promotora. a) Ilustración representativa de la región que amplifican los oligos, b) gel de electroforesis del producto de PCR de la región operadora-promotora, fragmento esperado de 424 pb. M: marcador de peso molecular, - control negativo, OP: región operadora-promotora.

9.7.2 Clonación de la región operadora-promotora en el vector de transición pJET1.2 blunt

La banda purificada de la región operadora-promotora fue clonada en el vector de transición pJET1.2 blunt. Se purificaron aproximadamente 50 colonias y de éstas se seleccionaron 6 para comprobar que tuvieran el fragmento de interés de 424 pb. Posterior a esto, se mandó a secuenciar la candidata 3 tomada al azar, la región operadora-promotora no presentó mutaciones, solo se observó los cambios que nosotros realizamos para modificar el codón de inicio del ORF 14 y 15 (Figura 23).

```

OP          -----TTGCCCGAGGATCCGAATCCGCA 25
OP3HF      TCCTACTGATATATTGTAGGAGACTTCTAGAAAGATTGCCCGAGGATCCGAATCCGCA 60
          *****

OP          TGAGTTGTTTTGCTAAGTCATACCATTTTGTTTTCATATCGCTACCCTATAACCTAAAAA 85
OP3HF      TGAGTTGTTTTGCTAAGTCATACCATTTTGTTTTCATATCGCTACCCTATAACCTAAAAA 120
          *****

OP          ATTTTGATGCAAGTCACAAAACGTATTTTTCAAGCCTTGATCTTAAAGCTCCATTCTGTA 145
OP3HF      ATTTTGATGCAAGTCACAAAACGTATTTTTCAAGCCTTGATCTTAAAGCTCCATTCTGTA 180
          *****

OP          AACTTGCTGACAAGGT AAGGCCATAGTTGCAATGATGCAAGAAAAAGATAAGGGAAAGC 205
OP3HF      AACTTGCTGACAAGGT AAGGCCATAGTTGCAATGATGCAAGAAAAAGATAAGGGAAAGC 240
          *****

OP          ACAAAGGTACATACCTTAAAAGCTCTTTAAAAATCCGGTGTCGCTGCGAAGCGAAAAAC 265
OP3HF      ACAAAGGTACATACCTTAAAAGCTCTTTAAAAATCCGGTGTCGCTGCGAAGCGAAAAAC 300
          *****

OP          AAATATCACGCAACGGCGGGATCTGTT CAGCGTCAGTCACTGCTATCTAATGCTAATTG 325
OP3HF      AAATATCACGCAACGGCGGGATCTGTT CAGCGTCAGTCACTGCTATCTAATGCTAATTG 360
          *****

OP          GATACCCGCCCGCGGTTCACTCTAACCATAGGAGAAAGAAACATGTATTACGTTTCGCAA 385
OP3HF      GATACCCGCCCGCGGTTCACTCTAACCATAGGAGAAAGAAACCTGTATTACGTTTCGCAA 420
          *****

OP          GGCTTTTGATATTGCATGCGAGCTCAAGCTTGTGAAAT----- 424
OP3HF      GGCTTTTGATATTGCATGCGAGCTCAAGCTTGTGAAATATCTTGCTGAAAACTCGAGC 480
          *****

```

Figura 23. Alineamiento de la región operadora-promotora wild type vs la región operadora-promotora en el vector de transición pJET1.2 blunt. Como se muestra, solo se generan dos mismatches indicados en rectángulos rojos que fueron diseñados por nosotros para modificar los codones de inicio de los dos ORF's 14 y 15.

9.7.3 Clonación de la región operadora-promotora en el vector p_{KQV4}GFP

Se llevó a cabo la doble restricción del vector p_{KQV4}GFP y p_{JET1.2} OP₃ (candidata 3) con las enzimas de restricción *Sph*I y *Eco*RI, se observó la liberación del fragmento de 408 pb correspondiente a la región operadora-promotora (Figura 24 b). Las bandas fueron cortadas y purificadas. Se procedió a realizar la ligación en una proporción 3:1, la reacción consistió en 7.14 µl del vector (50 ng), 1.1 µl del inserto (98.44 ng) 1µl de T4 DNA Ligasa (80 U), 2µl del buffer 10x y 8.76 µl de H₂O, posteriormente la ligación se transformó en bacterias DH5α quimiocompetentes. Se obtuvieron 26 candidatas, de las cuáles se seleccionaron 6 al azar para verificar la ligación del fragmento.

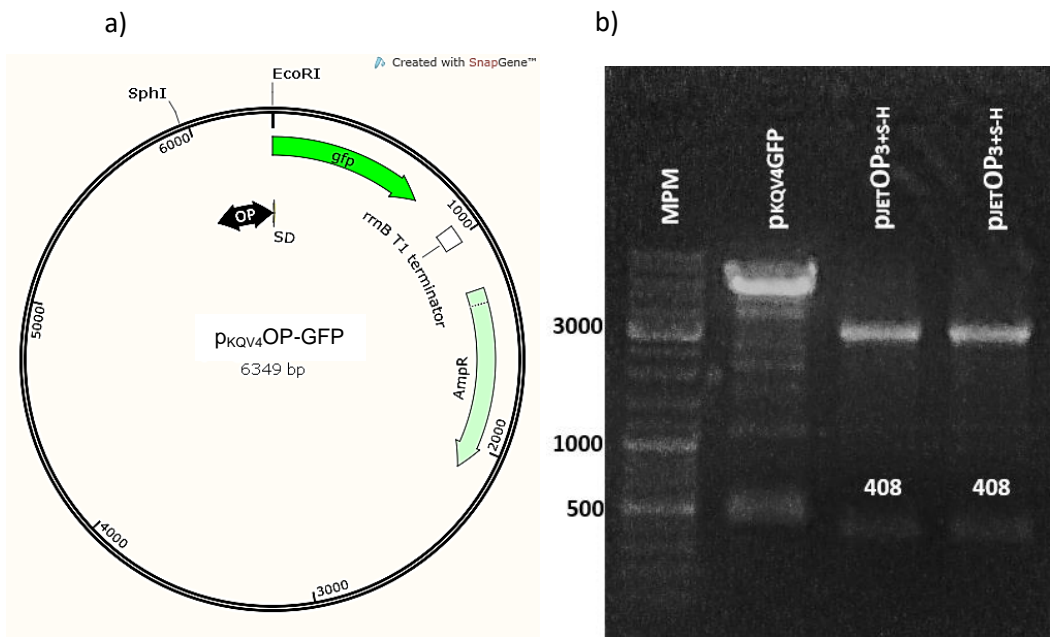


Figura 24. Mapa del vector p_{KQV4}OP-GFP y restricción del vector p_{KQV4}GFP y p_{JET}OP₃. a) el mapa muestra la primera construcción necesaria para nuestro sistema de doble reportero b) gel de electroforesis de la doble restricción de p_{KQV4}GFP y p_{JET1.2}bluntOP₃ utilizando las enzimas *Sph*I y *Eco*RI.

9.7.4 Comprobación de las candidatas de p_{KQV4}OP-GFP

Para verificar la presencia de la secuencia operadora promotora en las candidatas, se seleccionaron 6 como se mencionó anteriormente y los plásmidos fueron extraídos, se realizó una PCR de la región operadora-promotora, como se muestra

en la Figura 25 a). Las 6 candidatas seleccionadas presentaron el amplicón esperado de 424 pb. Adicionalmente se llevó a cabo un ensayo de restricción con la enzima *DraI* y se observó la liberación de los fragmentos correspondientes a 1059, 659 y 621 pb en las 5 candidatas (Figura 25 b).

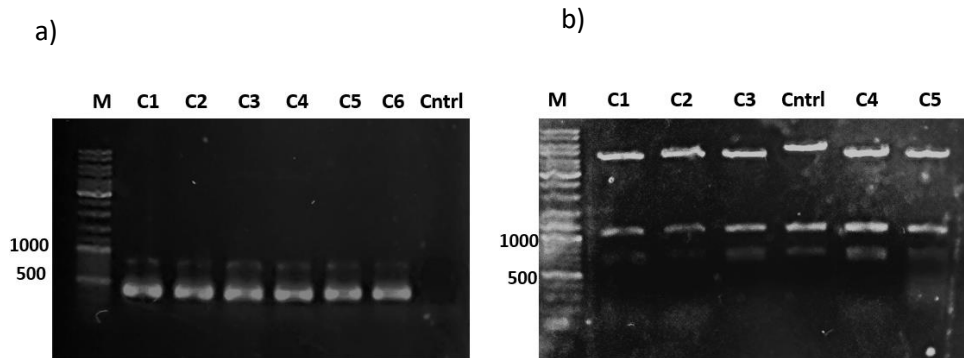


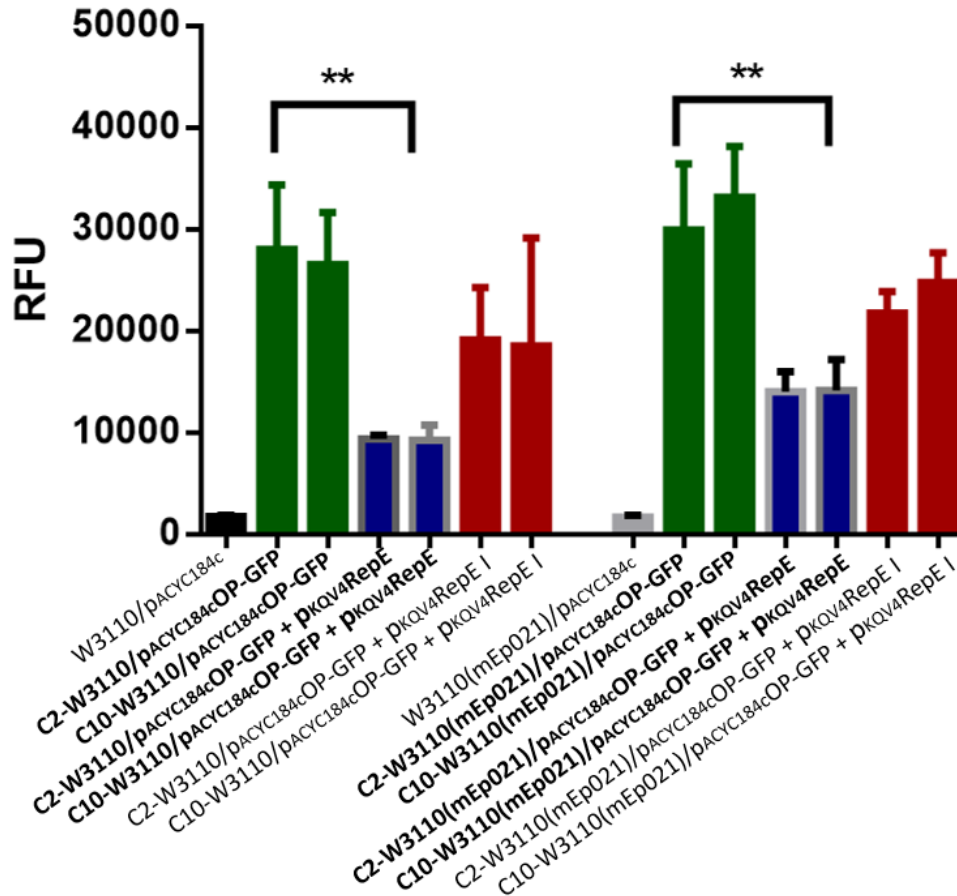
Figura 25. Análisis de las candidatas a portar el plásmido $p_{KQV4}OP-GFP$. a) Gel de agarosa al 1% del producto de PCR de la región operadora-promotora, amplicón esperado de 424 pb. b) gel de electroforesis al 1% de la restricción de las candidatas con la enzima *DraI*, fragmentos esperados de 1059,659 y 621 pb.

9.8 Evaluación de la fluorescencia: $p_{acyc184c}OP-GFP$

Para poder evaluar el efecto en los niveles de fluorescencia que se generaban en la interacción del represor con la región operadora-promotora, se clonó la región operadora-promotora flanqueada por GFP en el vector $p_{ACYC184c}$ (datos no mostrados), a partir de la construcción $p_{KQV4}OP-GFP$ previamente generada.

Se realizaron las mediciones, partiendo de los cultivos O/N los cuales fueron ajustados a una OD_{600nm} de 1. Es importante recordar que el plásmido $p_{acyc184c}OP-GFP$, presenta a la región operadora-promotora del gen del represor de mEp021 río arriba del gen de GFP, el cual se encuentra simulando al gen del represor (ORF 15), esta construcción le confiere resistencia a la bacteria al Cloranfenicol, por lo cual, pudimos realizar una cotransformación con el $p_{KQV4}RepE$ que a su vez le confiere resistencia a la bacteria a ampicilina. Como se puede apreciar en la Gráfica 2, en donde se muestran los controles, la cepa W3110 y W3110(mEp021) transformadas con el vector vacío $p_{ACYC184c}$ presentan niveles de fluorescencia basales (1687.5 - 1739.8 RFU, respectivamente) los cuales son similares a las cepas sin el vector

vacío (datos no mostrados). En la Gráfica 2 se aprecia que tanto los niveles de fluorescencia de la cepa W3110 (27274.4 RFU) y W3110(mEp021) (31552.5 RFU) con el plásmido $p_{acyc184c}OP-GFP$ son semejantes, pareciera que el represor no está llevando a cabo su función, al contrario de lo que se vió en la co-transformación con $p_{KQV4}RepE$, en donde los niveles de fluorescencia en ambas cepas disminuyeron drásticamente, siendo que hay una disminución en los niveles de fluorescencia de 3.4 veces de la cepa W3110/ $p_{acyc184c}OP-GFP + p_{KQV4}RepE$ comparada con la cepa W3110/ $p_{acyc184c}OP-GFP$. Por otro lado, hay una disminución de 2.2 veces en la cepa W3110(mEp021)/ $p_{acyc184c}OP-GFP + p_{KQV4}RepE$ con respecto a W3110(mEp021)/ $p_{acyc184c}OP-GFP$. Continuando con el razonamiento, a mayor cantidad de represor, menor niveles de fluorescencia, se evaluó induciendo al represor con 0.1 mM de IPTG, lo que se observó fue que la fluorescencia no disminuyó “drásticamente” como lo esperábamos, por el contrario aumentó con respecto al represor sin inducir (aunque estas diferencias no fueron significativas). Estos resultados nos sugirieron que el represor es capaz de reprimir su propia transcripción. En el Anexo 21, se presentan los valores obtenidos en la cuantificación de la fluorescencia, en tres repeticiones.



Gráfica 2. Evaluación de la fluorescencia de $p_{ACYC184c}OP-GFP$ en presencia de $p_{KQV4}RepE$. Del lado derecho se muestra la cepa W3110(mEp021) con los distintos plásmidos, del lado izquierdo se muestra la cepa W3110 con los distintos plásmidos. C2, C10: Candidata 2 y 10, respectivamente. I: inducción con [0.1 mM] de IPTG.

9.9 Construcción de $p_{KQV4}mCh-OP-GFP$

9.9.1 Amplificación del gen de mCherry.

Con el fin de obtener la región operadora promotora flanqueada por dos genes reporteros, se seleccionó un segundo gen, siendo el gen de mCherry. Se diseñaron los oligonucleótidos que incluían sitios de restricción para *SphI* y *EcoRV*, así como un sitio SD en el oligonucleótido Forward (ver Materiales y Métodos 8.11.3). Para la amplificación del gen mCherry y su terminador transcripcional, el ADN molde fue tomado del vector pSEVA-227R (Figura 26 a) proporcionado por el M. en C. Marco

Antonio Carballo Ontiveros. Se observó el amplicón esperado de 863 pb (Figura 26 b). La banda fue cortada y purificada.

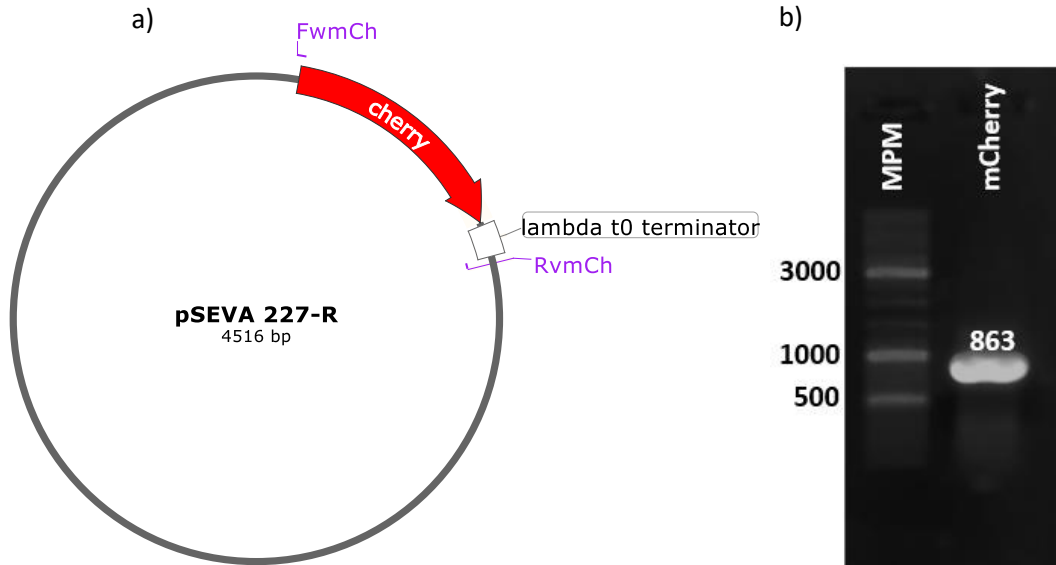


Figura 26. Mapa in silico del vector pSEVA 227-R y amplificado del gen mCherry. a) mapa in silico de pSEVA 227-R el cuál fue utilizado para amplificar el gen de mCherry con su terminador. b) gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del gen de mCherry con su terminador, fragmento esperado de 863 pb.

9.9.2 Clonación del gen mCherry en el vector de transición pJET1.2 blunt

Posterior a la purificación de la banda, se procedió a realizar la ligación y clonación en el vector de transición pJET1.2blunt. Se obtuvieron varias candidatas y algunas de ellas presentaron el fenotipo característico de la proteína Cherry, es decir, fueron colonias rosadas. Se seleccionaron éstas y se procedió a extraer el plásmido.

9.9.3 Clonación del gen mCherry en el vector p_{KQV4}OP-GFP

Para obtener la construcción p_{KQV4}mCh-OP-GFP (Figura 27 a), se realizó una doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *SphI*, de los plásmidos p_{KQV4}OP-GFP y las candidatas que presentaron el fenotipo rosado en el vector de transición, C2 y C5. Como es mostrado en la Figura 27 b), solo la candidata C5 liberó el fragmento

esperado de aproximadamente 863 pb. Las bandas de nuestro interés fueron cortadas y purificadas, para realizar una nueva reacción de ligación tomando en consideración la proporción 3:1, la reacción consistió en 2.5 µl del vector (50 ng), 3.5 µl del inserto (31.73 ng), 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa (80 U), 2 µl del buffer 10x y 10.6 µl de H₂O, en un volumen final de 20 µl. La mitad de la mezcla de ligación fue transformada en bacterias DH5α quimiocompetentes.

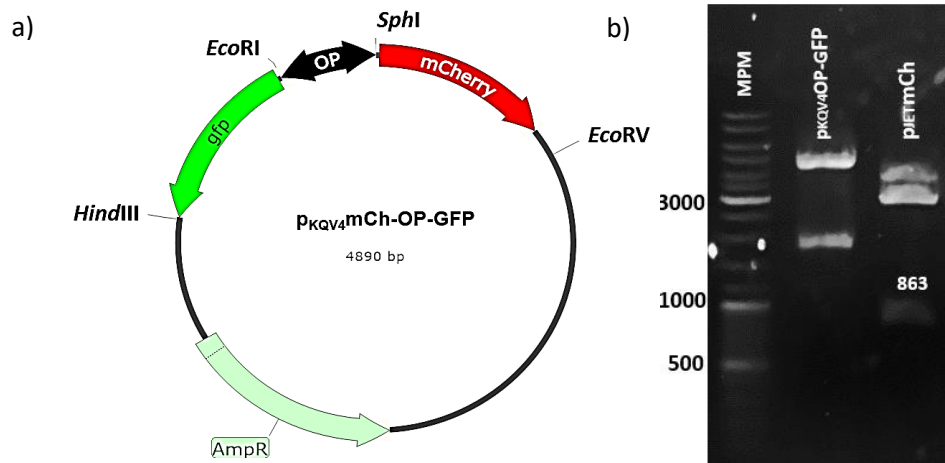


Figura 27. Mapa in silico del vector $p_{KQV4}mCh-OP-GFP$ y doble restricción de las candidatas en el vector de transición con $mCherry$ y el vector p_{KQV4} . A) mapa in silico de la región operadora-promotora flanqueada por dos genes reporteros. b) gel de electroforesis al 1% de la doble restricción de las candidatas portadoras de $mCherry$ y $p_{KQV4}OP-GFP$ con las enzimas $SphI$ y $EcoRV$, fragmento liberado esperado en las candidatas de 863 pb.

9.9.4 Comprobación de candidatas que tuvieran el fragmento mCh-OP-GFP

De la previa transformación se obtuvieron aproximadamente 60 candidatas provenientes de la ligación y en el control (reacción sin inserto) 11, de las 60 candidatas anteriores se seleccionaron 4. Se extrajo el plásmido y se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, esto debido a que entre estos sitios de restricción se encuentra el terminador transcripcional de *mCherry*. El gen de *mCherry*, la región operadora-promotora y el gen de *GFP*, dando un fragmento esperado de 1973 pb. Como se muestra en la Figura 28, sólo en 2 candidatas, C2 y C3 se liberó el fragmento de 1973 pb.

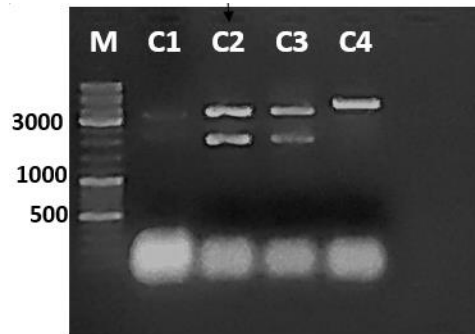


Figura 28. Comprobación de las candidatas con el inserto mCh-OP-GFP. Gel de electroforesis al 1% de la doble restricción utilizando las enzimas *EcoRV* y *HindIII*, fragmento esperado de 1973 pb.

9.10 Clonación de mCh-OP-GFP en el vector pACYC184c

La construcción final, pACYC184cmCh-OP-GFP (Figura 29 a), fue obtenida mediante la doble digestión de los vectores p_{KQV4}mCh-OP-GFP y pACYC184c con las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII*. En la Figura 29 b) se muestra la liberación de 1966 pb correspondiente a la región operadora-promotora flanqueada por los genes reporteros. Las bandas fueron cortadas y purificadas. Se realizó una reacción de ligación en proporción 3:1, la reacción consistió en 12.5 µl del vector (50 ng), 5.18 µl del inserto (72.56 ng), 1 µl de la enzima T4 DNA Ligasa (80 U), 2 µl del buffer 2x. La mitad de la mezcla fue transformada en bacterias DH5α quimiocompetentes.

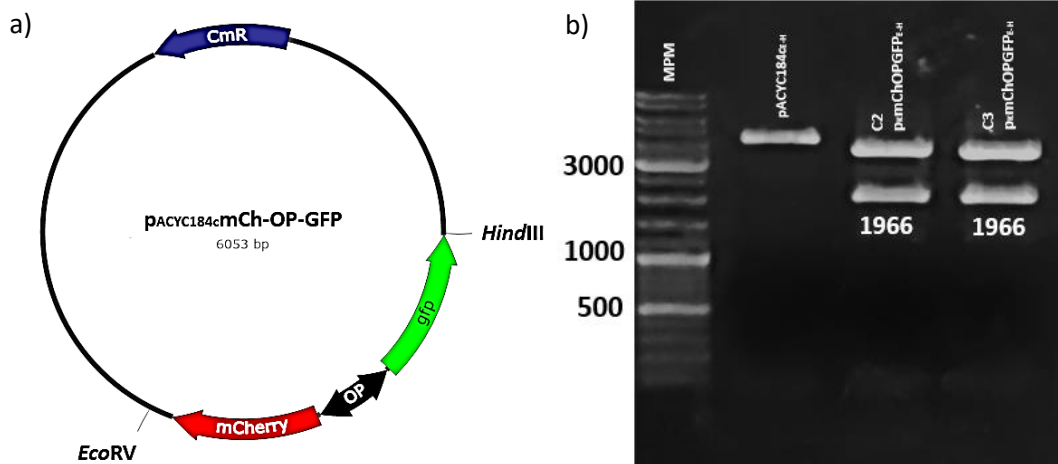


Figura 29. Mapa in silico del vector pACYC184cmCh-OP-GFP y doble restricción de los vectores p_{KQV4}mCh-OP-GFP y pACYC184c. a) mapa in silico del vector final pACYC184cmCh-OP-GFP vector que le confiere resistencia al cloranfenicol a la bacteria, b) gel de electroforesis al 1% de la doble restricción de p_{KQV4}mCh-OP-GFP y pACYC184c utilizando las enzimas *EcoRV* y *HindIII*.

9.10.1 Comprobación de candidatas con el fragmento mCh-OP-GFP

Se obtuvieron más de 60 candidatas y 32 en el control, las candidatas se resembraron y se seleccionaron 6, a las cuáles se les extrajo el plásmido y se realizó una reacción de PCR con los oligos rv de mCherry y de GFP. Dos de las 6 candidatas presentaron el amplicón de 1973 pb, una presentó un amplicón de aproximadamente 3000 pb y en las otras 3 no hubo presencia de amplificado Figura 30. Se procedió a trabajar con estas candidatas C2 y C3.

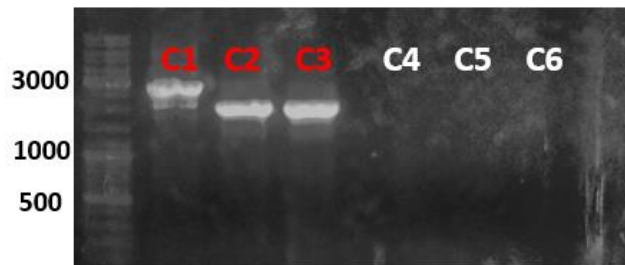
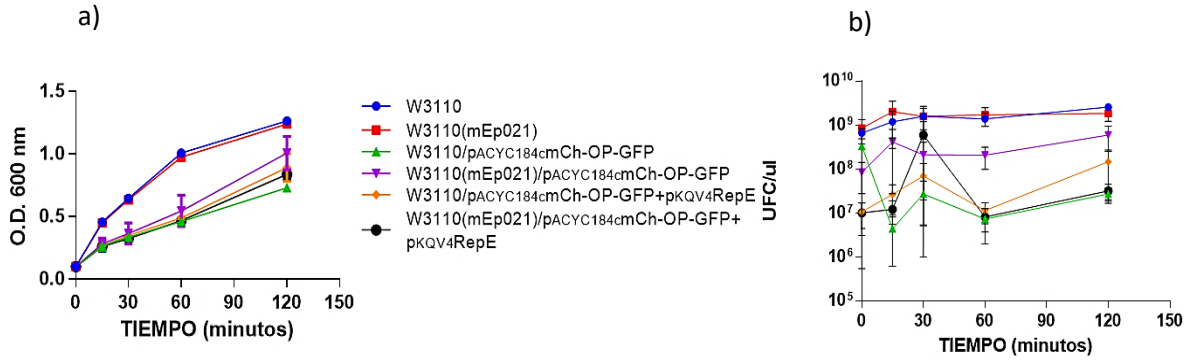


Figura 30. Comprobación de las candidatas portadoras de mCh-OP-GFP. Gel de electroforesis al 1% del producto de PCR de mCh-OP-GFP, fragmento esperado de 1973 pb.

9.10.2 Evaluación del crecimiento, viabilidad y fluorescencia del plásmido p_{ACYC184C}mCh-OP-GFP en presencia y ausencia del represor

9.10.3 Evaluación del crecimiento y la viabilidad

Para realizar este ensayo se siguió el crecimiento y la viabilidad durante 2 horas de las cepas W3110 y W3110(mEp021) con el plásmido p_{ACYC184C}mCh-OP-GFP y esté con el plásmido p_{KQV4}RepE, tomando alícuotas a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos, todos los cultivos fueron ajustados a un O.D._{600 nm} 0.1. Como se aprecia en la Gráfica 3, tanto la viabilidad como el crecimiento se ven retrasados con respecto a los controles (cepa W3110 y W3110(mEp021)).



Gráfica 3. Crecimiento y viabilidad de W3110 Y W3110(mEp021) en presencia de las construcciones p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y p_{KQV4}RepE. a) El crecimiento y la b) viabilidad se siguieron durante 2 horas.

Con el fin de calcular la viabilidad bacteriana se hicieron diluciones seriadas, como se puede observar en la Figura 31, el fenotipo fue distinto al ser expuestas a luz UV, (en esta Figura se presentan los goteos de 6 horas, a manera de resaltar el fenotipo de cada bacteria) se logró apreciar que hubo mayor fluorescencia en bacterias W3110 que portaban la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y disminuyó con las que eran lisógenas, comparado con los controles, la fluorescencia emitida por GFP disminuyó drásticamente en aquellas que poseían el plásmido p_{KQV4}RepE.

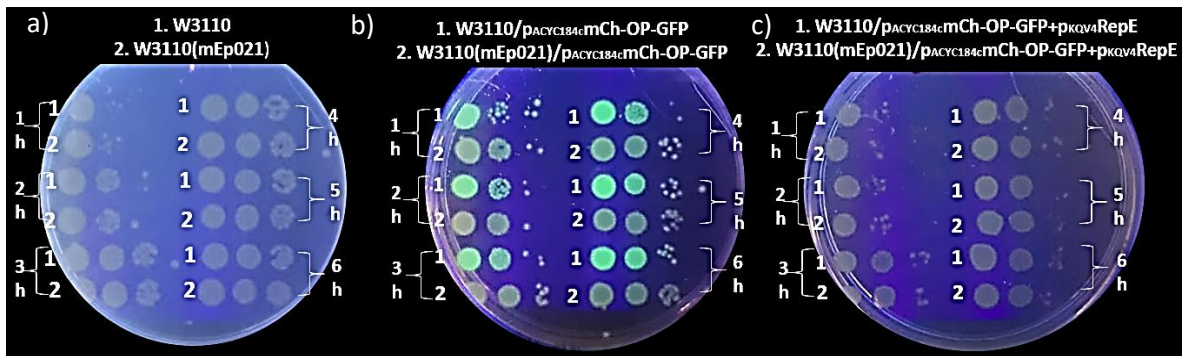


Figura 31. Viabilidad bacteriana. Se muestran los goteos realizados para determinar la viabilidad expuestos a luz UV, en a) los controles 1. W3110 y 2. W3110(mEp021) en b) 1.W3110/p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y 2. W3110(mEp021)/p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en c) 1.W3110/p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP+p_{KQV4}RepE y 2. W3110(mEp021)/p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP+p_{KQV4}RepE. La fluorescencia se aprecia diferente con respecto a los controles.

9.10.4 Ensayo de infección

Con el fin de comprobar la funcionalidad del represor, se realizaron tapices de cada bacteria, en medio TΦ suplementado con o sin antibiótico según correspondiera. Tuvimos que aquellas que portaban el represor ya sea provisto por la lisógena o por el plásmido $p_{KQV4}RepE$, inhibieron la infección de mEp021 cuando fue goteado. Interesantemente, el título disminuyó en bacterias W3110 que portaban la construcción $p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP$ (esto podría ser un efecto artefactual, debido a que se espatuló el Cloranfenicol sobre la caja con medio TΦ, Figura 32).

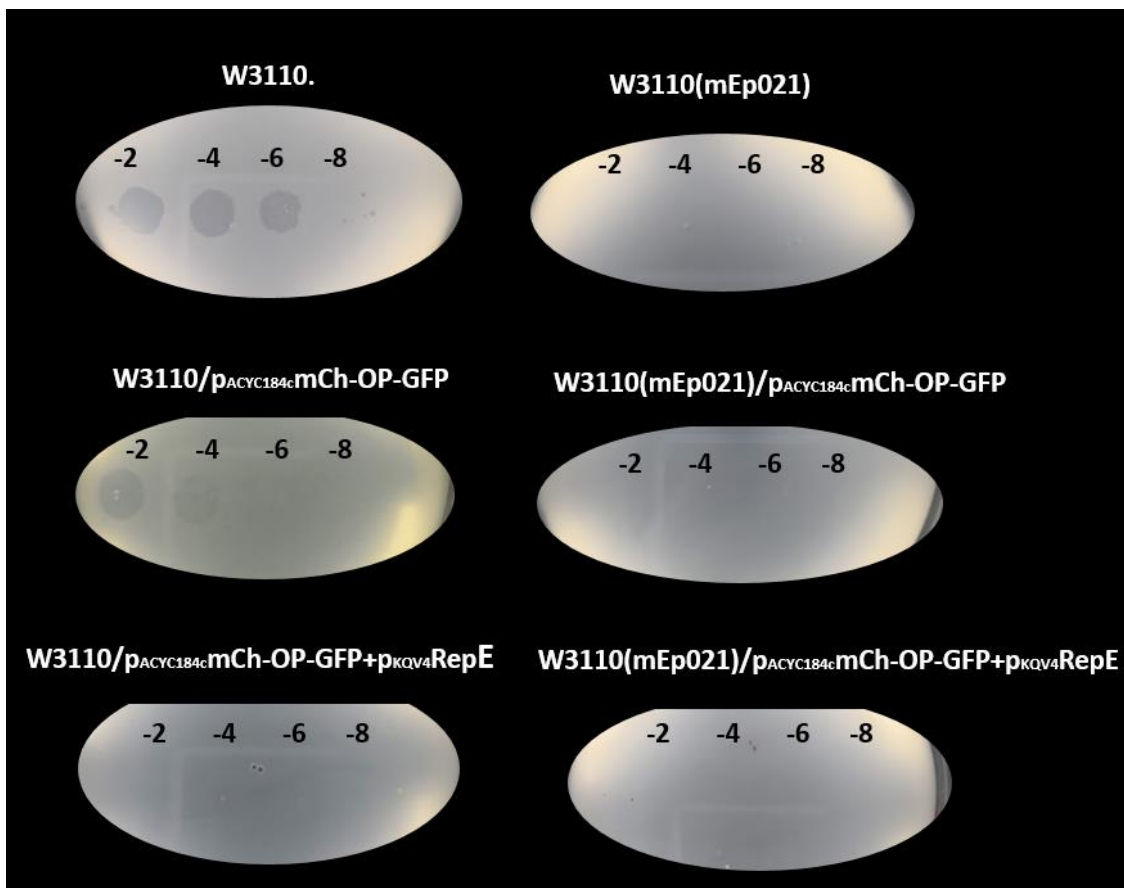


Figura 32. Ensayos de infección. En cada tiempo se tomaba una alícuota, aquí se presentan los tapices de los 30 minutos. Aquellas bacterias que portaban el represor no fueron infectadas.

9.10.5 Ensayo de fluorescencia: p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP

Con el fin de evaluar la presencia y funcionalidad de los probables promotores predichos por el análisis *in silico* de la secuencia operadora-promotora, así como para averiguar si el represor era capaz de unirse a esta secuencia y producir modificaciones en los niveles de fluorescencia, se llevó a cabo el ensayo de cuantificación de la fluorescencia, el cuál consistió en evaluar el plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP (en el cuál la región operadora-promotora se encuentra flanqueada por dos genes reporteros) en la cepa W3110, W3110(mEp021) y éstas dos en presencia adicional de p_{kqv4}RepE. A manera de visualizar el diseño del experimento, en la Figura 33 se muestra la región operadora-promotora a) flanqueada en el genoma de mEp021 por el gen del represor (ORF 15) y por el ORF 14, la proteína de este ORF presenta un dominio de unión a ADN y en b) la construcción de la región operadora-promotora flanqueada por el gen de gfp el cual sustituye al ORF 15 y del otro extremo, el gen de mCherry sustituyendo al ORF 14.

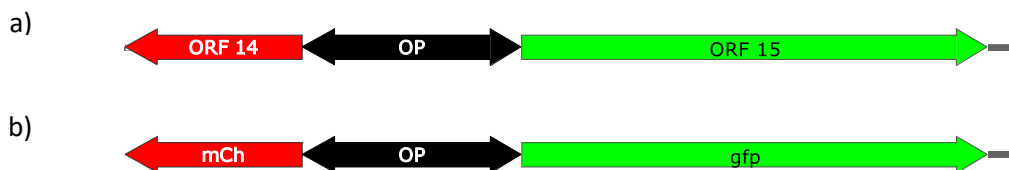
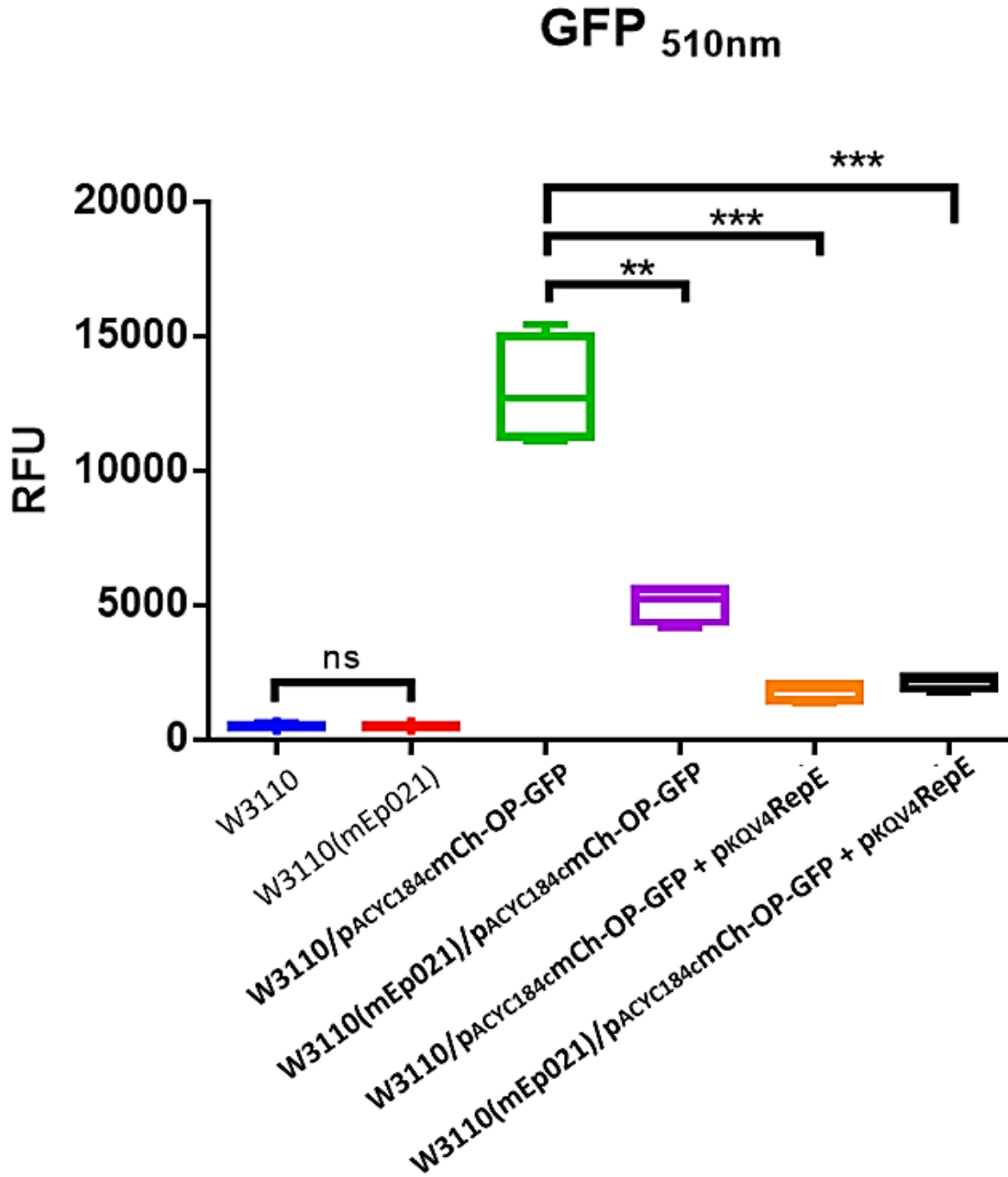


Figura 33. Comparación de la región operadora-promotora del gen del represor con el sistema generado en este trabajo. a) la región operadora-promotora se encuentra flanqueada por el gen del represor y por el gen de la proteína GE14, b) la región operadora-promotora flanqueada por el gen de GFP simulando al gen del represor E y por el gen de mCherry simulando al gen de la proteína GE14.

9.10.6 Evaluación de la fluorescencia de la proteína GFP

La fluorescencia emitida por GFP fue leída en 510 nm. En la Gráfica 4 se puede apreciar como hubo un aumento en los niveles de fluorescencia de la bacteria W3110 con la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP de 25.4 veces la fluorescencia del control, la bacteria W3110, lo cual nos indicó que por lo menos existía un

promotor funcional en dirección al gen de *gfp*. Con respecto a la bacteria lisógena W3110(mEp021) transformada con el plásmido p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP, se observó que hubo una disminución de los niveles de fluorescencia de 2.6 veces su valor en relación a la cepa W3110/p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP, esto nos sugirió que el represor producido por la bacteria lisógena era capaz de unirse a la región operadora promotora. Para descartar que la disminución de la fluorescencia fuera provocada por otra proteína del fago diferente al represor, se realizó una cotransformación de los plásmidos p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP y p_{KQV4}RepE en una bacteria W3110, de esta forma confirmamos que el efecto de la disminución de los niveles de fluorescencia (7.2 veces su valor comparando con W3110/p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP) era debido a la regulación negativa ejercida específicamente por el represor. Por otra parte, evaluamos los niveles de fluorescencia producidos por GFP en presencia de una cantidad mayor de represor logrando esto con la transformación de p_{KQV4}RepE en una bacteria lisógena; como se aprecia en la última barra de la Gráfica 4, los niveles de fluorescencia disminuyeron (6 veces) con respecto a W3110/p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP, esta diferencia fue significativa estadísticamente, sin embargo la diferencia entre la fluorescencia emitida por W3110/p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP + p_{KQV4}RepE y W3110(mEp021)/ p_{ACYC184c}mCH-OP-GFP + p_{KQV4}RepE no fue significativa.



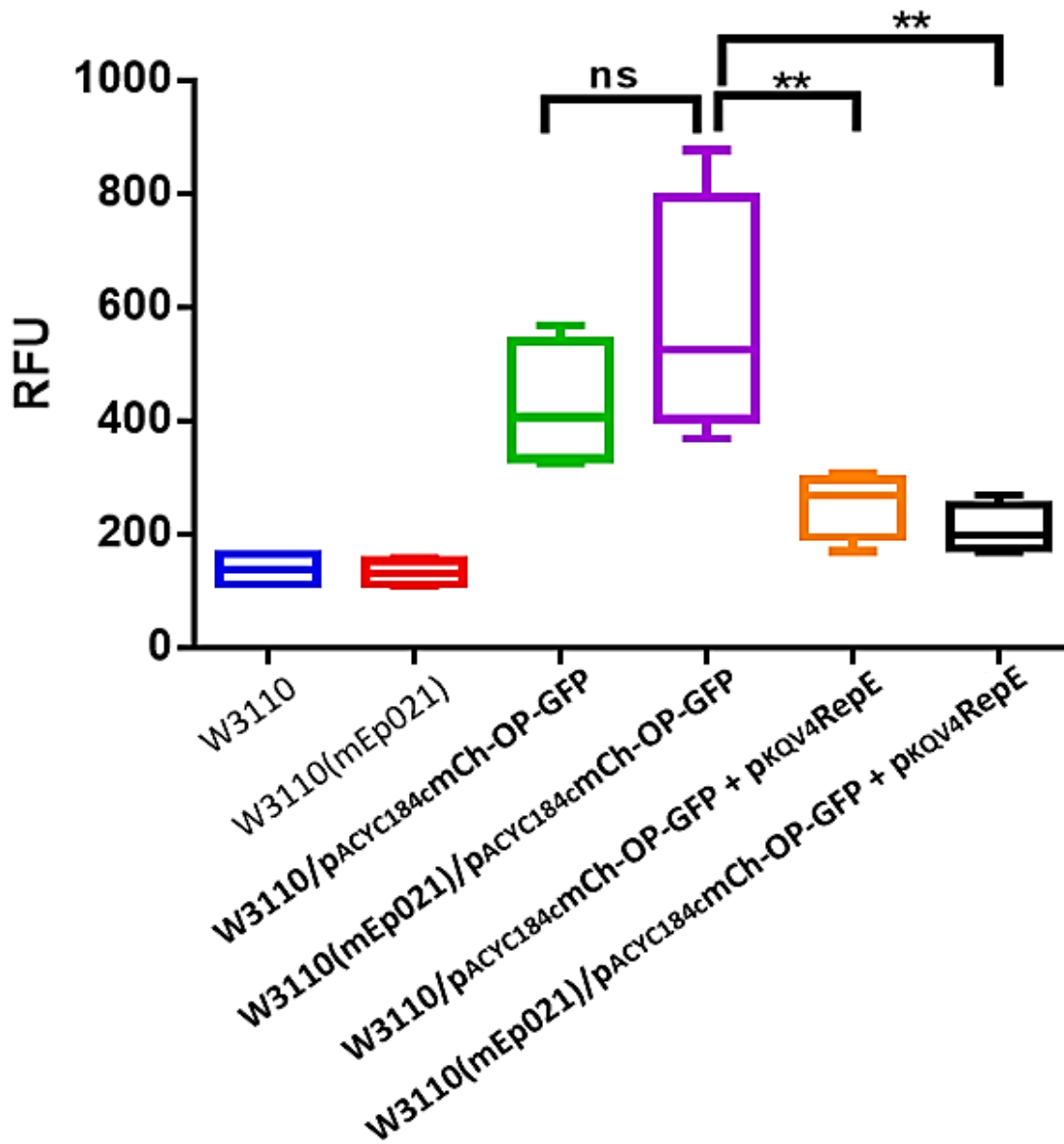
Gráfica 4. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína GFP en la construcción $p_{ACYC184}mCh-OP-GFP$: Nota: ns; diferencia no significativa. $**P < 0.01$, y $***P < 0.001$.

En el Anexo 22 se muestran los valores obtenidos en la cuantificación de la fluorescencia a los 15, 30, 60 y 120 minutos, por triplicado.

9.10.7 Ensayo de fluorescencia de la proteína mCherry

La medición de la fluorescencia emitida por la proteína mCherry fue realizada a 610 nm. Con el fin de conocer si existía algún promotor funcional y si el represor era capaz de regular al gen de mCherry (simulando al ORF 14), se realizó la evaluación de la fluorescencia emitida por mCherry en las mismas cepas, W3110 y W3110(mEp021) en presencia y ausencia del plásmido p_{KQV4}RepE. Como se muestra en la tercera barra de la Gráfica 5 correspondiente a la cepa W3110 con la construcción p_{ACYC184C}mCH-OP-GFP hubo un incremento de 3 veces en el nivel de fluorescencia con respecto al control (bacteria W3110), esta diferencia de unidades fue significativa, con este resultado se pudo decir que por lo menos existía un promotor funcional en dirección al gen de mCherry, cuando se evaluó la fluorescencia en una cepa lisogéna (cuarta barra) se observó un incremento en los niveles de fluorescencia con respecto a la cepa W3110/p_{ACYC184C}mCH-OP-GFP, sin embargo la diferencia entre estas no fue significativa. Por otra parte se evaluaron ambas cepas en presencia de p_{KQV4}RepE y al igual que en el ensayo de medición de la fluorescencia emitida por GFP, se observó una disminución en la fluorescencia siendo de 1.7 veces con respecto a W3110/p_{ACYC184C}mCH-OP-GFP y 2.7 veces comparado con W3110(mEp021)/p_{ACYC184C}mCH-OP-GFP, sugiriendo que el represor también es capaz de regular negativamente al ORF 14 como se aprecia en las barras 5 y 6 en donde disminuye la expresión de la proteína mCherry la cual simula al ORF 14.

mCherry 610nm



Gráfica 5. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína mCherry en la construcción $p_{ACYC184}cmCh-OP-GFP$. Nota: ns; diferencia no significativa. ** $P < 0.01$.

En el anexo 23 se muestran los valores obtenidos en la cuantificación de la fluorescencia a los 15, 30, 60 y 120 minutos, por triplicado.

X. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue conocer parte de la funcionalidad del circuito regulatorio del estado lítico-lisogénico del bacteriófago mEp021, Partiendo de la premisa, mEp021 es un fago temperado y un fago temperado puede entrar al ciclo lisogénico durante el cual el genoma del fago, por lo general se integra dentro del cromosoma bacteriano, recibiendo el nombre de profago, de esta forma persiste en lo que es considerado un estado quiescente el cual a diferencia del ciclo lítico, no promueve la muerte celular o la propagación de partículas, de esta forma el profago es replicado con el cromosoma bacteriano, este ciclo lisogénico es mantenido por la represión de los genes líticos (Feiner *et al.*, 2015). En el fago λ el estado lisogénico es mantenido por la unión del represor CI a los operadores O_{R1} , O_{R2} , O_{L1} y O_{L2} los cuales se encuentran traslapados con los promotores P_R y P_L , respectivamente, de esta forma se inhibe la transcripción de Cro (proteína represora) y N (proteína antiterminadora) resultando en la inhibición del ciclo lítico (Ptashne.,2004), examinando a detalle el genoma de mEp021, cuenta con la presencia de un gen correspondiente al ORF 15 el producto de este ORF presenta dos dominios, uno de unión a ADN, H-T-H, característico en el extremo N-terminal de algunos represores, como el CI de λ , el C de P2, el CB de KO2 y N15 (Ptashne ., 2004; Massad *et al.*, 2010; Hammerl *et al.*, 2016) y el otro dominio de peptidasa. Previamente el ORF 15 fue estudiado en nuestro grupo de investigación, (Lastra Vargas, 2013; Caraballo Hernández, 2017), se demostró que mutaciones en esta secuencia provocan fenotipo de placa clara y que bacterias portadoras del plásmido con el ORF 15 pueden inhibir la infección de mEp021. En este estudio se clonó el ORF15 modificando el codón de paro con el fin de adicionar seis codones de Histidinas, (para su posterior purificación), a la construcción le fue asignado el nombre de p_{KQV4}RepE. Debido a que la expresión de este ORF en el vector p_{KQV4} se encontraba bajo el control del promotor p_{Taq} y del operador *lac*, fue evaluada su funcionalidad en ausencia y presencia del inductor IPTG, los resultados mostraron que la fuga transcripcional es suficiente para inhibir la infección por mEp021 (Figura 15 c), algo muy interesante que se observó fue que al inducir con IPTG la

funcionalidad de represor desaparecía (Figura 15 d, e y f), algo que ya ha sido observado en los “*telomere phages*” N15, Φ KO2 y PY54, los autores tratan de explicar este fenómeno proponiendo que al haber grandes concentraciones de represor esté podría inhibir su propia síntesis por la unión a su operador, O_{R3} . (Hammerl *et al.*, 2016). Este resultado podría ser debido a que la inducción por IPTG adicional a la expresión de $p_{kqV4}RepE$ es tóxico para la bacteria, lo cual se ve reflejado en la apariencia enfermiza de los tapices (Figura 15 d, e y f) así como en el retraso del crecimiento (Gráfica 1), al encontrarse afectada la bacteria aún en presencia del represor (provisto por $p_{kqV4}RepE$) es susceptible a infección por mEp021. Para conocer si el aumento del represor llevaba a la pérdida de su función en una cepa W3110(mEp021) previamente transformada con $p_{kqV4}RepE$ realizamos el ensayo con inducción y sin inducción de IPTG, el fenotipo del tapiz enfermizo se conservó. Sin embargo, hubo una inhibición de la infección por mEp021 (ver Anexo 1) contrario al ensayo anterior, lo que nos estaba sugiriendo que existía por lo menos otra proteína que tenía función de inhibir la infección de mEp021. En nuestro grupo se ha reportado que las bacterias portadoras del plásmido con el ORF 81 (que codifica para la lipoproteína Lpp) presentan resistencia a la infección exclusiva por mEp021 a nivel membrana (Martínez Soto., 2018), probablemente, esta proteína presente en la bacteria lisogéna fue la que inhibió la infección de mEp021.

Adicionalmente se clonó el gen del represor mutante nombrado C4 (Caraballo Hernández, 2017) más la bandera de seis Histidinas, el cuál presenta una delección de 120 nucleótidos flanqueada por dos secuencias repetidas TCATGCGGGCGC, esta delección abarca el dominio H-T-H de unión al ADN en el extremo amino terminal (Figura 21) característico de los represores CI, Cro y “lambda like”, la eliminación de este fragmento llevó a la pérdida de función del represor (Figura 20 c), indicándonos que experimentalmente, entre los residuos eliminados por la delección se encuentran los residuos importantes para llevar a cabo el reconocimiento de los operadores. Esta proteína recombinante nombrada RepresorE(Δ 120), será utilizada como control en ensayos futuros.

Desde otra perspectiva, el estudio bioinformático de la región operadora-promotora (OP), reveló que esta secuencia es abundante en promotores (Figura 5), parecido a lo que se ha reportado en distintas regiones de inmunidad (Krause y Higgins., 1986, Ptashne., 2004, Saha *et al.*, 1987) las cuales se caracterizan por tener promotores divergentes y secuencias operadoras (Tabla 1), es interesante la variabilidad de las longitudes de las regiones de inmunidad, siendo que en el fago λ la región flanqueada por *ci* y *cro* es de 100 pb, en P22 la región flanqueada por *c2* y *cro* es de 80 pb, en el fago Mu 200 pb flanqueados por *c* y *ner* (Alazard *et al.*, 1997) y en el caso de mEp021 la región es de aproximadamente 324 pb flanqueada por el represor y por otro gen que codifica para una proteína con dominio de unión al ADN (ORF 14). Ordinariamente los operadores son secuencias palindrómicas como los que se presentan en λ y P22 (Vershon *et al.*, 1987; Ptashne., 2004;). La región intergénica de nuestro estudio, presentó siete secuencias palindrómicas las cuáles fueron discontinuas (no perfectas). En la Figura 7 a y b) se muestran las secuencias consenso, los operadores marcados en la Figura 6 en color naranja como OP1 fueron cuatro de 18 pb de longitud, tres de ellos se encuentran traslapados a los probables promotores tanto del ORF 14 como del ORF 15, los operadores marcados como OP2 en recuadros amarillos fueron tres de 19 pb de longitud, dos de ellos se encuentran traslapados a los probables promotores del ORF 14 y 15.

Interesantemente también se localizó una box A y una box B, las cuales son elementos importantes en la antiterminación mediada por N. En el fago λ y P22 se ha estudiado la antiterminación, ambos comparten sistemas relativamente parecidos en la regulación de la expresión de genes líticos tempranos, esto permitiendo que la transcripción prosiga aun en presencia de los terminadores en los operones provenientes de P_L y P_R . El reconocimiento del *hairpin* de box B (*nut site* o *N-utilization*) por los dominios de unión de N inicia el ensamblaje del complejo de antiterminación, el cual consiste de la proteína N, del factor NusA del hospedero, de la RNA polimerasa y de otros factores del hospedero unidos al sitio *nut* y a box A, permitiendo que la transcripción continúe río debajo de las señales de terminación de la transcripción (Cocozaki *et al.*, 2008).

La secuencia Box A, marcada en un rectángulo azul marino (Figura 6), como se aprecia en la Figura 9 tiene homología con los sitios de unión del factor hospedero Nus A del fago P22 y 21, difiriendo solo en una Adenina, sorpresivamente esta caja se encuentra traslapada tanto a un posible operador OP1 como a un OP2 (Figura 6), diferente a la localización en el fago λ donde se encuentra a 40 pb de distancia del operador O_{L1} y en P22 a 41 pb de distancia de O_{L1} , río abajo en ambos. Por otro lado, la posible box B (*nut site*), marcada con una flecha azul marino en la Figura 6, no se encuentra traslapada a ningún operador y conserva la característica de formar un *hairpin* (Figura 9). Se realizó una búsqueda rápida de terminadores transcripcionales (*FindTerm* Solovyev y Salamov., 2011; *ARNold* Naville *et al.*, 2011) en dirección al ORF 14, abarcando parte del ORF 10, no se encontraron posibles terminadores en la cadena +. Será interesante estudiar si las probables box A y B son funcionales.

Manualmente también se detectó la caja CAAT y GC, las cuales son elementos proximales de promotores en eucariontes, se sabe que la caja CAAT sirve de sitio de unión de diferentes factores de transcripción, como NF1 y la caja GC es el sitio de unión del factor SP1. En eucariontes, la presencia de una caja CAAT se considera como un indicador de un promotor fuerte (Devlin., 2004). La localización de estas cajas en la región operadora-promotora del gen del represor de mEp021 hacen notar que los bacteriófagos han ido evolucionando a lo largo de los años presentando así mosaicismos genéticos.

Por otro lado, nuestra región de interés presentó dos repetidos directos, cuya secuencia consenso se muestra en la Figura 8, los cuales están traslapados a los promotores hipotéticos. Menos frecuente es que las regiones de inmunidad presenten repetidos directos, aun así ya han sido reportados en al menos dos fagos cuyo represor los reconoce como es el caso del bacteriófago Mu y del bacteriófago P2 (Krause y Higgins., 1985; Saha *et al.*, 1987)

Partiendo de los resultados obtenidos en relación a la funcionalidad del represor en donde se demostró que esta proteína era capaz de inhibir la infección por mEp021, junto al análisis bioinformático de la región operadora-promotora localizada río

arriba del gen del represor, hipotetizamos que el represor era el responsable del mantenimiento del estado lisogénico del fago, esto mediante su unión a sus operadores en la región de inmunidad.

Es bien sabido que en ciertos fagos temperados las regiones de inmunidad se caracterizan por presentar secuencias palindrómicas o menos frecuente repetidos directos, los cuales pueden estar traslapándose a promotores, que a su vez pueden estar en forma divergente, dando origen a la transcripción 1) del gen represor por un lado y 2) por el otro de un ORF con función generalmente antagónica al represor, pero pudiendo actuar como represor o como un regulador de la transcripción.

Las regiones de inmunidad, como ya se hizo mención, contienen al gen de un represor, y a la par esta región del represor se caracteriza por tener un promotor, operador(es), una secuencia SD y posterior al gen un terminador transcripcional (Kenny *et al.*, 2006). Estas características las cumple la región del gen del represor de mEp021 (ORF 15).

Para confirmar parte de la hipótesis en donde el represor es el responsable del mantenimiento del estado lisogénico de mEp021, se diseñó la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP (Figura 29 a) en la cual la región operadora-promotora se encuentra flanqueada por el gen de GFP (sustituyendo al ORF 15) y por el gen de mCherry (sustituyendo al ORF 14), posterior a esto, se realizaron los ensayos de fluorescencia en presencia y ausencia del plásmido p_{KQV4}RepE. Los resultados indican que esta región tiene promotores funcionales en dirección a los genes reporteros,(características de las regiones de control de inmunidad) y que adicionalmente el represor está regulando negativamente la expresión tanto de su gen, como al ORF 14 (Gráficas 4 y 5), algo similar a lo observado en la autoregulación del represor del fago lambda, en donde el represor CI a concentraciones “altas” se encuentra unido a sus operadores, OR₁, OR₂ y OR₃, de los cuáles OR₃ y OR₁ se encuentran traslapados a los promotores P_{RM} y P_R, inhibiendo la transcripción de su propio gen y del gen *cro*, respectivamente (Laredo *et al.*, 1998).

Previo a la obtención de la construcción pACYC184c-mCh-OP-GFP, se evaluó la construcción pKQV4-mCh-OP-GFP en la cepa W3110 y W3110(mEp021) y los resultados sugirieron que el represor producido por la lisógena, actuaba como un activador para la transcripción de su gen y del gen 14 (Gráfica Suplementaria 1 y 2), esto podría ser debido a que en concentraciones bajas de represor, este puede actuar como un activador, similar a lo que ya ha sido reportado en el bacteriófago λ , en donde a concentraciones “normales” de represor y por unión cooperativa de dos dímeros de CI a los operadores O_{R1} y O_{R2} se incrementa la afinidad de la ARN polimerasa por el promotor P_{RM} debida a la interacción proteína-proteína (represor CI-polimerasa) adicionalmente el contacto de la polimerasa con el ADN, lo que favorece la transcripción del gen *ci* (Ptashne,2004). Sin embargo no se puede descartar la acción de algún otro factor de la lisógena, que pudiera dar este comportamiento. Además es importante mencionar que tanto el vector pACYC184c y pKQV4 son de bajo número de copias, con más precisión pACYC184c es de 4-7 y pKQV4 de 7-15 número de copias, probablemente las diferencias vistas en los niveles de fluorescencia, se pudieron deber a que hubo mayor cantidad del plásmido pKQV4-mCh-OP-GFP por tener mayor número de copias, superando al represor producido en la lisógena, esta podría ser otra razón, el efecto de activador del represor. Sin embargo, este ensayo no se realizó a diferentes tiempos (otra razón de más) como en la construcción pACYC184c-mCh-OP-GFP, sino que fue evaluado de un cultivo O/N.

Teniendo ya un sistema que simulaba la región operadora-promotora del gen represor de mEp021 flanqueada por dos genes reporteros, el cual nos permitió evaluar los niveles de fluorescencia emitidos en presencia y ausencia del represor, nos propusimos evaluar la participación del ORF 14. El ORF 14, se encuentra flanqueando la región operadora-promotora en dirección contraria al gen del represor (ORF 15). El ORF 14 forma parte del bloque de replicación del genoma de mEp021, cuenta con su SD y su codón de inicio y paro; los análisis bioinformáticos muestran que posee dominios de unión a ADN (*winged helix*), estos dominios son característicos en los represores transcripcionales de Biotina, LexA y Arginina (Wilson *et al.*, 1992). La proteína generada por el ORF 14 está conformada por 81

aminoácidos similar a lo que vemos en Cro, la cual tiene una longitud de 66 aa y Ner de 75 aa, tomando en cuenta los análisis *in silico* (los cuáles nos sugerían que se trataba de un represor transcripcional), procedimos a clonar este gen.

Teniendo la clonación, realizamos un ensayo de expresión para verificar que la proteína GE14 se producía, en la Figura Suplementaria 6 se muestra que con inducción [0.1 mM de IPTG] la banda de 9.2 kDa correspondiente al peso de la proteína se aprecia mejor.

Posteriormente se realizó un ensayo de goteo en tapiz. Hipotetizábamos, de que si la proteína GE14 tenía función contraria al represor, cuando goteáramos el lisado del fago mEp021 en un tapiz bacteriano portador del p_{kqv4}GE14, se iba a apreciar el fenotipo de placas claras (debido a que el estado lítico iba a predominar sobre el lisogénico por la posible unión de GE14 a sus operadores), como lo reportado en el antirepresor del fago SPC32H, aunque en este fago el antirepresor no compite con el represor por los operadores, sino que la unión es directamente al represor (Kim y Ryu., 2013). Sin embargo en los resultados no se pudo apreciar las placas claras (Figura Suplementaria 7).

Para tratar de esclarecer la función del ORF 14, se realizó un ensayo de cuantificación de fagos liberados en una lisógena en presencia del p_{KQV4}GE14, los resultados muestran que la cantidad de fagos liberados no es proporcional a la inducción con IPTG [0.1 y 0.5 mM] del producto del ORF 14, el número de fagos liberados es parecido con fuga transcripcional y con inducción a [0.1 mM] de IPTG, hubo un aumento notable de 3.7 veces con respecto al control W3110(mEp021)/pKQV4 y aumentó ligeramente al transcurrir el tiempo en presencia de p_{kqv4}GE14 con y sin inducción (Gráfica Suplementaria 4).

Con el resultado obtenido en la liberación de fagos, procedimos a evaluar si GE14 era capaz de reconocer alguna secuencia de ADN que estuviera en la región operadora-promotora y provocar algún cambio en los niveles de fluorescencia, sin inducir con IPTG la expresión de GE14 en la cepa W3110 no se observó que hubiera algún cambio significativo en los niveles de fluorescencia emitidos por GFP (Gráfica Suplementaria 5) ni por mCherry (Gráfica Suplementaria 6), lo cual nos sugería

fuertemente que la proteína 14 no tenía algún efecto sobre la región operadora-promotora, y el dominio de unión a ADN podría no unirse a alguna secuencia de la región operadora-promotora.

Por otro lado, también se realizó el ensayo de evaluación de la fluorescencia sobreexpresando a $p_{KQV4}GE14$ con 0.5 mM de IPTG, en la Gráfica Suplementaria 7 a) se observa que GE14 disminuye significativamente los niveles de fluorescencia de GFP aunque la represión no fue tan marcada como en el caso del represor. Los resultados sugieren que GE14 esta regulando negativamente la transcripción del gen del represor. Este resultado era el esperado, ya que en los fagos temperados como λ la proteína antagónica al represor, Cro es capaz de reconocer y unirse al O_{R3} el cual esta traslapado al promotor P_{RM} , de esta manera inhibe la transcripción del represor CI (Ptashne *et al.*, 1980).

Se ha reportado que la proteína Cro del fago $\Phi KO2$, reconoce exclusivamente al operador O_{R3} el cual se encuentra traslapado al promotor del represor CB (Hammerl *et al.*, 2016), quisimos saber si GE14 aparte de regular negativamente al gen del represor también era capaz de regular su transcripción, los resultados aún no son claros, la Gráfica Suplementaria 7 b) muestra que la fluorescencia emitida por mCherry disminuyo solo en una candidata portadora de $p_{KQV4}GE14$, por este motivo se planea realizar el ensayo con más candidatas.

Entre lo mínimo que sabemos de GE14 están los resultados de los ensayos de fluorescencia en una cepa W3110(mEp021) en presencia del plásmido $p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP$, se apreció que en GFP (sustituyendo al ORF 15) hubo una disminución significativa de fluorescencia, no así, cuando se evaluó la fluorescencia emitida por mCherry (sustituyendo al ORF 14) en donde parecía que mCherry incrementaba su fluorescencia, sin embargo esta diferencia no fue significativa con respecto al control (Gráfica 5, cuarta barra), esto podría sugerirnos que GE14 se expresa de manera basal en la lisógena (si es que no interviene otro factor) y quizás por esto, el represor no logró reprimir de manera eficaz su expresión. Otro dato, aunque preliminar y no mostrado, que apoya la expresión basal de GE14 en la cepa lisógena es el que se observó cuando la función de $p_{KQV4}GE14$ fue evaluada con

fuga transcripcional sobre el plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en una cepa W3110 donde no se apreciaron diferencias significativas en los niveles de fluorescencia, contrario a lo que se observó en una cepa lisógena, en donde hubo diferencias significativas en los niveles de fluorescencia, sugiriéndonos que la cantidad de GE14 producida por el plásmido (la cual es poca, ver Figura Suplementaria 6) en adición a la que probablemente es producida por la lisógena fueron suficientes para apreciar un efecto en los niveles de fluorescencia. Sin embargo, para saber si esta suposición de la expresión basal es correcta, es necesario realizar más ensayos.

Tomando en cuenta la localización de los probables promotores y operadores, junto a la acción del represor, probablemente podemos descartar a los operadores que son repetidos directos debido a que los ensayos de p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en la cepa lisógena la fluorescencia de mCherry no está disminuida como en el represor, adicionalmente a que en el vector p_{KQV4}mCh-OP-GFP la fluorescencia evaluada de un cultivo O/N aumenta significativamente en la cepa lisógena, sugiriéndonos que el represor actúa como activador tanto para GFP como mCherry, lo cual sería difícil si los operadores fueran dos y estuvieran traslapados a los promotores divergentes.

Con respecto a los 3 operadores marcados en amarillo como OP2, es llamativa la forma en que están distribuidos, siendo que 2 se encuentran traslapados entre ellos y con los probables promotores del ORF 14 y 15, algo parecido se observa en el operador O₂ del bacteriófago Mu (Krause y Higgins., 1986), aunque el traslape entre sus repetidos directos no cubre tantas bases como en los probables operadores de mEp021.

Por otro lado de los 4 operadores marcados como OP1 en rectángulos naranjas (Figura 6) algunos de ellos se encuentran traslapados a los probables promotores y otros cercanos a la región -35, lo cual podría explicar la función de activador del represor para su propia transcripción.

Por lo que concierne a GE14, será muy interesante conocer más acerca de su función y si reconoce a los mismos operadores que el represor. En este estudio solo nos enfocamos en la región intergénica flanqueada por el represor (ORF 15) y por GE14 (ORF 14). Sin embargo en el genoma de mEp021

existen otras regiones intergénicas así como una probable proteína Antirepresora, queda para estudios futuros proponer el circuito regulatorio (que muy probablemente intervienen otras proteínas) que mantiene el estado lisogénico en mEp021.

XI. CONCLUSIONES

- ☐ La región operadora-promotora del gen represor del bacteriófago mEp021 tiene por lo menos dos promotores divergentes, los cuales se encuentran fuertemente regulados negativamente por el represor.
- ☐ Los resultados sugieren que las secuencias reconocidas por el represor son al menos dos y muy probablemente se encuentran traslapadas o río abajo con los promotores.
- ☐ Las bacterias que portan tanto el plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y el p_{KQV4}RepE tienen una disminución en su crecimiento y en su viabilidad.
- ☐ El represor aún con bandera de seis Histidinas en el extremo carboxilo terminal es capaz de llevar a cabo su función, inhibe la infección de mEp021.
- ☐ El represor (Δ 120) es incapaz de llevar a cabo su función, permite la infección de mEp021.
- ☐ La proteína GE14 parece ser un regulador negativo de la transcripción del gen del represor.

XII. PERSPECTIVAS

- ☐ Caracterizar a los operadores del Represor y GE14 mediante *cross-linking* reversible o *DNase footprinting*.
- ☐ Realizar ensayos de competencia que involucren a la ARN polimerasa, al represor y a GE14 con el fin de conocer más acerca de la regulación de la transcripción.
- ☐ Evaluar cual(es) nucleótidos de los operadores son importantes para ser reconocidos por el represor, realizando mutágenesis al azar y después dirigida por PCR.
- ☐ Caracterizar a los promotores en la región operadora-promotora mediante *Primer extension*.
- ☐ Realizar la evaluación de los niveles de fluorescencia en el vector p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP en presencia de p_{KQV4}GE14 con distintas concentraciones del inductor IPTG, durante un tiempo superior a las 4 horas.
- ☐ Evaluar los niveles de fluorescencia en ensayos donde el gen del represor y GE14 estén en el lugar de GFP en el vector p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y otros en donde el gen del represor y GE14 se encuentren sustituyendo al gen de mCherry, es decir se encuentren en forma cis.
- ☐ Analizar y comprobar si el represor se une a otra región en el genoma de mEp021.
- ☐ Realizar una cocrystalización del represor unido a sus operadores para conocer los residuos específicos en la interacción con el ADN.
- ☐ Caracterizar el extremo C-Terminal del represor y comparar las diferencias con el dominio C-Terminal del represor C2 de P22.
- ☐ Evaluar si la box B presente en la región operadora-promotora es reconocida por la proteína N de λ , P22 o la probable N de mEp021.

XIII. REFERENCIAS

- Alazard Robert, Christine EBEL, Catherine VENIEN-BRYAN, Lionel MOUREY, Jean Pierre SAMAMA and Michael CHANDLER. Eur. J. Biochem. 252, 4082415 (1998)
- Baker T.A. Bacteriophage Mu: a transposing phage that integrates like retroviruses. *seminars in VIROLOGY*, Vol 6, 1995: pp 53-63
- Browning, D. F. and S. J. Busby (2004). "The regulation of bacterial transcription initiation." *Nat Rev Microbiol* 2(1): 57-65.
- Carballo Hernández Gerson Isaac. (2017) Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. El bacteriofago mEp021 y su control sobre el destino celular: doble fenotipo de placa en la misma progenie. Director: Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe. CINVESTAV, México, 2017.
- Cocozaki., et al. (2008). "Bacteriophage P22 Antitermination boxB Sequence Requirements are complex and overlap with those of λ ." *J Bacteriol* 190(12): 4263-4271.
- Crooks G., et al. (2004). WebLogo. "A sequence logo generator." *Genome Research*, 14:1188-1190.
- Degnan, P. H., et al. (2007). "Conservation and diversity in the immunity regions of wild phages with the immunity specificity of phage lambda." *Mol Microbiol* 64(1): 232-244.
- Devlin Thomas M. (2006). In:Devlin Thomas M. ed., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 5th ed. Reverté S.A., pp. 353.
- Feiner, R., et al. (2015). "A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria." *Nat Rev Microbiol* 13(10): 641-650.
- Hammerl, J. A., et al. (2016). "The diverse genetic switch of enterobacterial and marine telomere phages." *Bacteriophage* 6(2): e1148805.
- Hammerl, J. A., et al. (2016). "Binding Specificities of the Telomere Phage varphiKO2 Prophage Repressor CB and Lytic Repressor Cro." *Viruses* 8(8).

- Hatfull, G. F. (2008). "Bacteriophage genomics." *Curr Opin Microbiol* 11(5): 447-453.
- Hendrix, R. W. (2003). "Bacteriophage genomics." *Curr Opin Microbiol* 6(5): 506-511.
- Hendrix, R. W., et al. (1999). "Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(5): 2192-2197.
- Kameyama, L., et al. (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* 263(1): 100-111.
- Kameyama L, Fernández L, Bermúdez R.M, Gracia-Mena J, Ishida C, Guarneros G. Properties of a new coliphage group from human intestinal flora, in: P.S. G (Ed.), *Recent Research Developments in Virology-II*, Transworld Research Network, India, 2001, pp. 297-303 .
- Kameyama, L., Oviedo, N. y Guarneros, G. (2001). Cap. 18, Bacteriófago Lambda, Libro: *Microbios en línea*, Publicaciones Digitales, Libros UNAM
- Kenny, J. G., et al. (2006). "Characterization of the lytic-lysogenic switch of the lactococcal bacteriophage Tuc2009." *Virology* 347(2): 434-446.
- Kim, M., et al. (2016). "Noncanonical DNA-binding mode of repressor and its disassembly by antirepressor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(18): E2480-2488.
- Kim, M. and S. Ryu (2013). "Antirepression system associated with the life cycle switch in the temperate podoviridae phage SPC32H." *J Virol* 87(21): 11775-11786.
- Kourilsky, P. (1973). "Lysogenization by bacteriophage lambda. I. Multiple infection and the lysogenic response." *Mol Gen Genet* 122(2): 183-195.
- Krause, H. M. and N. P. Higgins (1986). "Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor." *J Biol Chem* 261(8): 3744-3752.

Ladero, V., et al. (1998). "Identification of the repressor-encoding gene of the Lactobacillus bacteriophage A2." *J Bacteriol* 180(13): 3474-3476.

Lastra Vargas Leonor. (2013) Tesis para obtener el grado de Maestra en ciencias. Caracterización del gen represor del bacteriofago mEp021 de Escherichia Coli. Directores: Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y Dr. Gabriel Guarneros Peña. CINVESTAV, México, 2013.

Little, J. W. and D. W. Mount (1982). "The SOS regulatory system of Escherichia coli." *Cell* 29(1): 11-22.

Marsin, S., et al. (2001). "Early steps of Bacillus subtilis primosome assembly." *J Biol Chem* 276(49): 45818-45825.

Massad, T., et al. (2010). "Crystal structure of the P2 C-repressor: a binder of non-palindromic direct DNA repeats." *Nucleic Acids Res* 38(21): 7778-7790.

Martínez Soto, Carlos Eduardo (2018) Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. "Caracterización parcial de una lipoproteína del colifago mEp021 involucrada en la exclusión a la superinfección". Director: Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe. CINVESTAV, México, 2018.

Naville M., et al. (2011). "ARNold A web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators." *RNA Biology* 8:1, 11-13.

Olson E., et al. (1982). "Analysis of nutR: A region of phage lambda required for antitermination of transcription". *Cell* 31, 61-70.

Pope, W. H., et al. (2011). "Expanding the diversity of mycobacteriophages: insights into genome architecture and evolution." *PLoS ONE* 6(1): e16329.

Prevelige Jr., P. (2006). Bacteriophage P22. In: P. Prevelige Jr., ed., *The Bacteriophages*, 3rd ed. [online] Oxford New York: Oxford University Press, pp.457-468.

Ptashne, M., et al. (1980). "How the lambda repressor and cro work." *Cell* 19(1): 1-11.

Ptashne Mark, 2004 A genetic switch : phage lambda revised / by Mark Ptashne.--
3rd ed. by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
Printed in the United States of America, ISBN 978-08796971 6-7

Roberts, J.W., and Devoret, R. (1983) Lysogenic induction. In Lambda II. Hendrix,
R.W., Roberts, J.W., Stahl, F.W., and Weisberg, R.A. (eds). Cold Spring Harbor, NY:
Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 123–144

Saha, S., et al. (1987). "Autoregulation of bacteriophage P2 repressor." *Embo j* 6(3):
809-814.

Stoddard Steven F. and Martha m. Howet *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, June
1989, p. 3440-3448.

Susskind, M. M. and D. Botstein (1975). "Mechanism of action of Salmonella phage
P22 antirepressor." *J Mol Biol* 98(2): 413-424.

Vershon, A. K., et al. (1987). "Interaction of the bacteriophage P22 Arc repressor
with operator DNA." *J Mol Biol* 195(2): 323-331.

V. Solovyev, et al. (2011). "Automatic Annotation of Microbial Genomes and
Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture,
Biomedicine and Environmental Studies*" (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p.
61-78

Wood, Z. A., et al. (2006). "Co-repressor induced order and biotin repressor
dimerization: a case for divergent followed by convergent evolution." *J Mol Biol*
357(2): 509-523.

Zhu, H., et al. (2004). "Characterization of polynucleotide kinase/phosphatase
enzymes from Mycobacteriophages omega and Cjw1 and vibriophage KVP40." *J
Biol Chem* 279(25):

XIV. APÉNDICE

Medios y Soluciones.

Medio Luria-Bertani

Se pesan 10 g de Bactotripton, 10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, el pH se ajusta con 200 µl de NaOH 10 N, cuando se preparan cajas se agregan 15 g de agar bacteriológico, se afora a 1 L con agua destilada. Se esteriliza con autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

Medio T φ suave

10 g Bactotripton, 10 g agar, 2.5 g NaCl, 2 ml NaOH 2 M. Agregar 1 ml MgSO₄ 1 M cuando se preparan cajas. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.

TMG

11.7 g NaCl, 1 g gelatina, 1 ml Tris HCl 1 M a pH 8.0, 0.5 ml MgSO₄ 1 M. Ajustar el pH a 7.4 con KOH. Esterilizar con autoclave

SOC

Se pesan 20 g de Bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de NaCl, los solutos se disuelven y se añaden 10 ml de 250mM de KCl, el pH se ajusta a 7 con NaOH 5 N, el volumen se ajusta a 1 L y se esteriliza por autoclaveo, antes de usar se le añaden 5 ml de una solución de MgCl₂ 2M y 20 ml de una solución de glucosa 1 M, posteriormente se esteriliza por filtración.

DEAE Celulosa equilibrada

200 gr de DEAE celulosa se colocan con 1 L de HCl 0.05 N, se adiciona NaOH para ajustar el pH, que debe ser cercano al de LB (6.8), la resina se deja sedimentar y el sobrenadante se decanta, posteriormente se realizan 3 lavados con medio LB, al volumen final de resina se le agrega un 25% de medio LB, la DEAE celulosa equilibrada se esteriliza y posteriormente se almacena a 4°C.

Soluciones para extracción de plásmido mediante *Miniprep*

Solución I

50 mM de glucosa

25 mM Tris-HCl (pH=8)

10 mM EDTA (pH=8)

La solución se prepara a partir de soluciones stocks, autoclavadas a 121°C a 15 psi por 15 minutos, a excepción de la glucosa, la cual se esteriliza mediante filtración. Se almacena a 4°C.

Solución II

0.2 N NaOH.

1% (w/v) SDS

La solución se prepara al momento y se usa a temperatura ambiente.

Solución III

5 M Acetato de potasio 60.0 ml

Ácido acético glacial 11.5 ml

H₂O 28.5 ml

La solución se mantiene a 4°C

Soluciones para células quimiocompetentes.

Tfb I: 500 ml.

30 mM KOAc	3 ML DE UN STOCK 5M.
100 mM RbCl₂	6 g.
10 mM CaCl₂	5 ml de un stock 1M.
50 mM MnCl₂*4H₂O	12.5 ml de un stock 2 M.
GLICEROL AL 15% V/V	75 ml de un bote al 100%.
pH 5.8 W/ DILUIR EN ÁCIDO ACÉTICO	
ESTERILIZA POR FILTRACIÓN O POR AUTOCLAVE.	

Tfb II: 500 ml.

10 mM MOPS (O PIPES)	1 G.
75 mM CaCl ₂	37.5 ml de un stock 1 M
10 mM RbCl ₂	10 ml de un stock 0.5 M
GLICEROL AL 15%	75 ml de un bote al 100%
pH 6.5-6.8 CON KOH/NaOH	
ESTERILIZA POR FILTRACIÓN O EN AUTOCLAVE	

Soluciones para las electroforesis

Buffer stock TAE 50X

242 g tris, 57.1 ml ácido acético, 100 ml EDTA 0.5 M pH 8.0. Llevar a un litro con agua destilada

Buffer de carga

0.25% (w/v) azul de bromofenol

0.25% (w/v) Xylene cyanol

30% glicerol en H₂O

Soluciones para los geles de proteínas

Gel de proteínas

Acilamida 30%, 2.7%bis

Acilamida 29.2 g

Bis-acilamida 0.8 g

Aforar a 100 ml.

Gel separador 16%

3.2 ml de Bis-acilamida, 1.5 ml de buffer Tris-HCl pH=8.8, 60 µl de SDS al 10%, 1.5 ml de H₂O, 50 µl de persulfato de amonio, 10 µl de TEMED.

Gel concentrador 4.25%

0.825 ml de Bis-acrilamida, 1.56 ml de Tris-HCl pH=6.8, 62.5 µl de SDS al 10 %, 3.75 ml de H₂O, 100 µl de persulfato de amonio, 20 µl de TEMED.

Tris-Glicina (Tris 0.25 M pH=8.3; Glicina 1.92 M)

Trisma-base 7.5 g

Glicina 37.5 g

Aforar a 250 ml de H₂O

Buffer de Tanque

Tris-glicina 50ml

SDS al 10% 5 ml

Aforar a 500 ml de H₂O.

Buffer de tratamiento

2.5 ml de Tris-HCl pH=6.8, 4 ml de SDS al 10%, 2ml de glicerol, 1 ml de 2-mercaptoetanol, una pizca de bromofenol, se afora a 10 ml.

Western Blot

Buffer de transferencia

Se colocan 50 ml del buffer de tanque, 5 ml de SDS al 10%, 100 ml de metanol para llevar a un volumen final de 500 ml con agua destilada.

PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x

Se pesan 8.06 g de NaCl, 0.22 g KCl, 1.15 g de Na₂HPO₄, el pH se ajusta a

7.4, se afora a un volumen de 1 L con agua Milli-Q o destilada y se almacena a temperatura ambiente.

Purificación de proteínas

Se prepararon soluciones stock de Tris-HCl 1M pH=8.0 y NaCl 5 M las cuales se utilizaron para la hacer los distintos buffers.

Buffer de lisis

50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

Buffer de lavado

50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

20 mM Imidazol

Buffer de Elución

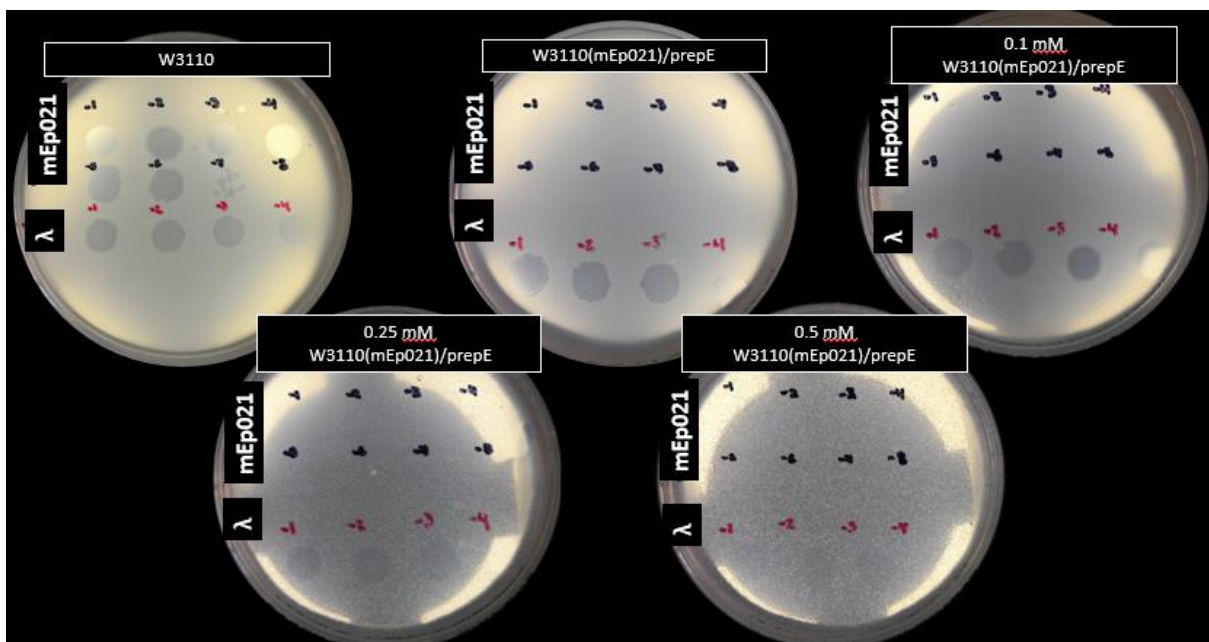
50 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

300 mM Imidazol

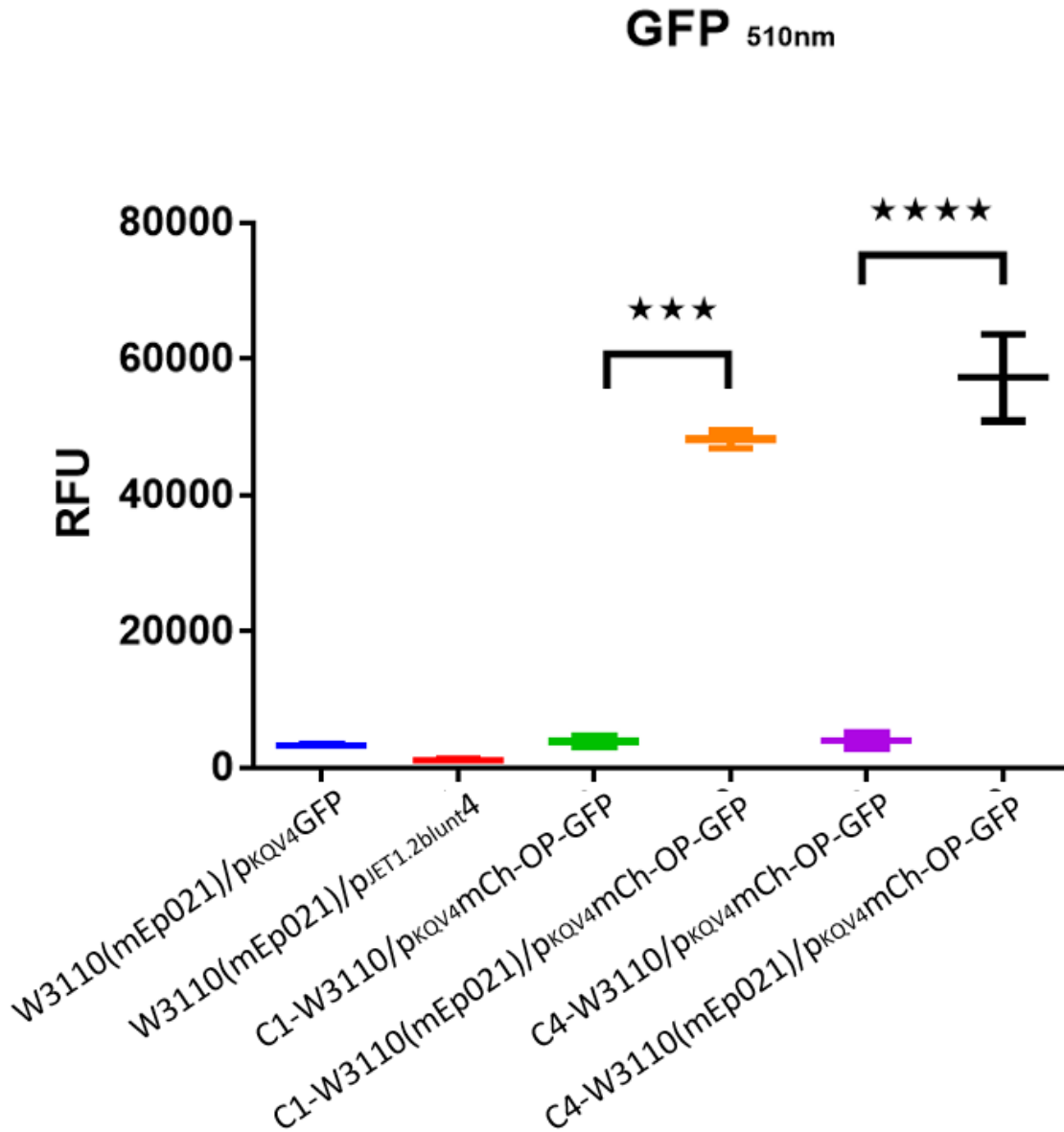
XV. ANEXOS

Anexo 1. Ensayo de infección de mEp021 en una cepa W3110(mEp021)/p_{KQV4}RepE, con inducción [0.1, 0.25 y 0.5 mM] de IPTG.



Anexo 2. Evaluación de la fluorescencia: p_{KQV4} mCh-OP-GFP

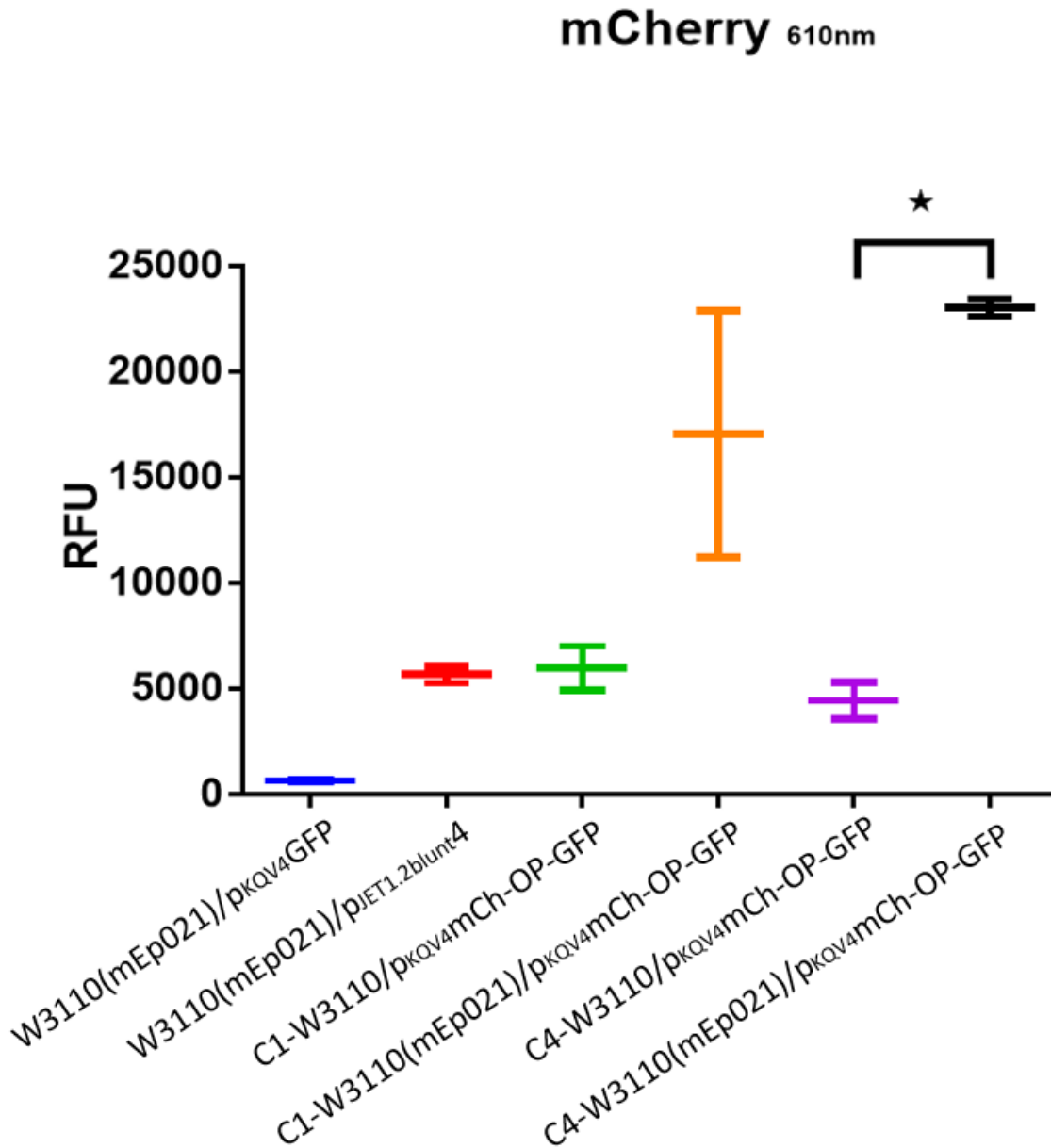
Previo a la obtención de la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP, se generó la construcción p_{KQV4}mCh-OP-GFP, posterior a la transformación en bacterias W3110 y W3110(mEp021) se evaluó su funcionalidad en 2 candidatas, este ensayo se realizó a partir de un cultivo O/N ajustando a una O.D_{600nm} de 1. Como se aprecia en la Gráfica Suplementaria 1, la fluorescencia leída en 510 nm correspondiente a GFP en las dos candidatas (C-1 y C-2) aumento notablemente en las bacterias W3110(mEp021) siendo el aumento de 14.2 veces comparándola con las candidatas (C-1 y C-2) en las bacterias W3110, sugiriéndonos que un factor de la lisógena parecía que estaba actuando como un activador para la transcripción del represor lo que se reflejó en la fluorescencia por GFP (esta es una probabilidad).



Gráfica Suplementaria 1. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en la construcción p_{KQV4}mCh-OP-GFP. La fluorescencia fue evaluada en cepas W3110 y W3110(mEp021) a 510 nm. C-1, C-4, Candidata 1 y 4, respectivamente.

CEPA	DÍA 1	DÍA 2
W3110(mEp021)/pKQV4GFP	3193	3293
W3110(mEp021)/pJET1.2blunt4	1107	1049
C1-W3110/pKQV4mCh-OP-GFP	4703	3005
C4-W3110/pKQV4mCh-OP-GFP	5021	2846
C1-W3110(mEp021)/pKQV4mCh-OP-GFP	46893	49446
C4-W3110(mEp021)/pKQV4mCh-OP-GFP	63544	50898

Por otro lado, también se evaluó la fluorescencia de mCherry a 610 nm, y similar a lo que observamos con GFP, el represor producido por la lisógena parece actuar como activador para la transcripción del ORF 14 (representado por mCherry) (Gráfica Suplementaria 2) lo que se ve reflejado en el incremento de 4.1 veces de los niveles de fluorescencia en las cepas lisógenas comparadas con las cepas *wild type*.



Gráfica Suplementaria 2. Evaluación de la fluorescencia emitida por mCherry en la construcción pKQV4mCh-OP-GFP. La fluorescencia fue evaluada en cepas W3110 y W3110(mEp021) a 610 nm. C-1, C.4, Candidata 1 y 4, respectivamente

CEPA	DÍA 1	DÍA 2
W3110(mEp021)/pKQV4GFP	646	587
W3110(mEp021)/pJET1.2blunt4	6059	5248
C1-W3110/pKQV4mCh-OP-GFP	4917	6998
C4-W3110/pKQV4mCh-OP-GFP	3547	5293
C1-W3110(mEp021)/pKQV4mCh-OP-GFP	11197	22875
C4-W3110(mEp021)/pKQV4mCh-OP-GFP	23445	22613

Anexo 3. Construcción de pKQV4GE14

Con el fin de averiguar si la proteína proveniente del ORF 14 con dominio de unión a ADN era capaz de unirse a la región operadora promotora, se decidió clonar este gen en el vector pKQV4.

Amplificación del ORF 14

Fueron diseñados los oligonucleótidos los cuáles incluían sitios de restricción para las enzimas 5'-*EcoRI* y 3'-*HindIII*, adicionalmente el cebador reverso posee una base degenerada, W, la cual puede modificar el codón de paro por un residuo de lisina y continuar con la lectura de la bandera de seis Histidinas. Se efectuó la PCR y el amplicón de 309 pb fue visualizado en un gel de agarosa (Figura Suplementaria 1).

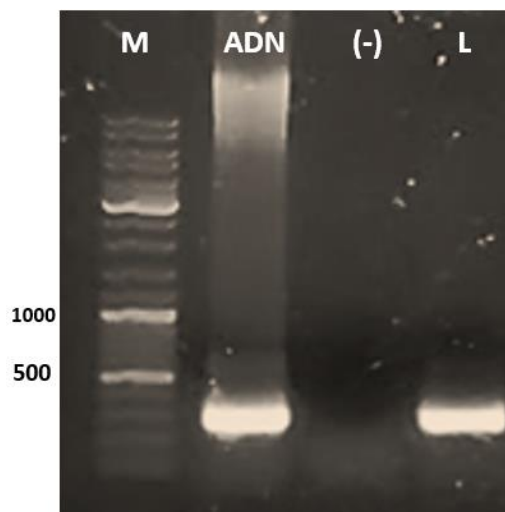


Figura Suplementaria 1. Amplificación del ORF 14. Gel de electroforesis al 1% del producto de PCR del ORF 14, fragmento esperado de 309 pb, como molde se utilizó ADN previamente extraído de mEp021 y lisado de mEp021. (-) control negativo.

Clonación del ORF14 en el vector de transición pJET1.2 blunt

La banda del producto de PCR fue cortada y purificada y se procedió a realizar la reacción de ligación con el vector pJET1.2 blunt, siguiendo con la transformación en bacterias DH5 α quimiocompetentes. Las candidatas fueron resembradas, para su posterior análisis.

Selección y comprobación de candidatas con el ORF 14

De las candidatas resembradas se seleccionaron 6, a las cuales se les realizó PCR de colonia, como se muestra en la Figura Suplementaria 2 a), las seis candidatas seleccionadas amplificaron la región de interés, posterior a esto se les extrajo el plásmido, se verificó la integridad del plásmido (Figura Suplementaria 2 b), como se observa, fue poco plásmido el extraído de la candidata 1, por este motivo se descartó para el siguiente ensayo, de las demás candidatas se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, con el fin de conocer cuáles eran capaces de liberar el fragmento de 309 pb. Solo cuatro liberaron el fragmento (datos no mostrados).

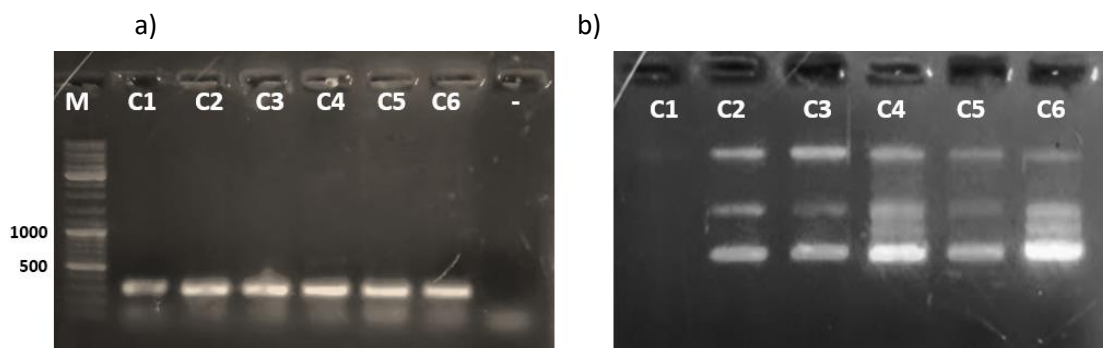
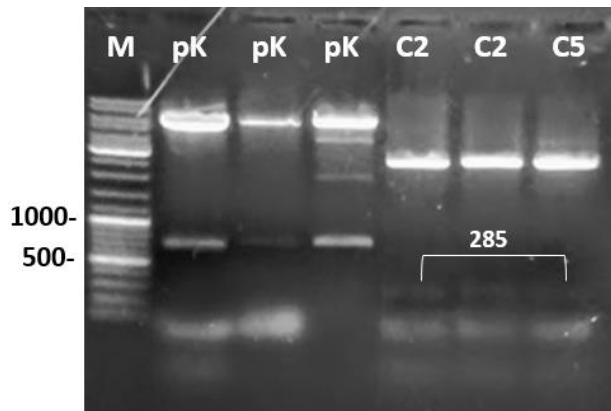


Figura Suplementaria 2. Comprobación de las candidatas portadoras del ORF 14. a) electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR de colonia de las candidatas pJETGE14. Amplicón esperado de 309 pb. b) Integridad del ADN plasmídico extraído de las candidatas.

Clonación del ORF 14 en el vector pKQV4

Se procedió a secuenciar a la candidata 2 y 5. Estas presentaron el nucleótido que traducía para un codón de paro, de este resultado se continuó con el ensayo de doble digestión, tanto del vector p_{KQV4}GFP y de las candidatas 2 y 5 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Como se aprecia en la Figura Suplementaria 3, de las candidatas se liberó el fragmento de 285 pb correspondiente al ORF 14 y del vector p_{KQV4}GFP se liberó el gen de GFP de aproximadamente 700 pb, se cortaron y se purificaron las bandas de interés, para posteriormente realizar una reacción de ligación en proporción 3:1. Seguida la transformación en bacterias DH5α quimiocompetentes.



*Figura Suplementaria 3. Doble digestión de los plásmidos p_{KQV4}GFP y p_{JET1.2blunt}GE14. Gel de electroforesis al 1% de la doble digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, fragmento esperado por las candidatas de 285 pb. C: P_{JET}GE14.*

Obtención y comprobación de candidatas de p_{KQV4}GE14

De la transformación solo se obtuvo 1 candidata y cero en los controles del vector ligado y sin ligar. Se procedió a resembrar y extraer el plásmido para después comprobar que tuviera insertado el ORF 14 mediante una reacción de PCR. Afortunadamente la candidata presentaba el ORF 14, como se puede apreciar la banda correspondiente a los 309 pb (Figura Suplementaria 4).

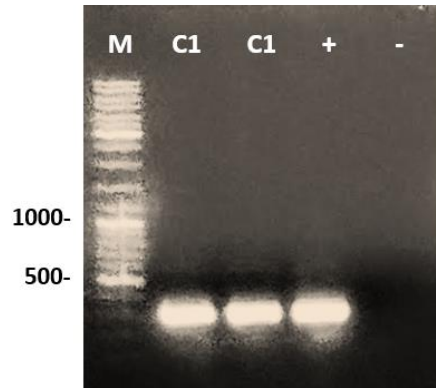


Figura Suplementaria 4. Amplificación del ORF 14. A partir del ADN plasmídico ($p_{KQV4}GE14$) de la única candidata obtenida se realizó la amplificación del ORF 14 y se corrió en un gel de agarosa al 1%, amplicón esperado de 309 pb.

Secuenciación de la candidata: GE14

Para verificar que la candidata no presentará ninguna mutación, se procedió a secuenciarla utilizando el oligonucleótido *Forward* del ORF 14. La secuencia no presentó ninguna mutación (Figura Suplementaria 5) aunque no hubo lectura clara del codón de inicio, por tal motivo se secuenció con el oligonucleótido *Reverse* (Anexo 19) y de esta forma se comprobó la presencia del codón de inicio.

```

GE14          ATGTATTACGTTTCGCAAGGCTTTTGATATTCGCCTGAATAACAATGATCATGTGCAAAAA 60
GE14pk       -----GTTTCGCAAGGCTTTTGATATTCGCCTGAATAACAATGATCATGTGCAAAAA 51
              *****

GE14          CTTATCTTAATTGCACTGGCAACAAAGGCCGGATGCAACGGCAAAGCGAAGTAACTCCG 120
GE14pk       CTTATCTTAATTGCACTGGCAACAAAGGCCGGATGCAACGGCAAAGCGAAGTAACTCCG 111
              *****

GE14          GAAGAGATCGCGGAAATGTGCGAAATTCGTTACGTGACACTATCTCTGCACTGCATCAA 180
GE14pk       GAAGAGATCGCGGAAATGTGCGAAATTCGTTACGTGACACTATCTCTGCACTGCATCAA 171
              *****

GE14          CTGAAAAGAAGCGGCCTGATTAGCCAGCTTCCAGGCTTCTTCTGTGTTTATCAGTTAATG 240
GE14pk       CTGAAAAGAAGCGGCCTGATTAGCCAGCTTCCAGGCTTCTTCTGTGTTTATCAGTTAATG 231
              *****

GE14          TTTTAG----- 246
GE14pk       TTTTAGCATCACCATCACCATCACTAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTT 291
              *****

```

Figura Suplementaria 5. Alineamiento del ORF 14 silvestre vs GE14 en p_{KQV4} . Como se muestra, la secuencia no presentó ninguna mutación.

Anexo 4. Expresión de la proteína GE14

Con el fin de visualizar la producción de la proteína GE14 proveniente de p_{KQV4}GE14, se realizó el gel de proteínas, tomando alícuotas cada hora durante 4 horas, partiendo de una OD_{600nm} de 0.2, se indujo con IPTG [0.1mM], en cada hora se ajustaron los cultivos a una OD_{600nm} de 0.4. En la Figura suplementaria 6 se muestran en los primeros dos carriles, los controles utilizados, los cuales fueron la bacteria W3110 con p_{KQV4} con y sin inducción de IPTG a la hora 4. El peso de la proteína es de 9.2 kDa y la banda correspondiente al peso, se logró apreciar mejor cuando se indujo con IPTG.

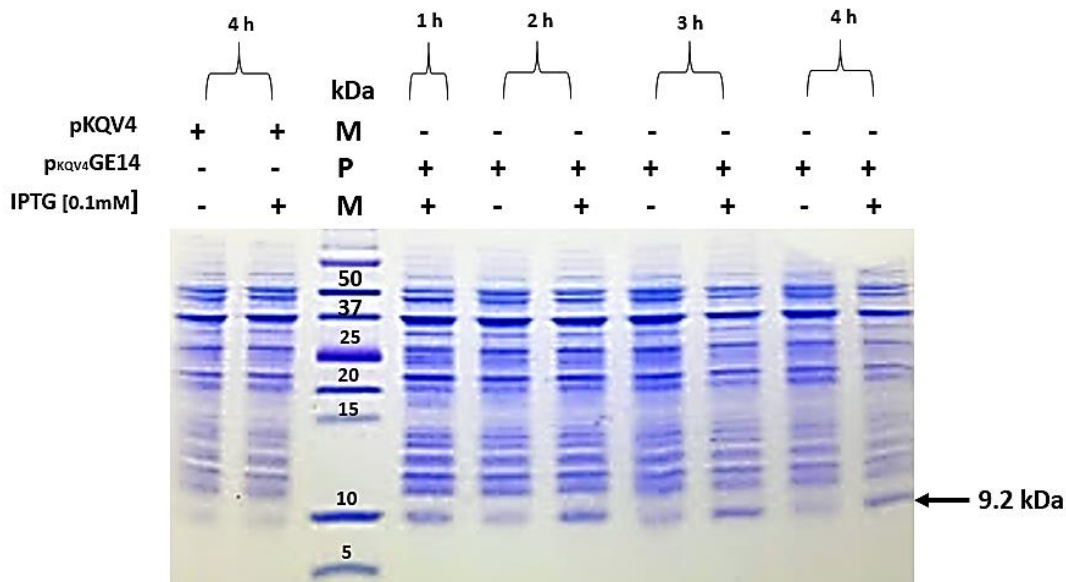


Figura Suplementaria 6. Expresión de GE14. Gel de proteínas de la bacteria W3110 con el vector vacío y con p_{KQV4}GE14. Se visualiza la banda de 9.2 kDa correspondiente a GE14, la inducción fue realizada con [0.1 mM de IPTG].

Anexo 5. Evaluación del fenotipo de placa producido por la proteína GE14 en un tapiz bacteriano

Con el fin de identificar si la expresión del ORF 14 podía producir el cambio de fenotipo de placa turbio a claro y ver si era un elemento importante en el ciclo lítico, realizamos tapices de la bacteria W3110 portadora del plásmido p_{KQV4}GE14 y goteamos diluciones seriadas del lisado de fago mEp021 de fenotipo de placa turbia y a manera de comparación también se gotearon diluciones seriadas del lisado de

mEp021 que produce fenotipo de placa clara. En la Figura Suplementaria 7 se aprecia que no hubo un cambio de fenotipo de placa turbia a clara, ni con fuga transcripcional ni con inducción con IPTG [0.1 y 0.5 mM]. Esto nos sugería que el ORF 14 podría no tener funcionalidad contraria al represor.

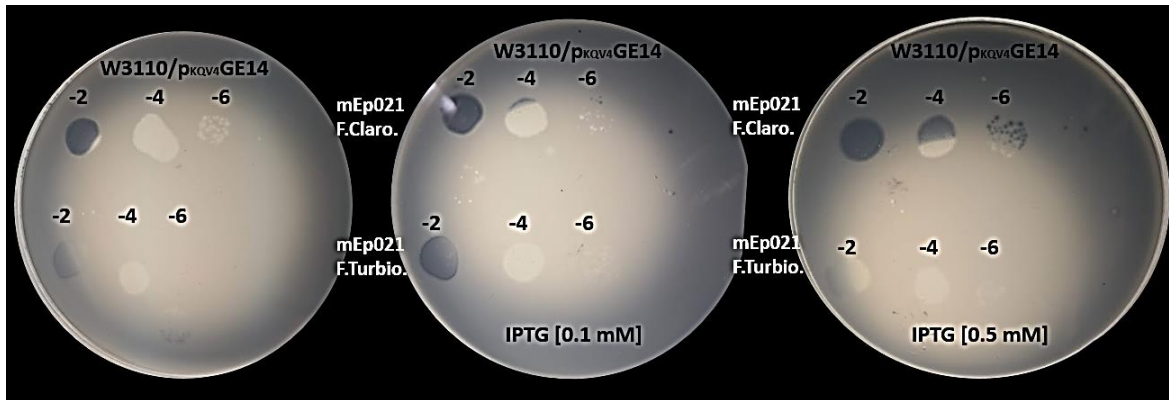
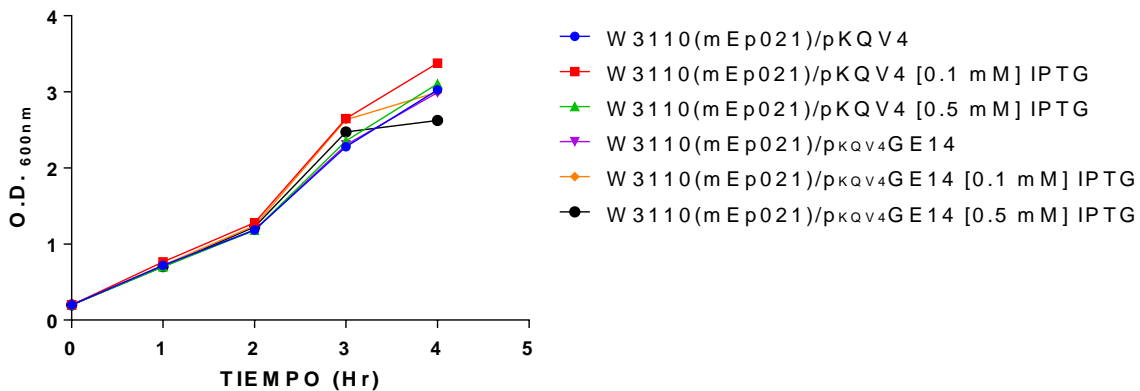


Figura Suplementaria 7. Evaluación del fenotipo de placa producido por el ORF 14 en un tapiz bacteriano W3110. El plásmido pKQV4GE14 fue inducido con IPTG [0.1 y 0.5 mM] y diluciones seriadas del lisado de mEp021 que produce fenotipo de placa turbio fueron goteadas, a manera de comparación también se goteó diluciones seriadas del lisado de mEp021 que produce fenotipo de placa clara.

Anexo 6. Ensayo de liberación de fagos en una bacteria W3110(mEp021) transformada con el plásmido pKQV4GE14

Para conocer si la expresión del ORF14 influía a la liberación de fagos en una lisogéna, realizamos el ensayo, partiendo de cultivos O/N de W3110(mEp021)/pKQV4 y W3110(mEp021)/pKQV4GE14, los cuáles fueron empastillados y lavados con PBS, para posteriormente ajustar a una O.D_{600nm} de 0.2, en este punto se indujeron con IPTG a [0.1. y 0.5 mM] y se siguió el crecimiento durante 4 horas. Como se aprecia en la Gráfica Suplementaria 3, la expresión de pKQV4GE14 parece no afectar el crecimiento de la bacteria lisogéna, ya que es muy similar al crecimiento del control.



Gráfica Suplementaria 3. Curva de crecimiento de W3110(mEp021)/pKQV4GE14. El crecimiento fue seguido durante 4 horas, las bacterias fueron inducidas con IPTG [0.1 y 0.5 mM].

CEPA/TIEMPO (Hr)	0	1	2	3	4
W3110(mEp021)/pKQV4	0.2	0.7176	1.1837	2.277	3.026
W3110(mEp021)/pKQV4 [0.1 mM] IPTG	0.2	0.7647	1.2814	2.649	3.377
W3110(mEp021)/pKQV4 [0.5 mM] IPTG	0.2	0.6985	1.1803	2.356	3.105
W3110(mEp021)/pKQV4GE14	0.2	0.7063	1.1837	2.303	2.991
W3110(mEp021)/pKQV4GE14 [0.1 mM] IPTG	0.2	0.7222	1.2412	2.632	2.995
W3110(mEp021)/pKQV4GE14 [0.5 mM] IPTG	0.2	0.704	1.2261	2.474	2.624

En cada hora se midió la densidad y se ajustó a la menor densidad, las alícuotas se empastillaron y se tomaron muestras del sobrenadante para realizar diluciones de -2, -4, -6 y -8 para posteriormente gotearlas en un tapiz de W3110, con el fin de conocer la cantidad de fagos liberados de la lisógena en presencia de pKQV4GE14, como control se metió a la cepa W3110(mEp021)/pKQV4 Figura Suplementaria 8.

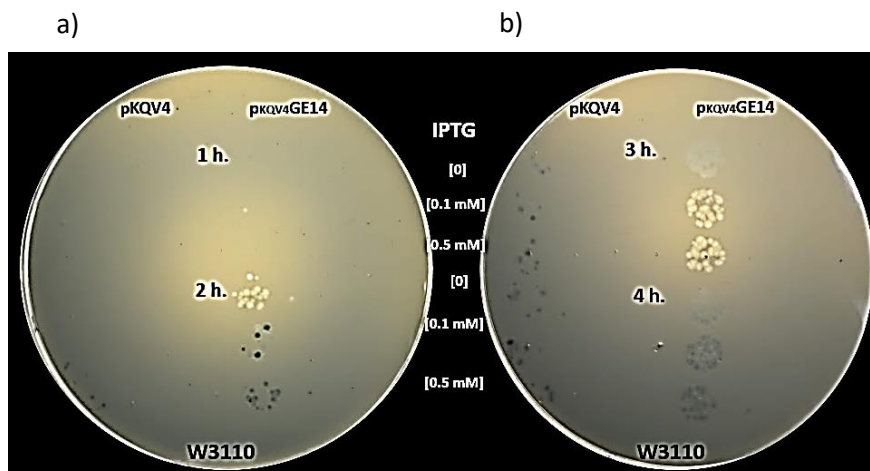
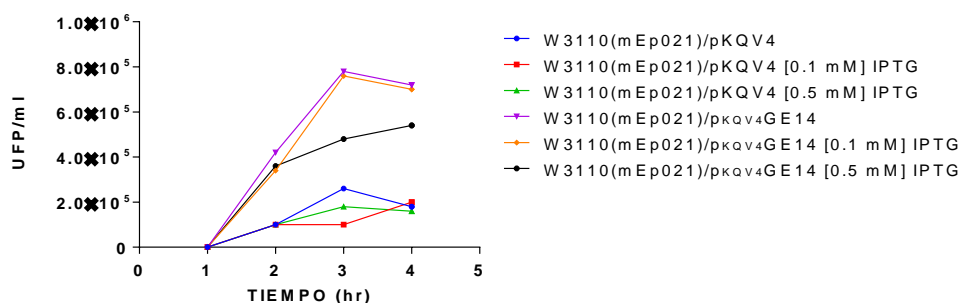


Figura Suplementaria 8. Conteo en tpiz de W3110 de los fagos liberados por W3110(mEp021)/pKQV4 y W3110(mEp021)/pKQV4GE14. En a) se muestra del lado derecho los fagos liberados por W3110(mEp021)/pKQV4 y del lado izquierdo los fagos liberados por W3110(mEp021)/pKQV4GE14 a la primera y segunda hora, en b) similar a a) se muestran los fagos liberados a las 3 y 4 horas. Las bacterias fueron evaluadas en presencia y ausencia de IPTG, a concentraciones de 0.1 y 0.5 mM.

En la Gráfica Suplementaria 4 se muestran las UFP/ml provenientes tanto de W3110(mEp021)/pKQV4 como de W3110(mEp021)/pKQV4GE14 versus tiempo, como se observa, hay un incremento de fagos liberados en presencia de pKQV4GE14, aunque pareciera que la inducción con 0.1 mM de IPTG y la fuga transcripcional liberan un número parecido de fagos, con la concentración de 0.5 mM se esperaría que incrementara la liberación, sin embargo las UFP/ml son menores que las dos condiciones anteriores, pero a su vez mayores que los controles. Estos resultados sugieren que el ORF 14 de alguna manera está promoviendo la liberación de fagos, pero no cómo se esperaría para un antirepresor.

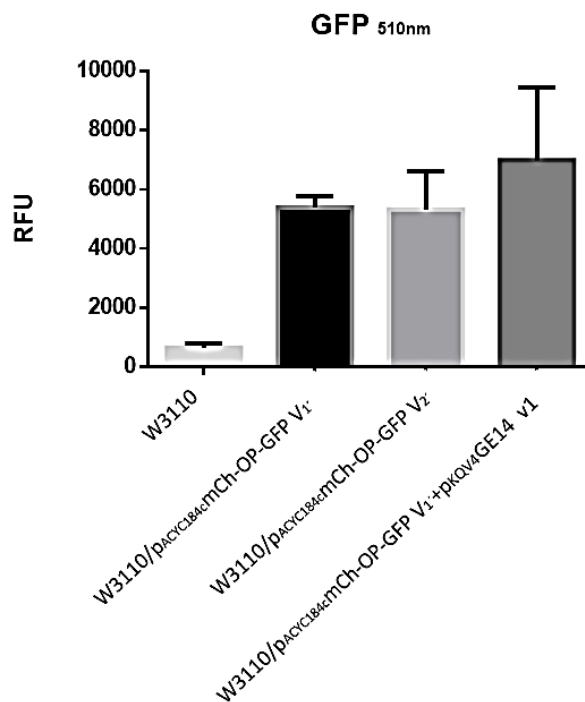


Gráfica Suplementaria 4. Liberación de fagos provenientes de las bacterias W3110(mEp021)/pKQV4 y W3110(mEp021)/pKQV4GE14. Las UFP/ml fueron calculadas a partir de los ensayos en tpiz, se tomó una alícuota cada hora durante 4 horas.

CEPA/TIEMPO	UFP/ml	UFP/ml2	UFP/ml3	UFP/ml4
W3110(mEp021)/pKQV4	0	1.00E+05	2.60E+05	1.80E+05
W3110(mEp021)/pKQV4 [0.1 mM] IPTG	0	1.00E+05	1.00E+05	2.00E+05
W3110(mEp021)/pKQV4 [0.5 mM] IPTG	0	1.00E+05	1.80E+05	1.60E+05
W3110(mEp021)/pKQV4GE14	0	4.20E+05	7.80E+05	7.20E+05
W3110(mEp021)/pKQV4GE14 [0.1 mM] IPTG	0	3.40E+05	7.60E+05	7.00E+05
W3110(mEp021)/pKQV4GE14 [0.5 mM] IPTG	0	3.60E+05	4.80E+05	5.40E+05

Anexo 7. Ensayo de fluorescencia: p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP + p_{KQV4}GE14

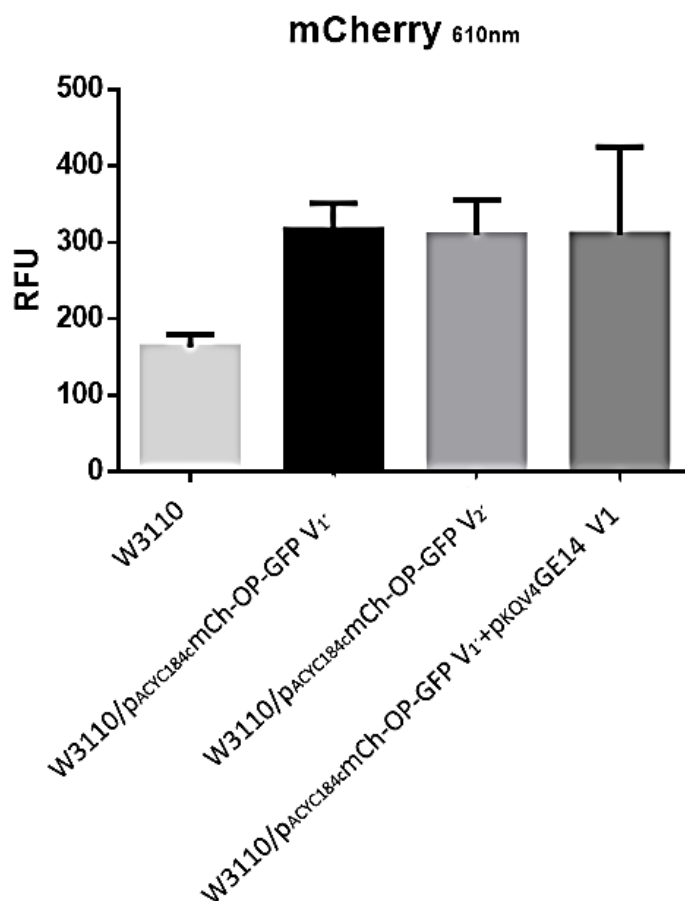
Con el fin de conocer el efecto del ORF 14 sobre la región operadora-promotora, se realizó la evaluación de la fluorescencia en la cepa W3110 en presencia de p_{KQV4}GE14. En la Gráfica Suplementaria 5, se muestra la fluorescencia emitida por el plásmido p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP y p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP+ p_{KQV4}GE14 leída en 510 nm, como se pudo apreciar, no hubo diferencia estadística significativa, lo que nos sugería que el producto del ORF 14 no estaba uniéndose a la región operadora-promotora del lado del gen del represor (ORF 15).



Gráfica Suplementaria 5. Evaluación de la fluorescencia emitida por GFP en presencia de p_{KQV4}GE14 en la cepa W3110. Nota: V1 y V2; candidatas que presentaron un fenotipo muy brillante al ser expuestas a luz UV.

CEPA/GFP	510 nm RFU 1	510 nm RFU 2	510 nm RFU 3
W3110	664	803.6667	525.3333
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V1	5123.333	5209	5823
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V2	6766	4275.333	4917
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+ p _{KQV4} GE14 V1	8647	4164.667	8159.333

El ensayo también se realizó midiendo la fluorescencia emitida por mCherry y como se muestra en la Gráfica Suplementaria 6, tampoco hubo diferencia significativa en presencia de la proteína 14, lo que nos sugería que el producto del ORF 14 no se estaba uniendo a la región operadora-promotora del lado de su propio gen.

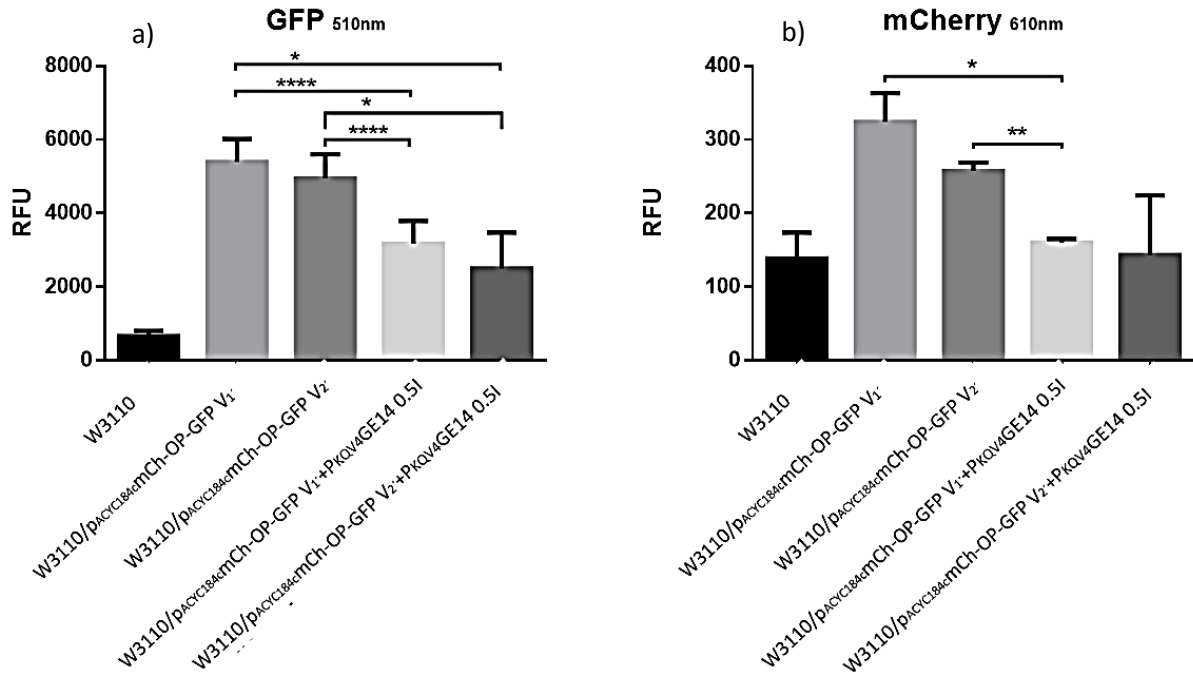


Gráfica Suplementaria 6. Evaluación de la fluorescencia emitida por mCherry en presencia de P_{KQV4}GE14 en bacterias W3110. Nota: V1 y V2; candidatas que presentaron un fenotipo muy brillante al ser expuestas a luz UV.

CEPA/mCherry	610 nm RFU 1	610 nm RFU 2	610 nm RFU 3
W3110	174	145	171.3333
W3110/P _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V1	348.6667	279.6667	321
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V2	350.6667	260	318.6667
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+ p _{KQV4} GE14 V1	302.6667	200.6667	428.3333

Ensayo de fluorescencia con inducción: p_{ACYC184C}mCh-OP-GFP + p_{KQV4}GE14 con [0.5 mM de IPTG]

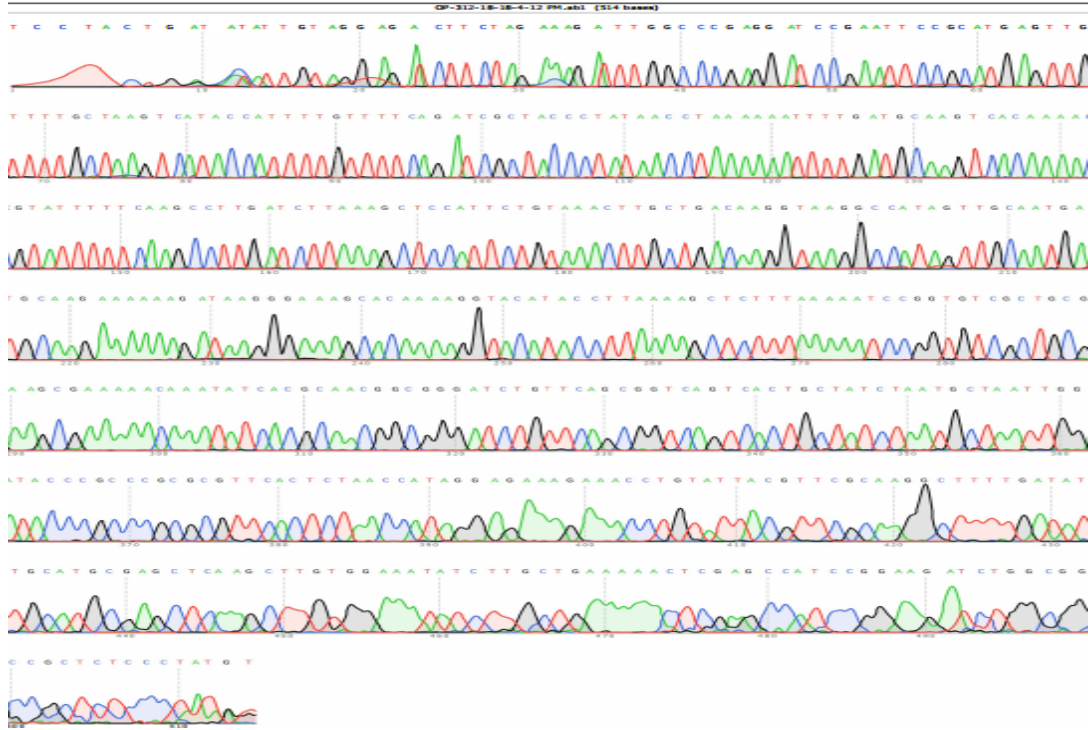
La evaluación de la fluorescencia en bacterias W3110, también fue realizada al inducir a p_{KQV4}GE14 con [0.5 mM de IPTG], como se muestra en la Gráfica Suplementaria 7 a), los niveles de fluorescencia de GFP disminuyeron significativamente a las 4 horas de crecimiento, sugiriéndonos una función de represor de GE14. Por otro lado (Gráfica suplementaria 7 b), los niveles de fluorescencia de mCherry disminuyeron solo en 1 candidata, por lo cual se planea repetir el experimento para verificar la función de GE14 y asegurarnos de la reproducibilidad en todas las candidatas.



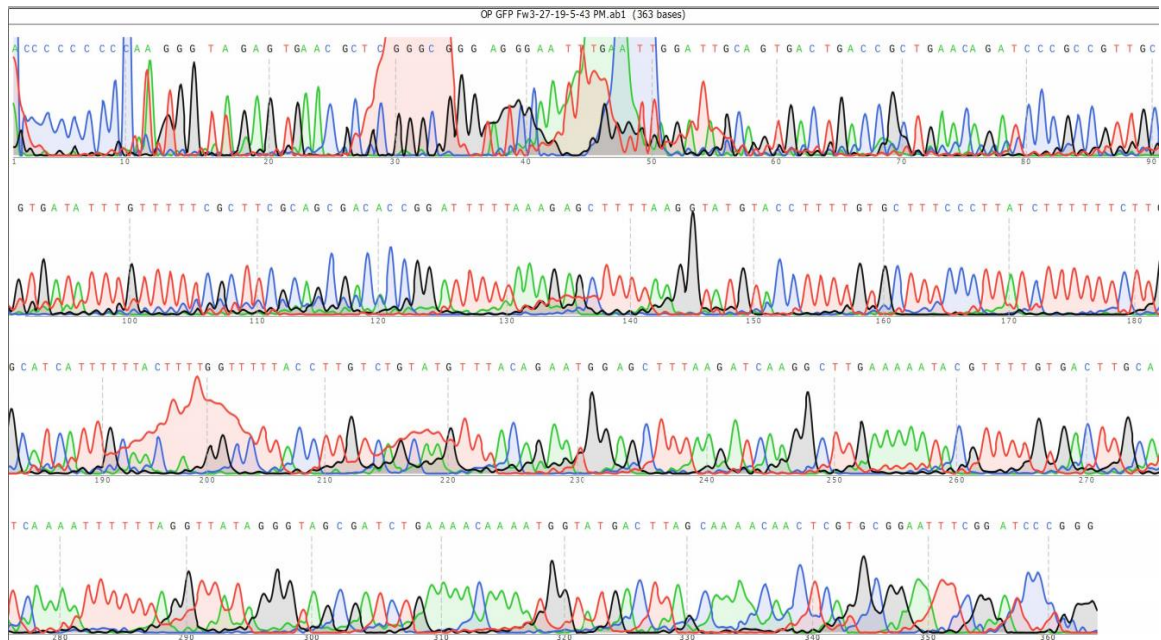
Gráfica Suplementaria 7. Evaluación de la fluorescencia en presencia de $p_{KQV4}GE14$ inducida con [0.5 mM de IPTG] en la cepa W3110. En a) la evaluación de la fluorescencia emitida por GFP y en b) evaluación de la fluorescencia emitida por mCherry. Nota: V1 y V2; candidatas que presentaron un fenotipo muy brillante al ser expuestas a luz UV.

CEPA/GFP	510 nm RFU 1	510 nm RFU 2	510 nm RFU 3
W3110	664	803.6667	525.3333
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V1	5394	6016.3333	4773.667
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V2	4941	5606	4276.667
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+			
p _{KQV4} GE14 V1 0.5 I	3168	3793.667	2544.667
w3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+			
p _{KQV4} GE14 V2 0.5 I	2501	3480	1523
CEPA/mCherry	610 nm RFU 1	610 nm RFU 2	610 nm RFU 3
W3110	174	103.6667	138.5
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V1	363.3333	285.3333	324
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP V2	268.6667	247.3333	257
W3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+			
p _{KQV4} GE14 V1 0.5 I	165	155	160
w3110/p _{ACYC184C} mCH-OP-GFP+			
p _{KQV4} GE14 V2 0.5 I	224.3333	62.66667	143

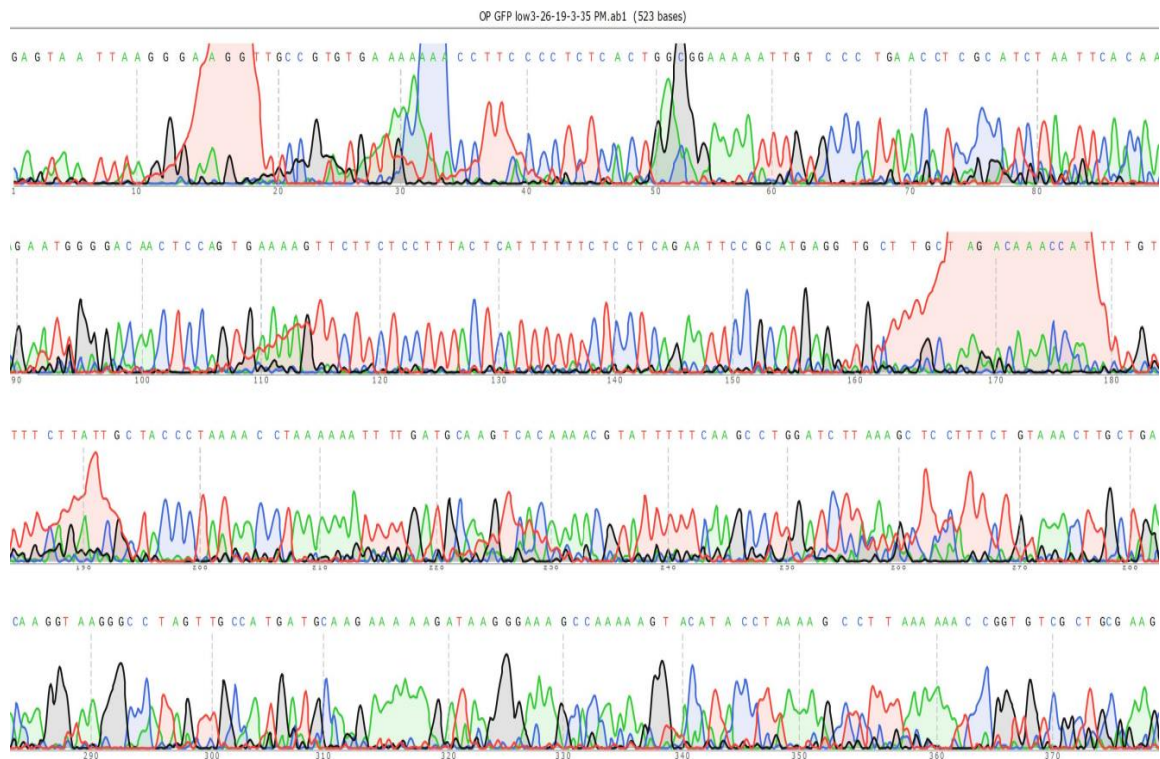
Anexo 8. Electroferograma de pJET1.2bluntOP3



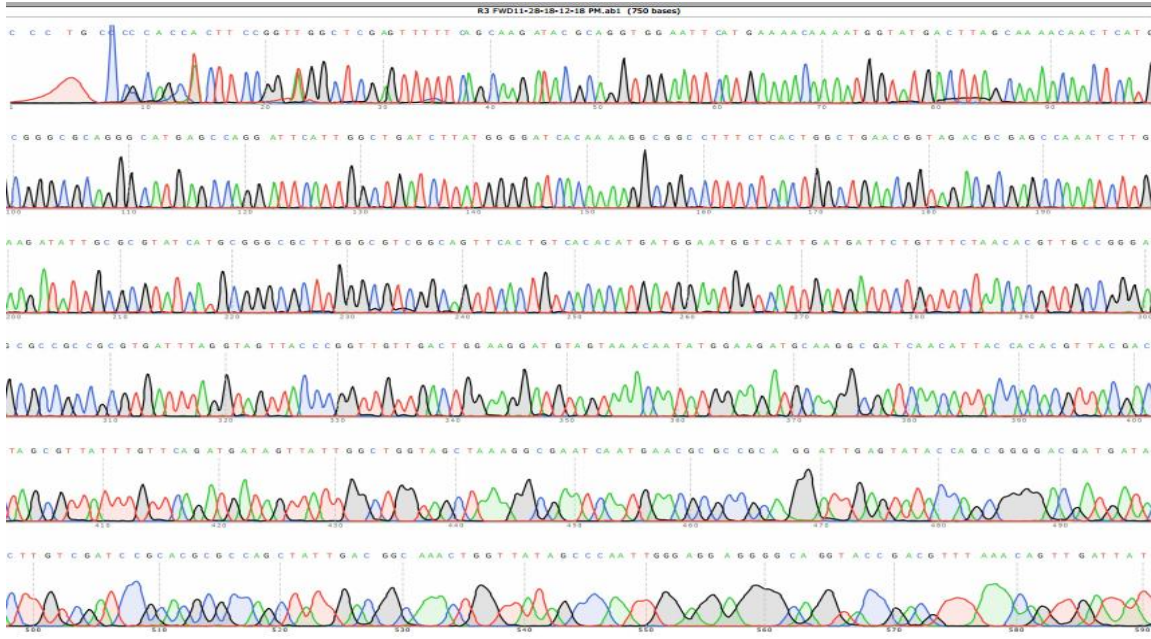
Anexo 9. Electroferograma de pKQV4OP-GFP (Fw)



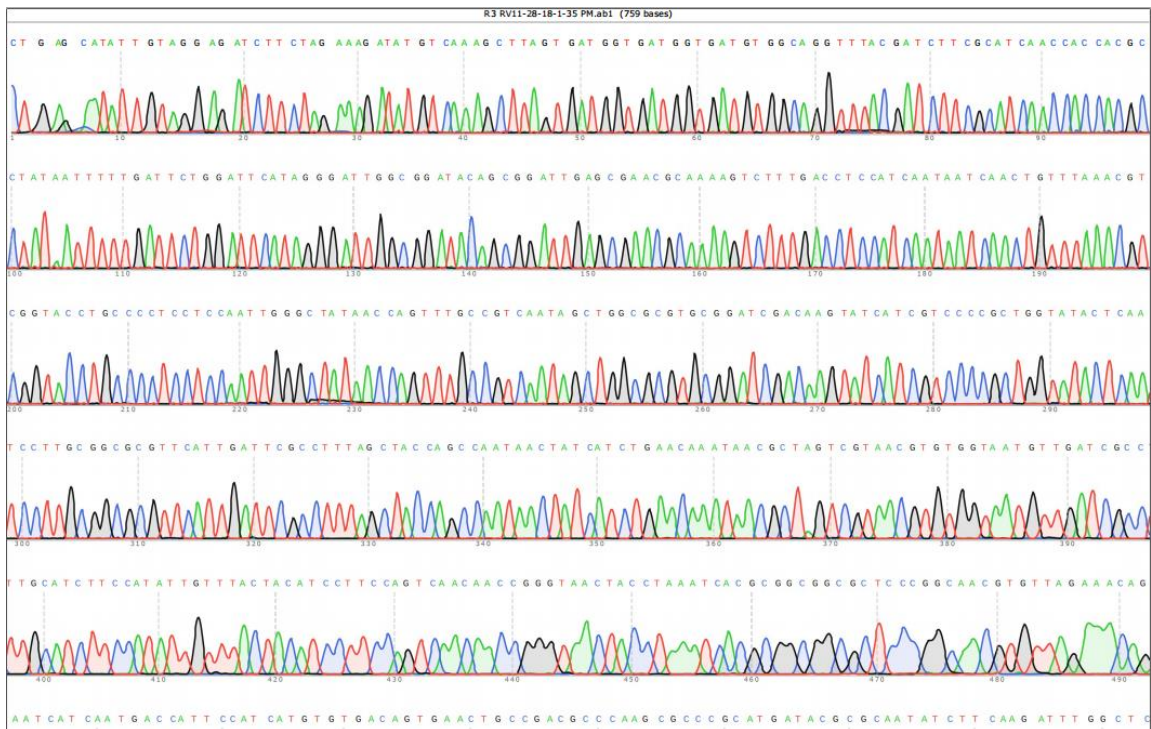
Anexo 10. Electroferograma de p κ QV4OP-GFP (Rv)



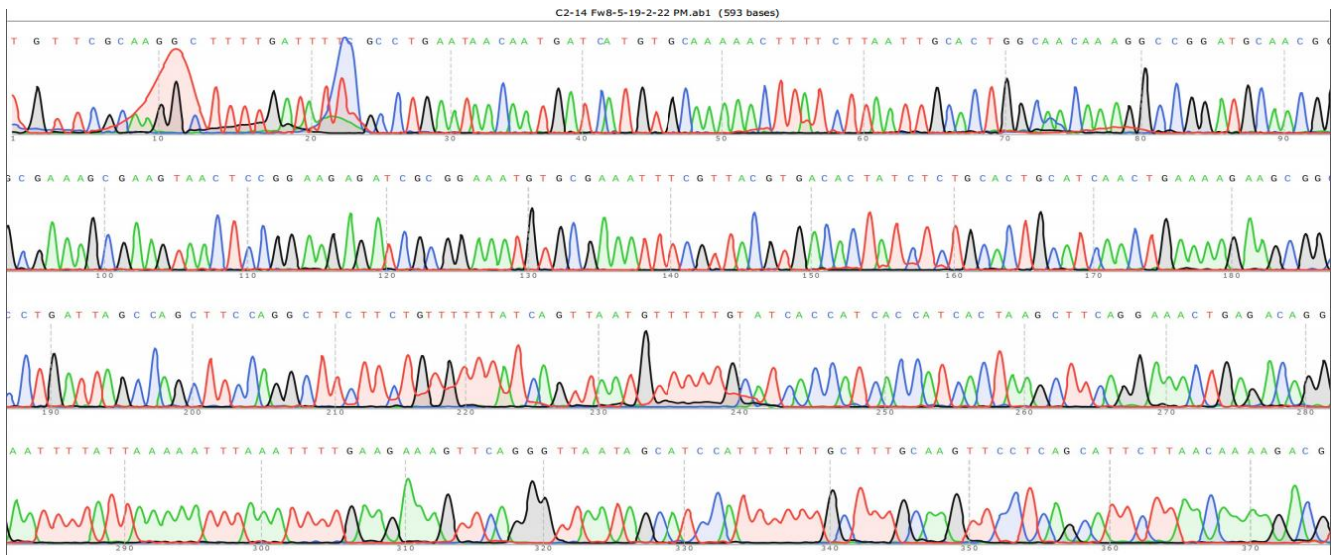
Anexo 13. Electroferograma de p_{KQV4}RepE (Fw)



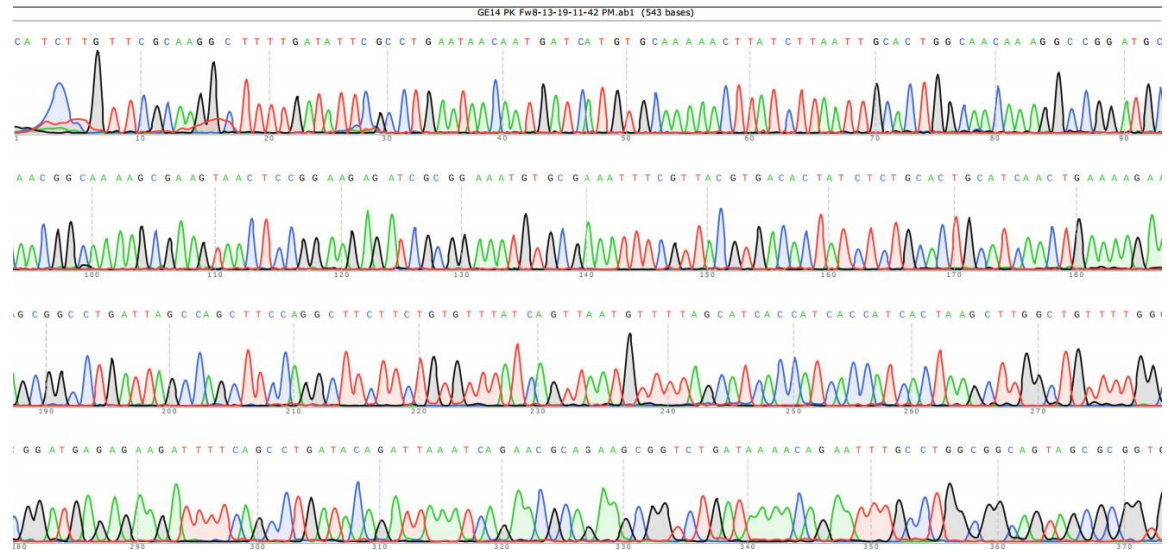
Anexo 14. Electroferograma de p_{KQV4}RepE (Rv)



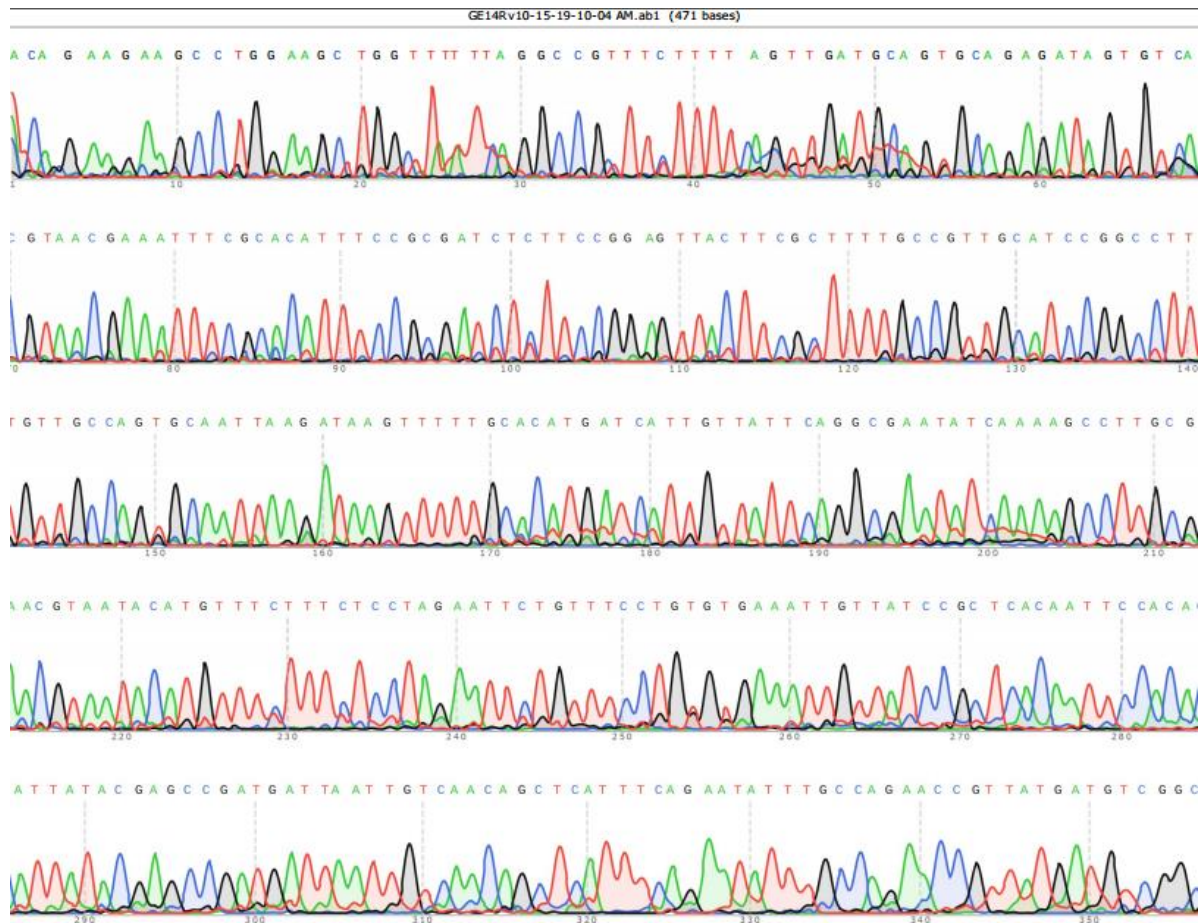
Anexo 17. Electroferograma de la candidata 2 (mutada) de p_{KQV4}GE14 fusionada al Tag de Histidinas



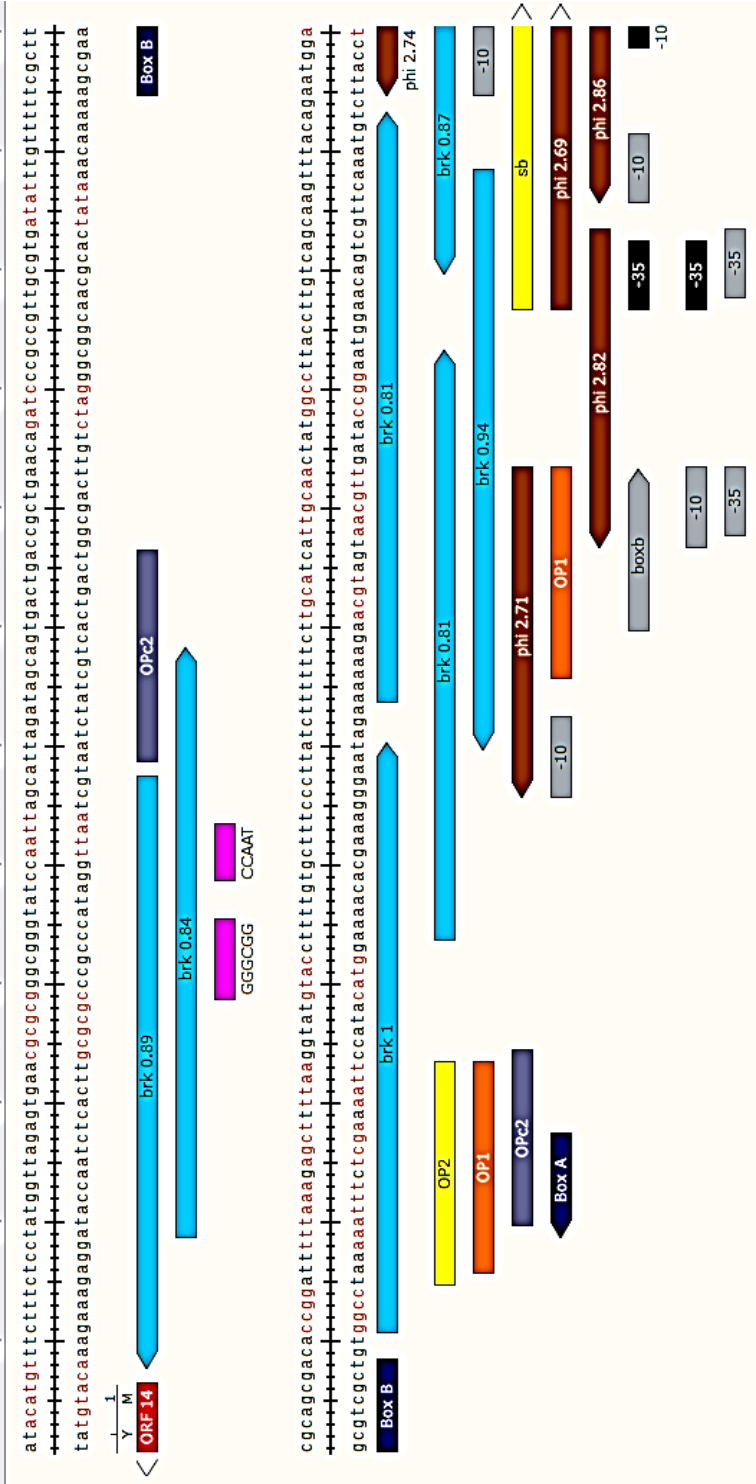
Anexo 18. Electroferograma de p_{KQV4}GE14 (Fw)



Anexo 19. Electroferograma de ρ_{KQV4}GE14 (Rv)



Anexo 20. Localización de secuencias palindromicas, repetidos directos, cajas CAAT, GC, box A, box B, probables promotores y sus cajas -10 y -35 en la región intergénica del ORF 14 y el ORF 15



Anexo 21. Evaluación de la fluorescencia de p_{ACYC184c}OP-GFP en presencia de p_{KQV4}RepE

CEPA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3
W3110/pACYC184c	1742.67	1843.66	1633.33
W3110(mEp021)/pACYC184c	1564.667	1620.67	1877.33
C2-W3110/pACYC184cOP-GFP	34804.33	27032.33	22258.66
C10 W3110/pACYC184cOP-GFP	32432.33	23617.66	23501
C2-W3110/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE	9803	9173.66	9078.66
C10 W3110/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE	10656.66	9347.66	7648.33
C2-W3110/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE I	14201	18613	24521
C10 W3110/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE I	6379	23077.66	26107
C2-W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP	37333.66	27421	25064.66
C10 W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP	34918	37047	27531
C2-W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE	15811.67	14317.66	11959
C10 W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE	16958	14515.33	10922
C2-W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE I	24131.33	20948	20147
C10 W3110(mEp021)/pACYC184cOP-GFP+pKQV4RepE I	25351.33	21654	27356.66

Anexo 22. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína GFP en la construcción p_{ACYC184c}mCh-OP-GFP

CEPA/TIEMPO	15.1	15.2	15.3
W3110	532.6667	675.6667	543.3333
W3110(mEp021)	432.6667	604	666.6667
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	22781	11663.33	11848.67
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	9161	2965	4683.333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	759.3333	1352.333	1951.667
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	2182.667	2813.333	1313.333

CEPA/TIEMPO	30.1	30.2	30.3
W3110	512.3333	553.6667	587.3333
W3110(mEp021)	499.3333	504.3333	545.3333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	24743.67	7443	9042
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	3389.333	3106	6067.333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	1138	3015	2128.333
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	1863.333	1968	1602.667

CEPA/TIEMPO	60.1	60.2	60.3
W3110	339.3333	441.6667	645
W3110(mEp021)	400.6667	415.3333	534.6667
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	11138.67	9651.667	12607.33
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	5251.333	4287.333	7260.333

W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	2379.667	1972.333	1422.333
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	1544.667	3656	1854.667

CEPA/TIEMPO	120.1	120.2	120.3
W3110	420.3333	475.6667	419.6667
W3110(mEp021)	476.3333	464	576
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	13200.33	12605	9195
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	5404.333	3882.333	5376.667
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	1893.667	1907.667	1752.667
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	1991.333	2715	2342.333

Anexo 23. Evaluación de la fluorescencia emitida por la proteína mCherry en la construcción pACYC184cmCh-OP-GFP.

CEPA/TIEMPO(min)	15.1	15.2	15.3
W3110	146.6667	180	166
W3110(mEp021)	120.3333	138	168.3333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	798	487.6667	421.6667
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	1554.333	459	617.3333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	167	335.6667	303.3333
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	316.3333	370.3333	117.3333

CEPA/TIEMPO(min)	30.1	30.2	30.3
W3110	152.6667	145.3333	194
W3110(mEp021)	148	150.6667	174
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	800.3333	280.6667	284.3333
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	473.6667	392	661.3333
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	193.6667	434.6667	290
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	183.3333	214	110.6667

CEPA/TIEMPO(min)	60.1	60.2	60.3
W3110	73	84.66666	179
W3110(mEp021)	101.6667	89.33334	168
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	303.3333	305	367.6667
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	548.3333	366.6667	706
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	416.3333	227	164
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	180	254	150

CEPA/TIEMPO(min)	120.1	120.2	120.3
W3110	115.3333	129.3333	94
W3110(mEp021)	108	98	122.6667
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP	381	403.3333	289

W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP	393.3333	314.6667	396
W3110/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	147.3333	181	184
W3110(mEp021)/pACYC184cmCh-OP-GFP+pKQV4RepE	218	205	178
