



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia. coli* EN LA
EXCLUSIÓN DE FAGOS FhuA DEPENDIENTES POR LA PROTEÍNA Cor DEL PROFAGO
mEp167**

Tesis que presenta

M. en C. Emma Socorro Arguijo Hernández

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Codirectores de la Tesis

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Dr. Javier Hernández Sánchez

Ciudad de México

Septiembre de 2018

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular, laboratorio No. 25 de él Dr. Gabriel Guarneros Peña con la cotutoría de los Doctores Luis Yoshio Kameyama Kawabe y Javier Hernández Sánchez.

Durante la realización de esta tesis fui beneficiada con la beca No. 210176 asignada a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Expreso mi más sincero agradecimiento a:

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Dr. Javier Hernández Sánchez

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

Dr. Jaime Ortega López

Dr. Samuel Zinker Ruzal

Dr. Serafín Vivanco Domínguez

M. en C. Marco Antonio Magos Castro

M. en C. María Guadalupe Aguilar González

M. en C. Carlos Vázquez Calzada

Téc. en Inv. José Arturo Rojas Rodríguez

Asistente secretarial Gabriela Mora Macías

Por todas las enseñanzas y apoyo durante la realización de este proyecto.

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS.....	1
LISTADO DE FIGURAS.....	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Generalidades de bacteriófagos.....	7
1.2 Proceso de infección bacteriófago vs bacteria.....	8
1.2.1 Adsorción del bacteriófago a la bacteria	8
1.2.2 Inyección del genoma fágico	10
1.3 Sie (Exclusión a la Superinfección).....	11
1.4 Infección abortiva (Abi).....	12
1.5 Mecanismos bacterianos de resistencia a fagos.....	13
1.5.1 Resistencia a la adsorción.....	13
1.5.2 Bloqueo de la introducción del genoma viral	15
1.5.3 Restricción modificación (R-M).....	15
1.5.4 CRISPR	16
1.6 Envoltura bacteriana	17
1.6.1 Membrana externa (OM).....	18
1.6.2 Biogenesis de las OMPs.....	20

1.6.3 Lipoproteínas de membrana.....	21
2. ANTECEDENTES	25
2.1 Mexican <i>E. coli</i> phages (mEp).....	25
2.2 Fago mEp167	25
2.3 Diversos estudios han determinado la exclusión mediada por Cor.....	27
2.4 Cor _{mEp167} y proteínas ortólogas.....	28
2.5 Mutaciones puntuales en Cor generan fenotipo Cor ⁻	29
2.6 Prevalencia de Cor en colección de fagos mEp	30
2.7 Receptor de membrana FhuA	30
2.8 Actualidad de la relación Cor-FhuA	31
3. JUSTIFICACIÓN.....	33
4. HIPOTESIS	33
5. OBJETIVO	35
5.1 Objetivos particulares	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1 Bacterias, bacteriófagos y plásmidos	37
6.2 Medios y condiciones de crecimiento del cultivo	37
6.3 Aislamiento de ADN plasmídico	39
6.4 Inducción de Cor.....	39
6.5 Construcción del plásmido pPHCcor	39
6.6 Construcción de mutantes.....	40

6.7 Electroforesis de geles de agarosa.....	41
6.8 Reacción de secuenciación y purificación del producto.....	41
6.9 Transformación.....	42
6.10 Propagación de fagos y ensayo de exclusión por goteo.....	42
6.11 Obtención de membranas citoplasmática y externa.....	43
6.12 Purificación de la proteína Cor.....	44
6.13 Diálisis de proteína.....	44
6.14 Ensayo tipo Overlay.....	44
6.15 Ensayo de la Copurificación.....	45
6.16 SDS PAGE.....	46
6.17 Análisis de espectrometría de masas.....	47
7. RESULTADOS.....	49
7.1 Construcción del plásmido pPHCcor.....	49
7.1.2 Inducción de Cor.....	51
7.2 Mutagénesis de pPHCcor para generar las mutantes C17F, A18D, C17FA18D, A57E, N62D, S62R y Δ57-59.....	52
7.2.1 Western Blot de mutantes.....	55
7.3 Cor es una proteína de membrana.....	56
7.3.1. Cor esta enriquecido en la fracción de membrana externa.....	58
7.4 Purificación de Cor.....	58
7.5 Cor reconoce fuertemente a una OMP que migra entre los 25 y 37 kDa.....	59

7.6 Seis proteínas de membrana externa copurifican con Cor	60
7.7 Cor requiere de al menos 6 proteínas para ejercer su acción.	61
7.7.1 Expresión de Cor a partir de pPHCcor en cepas mutantes de la colección Keio	63
7.7.2 Exclusión-Infección de fagos FhuA dependientes en cepas de la colección Keio transformadas con pPHCcor	63
7.7.3 Plásmidos complementarios de la colección ASKA para cepas de la colección Keio	66
7.7.4 Complementación de cepas de la colección Keio lisógenas para mEp167	66
7.8 Ensayos complementarios	68
7.8.1 Localización celular de Cor por gradiente de sacarosa	68
7.8.2 Inmunoprecipitación de Cor	69
7.8.3 Estandarización de copurificación	70
8. DISCUSIÓN	73
9. CONCLUSIONES	79
10. PERSPECTIVAS	81
11. REFERENCIAS	83
APÉNDICE I: Listado de cepas y oligonucleótidos utilizados.	91
APENDICE II: Electroferogramas	93

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Ejemplo de receptores de bacteriófagos	9
Tabla 2 Ejemplo de OMPs de <i>Escherichia coli</i>	20
Tabla 3 Perfil de exclusión de fagos mEp y sus lisogenas.....	25
Tabla 4 Perfil de exclusión mediada por Cor de fagos mEp	26
Tabla 5 Analisis requerimiento de receptor y amplificación de <i>cor</i> en fagos mEp	32
Tabla 6 Formulación y procedimiento para preparación de medios de cultivo	38
Tabla 7 Condiciones de amplificación para <i>cor</i>	40
Tabla 8 Condiciones de PCR para mutagenesis	41
Tabla 9 Formulación y preparación de buffer TAE.....	41
Tabla 10 Condiciones de PCR para secuenciación.....	41
Tabla 11 Concentración de las soluciones madre para la elaboración de geles Ticina-SDS PAGE ^a	46
Tabla 12 Composición de geles, concentrador, espaciador y separador.....	46
Tabla 13 Formulación y procedimiento para preparación de soluciones para SDS-PAGE y tinción de membranas.....	47
Tabla 14. Fenotipo de Sie del plásmido pPHCcor	51
Tabla 15 Valores de absorbancia a OD600 _{nm} de Cor silvestre y mutantes.....	54
Tabla 16 Fenotipo de mutantes en Cor	55
Tabla 17 Infección de diferentes fagos en cepas knockout transformadas con pPROEX-1	63

Tabla 18 Fenotipo de cepas knockout transformadas con pPHCcor.....	65
Tabla 19 Fenotipo de cepas knockout complementadas y lisogenizadas con mEp167....	68
Tabla 20 Condiciones ensayadas para estandarización de copurificación.	71
Tabla 21 Cepas, bacteriófagos y plásmidos utilizados en este estudio.....	91
Tabla 22 Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	92
Tabla 23 Secuencia de cor_{mEp167}	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representación del cambio estructural de T7 durante la infección.....	11
Figura 2 Mecanismo de Sistema abortivo de la infección (Abi).....	13
Figura 3 Diferentes estrategias utilizadas por las bacterias para bloquear la adsorción de fagos.....	14
Figura 4 Representación del ciclo de infección de los fagos líticos y los sistemas bacterianos antifagos..	17
Figura 5 Estructura general de la membrana de <i>Escherichia coli</i>	18
Figura 6 Las proteínas de membrana externa (OMPs) se encuentran predominantemente como β –barriles.....	19
Figura 7 Esquema en donde se muestra los componentes involucrados en la biogénesis y la inserción secuencial de las OMPs nacientes en bacterias Gram-negativas.....	21
Figura 8 Maduración de lipoproteínas y ruta de exportación.	23
Figura 9 Efecto de Cor _{mEp167} en la captación de [⁵⁹ Fe] -ferricromo.	27
Figura 10 Alineamiento de la lipoproteína Cor de los fagos NS18, N15, mEp167, HK022, ϕ 80, T1 y las relacionadas de BF23, Rtp45 y T5.....	29
Figura 11 Mutaciones en la proteína Cor tienen efecto en el fenotipo.....	29
Figura 12 Análisis de la secuencia de <i>cor</i> en NEBcutterV2.0.....	49
Figura 13 Clonación del fragmento de ADN que contenía el gen <i>cor</i> con las Histidinas adicionales e inserción en el plásmido de expresión pPROEX-1.	50
Figura 14 Sobreexpresión de Cor en W3110/pPHCcor.....	52
Figura 15 Producto de la PCR de la reacción de mutagénesis.....	53
Figura 16 Gráfica de cinética de crecimiento de Cor y mutantes derivadas.	54

Figura 17	Expresión de proteína en la cepa W3110 con plásmidos mutantes de <i>cor</i>.....	56
Figura 18	Localización intracelular de Cor.....	57
Figura 19	Western blot revelado con anti polihistidinas.....	58
Figura 20	Purificación de Cor.....	59
Figura 21	Overlay con Cor detectado con anti polihistidinas..	60
Figura 22	Coopurificación de proteínas con Cor.....	61
Figura 23	Expresión de la proteína Cor en BW25113 y en las mutantes derivadas.....	63

RESUMEN

La exclusión a la superinfección (Sie) por bacteriófagos, es observada frecuentemente en bacterias lisógenas. Se le ha asociado a un gen moron (unidades de transcripción independientes diseminadas entre los genomas del fago mediante transferencia horizontal de genes), relacionado con la región de plasticidad genómica del profago. El producto del gen *cor* del profago mEp167 lleva a cabo la Sie de fagos FhuA dependientes. En este trabajo presentamos las evidencias de que Cor es una lipoproteína de membrana externa (OM). Las mutantes de Cor *corC17F* y *corA18D* pierden la capacidad de excluir fagos FhuA dependientes en la cepa silvestre de *Escherichia coli* W3110. Cor silvestre presentó dos bandas que corresponden a las pre-prolipoproteína/prolipoproteína y la lipoproteína. La mutante CorC17F presentó solo una banda relacionada con la pre-prolipoproteína, y CorA18D dos bandas similares a la Cor silvestre, sin embargo debido a que en esta última, la lipoproteína tiene al Asp en la posición +2, podría hacer que se quede en la membrana citoplasmática (IM). Cor reconoció a una proteína entre los 25 y 37 kDa, que podría corresponder a OmpA en el ensayo de Overlay, y en el ensayo de Co-purificación con Cor acoplado al análisis de LC_ESI_MS/MS, se detectaron los péptidos para OmpA, OmpC, OmpF, OmpW y LamB. Las células FhuA⁺ con mutaciones en cualquiera de las proteínas de membrana externa (*ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompF*⁻, *ompW*⁻, *fhuE*⁻ y *lamB*⁻) y que sobreexpresan Cor no fueron capaces de excluir a fagos FhuA dependientes. Sin embargo cuando se suplementaron con los plásmidos para sobreexpresar las proteínas de membrana correspondientes, se restableció la exclusión. Se puede decir que en el mecanismo de Sie mediado por Cor sobre fagos FhuA dependientes requiere proteínas adicionales y específicas que permitirán la exclusión.

ABSTRACT

Superinfection exclusion (Sie) of FhuA-dependent phages is carried out by Cor in the *Escherichia coli* mEp167 prophage lysogenic strain. In this work, we present evidence that Cor is an outer membrane (OM) lipoprotein that requires the participation of additional outer membrane proteins (OMPs) to exclude FhuA-dependent phages. Two Cor species of ~13 and ~8.5 kDa corresponding to the prelipoprotein/prolipoprotein and lipoprotein were observed by Western blot. Cor cell mutants CorC17F, CorA18D, CorC17FA18D, CorA57E, CorN62D, CorS67R and Cor Δ 57-59 lost the Sie phenotype for FhuA-dependent phages. A copurification affinity binding assay combined with LC_ESI_MS/MS showed that Cor bound to OMPs: OmpA, OmpC, OmpF, OmpW, LamB, and Slp. Interestingly, Sie for FhuA-dependent phages was reduced on Cor overexpressing FhuA⁺ mutant strains, where *ompA*, *ompC*, *ompF*, *ompW*, *lamB*, *fhuE*, genes were knocked out. The exclusion was restored when these strains were supplemented with plasmids expressing these genes. Sie was not lost in other Cor overexpressing FhuA⁺ null mutant strains JW3938(*btuB*-), JW5100(*tolB*-), JW3474(*slp*-). These results indicate that Cor interacts and requires some OMPs to exclude FhuA-dependent phages.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de bacteriófagos

Los bacteriófagos definidos como: “los que comen bacterias” son las entidades genéticas semi-autónomas más abundantes en el planeta; los fagos existen en la naturaleza como viriones o profagos, la cual es una forma en la que sus genomas son mantenidos como un plásmido de replicación autónoma o están integrados en el cromosoma bacteriano y se replica pasivamente. Diversos en tamaño, morfología y organización genómica, todos, contienen un genoma de ácido nucleico empaquetado por una cubierta de proteínas, la cápside, que protege el ácido nucleico del entorno extracelular [1], en los fagos caudovirales, la cola o cauda es una máquina compleja que desempeña un papel central en el reconocimiento y fijación a la célula huésped, la penetración a la membrana celular y la eyección del genoma viral [2]; por ejemplo el cromosoma del bacteriófago λ forma una molécula de ADN (Ácido desoxirribonucleico) de doble cadena, de 48,502 pb, la cápside tiene una estructura icosaédrica, con un diámetro aproximado de 0.05 μ , y unido a ésta, la proyección tubular de 0.15 μ m de longitud [3].

Se estima que la relación bacteria fago en la naturaleza es de 1:10; descritos hace aproximadamente un siglo por Frederick Twort y Félix d'Herelle, han sido elementos fundamentales como modelos, para comprender los principios de la biología molecular; son ubicuos y algunos autores consideran la teoría “*everything is everywhere*”, esto es que todos los tipos de fagos están en todas partes, sin embargo los estudios biogeográficos han determinado que las bacterias tienen localización y temporalidad específica, por ende los fagos también tendrán que tener patrones de localización acorde a su hospedero. En los ecosistemas, la mortalidad inducida por los fagos es el principal mecanismo para el mantenimiento sustentable de los microbiomas e indirectamente contribuyen al reciclado de nutrientes orgánicos e inorgánicos. Los bacteriófagos son específicos con respecto a sus hospederos, y por lo general, solo infectan una especie bacteriana o incluso solo cepas específicas de una especie. Fagos y bacterias están inmersos en un ciclo continuo de coevolución o selección natural, representado por la resistencia del hospedero y mediada por estructuras superficiales y mecanismos intracelulares que actúan como sistemas antivirales a la infección, versus la diversificación de los fagos para sortear los mecanismos de resistencia. A este fenómeno de cambios entre la resistencia de la bacteria y la infectividad de los fagos se ha denominado coevolución antagonista [4], en donde la variabilidad genética de la bacteria aumenta en

proporción a la presión ejercida por su depredador. Los huéspedes insensibles a los fagos emergentes contribuyen a preservar los linajes bacterianos. Como parásitos, los fagos realizan su ciclo biológico en una bacteria hospedera; para el éxito de la infección (definido por la producción de progenie viral), se requiere que además de ser infectada, la célula sea permisible, esto significa que cuente con los requerimientos necesarios para el ensamblado de viriones. La infección de fago puede alterar también la fisiología bacteriana, mediante la transferencia horizontal de genes adaptativos accesorios, tales como resistencia a antibióticos o producción de toxinas en cepas lisogénicas; ejemplos son la toxina del cólera en *Vibrio cholerae*, la toxina diftérica en *Corynebacterium diphtheriae*, la neurotoxina botulínica en *Clostridium botulinum*, la toxina binaria de *Clostridium difficile* y la toxina Shiga de especies de Shigella. Aunque los bacteriófagos no pueden infectar ni replicarse en células humanas, son parte importante del microbioma humano y un mediador crítico del intercambio genético entre bacterias patógenas y no patógenas mediante mecanismos de transducción [1, 5, 6, 7].

1.2 Proceso de infección bacteriófago vs bacteria

1.2.1 Adsorción del bacteriófago a la bacteria

El proceso infectivo del bacteriófago inicia por el sondeo y rastreo del receptor en el hospedero, seguido de la adsorción que se realiza en dos etapas, la primera tiene carácter reversible y localiza a un receptor primario (por ser el primero en ser reconocido), por ejemplo, los lipolisacaridos (LPS) para los fagos T5, K20, Ox2, T2, λ , mEp021, mEp167 y mEp213 [8, 9, 10, 11, 12], en esta etapa, la disociación de los fagos de la superficie celular es posible, con la preservación de la viabilidad de la partícula viral, en la segunda etapa el fago reconoce a su receptor principal o secundario, proceso altamente específico e irreversible que conduce a la activación de mecanismos moleculares de infección (contracción de la cola en el caso de los myo- fagos caudovirales) en el virión, necesarios para formar un canal con función de eyección y suministro del genoma del fago a través de la envoltura celular que finalmente resulta en la infección celular. A nivel molecular la adsorción implica la interacción entre el receptor y las adhesinas presentes en la cola del fago, también llamadas proteínas de unión a receptores (RBPs), esta interacción tiene una correspondencia estérica exacta como la descrita en el reconocimiento antígeno anticuerpo; en algunos casos, la adsorción también puede involucrar proteínas de la cápside, por ejemplo, el fago phiCb13 de *Caulobacter crescentus*

tiene protuberancias filamentosas localizada en los vértices de su cápside icosaédrica, estos filamentos interactúan con la flagelina de las células móviles de *C. crescentus* y enrollan el filamento flagelar de tal manera que, debido a la rotación del flagelo, la partícula del fago desciende a la superficie de la célula como una tuerca que se mueve alrededor del hilo en un tornillo. La transición a la adsorción irreversible generalmente requiere la unión adicional de una proteína del fago al receptor secundario, ya sea utilizando el mismo RBP u otro diferente al empleado para la unión reversible [13], por ejemplo el fago T5 tiene dos componentes en la cola para adsorberse en la membrana: la RBP (pb5 codificado por el gen *oad*) y las fibras de la cola en forma de L, que se unen a FhuA (receptor para ferricromo) y al lipopolisacárido (LPS), respectivamente [14]. La naturaleza de los receptores utilizados por los fagos es diversa (ver Tabla 1) e incluye porinas como OmpA presentes en la OM de *E. coli* en cantidades de hasta 10^5 copias, también proteínas como NfrA (receptor del fago N4), con 5 copias por célula; el número de copias por célula contribuye a variaciones en la cinética de adsorción del bacteriófago, pero teóricamente solo una molécula receptora es suficiente para que una infección sea exitosa [13].

Tabla 1
Ejemplo de receptores de bacteriófagos

Fago	Grupo	Hospedero	Receptor primario	Receptor secundario	Observaciones
T1	T1-like	<i>E. coli</i>	?	FhuA (requiere TonB)	Se han obtenido mutantes en una bacteria que no necesita la energía transducida por TonB y un fago que no depende en la proteína FhuA.
T4	T4-like	<i>E. coli, Shigella</i>	OmpC	LPS	fosfolípidos de la IM puede ser un receptor terciario; el fago interactúa con mucina a través de la proteína Hoc
T5	T5-like	<i>E. coli</i>	Antígeno O de LPS	FhuA	
BF23	T5-like	<i>E. coli</i>	LPS	BtuB	
λ	Lambdaoide (λ-like)	<i>E. coli</i>	OmpC	LamB	
P22	Lambdaoide (P22-like)	<i>E. coli</i>	Antígeno O de LPS	LPS?	
Sf6	?	<i>Shigella flexneri</i>	LPS	OmpA, OmpC	Loops 2, 4 de OmpA.
N4	N4-like	<i>E. coli</i>	?	NfrA	La interacción es vía la proteína del tallo (gp65).
G7C	N4-like	<i>E. coli</i>	Antígeno O de LPS	?	La acetilación de los LPS es necesaria.
CP81 y fagos relacionados	?	<i>Campylobacter jejuni</i> NCTC12658	Exopolisacárido	?	
VP5	?	<i>Vibrio cholera</i> O1 El Tor	?	OmpW	

(?) Desconocido. Tomada y modificada de Letarov y Kulikov (2017) [13].

1.2.2 Inyección del genoma fágico

Posterior al reconocimiento del receptor principal sigue la eyección del genoma de la cápside del bacteriófago a la célula hospedera, para realizar este proceso, en los podofagos la cola del fago penetra a través de la membrana celular. La estructura de la cola es una compleja maquinaria dinámica, en el fago T7 está conformada de 12 unidades de la proteína gp8, seis trímeros de gp17, dos dodecámeros de gp11 y un hexámero de gp12, la cola atraviesa aproximadamente 450 angstrom (Å) de envoltura celular y en la parte interna de la cola, las proteínas gp14, gp15 y gp16 forman un poro por el cual el ADN liberado de la cápside pasa al citoplasma de la célula, este proceso no está totalmente descrito, y el comienzo de la eyección es un proceso fisicoquímico regulado por cambios estructurales en la cola (Figura 1). Un mecanismo similar se ha descrito en el fago ϕ 29 de *Bacillus subtilis*, en este caso la cola del fago penetra hasta la IM y permite la liberación del ADN al citoplasma bacteriano [2]. También se han descrito otras funciones de la cola por ejemplo en el fago P22 la gp9 se une a el antígeno O de los LPS y rompe el enlace α (1,3-) O-glicosídico entre la galactosa y la ramnosa [15]. Después de la entrada de aproximadamente 1/3 del genoma, el proceso se suspende, y empieza la transcripción de genes tempranos o precoces ubicados en el segmento del genoma penetrado, los productos de estos genes aseguran el "secuestro" de la maquinaria celular para el metabolismo del fago. Por ejemplo, el fago T7 tiene genes inhibidores de los sistemas de restricción-modificación de células hospedadoras y el fago T5 provoca la degradación del ADN celular incluso antes de la completa internalización del genoma del fago. La penetración completa del ADN requiere de la actividad de proteínas del fago expresadas desde el segmento "líder" de su genoma y depende de la energía metabólica celular, en el fago T7, el motor que empuja el ADN a la célula es la T7- ARN polimerasa [13]. Posterior al reconocimiento del receptor principal en la OM, para la inyección de su genoma, λ requiere sortear el obstáculo de la IM, y para esto utiliza el complejo PtsM [16]. Por otro lado, los fagos C1 y C6, cuyos receptores hospederos son BtuB y FhuA, y para llevar eficientemente sus infecciones requieren de las proteínas DcrA de IM y DcrB del espacio periplásmico, respectivamente [17]. El fago T1 que utiliza también a FhuA como receptor, además es TonB dependiente, por esto, aunque varios fagos utilicen un mismo receptor requieren de proteínas adicionales y diferentes para que el material genético atraviese la estructura membranal, recientemente, se ha reportado que la Tape measure protein (TMP) de

la cola del fago HK97, requiere de la chaperona del periplasma FkpA y de la proteína PtsG (Phosphotransferase system of Glucose) de IM para su eyección [18].

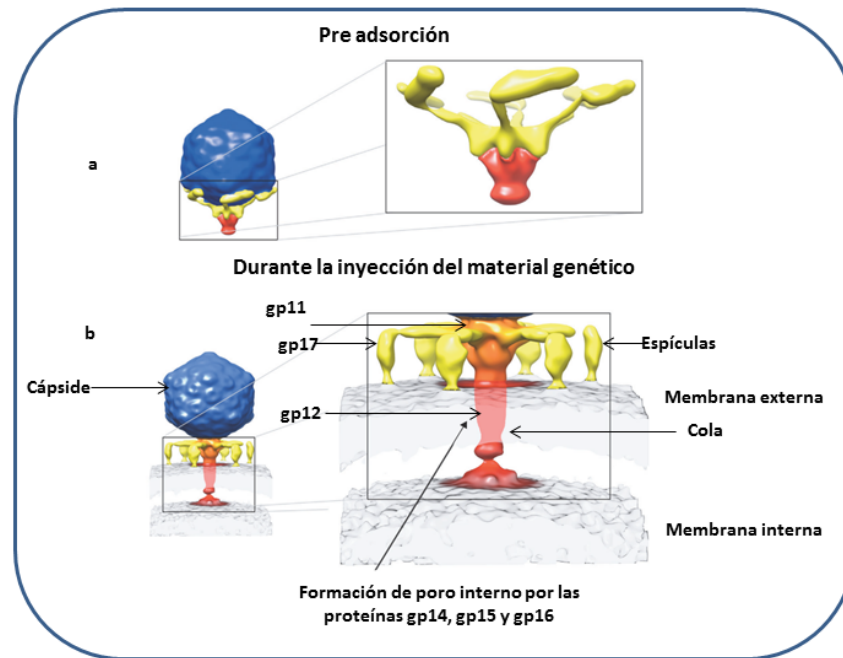


Figura 1 Representación del cambio estructural de T7 durante la infección. (a) Estructura en la pre adsorción y (b) durante la inyección del material genético. Durante la adsorción las fibras de la cola se reordenan y la cola a traviesa la OM. El ADN pasa a través de un poro que se forma en el núcleo de la cola. Tomada y modificada de Bhardwaj et al., 2014 [15].

1.3 Sie (Exclusión a la Superinfección)

Aún las bacterias lisógenas, están en riesgo de sufrir la superinfección por otros fagos; de efectuarse esta infección, el fago infectivo competirá por los recursos de la célula hospedera. Ciertos profagos han desarrollado diversos mecanismos, alterando la morfología de la envoltura de las bacterias o bien expresando proteínas específicas que las vuelven resistentes a la infección por otros fagos. A este fenómeno se le ha definido como **Exclusión a la Superinfección** (Sie: Superinfection exclusion) [19]. La Sie está regulada por proteínas fágicas que bloquean la entrada del ADN del fago superinfectante a la célula por lo que se sugiere que estas proteínas están ancladas en la membrana celular y asociadas a las proteínas que son reconocidas por los fagos, como son los receptores.

Las cepas infectadas con el fago T5 expresan la lipoproteína Llp que bloquea la funcionalidad del receptor para ferricromo FhuA e impide la reinfección por fagos FhuA dependientes [20]. La inactivación del receptor no solo es ventajosa para prevenir la superinfección de la bacteria

lisógena, sino que también impide la adsorción de los fagos liberados durante la lisis celular [21].

El fago T4, inhibe la reinfección por dos sistemas independientes: **I**) la proteína Imm de T4 se localiza en la membrana de las células infectadas y modifica la conformación del sitio de inyección impidiendo la entrada de otro ADN al citoplasma bacteriano; **II**) la proteína Sp de T4 impide la degradación del peptidoglucano por la lisozima presente en la cola del fago de esta manera imposibilita la infección. El profago TP-J34 de *Streptococcus thermophilus* codifica para la lipoproteína LTP que también inhibe la infección por este mecanismo [22]. SieA y SieB del profago P22 de *Salmonella typhimurium* excluyen a los fagos heteroinmunes L, MG178 y MG40 [23], se propone que SieA es una proteína de IM que bloquea la transferencia de ADN al citoplasma [24, 25]. El producto gp15 del profago HK97 de *E. coli* es una proteína de IM y excluye a los fagos HK75 y HK97, funciona independiente del represor de inmunidad, recientemente se reportó que gp15 interactúa sobre un complejo TMP-PtsG (Tape measure protein-Phosphotransferase system of Glucose) cambiando su conformación e inhibiendo la inyección del ADN al citoplasma [18, 26].

1.4 Infección abortiva (Abi)

Las bacterias pueden utilizar estrategias suicidas para abortar la propagación de los fagos. El sistema Rex (Abi) descrito en lisógenas del fago λ , codifica para dos proteínas RexA y RexB que excluyen el fago mutante T4rII. Cuando ocurre la eyección del ADN del fago en la lisógena, una proteína se une al ADN que está ingresando a la célula y activa a RexA. RexA es un sensor intracelular que activa la OMP RexB. Se necesitan al menos dos proteínas RexA para activar una proteína RexB. RexB forma un canal iónico que despolariza la membrana, con una caída de ATP intracelular, se disminuye la síntesis de macromoléculas y detiene la multiplicación celular [22]. El profago *e14* de *E. coli* K12 codifica para la proteína Lit que abortan la infección por inhibición de la traducción. Lit posee un dominio de metaloproteasa de zinc y escinde el factor de elongación Tu (EF-Tu) y de esta manera bloquea la síntesis de proteínas celulares (Figura 2). Lit es activado cuando la proteína principal de la cápside Gp23 (o Péptido Gol) del fago T4 se une al factor de elongación ribosomal Tu (EF-Tu). Derivados

de T4 que tienen mutaciones en *gol* no activan Lit y por lo tanto son capaces de replicar en cepas Lit⁺ [27].

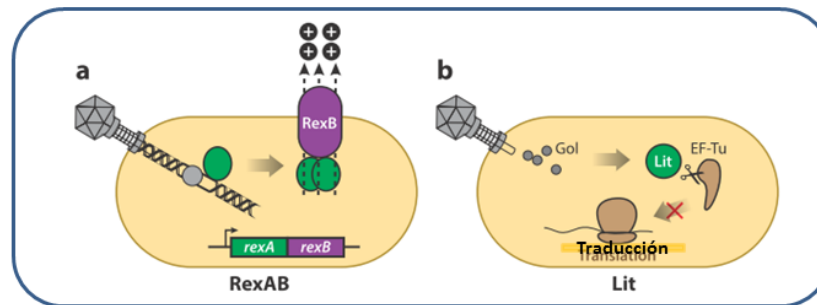


Figura 2 Mecanismo de Sistema abortivo de la infección (Abi). (a) RexAB es activado por el complejo formado entre el ADN del fago y proteínas durante la replicación. RexB es activada por RexA y forma un canal iónico en la membrana celular que la despotencia y la célula muere. (b) Lit es una metaloproteasa que bloquea la maquinaria de traducción, al escindir el factor de elongación EF-Tu, de tal manera que la producción de proteínas del fago y de la bacteria es inhibida, entonces la bacteria muere. Tomada de Dy et al., 2014 [27].

1.5 Mecanismos bacterianos de resistencia a fagos

La bacteria resiste la infección fágica mediante diversos mecanismos como son: la resistencia a la adsorción que reduce la interacción entre la bacteria-fago, y el bloqueo a la introducción del genoma viral, la restricción-modificación y por el sistema CRISPR [28].

1.5.1 Resistencia a la adsorción

En la inhibición de la infección por interferencia en la adsorción (Figura 3) se han descrito tres estrategias: **I) Mutación o bloqueo del receptor:** *Staphylococcus aureus* produce la proteína A que es un factor de virulencia asociado a la superficie celular, se ha demostrado que la adsorción de fagos disminuye en presencia de esta proteína. El plásmido F codifica para la OMP TraT que enmascara al receptor OmpT e inhibe la adsorción de colifagos T-like [13]. **II) Producción de una matriz extracelular que oculta los receptores:** de manera natural, estos polímeros promueven la supervivencia de la bacteria en microambientes hostiles e inhiben mecanismos de defensa, a su vez forman una barrera física entre el fago y su receptor; la naturaleza de esta matriz es variada, por ejemplo: a) en *Pseudomonas spp* y *Azotobacter spp* la matriz está compuesta de alginatos e incrementan la resistencia a fagos, b) en cepas de *Lactococcus*, la adsorción se inhibe por un aumento en el nivel del ácido lipoteicoico en la

superficie de la célula y por la producción de una capa que contiene galactosa y/o ramnosa, los genes involucrados en estos productos se encuentran codificadas en un plásmido. La producción de la matriz extracelular no siempre es eficaz para prevenir la adsorción del fago, algunos fagos reconocen los polímeros de la matriz y portan enzimas (hidrolasas y liasas) capaces de degradarla, por ejemplo, el fago F116 de *Pseudomonas spp* produce una liasa que dispersa los alginatos. Además algunos fagos utilizan componentes de la matriz durante el proceso de infección, por ejemplo, el fago ϕ PLS-I de *Pseudomonas spp* se adsorbe en los alginatos, el P22 de *Salmonella* en el antígeno O de los lipolisacaridos, el fago ϕ V10 reconoce al antígeno O de *E. coli* O157:H7, en estos casos, las mutantes previenen la adsorción; en cepas de *Haemophilus influenzae* la modificación del gen *lic2A* que codifica para una proteína con función en la síntesis de LPS, previene la adsorción del fago HP1c1. Cepas de *Klebsiella* bloquean la infección por el fago FC3-10 al inhibir la producción de su propia cápsula. **III) Producción de inhibidores competitivos:** en este caso las moléculas que naturalmente están presentes en los microambientes bacterianos pueden unirse a los receptores de la membrana celular e impiden que estos puedan ser reconocidos por los fagos, por ejemplo, la microcina J25 producida por cepas de *E. coli* en condiciones de déficit de nutrientes se une a FhuA y compite con fagos FhuA dependientes, por ejemplo, T1, T5 y ϕ 80 entre otros [22].

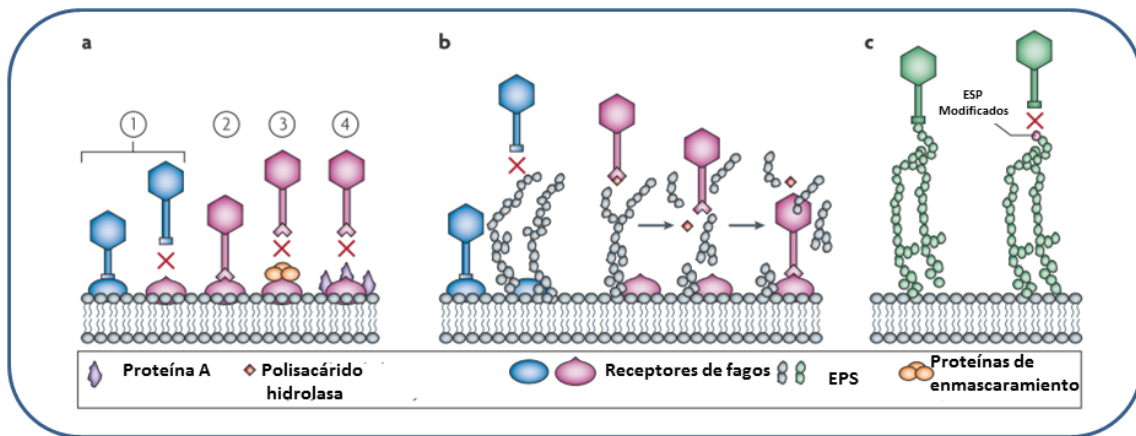


Figura 3 Diferentes estrategias utilizadas por las bacterias para bloquear la adsorción de fagos. La adsorción de fagos a la superficie de las células bacterianas se produce mediante el reconocimiento de un receptor. a: (1) Modificación de receptores de superficie celular; (2) los fagos se pueden adaptar para reconocer estos nuevos receptores. (3) Las bacterias también pueden producir proteínas que enmascaran el receptor del fago; (4) *Staphylococcus aureus* produce proteína A, que reduce la adsorción de fagos. b: La adsorción de fagos también puede ser bloqueada por la producción de exopolisacáridos (EPS), pero los fagos producen una polisacárido liasa o la polisacárido hidrolasa para escindir EPS. c: Los fagos también han evolucionado para reconocer específicamente polisacáridos tales como Antígenos O y antígenos K. Tomada de Labrie et al., 2010 [22].

1.5.2 Bloqueo de la introducción del genoma viral

Estos mecanismos evitan que los genomas de los fagos adsorbidos lleguen al citoplasma bacteriano, algunos genes están asociados con el cromosoma bacteriano y otros a plásmidos o a genes de profagos (ver apartado 1.3 Sie). Fagos de *Lactococcus* requieren de la proteína de membrana PIP (**p**hage **i**nfection **p**rotein) para introducir su genoma, cuando esta proteína es mutada la bacteria es resistente a la infección [28].

1.5.3 Restricción modificación (R-M)

La función principal del sistema R-M es proteger a la célula contra la invasión de un ADN foráneo, por lo que se considera el sistema inmune innato de las bacterias.

Los sistemas R-M están compuestos por: (a) una metiltransferasa (MTase) que modifica las bases de ADN de una secuencia específica mediante la transferencia de un grupo metilo a ambas cadenas y (b) una endonucleasa de restricción (REase) que reconoce y escinde las secuencias de ADN no metilado. Las secuencias metiladas se discriminan entre ellas, por lo que están protegidas, mientras que las secuencias extrañas no metiladas se consideran no propias y son degradadas. Los sistemas de R-M, se clasifican en cuatro familias, 1) por la composición de sus subunidades, 2) reconocimiento de la secuencia de ADN, 3) la posición de escisión, requisitos del cofactor y 4) especificidad del sustrato. El ADN del fago no metilado, en la célula es reconocido por el sistema R-M y es rápidamente degradado, o en menor medida, metilado por la metilasa bacteriana, para evitar su restricción, lo que conduce a la iniciación del ciclo lítico del fago. El destino del ADN del fago es determinado por la tasa de procesamiento de las enzimas. Cuando el ADN del fago es metilado, los nuevos viriones se vuelven insensibles a la enzima de restricción análoga e infectan fácilmente a las células que contienen el mismo sistema R-M. Para hacer frente a los sistemas R-M, los fagos han desarrollado estrategias antirrestricción; una es la ausencia en su genoma de sitios de reconocimiento para endonucleasa a través de la acumulación de mutaciones puntuales, por ejemplo, el fago K de *Staphylococcus* no tiene sitios para *Sau3A*. La eficacia antiviral de un sistema R-M es directamente proporcional al número de sitios de reconocimiento en un ADN del genoma viral. Además, algunos fagos han superado los sistemas R-M a través de la adquisición de gen(es) metilasa(s) en su genoma. El genoma del fago T4 contiene la base

inusual hidroximetilcitosina (HMC) en lugar de la citosina, esta modificación lo hace insensible a los sistemas R-M. En la carrera de co-evolutiva, algunas bacterias han adquirido la capacidad de atacar el ADN del fago modificado, por ejemplo, la *E. coli* CT596 es capaz de atacar el ADN glucosilado. Algunos fagos similares a T4 tienen un gen que codifica para la proteína interna I (IPI), que desactiva el sistema GmrS-GmrD, durante la infección, la IPI madura se inyecta en la célula huésped junto con el genoma del fago e interactúa con el complejo GmrS-GmrD para desactivar su actividad de restricción. El colifago P1, posee proteínas que se inyectan con su genoma y enmascaran los sitios de restricción [22].

1.5.4 CRISPR

CRISPR significa repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas, y son *locis* generalmente compuestos por repeticiones de 21-48 pb e intercalados por espaciadores no repetitivos (26-72 pb) de largo, y flanqueados por un número variable de genes *cas* que confiere inmunidad adaptativa contra elementos exógenos. El sistema tipo I-F de CRISPR-Cas regula la defensa contra los fagos. La inmunización mediada por CRISPR ocurre en tres pasos, en primer lugar, las proteínas Cas1 y Cas2 reconocen una secuencia diana dentro del genoma del fago invasor y la incorporan en el *loci* de CRISPR como un espaciador. A continuación, el *loci* CRISPR se transcribe en un ARN pre-CRISPR largo (ARNcr) y se escinde en las secuencias repetidas para producir el ARNcr maduro que proporcionan el emparejamiento de bases complementarias con el ADN extraño invasor. Esta unión está mediada por la endonucleasa de la proteína Csy4, que permanece unida al extremo 3' del ARNcr. Finalmente, el complejo crRNA-Csy4 interactúa con las proteínas Csy1, Csy2 y Csy3 para formar el complejo Csy. Una vez que se une al ADN, el complejo Csy recluta la proteína Cas helicasa-nucleasa, que media la degradación del ADN diana. Fagos de *Pseudomonas aeruginosa* codifican para proteínas que inactivan el sistema CRISPR-Cas. Se identificaron un total de cinco familias diferentes de proteínas anti-CRISPR que inhiben el sistema de tipo I-F y cuatro familias de proteínas que inhiben el sistema de tipo I-E. Los genes anti-CRISPR se expresan en el profago y durante una infección por fagos líticos [29].

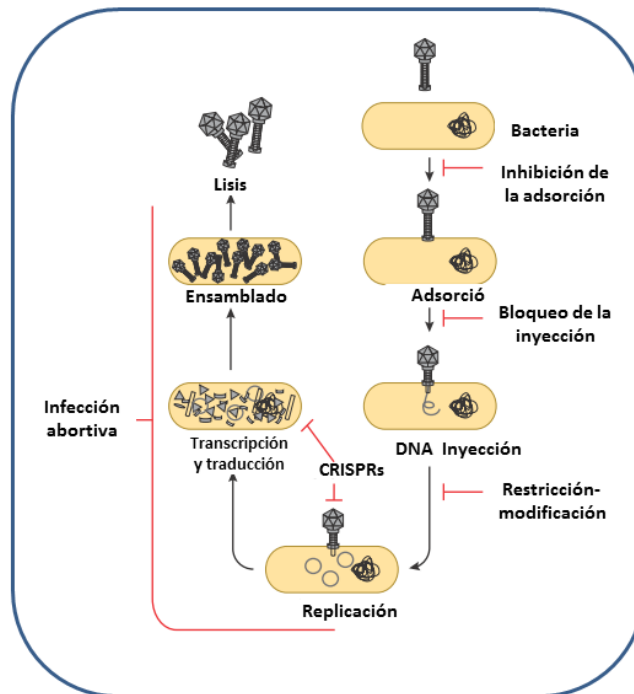


Figura 4 Representación del ciclo de infección de los fagos líticos y los sistemas bacterianos antifagos. La bacteria posee estrategias de defensa en las diferentes fases del ciclo de infección viral, adsorción vs inhibición de la adsorción; inyección del genoma viral vs inhibición de la inyección; cuando el ADN fágico está en el citoplasma se pueden activar mecanismos de Restricción-modificación; durante la replicación la infección se aborta por la activación del sistema CRISPRs. Tomada de Dy et al., 2014 [27].

1.6 Envoltura bacteriana

En el proceso de infección la envoltura bacteriana representa la barrera física que el fago debe de sortear. En las bacterias Gram-negativas esta está conformada por: 1. La OM, formada por una bicapa lipídica de forma asimétrica, compuesta de fosfolípidos y de LPS porción interna y externa, respectivamente, que separa el periplasma del medio externo 2. El periplasma, que es aproximadamente el 10% del volumen celular, de consistencia viscosa y compuesto de peptidoglucano y proteínas solubles. Funciona como un citoexqueleto extracitoplasmático, en este compartimento se realiza el plegamiento y transporte de OMPs, y 3. La IM que separa y esta en contacto directo con el citoplasma y el periplasma; conformada por una bicapa de fosfolípidos y proteínas de dos tipos: I) integrales de membrana generalmente formada por α -hélices y II) lipoproteínas ancladas a la porción interna de la membrana [30]. Los fosfolípidos presentes en la OM son análogos a los de IM. Además por encima de la OM algunas cepas presentan polisacáridos capsulares, exopolisacáridos y otras moléculas de polisacáridos, que forma una capa morfológicamente estructurada, que pueden actuar como el componente

principal de la matriz del biofilm y como mecanismo de resistencia a la infección por fagos. La distribución espacial de los componentes membranales, y en específico de las proteínas no está completamente descrita, en *E. coli* los flagelos y el pili están anclados alrededor de toda la membrana, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio cholerae* solo se encuentran en un polo. Se han descrito que el receptor LamB no se distribuye de manera uniforme en la membrana y así su patrón de distribución se clasifica en dos poblaciones, una móvil y otra inmóvil, la distribución de la población móvil depende del tamaño de la célula y sigue un patrón relacionado a la población inmóvil [31].

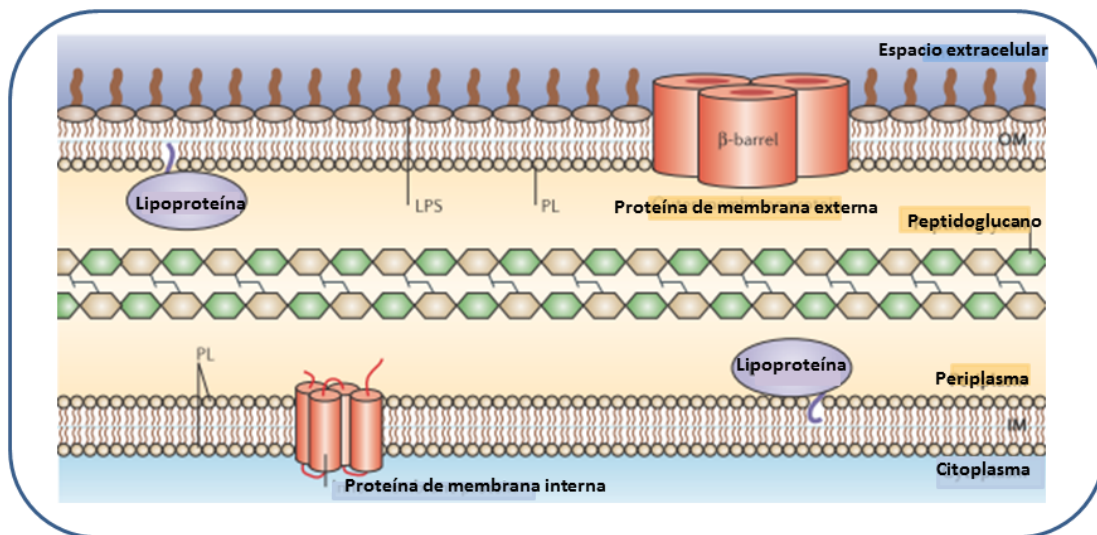


Figura 5 Estructura general de la membrana de *Escherichia coli*. El citoplasma está rodeado por una IM, el periplasma y la OM. La IM es una bicapa lipídica simétrica compuesta por fosfolípidos (PL) y proteínas integrales de membrana con características α -hélices con dominios transmembrana. El periplasma es un compartimiento acuoso ubicado entre el MI y la OM, que alberga la pared celular compuesto por peptidoglucano. La OM es una bicapa lipídica asimétrica que contiene PL en la porción interior y LPS en el espacio externo. La OM también contiene proteínas integrales, plegadas en conformación de β -barril. Ambas membranas contienen lipoproteínas que están ancladas a sus caras periplásmicas. Tomada y modificada de Ruíz et al., 2006 [30].

1.6.1 Membrana externa (OM)

La OM funciona como una barrera de protección que controla la entrada y salida de solutos, evita la entrada de moléculas tóxicas y le permite a la bacteria habitar en diferentes ecosistemas; una característica fundamental de las proteínas de OM son los β -barriles transmembranales que la conforman, también presentes en la membrana de cloroplastos y mitocondrias, y que pueden ser reconocidos como receptores primarios o secundarios; el canal de los barriles es de carácter hidrofílico, mientras que el exterior es hidrofóbico, las regiones

que unen las cadenas β de la estructura secundaria de porinas se denominan “loops” y también puede ser reconocidos dos por fagos para el inicio del ciclo de infección [13].

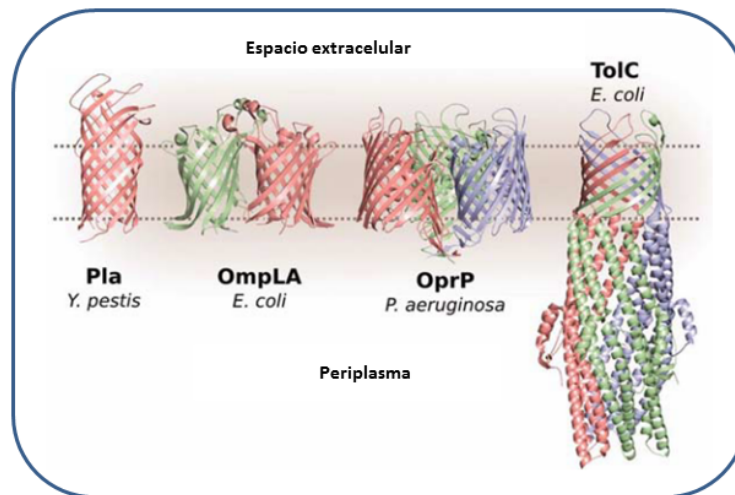


Figura 6 Las proteínas de membrana externa (OMPs) se encuentran predominantemente como β -barriles. Como monómero, Pla de *Yersinia pestis*; como dímero y trímero de β -barriles individuales, OmpLA de *E. coli* y OprP de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente; a diferencia de las anteriores TolC de *E. coli* es ejemplo de un oligómero donde tres subunidades se unen para formar un β -barril. Tomada y modificada Kim et al., 2012 [32].

Basados en la función las proteínas de OM (OMPs) se clasifican en seis categorías: **I)** porinas no específicas, **II)** canales sustrato específicos, **III)** translocones para exportación de sustratos, **IV)** autotransportadores, **V)** enzimas y **VI)** proteínas estructurales de membrana. Las porinas no específicas permiten el paso por difusión pasiva de moléculas hidrofílicas pequeñas. Los canales sustrato específico permiten el paso solo de determinadas moléculas por difusión pasiva y transporte activo, por ejemplo, vitaminas y azúcares (ver Tabla 2). Los translocones incluyen OMPs con funciones de exporte de proteínas, fármacos y moléculas relacionadas. Los autotransportadores pertenecen a la categoría de OMPs que secretan desechos, proteínas como factores de virulencia, moléculas para adhesión celular, son encontrados en cepas patógenas. Las OMPs que se clasifican como enzimas tienen actividad de proteasas y fosfolipasas. La última categoría de OMPs contribuye a la formación de la pared celular con función estructural para el mantenimiento de la integridad, incluye proteínas y receptores. El rango de tamaño de las OMPs va de 8 a 26 cadenas β , arregladas en monómeros a trímeros y en un número de copias de cientos a miles de copias por célula, por ejemplo, la fosfolipasa OmpLA solo es funcional cuando esta como dímero [32]. En algunos casos, las proteínas de sistemas de transporte específicos se puede unir a proteínas citoplasmáticas a través de

proteínas periplásmicas (transductores de energía). Para algunos fagos, la energía es necesaria para la internalización exitosa de el material genético; en otros casos, la proteína de OM (que actúa como receptor) es suficiente.

Tabla 2
Ejemplo de OMPs de Escherichia coli

Proteína	Número de cadenas β	Peso molecular (kDa)	Estado de oligomerización	Función
OmpA	8	37.2	Dímero	Porina y receptor
OmpW	8	?	?	Canal
OmpX	8	?	?	
OmpT	10	35.6	Posible pentamero	Proteasa
TolC	12	53.7	trimero	Transportador
EspP	12	?	?	Autotransportador
NanC	12	?	?	Porina
OMPLA	12	?	?	Fosfolipasa
Tsx	12	?	?	Transportador
OmpG	14	?	?	Canal
OmpC	16	40.4	Trímero	Porina
OmpF	16	39.3	Trímero	Porina
PhoE	16	38.9	Trímero	Porina
LamB	18	49.9	Trímero	Porina
BtuB	22			Transportador
FepA	22			Transportador
FhuA	22		Monomero	Transportador
FimD	24	96.5	Dímero	Transportador

Tomada de Kim et al., 2012 [32] y Fairman et al., 2011 [33].

1.6.2 Biogenesis de las OMPs

Las OMPs sintetizadas en el citoplasma, con una secuencia señal peptídica de membrana en el extremo amino terminal, se unen a la chaperona SecB y es translocada a través de la IM hacia el periplasma por el translocón SecYEG en un proceso ATP (Adenosina trifosfato) dependiente mediado por la ATPasa SecA. Simultáneamente la porción peptídica del N-terminal es removido por la peptidasa I (SPaseI). La proteína se libera en el periplasma y es transportada por la chaperonas SurA o por la vía Skp/DegP a la porción interna de la OM; las chaperonas evitan plegamientos irregulares y agregación de proteínas, por lo que la OMP es reconocida para su inserción en la OM por el complejo de BAM (maquinaria de ensamblado

de β -barril) en la secuencia consenso del C-terminal X-Z-X-Z-X-Z-Tyr-Z-Phe/Trp, donde X es un aminoácido hidrofóbico y Z es cualquier aminoácido [32]. En *E. coli* el complejo BAM es conformado de cinco proteínas BamA, BamB, BamC, BamD y BamE [33, 34]. La proteasa Deg detecta la acumulación de proteínas sin plegar y las degrada.

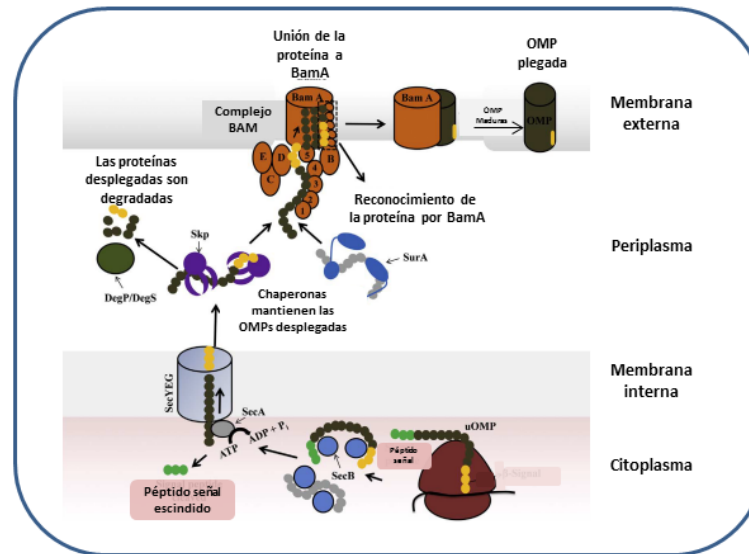


Figura 7 Esquema en donde se muestra los componentes involucrados en la biogénesis y la inserción secuencial de las OMPs nacientes en bacterias Gram-negativas. La proteína sintetizada es liberada del ribosoma y reconocida por la chaperona citoplasmática SecB después es translocada del citoplasma al periplasma a través de la IM por el translocón SecYEG, la energía requerida para este proceso es suministrada por la ATPasa SecA. En este proceso el péptido señal es removido. En el periplasma la proteína es secuestrada por la chaperona Skp o SurA. Las chaperonas previenen el plegamiento aberrante de la proteína y la mantienen soluble a pesar de su naturaleza hidrofóbica. Las OMP que no son reconocidas por chaperonas forman agregados y son degradadas por la proteasa DegP. El polipéptido unido a Skp o SurA es liberado y reconocido por el complejo BAM para su ensamble a la OM. Se ha reportado que este reconocimiento es mediado por una secuencia consenso en el carboxilo terminal de la proteína. Después del reconocimiento, BamA facilita el plegamiento espontáneo de la OMP y terminado el proceso, el β -barril es liberado de BamA a la OM. Tomada de Chaturvedi et al., 2017 [35].

1.6.3 Lipoproteínas de membrana

Ancladas por un N-acil-diacilglicerolcisteína a la IM y OM, se encuentran las lipoproteínas, con funciones celulares diversas, por ejemplo, participan en la biogénesis y mantenimiento de la membrana celular, transporte de sustratos y eliminación de drogas; en *Borrelia burgdorferi* las lipoproteínas localizadas en la superficie celular tienen importancia médica derivado de que inducen la respuesta inflamatoria del hospedero. En la mayoría, la porción proteica queda expuesta en el espacio periplasmático, pero se ha reportado que puede extenderse al espacio extracelular, por ejemplo, LbpB y TbpB de *Neisseria meningitidis*, los cuales son componentes de los receptores de lactoferrina y transferrina, respectivamente [36]. *E. coli*

expresa 90 lipoproteínas; el análisis “*in silico*” predice que la mayoría están localizadas en la OM y en menor proporción en la IM, en ambos casos el péptido es desplegado en el lado periplasmático [37]. Los precursores portan la secuencia señal de lipoproteínas de membrana en el extremo amino terminal y son translocadas a la IM por el sistema Sec, en la membrana ocurre la lipidación y el plegamiento [38]. La secuencia señal de lipoproteínas de membrana consta de tres regiones (“*n*”, “*h*” y “*c*”); la región “*n*” o amino terminal acarrea una carga neta positiva, la región “*h*” compuesta en mayor proporción de residuos hidrofóbicos y la región “*c*” o carboxilo terminal que es el sitio entre la región de procesamiento y el inicio de la proteína madura [39].

En la secuencia consenso de procesamiento para lipoproteínas de membrana se identifican los aminoácidos Leu-(Ala/Ser)-(Gly/Ala)-Cys que van de la posición -3 a +1, tomando como +1 la Cisteína dado que es el primer a.a de la proteína madura, el procesamiento de las pro-lipoproteínas comprende tres pasos: **I**) formación de un enlace tioéster entre el grupo sulfidrilo de la Cys de “lipobox” (extremo amino) y un diacilglicerol, reacción catalizada por la prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Lgt); **II**) escisión del péptido señal por la lipoproteína señal peptidasa (LspA o Señal peptidasa II) y **III**) aminoacilación en la Cys (+1) catalizada por una transacilasa de fosfolípidos / apolipoproteína transacilasa (Lnt). Todo el procesamiento ocurre en la porción periplásmica de la IM [39, 40]. La naturaleza de las lipoproteínas es altamente hidrofóbica por lo tanto el transporte a la OM a través del periplasma hidrófilico requiere un mecanismo especializado. Las lipoproteínas se separan de la IM por la unión al transportador dependiente de ATP, LolCDE, en presencia de una proteína portadora periplásmica, LolA. LolCDE reconoce las lipoproteínas y las libera de la IM hacia el periplasma en un proceso dependiente de ATP, se ha reportado que la presencia de Asn, Phe, Trp, Tyr, Gly y Pro actúa como una señal de retención de la proteína en la IM, ninguna lipoproteína de *E coli* tiene alguno de estos aminoácidos en esta posición, lo que conduce a la formación de un complejo soluble entre una molécula de LolA y la lipoproteína. El complejo LolA-lipoproteína formado se mueve a través del periplasma, y luego interactúa con un receptor específico de lipoproteínas, LolB, que a su vez es una lipoproteína anclada a la OM. Luego, se transfiere la lipoproteína de LolA a LolB, esta última incorpora la lipoproteína en la placa interior de la OM [41].

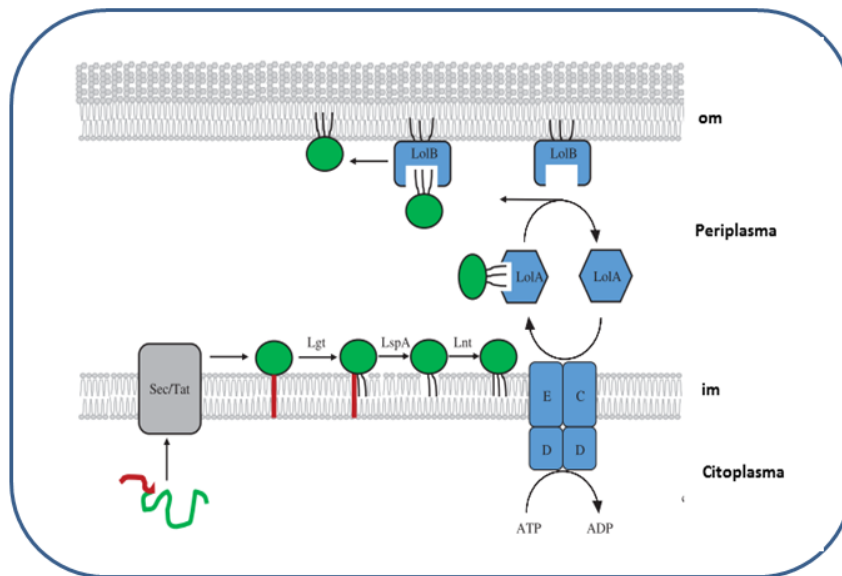


Figura 8 Maduración de lipoproteínas y ruta de exportación. Lipoproteína (verde) es sintetizada en el citoplasma con una secuencia señal (SS) en el amino terminal (rojo) y con marcas para su translocación a la IM por el translocón Sec o Tac. La lipoproteína permanece anclada a la IM por su SS y la Lgt adiciona un diacilglicerol a la Cisteína. LspA escinde la SS y Lnt adiciona un grupo acilo al amino terminal que acaba de formar. La lipoproteína es reconocida por el complejo de IM LolCDE que extrae la lipoproteína de la IM con consumo de ATP. La lipoproteína es liberada al periplasma en complejo con la chaperona LolA. LolA entrega la lipoproteína al receptor de OM LolB que está localizado en la parte interna de la OM. Cuando LolA queda vacío es reciclado por LolCDE. Tomada de Narita et al., 2006 [41].

2. ANTECEDENTES

2.1 Mexican *E. coli* phages (mEp)

Kameyama et al., 1999 [42] aislaron y caracterizaron la colección “Mexican *E. coli* phages” (mEp). 95 fagos temperados se clasificaron en 20 grupos de inmunidad, de estos 19 son lambdoides con un total de 43 fagos. Un fago de cada grupo de inmunidad se ensayó para determinar el patrón de exclusión en las lisógenas de los mismos fagos (Tabla 3). Cada bacteria lisógena (debido a la inmunidad por represor) excluyó a su fago correspondiente. Las cepas lisógenas para los profagos mEp167, mEp173 y mEp506 excluyen fagos de diferentes grupos de inmunidad. Los fagos excluidos en las lisógenas de ϕ 80 y HK022 utilizan FhuA como receptor.

Tabla 3
Perfil de exclusión de fagos mEp y sus lisógenas

Fago mEp	Lisógenas derivadas de W3110(mEp)																			
	038	003	023	043	064	167	173	174	213	237	390	410	416	460	506	G-3	λ BLK20	λ	ϕ 80	HK022
038	-	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	-	±
003	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	+	-
023	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	+	-	±
043	+	+	+	-	+	+	-	+	+	±	±	±	±	+	+	+	+	+	+	-
064	+	+	+	+	-	±	±	+	+	±	±	-	+	+	+	+	+	+	+	-
167	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	±	-	+	-	+	+	-	+	±
173	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	±	±	+	+	+	+	±	±	±
174	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	±	±	+	-	+	+	+	±	±
213	+	+	+	+	+	-	±	±	-	±	±	±	±	-	±	±	±	±	-	±
237	+	+	+	+	+	-	±	+	-	-	+	±	±	+	-	+	+	+	±	±
390	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-	±	±	±	±	±	+	+	+	±	±
410	+	+	+	+	+	-	±	±	±	±	±	-	±	±	±	+	+	±	±	-
416	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	-	±	±	+	+	±	±	-
460	+	+	+	+	-	+	+	+	±	±	±	±	±	-	±	+	+	±	±	±
506	+	+	+	+	+	+	-	+	±	±	±	±	±	±	-	±	±	±	±	-
G-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	-
λ BLK20	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	±	±	±	±	-	±	±	±
λ	+	+	+	+	+	+	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-	±	-
ϕ 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	-	±
HK022	+	+	+	+	+	+	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	-
Grupo de inmunidad	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX

λ , ϕ 80 y HK022 son fagos representativos de los grupos de inmunidad XVIII, XIX y XX, respectivamente. (+) Crecimiento de fagos en W3110, (±) los fagos son excluidos de 10^2 a 10^4 veces en comparación a W3110, (-) fagos que son excluidos $\geq 10^5$ en comparación a W3110. Tomada de Kameyama et al., 1999 [42].

2.2 Fago mEp167

Para investigar el gen responsable de la exclusión de los fagos mEp213, mEp237 y mEp410 en la lisógena para mEp167, Uc-Mass et al., 2004 [43] construyeron una biblioteca genómica del fago mEp167, de las construcciones, obtuvo el plásmido pT41 y fué transformado en W3110,

la cual excluyó 13 de los 20 fagos de diferentes grupos de inmunidad, de los reportados por [42] y a 10 fagos más (ver Tabla 4).

El aumento en el número de fagos excluidos se atribuye a la sobreexpresión de la proteína. El análisis “*in silico*” de la secuencia de pT41 mostró un “ORF” (Marco de Lectura Abierto) que codifica para un péptido de 77 aminoácidos homólogo a la proteína Cor reportada en los fagos HK022, N15 y ø80, con porcentaje de homología 91%, 74% y 61%, respectivamente.

El gen *cor* se clonó en el vector de expresión pPROEXd [43], y a esta construcción se le denominó pKINAM y fué transformado en W3110, la cual presenta el patrón de exclusión similar al observado con pT41. La Sie mediada por Cor solo se observó en células *fhuA*⁺, lo que indica que los fagos reconocen como receptor a la OMP FhuA, además la sobreexpresión de Cor alteró la función fisiológica de FhuA. La captación de ferricromo se inhibe en células Cor⁺, Figura 9.

Tabla 4
Perfil de exclusión mediada por Cor de fagos mEp

Fago	Grupo de inmunidad	Cepa								
		W3110	W3110 (mEp167)	W3110 [pT41;Cor]	W3110 [pKINAM;Cor]	C600 FhuA ⁻	C600 [pUCJA;FhuA ⁻]	KP1039 TonB ⁻	KP1039 [pRZ540;TonB ⁻]	KP1039 [pKINAM;Cor ⁻]
λ	XVIII	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mEp167	VI	+	-	-	-	-	+	-	+	-
mEp237	X	+	-	-	-	-	+	-	+	-
mEp410	XII	+	-	-	-	-	+	-	+	-
mEp213	IX	+	-	-	-	-	+	+	+	-
mEp003	II	+	+	-	-	-	+	-	+	-
mEp023	III	+	+	-	-	-	+	-	+	-
mEp043	IV	+	+	-	-	-	+	-	+	-
mEp174	VIII	+	+	-	-	-	+	-	+	-
mEp390	XI	+	+	-	-	-	+	-	+	-
mEp416	XIII	+	+	-	-	-	+	+	+	-
mEp506	XV	+	+	-	-	-	+	+	+	-
mEp038*	I	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mEp553	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mEp409	VII	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mEp460	XIV	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mEp505	XVI	+	+	+	+	+	+	+	+	+
λBLK-20	XVII	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ø80	XIX	+	+	-	-	-	+	-	+	-
HK022	XX	+	+	-	-	-	+	+	+	-
T5*	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-

(+) Crecimiento de fagos, (-) sin crecimiento de fagos, * fagos no lambdoides.

Tomada y modificada de Uc-Mass et al., 2004 [43].

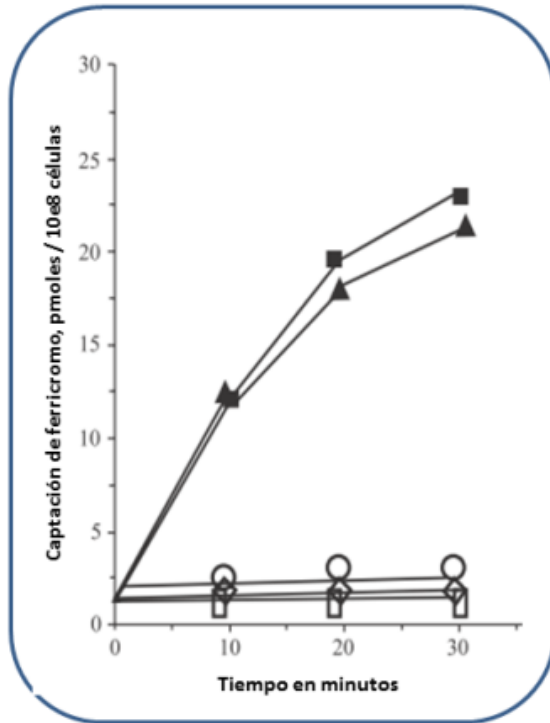


Figura 9 Efecto de Cor_{mEp167} en la captación de $[^{59}Fe]$ -ferricromo. C600 (*fluA*⁻) (○-○), W3110 (■-■) y células W3110 / pUC18 (▲-▲), pT41 (□-□) y pKINAM (◇-◇). Tomada de Uc-Mass et al., 2004 [43].

Aunque el fago mEp237 es excluido en W3110/pKINAM la tasa de adsorción es igual que en W3110/pPROEXd. Además la producción de partículas virales en W3110/pKINAM post electroporación del ADN de mEp237 fué de 0.768 ± 0.089 relativo a 1 en W3110/pPROEXd, esto sugiere que la inhibición de la superinfección mediada por Cor se ejerce a nivel de la entrada del ADN.

2.3 Diversos estudios han determinado la exclusión mediada por Cor

Así como lo reportó Uc-Mass *et al.*, 2004; en la literatura se encuentran reportes de la exclusión mediada por Cor utilizando diversos fagos; Kozyrev et al., 1982 [44] reportó la *Sie* por lisógenas de $\phi 80$, la secuencia correcta de $\phi 80$ la reportó Vostrov et al., 1996 [45] observando la inhibición de la adsorción y determinaron al producto del gen *cor* como el responsable de la “conversión lisogénica” e inhibición de la funcionalidad de TonA (FhuA). Malinin et al., 1993 [46] reportó que la conversión lisogénica del fago N15 es mediada por Cor y que inhibe la adsorción de T1, $\phi 80$ y N15. Decker *et al.*, en 1994 [20] reportaron la resistencia a la infección derivada de la expresión de la Lip (polipéptido de 7.8 kDa) expresada

por el fago T5, y a este fenómeno lo denominó como “conversión lítica”; con sus ensayos concluyeron que la resistencia a la superinfección, por T5 es derivada de la inhibición de la adsorción del fago. Braun et al., 1994 [47] reportó que la inactivación de FhuA por la lipoproteína Llp (reportada como Lip 7.8 por [20]) del fago T5 es causada por una posible interacción con FhuA; en adición a lo reportado por Decker *et al.*, en 1994 [20], describen que cepas Llp⁺ son resistentes al fago ϕ 80, colicina M, albomicina y los niveles de absorción de ferricromo disminuyen. En 1996 Vostrov *et al.*, [45] determinaron la conversión lisogénica en las lisógenas de N15 y ϕ 80 y propusieron que Cor podría estar interactuando directamente con FhuA o indirectamente con TonB. Mondigler, Ayoub y Heller, 2006 [48] mencionan que la Llp de T5 bloquea FhuA por un cambio conformacional que impide la infección, mientras que la Llp del fago BF23 bloquea al receptor BtuB.

2.4 Cor_{mEp167} y proteínas ortólogas

Wietzorrek et al., 2005 [21] analizaron “*in silico*” la secuencia de Cor de los fagos: ES18, N15, mEp167, HK022, ϕ 80, T1 y de las lipoproteínas de BF23 y T5. En todas las secuencias encontraron el péptido señal de lipoproteína de membrana en el extremo N-terminal y en la posición (+2) los a.a. (A, S) característicos para que la lipoproteína madura se ancle a la porción interna de la OM, además un dominio conservado en los a.a. 45 a 75 con un alto porcentaje de homología inter secuencia (ver Figura 10). En un trabajo previo Arguijo Hernández E., (tesis de maestría, resultados no publicados) clono el gen *cor* del pKINAM (Uc-Mass *et al.*, 2004 [43]) en el plásmido pPROEX-1 que tiene una bandera de Histidinas posterior a la Metionina de inicio del SD, a este plásmido se denominó pPROEX-cor. La proteína sobreexpresada con de pPROEX-cor solo se logró visualizar en gel de SDS-PAGE y no por Inmunodetección, este resultado sugiere que la prepoliproteína Cor_{mep167} se modifica en el C17 y la porción anterior a este aminoácido es escindida (bandera de Histidinas de pPROEX-1) según el proceso que se describe en el apartado 1.6.3; de ser así solo se podrá monitorear a la proteína madura si se coloca una bandera en el extremo carboxilo terminal.

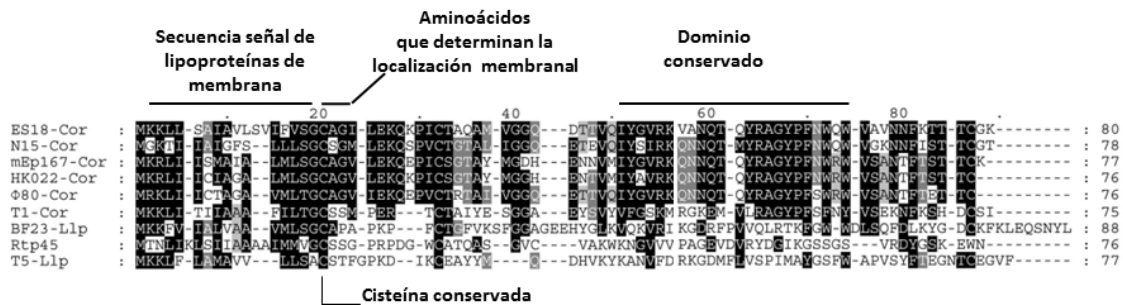


Figura 10 Alineamiento de la lipoproteína Cor de los fagos NS18, N15, mEp167, HK022, φ80, T1 y las relacionadas de BF23, Rtp45 y T5. La cisteína conservada en la posición 20 de todas las secuencias constituye el aminoácido del N-terminal de la lipoproteína madura. Es el sitio de escisión de la secuencia señal y modificación lipídica. El Cor de T1 es el miembro más distante de la familia de las seis proteínas que se han reportado. Las Llp de T5, BF23 y Rtp45 muestran homología en la secuencia señal de lipoproteínas de membrana. Los a.a. conservados en todas las secuencias están resaltados en negro, en gris los que son conservados solo en algunas proteínas. Tomada de Wietzorrek et al., 2005 [21].

2.5 Mutaciones puntuales en Cor generan fenotipo Cor⁻

Arguijo Hernandez E (tesis de maestria, resultados no publicados) reportó que deleciones y mutaciones puntuales en el gen *cor* tienen efecto en la funcionalidad de Cor, de tal manera que la expresión de las proteínas mutantes presenta fenotipo Cor⁻. Las deleciones de los a.a. 15-17, 29-31 tiene un fenotipo Cor⁻; sin embargo, la deleción 49-52 excluye a los fagos mEp167, mEp043, mEp237, pero no a los fagos φ80 y mEp506 ya que estos pueden infectar. Las mutantes I27N, C28G, I43N, Y44C, A57E, V66R, S67R, A68V y T72P también presentan fenotipo Cor⁻.

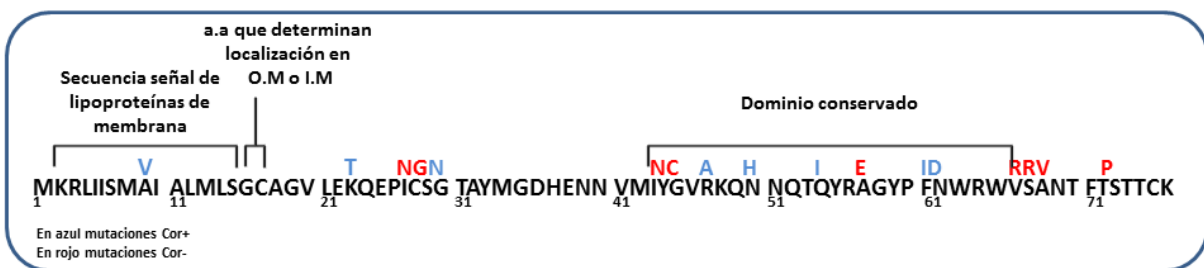


Figura 11 Mutaciones en la proteína Cor tienen efecto en el fenotipo. Los plásmidos mutagenizados se transformaron en W3110, se realizó el goteo y se determinó la infección/exclusión. En rojo las mutaciones con fenotipo Cor⁻, en azul mutantes sin efecto en el fenotipo.

2.6 Prevalencia de Cor en colección de fagos mEp

El estudio reportado por Hernández-Sánchez et al., 2008 [49] determinó que 37 de los 43 fagos (86%) clasificados en los grupos de inmunidad II al XIX descritos por Kameyama *et al.*, 1999 [42] son FhuA-dependientes, de los restantes, tres son LamB dependientes y otros tres son OmpC dependientes, *cor* se amplificó en 25 de los 43 (58%) fagos analizados (Vease Tabla 5). Se sugiere que la exclusión competitiva mediada por Cor es un fenómeno que está extendido ampliamente en la naturaleza.

2.7 Receptor de membrana FhuA

El sistema transportador de ferricromo en bacterias Gramnegativas consta de cuatro proteínas (FhuA, FhuB, FhuC y FhuD) y un sistema transductor de energía (Complejo TonB). FhuA además es utilizado como receptor por los fagos T1, T5, ø80, UC-1 y mEp167 (Uc-Mass *et al.*, 2004 [42]) y de los antibióticos como albomicina o rifamicina y de la colicina M. La estructura de FhuA consta de dos dominios: 1) El N-terminal a.a del 19 al 160 denominado “cork” (tapón) formado por cuatro hojas β entre los residuos 47 a 154, el resto de los a.a forman cuatro pequeñas α hélices; 2) El C-terminal (a.a del 161 al 725) consta de 22 cadenas β antiparalelas que forma un β -barril. El dominio “cork” ocluye el lumen del barril, impidiendo la difusión pasiva de ferricromo. Las interacciones del dominio “cork” con el interior del barril son por interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. La interfase entre el dominio “cork” y el β barril esta áltamente hidratada, ya que la presencia de moléculas de agua en la interfase reduce la energía requerida para efectuar los cambios conformacionales necesarios para el transporte del sideróforo [50, 51]. Las-cadenas β del dominio barril están conectadas por once “loops” extracelulares y diez vueltas en la porción periplasmática [52]. El ferricromo se une a los “loops” extracelulares del receptor FhuA y a las regiones apicales del dominio “cork”.

En diversos estudios se ha reportado la repercusión biológica de mutaciones en FhuA [53] reportaron que la captación de ferricromo y albomicina en mutante FhuA Δ 322-355 no requiere de el complejo TonB. El proceso se convierte en una captación por difusión pasiva, además las bacterias muestran sensibilidad a dodecil sulfato de sodio (SDS) y bacitracina. Las células que expresan la proteína mutada también resisten la infección por los fagos T1, ø80 y T5 y no son sensibles a colicina M. La deleción de Asp-348 reduce la sensibilidad de 1 a 10%

hacia T5, es resistente a colicina M y a los fagos T1, ϕ 80. Endriß y Braun (2004) [54] reportaron que los “loops” 3 (a.a 243-273), 5 (a.a 394-419), 7 (a.a 502-515), 8 (a.a 552-558) y 11 (a.a 689-701) de FhuA contribuyen al transporte de ferricromo, la delección del 3 y 11 lo inactiva por completo mientras que el 3, 5, 11 son esenciales para la unión. El loop 4 (318-339) es esencial para la infección por los fagos T1 y ϕ 80 (TonB dependientes), pero no para el fago T5 TonB-independiente. El loop 8 también es necesario para la infección por T1, T5 y ϕ 80, además, la bacteria presenta fenotipo de resistencia a colicina y los loops 3, 7, 8 son esenciales para la sensibilidad hacia colicina M. Estas mutaciones indican que FhuA es una proteína con varios sitios de reconocimiento para los ligandos.

2.8 Actualidad de la relación Cor-FhuA

Aunque diversos autores sugieren que la Sie de fagos FhuA dependientes es resultado de la interacción de Cor con FhuA, a la fecha no se tiene evidencia experimental que avale esta hipótesis, solo se puede concluir que la producción de una proteína ajena al genoma bacteriano, en este caso Cor o Llp asegura la resistencia de la cepa a la reinfección para un determinado grupo de fagos, o desde otro punto de vista, el mecanismo por el cual el bacteriófago asegura su supervivencia como profago. Aún más, no se tienen reportes de la interrelación entre la inactivación del receptor y la activación o represión de vías de señalización intracelulares.

Tabla 5***Análisis requerimiento de receptor y amplificación de cor en fagos mEp***

Fago	Grupo de inmunidad	Cepa					Amplificación de <i>cor</i>
		W3110	C600 (<i>fhuA</i> ⁻)	C600 / (pUCJA; FhuA ⁺)	MCR106 ($\Delta lamB$)	MH760 (<i>ompC</i> ⁻)	
mEp003	II	+	-	+	+	+	+
mEp141	II	+	-	+	+	+	+
mEp147	II	+	-	+	+	+	+
mEp450	II	+	-	+	+	+	+
mEp468	II	+	-	+	+	+	+
mEp023	III	+	-	+	+	+	+
mEp145	III	+	-	+	+	+	+
mEp498	III	+	-	+	+	+	-
mEp504	III	+	-	+	+	+	-
mEp534	III	+	-	+	+	+	-
mEp543	III	+	-	+	+	+	-
mEp043	IV	+	-	+	+	+	-
mEp064	V	+	-	+	+	+	+
mEp263	V	+	-	+	+	+	-
mEp553	V	+	+	+	-	+	-
mEp167	VI	+	-	+	+	+	+
mEp173	VII	+	-	+	+	+	+
mEp409	VII	+	+	+	-	+	-
mEp414	VII	+	+	+	-	+	-
mEp524	VII	+	-	+	+	+	+
mEp174	VIII	+	-	+	+	+	+
mEp539	VIII	+	-	+	+	+	-
mEp213	IX	+	-	+	+	+	+
mEp237	X	+	-	+	+	+	+
mEp390	XI	+	-	+	+	+	-
mEp410	XII	+	-	+	+	+	+
mEp502	XII	+	-	+	+	+	+
mEp416	XIII	+	-	+	+	+	+
mEp457	XIII	+	-	+	+	+	+
mEp460	XIV	+	+	+	+	-	-
mEp506	XV	+	-	+	+	+	+
mEp505	XVI	+	+	+	+	-	-
mEp235	XVII	+	-	+	+	+	+
mEp120	XVIII(λ)	+	-	+	+	+	+
mEp123	XVIII(λ)	+	-	+	+	+	+
mEp155	XVIII(λ)	+	-	+	+	+	+
mEp234	XVIII(λ)	+	-	+	+	+	+
mEp332	XVIII(λ)	+	+	+	+	-	-
mEp500	XVIII(λ)	+	-	+	+	+	+
mEp533	XIX	+	-	+	+	+	-
mEp266	XIX	+	-	+	+	+	-
mEp138	XX	+	-	+	+	+	-
mEp144	XX	+	-	+	+	+	-
λ	XVIII	+	+	+	-	+	-
Φ 80	XIX	+	-	+	+	+	+

(+) Infección y/o amplificación positiva (-) infección y/o amplificación negativa. Tomada de Hernández Sánchez *et al.*, 2008 [49].

3. JUSTIFICACIÓN

El 85% de los fagos lambdoides aislados por Kameyama et al., 1999 son FhuA dependientes. De estos el 58% porta en su genoma el gen *cor* que excluye a los fagos FhuA dependientes. La captación de ferricromo se inhibe en cepas Cor^+ con fondo genético *fhuA*⁺. La determinación de la interacción de Cor con proteínas membranales del huésped, es crucial para el entendimiento de proceso biológico que regula la Sie.

4. HIPOTESIS

Cor se transloca a la membrana externa e interacciona con varias proteínas del sistema transportador de ferricromo, altera la función fisiológica de FhuA y la exclusión de fagos FhuA-dependientes.

5. OBJETIVO

Determinar la localización celular de Cor y su interacción con proteínas de OM asociadas a la Sie de fagos FhuA dependientes.

5.1 Objetivos particulares

- I. Añadir una bandera de seis Histidinas en el extremo carboxilo terminal del gen *cor* para el seguimiento de la proteína procesada en su extremo amino terminal.
- II. Realizar mutaciones en la posible secuencia señal (SS) de lipoproteínas del gen *cor* y en los aminoácidos conservados para determinar su modificación postraduccional y reclutamiento en membrana.
- III. Sobreexpresión de Cor y sus mutantes, purificación de Cor silvestre.
- IV. Separación de proteínas de IM y externa para la localización de Cor y sus mutantes.
- V. Determinar si Cor interacciona con proteínas Cor mediante un ensayo de tipo "Overlay".
- VI. Copurificación de Cor y análisis por espectrofotometría de masas para identificar las proteínas copurificadas.
- VII. Determinar in vivo si la participación de las proteínas identificadas en el objetivo VI es crucial para la Sie de fagos FhuA dependientes.

6. MATERIALES Y METÓDOS

6.1 Bacterias, bacteriófagos y plásmidos

Las cepas bacterianas, bacteriófagos y plásmidos utilizados en este trabajo, están enlistados en la Tabla S1. Todas las cepas son derivadas de la *E. coli* K-12. La cepa W3110 se utilizó para la propagación de fagos y para los ensayos de exclusión, la cepa C600 (*fhuA*-) sirvió como control negativo en la infección de fagos FhuA dependientes, la cepa XL1-blue (para Fenotipo ver Tabla 21) se utilizó para la transformación y para la selección de plásmidos provenientes de la mutagénesis sitio dirigida, y la cepa BW25113 y las mutantes derivadas de la misma, pertenecen a la colección Keio [55], y se obtuvieron amablemente del Dr. Drimitis Georgellis. Los fagos mEp utilizados en este estudio pertenecen a la colección del Laboratorio y están descritos en Kameyama *et al.*, (1999) [42]. Los bacteriófagos λ , Φ 80 y HK022 fueron utilizados como controles de infección.

6.2 Medios y condiciones de crecimiento del cultivo

Los medios LB, TB, SOB, NZY y el medio de dilución TMG para fagos, fueron preparados de acuerdo a [56]. Para el crecimiento de las bacterias se utilizó el medio LB y las condiciones de cultivo se realizaron a 37°C, con agitación constante a 200 rpm. Para los experimentos de exclusión, se tomaron 300 μ l de células del cultivo de toda la noche (O/N) y se mezclaron con 3 ml de agar del medio TB suave, realizándose el tapiz en el mismo medio. Cuando se requirió, el medio fue suplementado con 100 μ g/ml ampicilina, 41 μ g/ml kanamicina y 14 μ g/ml cloranfenicol, concentración final (F.C.).

Tabla 6
Formulación y procedimiento para preparación de medios de cultivo

Medio	Reactivo	Gramos/ concentración	Procedimiento de preparación
LB líquido	Bacto triptona	10 g	Disolver los reactivos en agua destilada, ajustar a pH 6.8 con NaOH y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave.
	Bacto extracto de levadura	5 g	
	NaCl	5 g	
LB para cajas de petri	Bacto triptona	10 g	Disolver los reactivos en agua destilada, ajustar a pH 6.8 con NaOH y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave. Posteriormente vaciar de 25 a 30 ml en cajas de petri. En caso de requerir antibiótico, adicionarlo en la concentración necesaria cuando el medio esté a una temperatura de 50-55°C, previo al vaciado.
	Bacto extracto de levadura	5 g	
	NaCl	5 g	
	Agar	15 g	
SOB	Bacto triptona	20 g	Disolver los reactivos en agua destilada y paralelamente, preparar una solución 250 mM de KCl, de este stock se adicionan 10 ml por cada litro de medio a preparar. Ajustar a pH 7.5 y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave. Posterior a la esterilización, enfriar a 50-55°C y añadir 10 ml de MgCl ₂ 1M estéril
	Bacto extracto de levadura	5 g	
	NaCl	0.5 g	
	KCl	2.5 mM	
	MgCl ₂	10 mM	
Agar Suave	Bacto triptona	10 g	Disolver los reactivos en agua destilada, ajustar a pH 6.8 con NaOH aforar a un litro y distribuir alicuotas de 100ml, esterilizar en autoclave y almacenar a TA. El medio se funde previo al uso.
	Bacto extracto de levadura	5 g	
	NaCl	5 g	
	Agar	7 g	
Medio para "stabs"	Caldo nutritivo-Bacto	10 g	Disolver los reactivos en agua y calentar hasta fundir completamente el agar. Distribuir 3 ml de medio por vial y esterilizar. Realizar prueba de esterilidad después de la solidificación del agar. Cerrar perfectamente los viales para evitar la deshidratación.
	NaCl	8 g	
	Bacto Agar	6 g	
NZY	Extracto de levadura	5 g	Disolver los reactivos en agua destilada, ajustar a pH 6.8 con NaOH y aforar a un litro. Esterilizar en autoclave
	Triptona	10 g	
	NaCl	5 g	
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g	
	Bacto Agar	6 g	
TMG	Tris base	1.21 g	Disolver el tris base en agua y ajustar el pH 7.0; disolver la gelatina en agua caliente mezclar con la solución de tris, aforar a 1 litro, esterilizar en autoclave. Una vez atemperado adicionar 5 mL de solución 1m de MgSO ₄ .
	Gelatina	0.1 g	
	MgSO ₄	5 mM	

6.3 Aislamiento de ADN plasmídico

Los plásmidos se aislaron y se purificaron por el método de la lisis alcalina en “minipreps” [57]. 5 ml de un cultivo O/N se centrifugó a 12,000 xg por 15 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se resuspendió en 100 µl de una solución (50mM Tris clorhidrato pH8.0, 10 mM EDTA), previamente enfriada. Posteriormente se le agregaron 200 µl de solución II recién preparada (0.1% de SDS en 0.2N de NaOH), se mezcló suavemente, y se le agregaron 150 µl de la solución III (3.0 M acetato de potasio), y se agitó nuevamente. Se centrifugó a 12,000 xg por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se le agregó un volumen igual de la mezcla fenol: cloroformo (24:1), se agitó vigorosamente y se volvió a centrifugar 10 minutos a 12,000 xg 4°C, se extrajo el sobrenadante, y el ADN se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto, se mezcló suavemente y se dejó reposar a -20°C por una hora. Posteriormente el tubo se centrifugó a 12,000 xg 4°C por 15 minutos. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70% y posteriormente se secó a 55°C. El ADN obtenido se resuspendió en agua estéril y se almacenó a -20°C.

6.4 Inducción de Cor

El pie de cultivo se creció en medio NZY con 100 µg/ml de ampicilina concentración final (F. C.) y por O/N, se diluyó 1/100 y se monitoreó hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4, condición que se utilizó para inducir la expresión con 1 mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside SIGMA-ALDRICH), F. C. Para homogenizar la cantidad de la proteína total, las muestras se ajustaron a una OD_{600nm} de 1.0, el cultivo se centrifugó a 7,000 x g por 3 minutos, y se le adicionó 500 µl de Laemmli buffer (0.125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% de SDS, 2% glicerol, 0.1% 2-β-Mercaptoetanol, .01% azul de bromofenol).

6.5 Construcción del plásmido pPHCcor

A partir del plásmido pKINAM (Uc-Mass *et al.*, 2004), el gen *cor* de mEp167 fue restringido con las enzimas *EcoRI* (G[↓]AATTC) y *NspI* (RCATG[↓]Y) (NEB ENGLAND BioLabs®). La banda de ~300 pb fue escindida del gel y purificada utilizando las columnas Gel Extraction Kit (QIAGEN). Por otro lado, se hibridaron los oligonucleótidos complementarios Fw-CCHT y

Rv-CCHT (secuencias en Tabla S2) se mezclaron 100 pg de cada oligo y calentaron a 96°C cinco minutos, la temperatura fué disminuida hasta 26°C a intervalos de 5 grados menos cada tres minutos. La banda de ~300 pb previamente mencionada, y restringida con *EcoRI* y *NspI* fue ligada en el sitio *NspI* con la doble cadena de oligonucleótidos, para después amplificar el producto de ligación con los primers Fw-COR y el Rv-CCHT (secuencias en Tabla S2) utilizando la Taq ADN Polimerase (NEB ENGLAND BioLabs®).

Tabla 7
Condiciones de amplificación para cor

	Desnaturalización inicial	Ciclo de amplificación 25 ciclos			Amplificación final	Enfriamiento
		Desnaturalización	hibridación	amplificación		
Temperatura	94°C	94°C	62°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	5'	40''	30''	50''	4'	∞

El producto de la PCR se digirió con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, y se clonó en el vector de expresión pPROEX-1 [58], previamente digerido con las enzimas anteriores. Las ligaciones se incubaron de 16 a 24 horas a 16°C.

6.6 Construcción de mutantes

Para la construcción de las mutantes *corC17F*, *corA18D*, *corC17F-A18D*, *corA57E*, *corΔ57-59* y *corN62D* se empleó el método de la mutagénesis sitio dirigida de acuerdo al QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE); se utilizó el par de oligonucleótidos degenerados Fw-MUTC17A18 y Rv-MUTC17A18; para generar la mutante A57E se diseñaron los oligonucleótidos Fw-MUTA57 y Rv-MUTA57; para la delección de los aminoácidos 57-59 se utilizaron los oligos Fw D-Cor y Rv D-Cor y para la mutación de N62D los oligos Fw62-AACGAC y Rv62-AAC GAC. La secuencia de los oligonucleótidos se puede consultar en la Tabla S2. Una vez realizada la mutagénesis, el producto de la reacción se transformó en células XL1-Blue y se seleccionaron candidatas con fenotipo Cor-, se aisló ADN plasmídico de dichas clonas y el mismo se secuenció. Los cambios esperados se identificaron en la lectura del electroferograma.

Tabla 8
Condiciones de PCR para mutagenesis

	Desnaturalización inicial	Ciclo de amplificación 25 ciclos			Amplificación final	Enfriamiento
		Desnaturalización	hibridación	amplificación		
Temperatura	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	4°C
Tiempo	5'	30''	30''	6'	10'	∞

6.7 Electroforesis de geles de agarosa

En la electroforesis del ADN se utilizaron geles de agarosa del 1 al 1.5% con el buffer TAE 1X.

Tabla 9
Formulación y preparación de buffer TAE

Reactivo	Gramos	Concentración	Procedimiento de preparación
Tris base	4.84 g	40 mM	Mezclar el EDTA y tris base, adicionar aproximadamente 700 ml de agua destilada y agitar, adicionar el ácido acético, aforar a un litro.
EDTA	0.37 g	1 mM	
Ácido acético	1.1 ml	20 M	

6.8 Reacción de secuenciación y purificación del producto

La secuenciación se realizó según el protocolo del set BigDye® Terminator de Applied Biosystems.

Tabla 10
Condiciones de PCR para secuenciación

	Desnaturalización inicial	Ciclo de amplificación 40 ciclos			Amplificación final	enfriamiento
		Desnaturalización	hibridación	amplificación		
Temperatura	94°C	94°C	55°C	60°C	60°C	4°C
Tiempo	3'	30''	20''	4'	4'	∞

Terminada la reacción de secuenciación, se purificaron los productos para eliminar los nucleótidos y demás sustancias residuales. Cada reacción se colocó en un Eppendor de 1.5 ml y se le agregó 5µl de EDTA 125mM pH 8.0 y 60 µl de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C, se agitó en el vortex y se dejó precipitando a temperatura ambiente por 30 minutos. Se centrifugó 20 minutos a 13,000 xg, el sobrenadante se removió y se lavó dos veces con etanol al 70%, los tubos se secaron en la mesa por 10 minutos. Se guardaron a -20 °C hasta su uso.

6.9 Transformación

Para obtener las células competentes, el cultivo se creció en el medio SOB. La transformación química se realizó según el método descrito por Hanahan (1985) [59]. Las bacterias provenientes de las preparaciones químicas, así como las eletro-competentes, primero se congelaron en hielo seco a -20°C , y después se llevaron a -70°C , hasta su posterior uso. En la electroporación, las células fueron preparadas según Hanahan *et al.*, 1991 [60]. Se tomó una alícuota de $19\mu\text{L}$ de células electro-competentes, se colocaron en la celda de electroporación (previamente enfriada), se le adicionó $1\mu\text{l}$ del ADN plasmídico, o de la mezcla de ligación, se mezcló lentamente, y se incubó ~ 20 min, en el hielo. La celda se colocó en la cámara de electroporación, del aparato CELL-PORATOR[®], (Gibco BRL Technologies), y se dio un pulso eléctrico, con carga de $200\ \Omega$, una capacitancia de $1180\ \mu\text{F}$ y una tensión de refuerzo (Voltaje booste) de $4\ \text{K}\Omega$, por un lapso de 20-100 milisec. La muestra se retiró y se colocó en un vial estéril, con 1 ml de medio LB y su antibiótico y se llevó a 37°C con agitación lenta por una h, para después espatular la mezcla transformante, en cajas con medio agar Luria.

6.10 Propagación de fagos y ensayo de exclusión por goteo

La propagación de fagos se realizó según lo descrito por Kameyama *et al.*, 1999, las bacterias lisógenas W3110 (mEp) se sembraron en cajas de LB, se tomó una colonia aislada y se sembró en 3 ml de medio LB líquido a 37°C , O/N. El cultivo se centrifugó a 4,000 RPM por 10 minutos. En una caja de medio LB se escurrieron $20\ \mu\text{l}$ del sobrenadante en diagonal a partir del extremo superior, se dejó secar a temperatura ambiente y se vertió una suspensión de $300\mu\text{l}$ de cultivo de W3110 O/N en 3 ml de medio agar suave atemperado a $55^{\circ}\text{C} \pm 5$, después de que el medio solidificó, se verificó que el tapiz formado estuviera homogéneo, las cajas se incubaron a 37°C , hasta que la presencia de placas líticas fué visible. Con una pipeta Pasteur estéril se tomó una placa y se depositó en un matraz Erlemeyer con $300\mu\text{l}$ de un cultivo O/N de W3110, después de 15 minutos de haber dejado la placa en el medio se agregaron 15 ml de medio LB líquido y se incubó a 37°C con agitación constante (200 RPM) hasta que fué visible la lisis celular (aproximadamente seis horas). En ese momento se agregaron $500\mu\text{l}$ de cloroformo, se incubó 15 minutos más a 37°C , procurando no arrastrar cloroformo el cultivo

se vertió en un tubo estéril y se centrifugó a 4,000 RPM por 15 minutos, el sobrenadante (suspensión de fagos) se almacenó en tubos estériles a 4°C. Cada stock se considera adecuado cuando su título está por arriba de 10^9 UFP/ml, en caso contrario se realizó una nueva propagación. Para verificar la pureza de los “stock” se realizaron diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} , y se gotearon sobre un tapiz de su lisógena.

El ensayo de exclusión se realizó de acuerdo a Kameyama *et al.*, 1999 [42], a partir de un cultivo O/N de la cepa a ensayar se tomaron 300 μ l y se mezclaron con 3 ml de medio Agar suave, la suspensión formada se vertió en una caja de Petri de medio agar suave a temperatura ambiente, la caja se deja entreabierta por 10 minutos o hasta que solidifique por completo, una vez que el tapiz está formado se revisó que estuviera homogéneo y se gotearon 10 μ l las diluciones de fagos a ensayar.

6.11 Obtención de membranas citoplasmática y externa

Para la obtención de la membrana citoplasmática y externa, primeramente, se procedió a la obtención de la fracción membranal total. De 1 L de cultivo bacteriano inducido por 1 h, las bacterias se cosecharon por centrifugación. La pastilla se resuspendió en 12 ml de buffer NTI-10G descrito en Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (QIAGEN), y se le adicionaron 12 mg de lisozima, 1 μ l de Benzonase® Nuclease recombinant y Protease Inhibitor Cocktail al 2% [todos los reactivos fueron de (SIGMA-ALDRICH)]. Esta suspensión se incubó por 1 h en hielo. Después se sonó con 3 pulsos de 30 seg cada uno a 12 micrones de amplitud en el sonicador (Soniprep 150). El lisado se clarificó centrifugando a 8,000 x g por 10 min, el sobrenadante se recuperó en un tubo (Ultra-Clear™ 13 x 51mm), y se ultracentrifugó a 100,000 x g por 45 min a 4°C. Terminado el proceso, el sobrenadante correspondió a la fracción citoplasmática y la pastilla a la membranal. Para solubilizar la membrana citoplasmática, el procedimiento fue: La pastilla de la fracción membranal se lavó 3 veces con buffer NTI-10G, y se resuspendió en el mismo buffer, pero ahora adicionado dodecil sarcosinato de sodio (Sarcosyl) al 0.5%. Esta suspensión se incubó 30 min, con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 100,000 x g por 45 min., a 4°C. El sobrenadante correspondió a la membrana citoplasmática y el precipitado a la OM. Antes de recuperar la pastilla, esta se lavó 3 veces con buffer NTI-10G.

6.12 Purificación de la proteína Cor

La fracción membranal de W3110/pPHCCor se solubilizó durante 3 h. con agitación constante a 4°C en buffer NTI-10G (20 mM Tris base, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0.04% Azida de Sodio y 10% Glicerol) con 20 mM de n-Dodecyl β -D-maltoside (SIGMA-ALDRICH). La suspensión obtenida se centrifugó a 12,000 x g por 30 min. La fracción soluble es en la que están las proteínas de membrana solubilizadas, ésta se decantó y se congeló a -70°C. Por otro lado, se preparó una columna de 12 x 0.5 cm con una cama de perlas de Ni-NTA agarose Superflow, de 4 cm, se enjuagaron con 6 ml de agua miliQ, por cada ml de suspensión de perlas, y se equilibró con un volumen de buffer NTI-10G adicionado con 20 mM de n-Dodecyl β -D-maltoside. La mezcla de proteínas membranales se pasó a través de la columna a un flujo de 0.5 ml/min, después se lavó con 10 vol. de buffer NTI-25G (25mM de imidazol), dependiendo del volumen de extracto pasado por la columna. Se eluyó con un gradiente de NTI-50G a NTI-500G (500 mM de imidazol) a un flujo de 0.5 ml/min.

6.13 Diálisis de proteína

La proteína purificada se colocó en una membrana (Spectra MWCO 3.5 kD) y se dializó con buffer 20 mM de Tris HCl, 200 mM de NaCl, 50 mM de NaH₂PO₄, 0.004% de azida de sodio y 5% de glicerol, a un pH de 7.2 final. La proteína dializada se conservó a -70°C hasta su uso.

6.14 Ensayo tipo Overlay

Primeramente, las muestras de proteínas se corrieron en geles de Tricina-SDS, según la técnica descrita por Schägger y Jagow (1987) [61], en geles de 1mm de espesor, el Voltaje inicial de corrimiento fue de 20V, después se dejó correr toda la noche a 90V. Para la tinción de geles de poliacrilamida, se fijó el gel por 10 min en solución 50% de metanol y 10% de ácido acético. Después se tiñó con 0.1% de Blue R-250 Comassie Brilliant, 50% de metanol y 10% de ácido acético. El exceso de colorante se eliminó enjuagando el gel con una mezcla de 40% de metanol y 10% de ácido acético. Para la electrotransferencia se utilizó la membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL), y se siguió el método descrito por Towbin *et al.*, (1979) [62]. Se verificó agregando a la membrana una mezcla de colorante (Ponceau S 0.33% y 0.03% de

ácido acético), el exceso de colorante se eliminó con buffer de fosfatos. Para la inmunodetección: Después de la electrotransferencia, la membrana se bloqueó por 2 h con leche descremada al 5% en PBS 7.4 (137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ y 1.8 Mm de KH₂PO₄) adicionado 0.05 % Tween 20. Para eliminar el exceso de leche se le dieron 3 lavados con PBS de 5 min cada uno. Después se incubó por 2 h. con el anticuerpo primario diluido en PBS y 1 h con el anticuerpo secundario. Para la incubación del anticuerpo secundario, al buffer de PBS se le adicionó 0.25% de gelatina, 5.5 mM de EDTA pH 8.0 y 0.1% de Tween 20. Después de incubar cada anticuerpo con la membrana, ésta se lavó 3 veces por 15 min, cada vez. Las diluciones utilizadas para los anticuerpos fueron: anti polihistidinas 1:3,000; anti_raton 1:5,000; anti_lamB 1:8,000; y anti_conejo 1:15,000. Para revelar se utilizó SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Termo Scientific).

El Overlay se realizó como lo reporta Cruz *et al.*, (2009) [63], con algunas modificaciones. El gel de poliacrilamida fue preparado sin SDS, según lo descrito por Jansen *et al.*, (2000) [64]. Después de la transferencia, la membrana fue bloqueada y se le adicionó la proteína Cor previamente purificada y dializada en buffer de fosfatos con 0.004% de azida de sodio, se incubó por 12 h a 4°C, Después se realizaron los lavados para eliminar el exceso de proteína e interacciones inespecíficas, y la membrana se incubó con anti-poliHistidine (SIGMA) por 2 h, se realizaron los lavados y posteriormente la membrana se volvió a incubar con anti_mouse (Amersham).

6.15 Ensayo de la Copurificación

Primeramente, se tomó una alícuota de 200 µl de Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (QUIAGEN), se separó de la solución de conservación y las perlas se equilibraron en buffer NTI-10G adicionado con 20 mM de n-Dodecyl β-D-maltoside, y se incubaron con el buffer por 30 min a temperatura ambiente. Las perlas se sedimentaron utilizando la gradilla magnética de separación. En el tubo que contenía las perlas, se agregaron 200 µg de extracto membranal con 0.05% Tween 20, el volumen se ajustó a 500 µl con el mismo buffer y la mezcla se incubó 2 h a 4°C. Terminada la incubación, las perlas se sedimentaron y se hicieron 4 lavados con 500 µl de buffer NTI-50G adicionado con Tween 20 y n-Dodecyl β-D-maltoside, a las concentraciones antes referidas. Finalmente, todo el buffer del último lavado

se retiró y las perlas se mezclaron con Laemmli buffer, se hirvieron por 8 min y se cargaron en gel de acrilamida.

6.16 SDS PAGE

Los extractos de proteína se cargaron en un gel de acrilamida de 1mm, de espesor Tris – Tricina. El porcentaje de preparación del gel se indica en cada figura; después del corrimiento, el gel se fijó con ácido acético al 10% y se tiñó con azul de Coomassie. Las soluciones y volúmenes utilizados para la preparación de geles se muestran en la siguientes Tablas (tomadas de A Practical Guide to Membrane Protein Purification, Capítulo 3 Denaturing Electrophoretic Techniques Hermann Schägger).

Tabla 11
Concentración de las soluciones Stock para la elaboración de geles Tri-Tricina-SDS PAGE^a

Buffer	Tris(M)	Tricina (M)	pH	SDS%
Anodo 10X	1.0	-	8.9 ^b	-
Catodo 10x	1.0	1.0	8.25 ^c	1.0
Buffer de gel 3x	3.0	-	8.45 ^b	0.3
AB-mix ^d	Acrilamida (g/100ml)		Bisacrilamida (g/100ml)	
S (49.5% T, 3% C)	48		1.5	
H (49.5% T, 6% C)	46.5		3.0	

^aLas soluciones de acrilamida se mantienen en refrigeración y protegidas de la luz.

^b El pH se ajusta con HCl,

^c No requiere ajustar el pH per se su pH es 8.25

^d AB-mix S, solución de acrilamida-bisacrilamida estándar; AB-mix H, solución de acrilamida-bisacrilamida con alto cross-linker concentración.

% T, concentración total de ambos monómeros

% C, porcentaje relativo de cross-linker

Tabla 12
Composición de geles, concentrador, espaciador y separador

	Gel concentrador	Gel espaciador	Gel separador		
			10% T 3% C	16.5% T 3% C	16.5% T 6% C
AB-mix S	1 ml	3 ml	6 ml	10 ml	-
AB-mix H	-	-	-	-	10 ml
Buffer de gel 3x	3 ml	5 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Glicerol	-	-	3 g	3 g	3 g
Agua csp	12 ml	15 ml	30 ml	30 ml	30 ml
APS (10%) ^a	90 µl	80 µl	150 µl	100 µl	100 µl
TEMED ^b	8 µl	8 µl	15 µl	10µl	10µl

^a Persulfato de amonio de preparación reciente

^b Tetrametiletlenamina

Tabla 13

Formulación y procedimiento para preparación de soluciones para SDS-PAGE y tinción de membranas.

Solución	Reactivos	Gramos/ concentración	Procedimiento de preparación
PBS 1X	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	8 g 0.2 g 1.44 g 0.24 g	Disolver los reactivos en agua destilada y aforar a un litro. En caso de ser necesario esterilizar en autoclave.
Solución de fijación	Metanol Ácido acético Agua	50% (v/v) 10% (v/v) 40%	Mezclar todos los reactivos.
Solución de tinción azul de comassie	Metanol Coomasie brillant blue R-250 Ácido acético Agua	50% (v/v) 0.1% (w/v) 10 % 40%	Disolver el reactivo Coomasie brillant blue R-250 en metanol, adicionar el ácido acético y aforar con agua.
Solución de desteñido	Metanol Ácido acético Agua	40% (v/v) 10% (v/v) 88%	Mezclar todos los reactivos. Estable por aprox 1 mes a temp ambiente
Solución de conservación	Ácido acético	5 %	Mezclar el ácido acético con el agua.
Ponceau S	Ponceau S Ácido acético	0.033 g 0.3 ml	Mezclar el ácido acético con el Ponceau S hasta disolver por completo, aforar a 30 ml con agua miliQ.

6.17 Análisis de espectrometría de masas.

Las porciones de SDS-PAGE conteniendo la proteína se digirieron en gel con Tripsina, de acuerdo con el protocolo modificado de Shevchenko *et al.*, 2006 [65]. Las bandas de proteína escindidas del gel se lavaron con una solución mixta de ácido acético al 5% y metanol al 50%, durante 12 h. Los fragmentos se lavaron con agua Milli-Q, se sumergieron en una solución de bicarbonato de amonio 100 mM durante 10 minutos y se deshidrataron con acetonitrilo al 100% en seco al vacío. Para reducir las proteínas, se usó DTT 10 mM, y se alquiló la Cisteína con Iodoacetamida 100 mM en bicarbonato de amonio 100 mM. La digestión en gel se realizó con 600 ng de Tripsina grado espectrometría de masas (Promega, Madison, WI, EE. UU.), en bicarbonato de amonio 50 mM durante 12 h 25 ° C la extracción de péptidos se realizó por duplicado con ácido fórmico al 5% y acetonitrilo al 50% durante 30 minutos y se secaron al vacío y se suspendieron en 20 µl de ácido fórmico al 0,1%.

El análisis HPLC / MS/MS de péptidos tripsinizados se llevó a cabo utilizando un equipo nano-LC_ESI_MS/MS integrado, que consiste en un cromatógrafo líquido de ultra-rendimiento NanoAcquity (UPLC) (Waters, Milford, MA) acoplado al Espectrómetro de masas de alta definición Q-ToF SYNAPT G2 (Waters, Milford, MA) y equipado con una fuente de iones NanoLockSpray. El solvente binario utilizado fue: fase móvil A (mph-A) (ácido fórmico al 0.1% con 2% de acetonitrilo en agua Milli-Q) y para la fase móvil B (mph-B) (0.1% de ácido fórmico con 98% de acetonitrilo en Milli-Q agua). Los péptidos tripticos se concentraron y se desalaron en línea mediante inyección en una columna de trampa Symmetry C18 UPLC (Waters, Milford, MA) a una velocidad de flujo de 5 μ l/min con 1% mph-B. Después de 3 minutos, la columna de trampa se cambió a la línea de columna analítica. Los péptidos se separaron en una columna BEH, C18 UPLC (Waters, Milford, MA), usando un gradiente lineal de 3-40% mph-B, en un intervalo de 30 minutos, a un caudal de 0,3 ml/min, seguido de un enjuague de 10 minutos con 95% mph-B. La columna se volvió a equilibrar en condiciones iniciales, pero con 3% mph-B durante 25 minutos.

El espectrómetro de masas se calibró con una solución NACS (espectrómetro de composición de atmósfera neutra) (rango de masas: 50 a 2000 Da) y se operó en modo V positivo (ionización por electrospray) a una resolución de 10,000 de ancho completo y a altura media máxima (FWHM). Los espectros se adquirieron de modo automático con la adquisición dependiente de datos (DDA). Los archivos RAW generados, que contienen espectros de MS y MS/MS, fueron deconvolucionados y comparados utilizando el software ProteinLynx Global SERVER versión 2.4 (PLGS) (Waters, Milford, MA), contra la base de datos *E. coli* K 12 (<http://www.Uniprot.org/>), y MASCOT (Versión 1.6b9, Matrix Science, Londres, disponible en <http://www.matrixscience.com>) para investigar algoritmos y lograr la búsqueda para la identificación de proteínas.

7. RESULTADOS

7.1 Construcción del plásmido pPHCcor.

Con el objetivo de tener una “etiqueta” con la cual, se pudiera detectar por inmunodetección y purificar por afinidad a la proteína Cor, la secuencia del gen se analizó en el servidor NEBcutter V2.0 para identificar un sitio de restricción lo más cercano al extremo 3' y clonar en esa posición la bandera de Histidinas; en la Figura 12 se indica la presencia de un sitio de restricción para *NspI* (CATG) que va del nucleótido 224 al 227, solo antes de 7 nucleótidos restantes 5' TAAATAA3', donde TAA es el codón de paro. Se diseñaron los oligos Fw-CCHT y Rv-CCHT, el oligo Rv-CCHT (ver Tabla S2), deja en su extremo 3' terminal la secuencia 5'-CATG-3' de 4 nts de cadena sencilla (sitio de reconocimiento de la enzima *NspI*), en adición, los oligos complementarios presentan las bases que codifican para 6xHis, el codón de paro TAA, un sitio de corte para *BamHI* (G[↓]GATCC) y el sitio *HindIII* (A[↓]AGCTT).

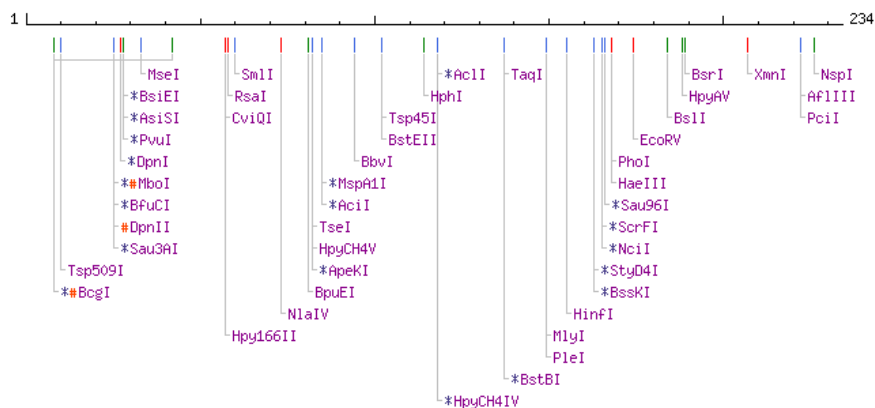


Figura 12 Análisis de la secuencia de *cor* en NEBcutterV2.0. Ubicación de los sitios de restricción en la secuencia de *cor*; a partir del nucleótido 224 al 227 se identificó el sitio de restricción para *NspI*.

La clonación de los oligonucleótidos hibridados se diseñaron para realizarla sobre el plásmido pKINAM (Uc-Mass *et al.*, 2004), sin embargo la restricción con *NspI* generó un patrón de 5 bandas Figura 13 (A) carril 4, (por la presencia de otros cuatro sitios *NspI*) en el plásmido (que previamente no se habían contemplado), por tal motivo se decidió cambiar la estrategia y se escindió el gen *cor* a partir de pKINAM con *EcoRI* y *NspI*, para después ligarlo con los oligos previamente hibridados. En la Figura 13 (A) se observa el patrón de corrimiento de pKINAM, carril 2 sin restringir, carril 3 con *EcoRI*, carril 4 con *NspI*, carril 5 con *EcoRI* y *NspI*, la banda de interés es la que migra a 250 pb aproximadamente, esta se escindió del gel y se purificó con

la columna de adsorción para ADN Gel Extraction Kit (QIAGEN®). El fragmento purificado se ligó con la doble cadena de oligonucleótidos Fw-CCHT y Rv-CCHT, el producto de ligación se amplificó con los primers Fw-cor y el Rv-CCHT Figura 13 (B). El producto de la PCR se digirió con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* y se ligó en el vector de expresión pPROEX-1 [58], previa restricción con las enzimas antes mencionadas; la mezcla de ligación se transformó en W3110. De las clonas obtenidas se realizó la PCR a ocho colonias (Figura 13 C).

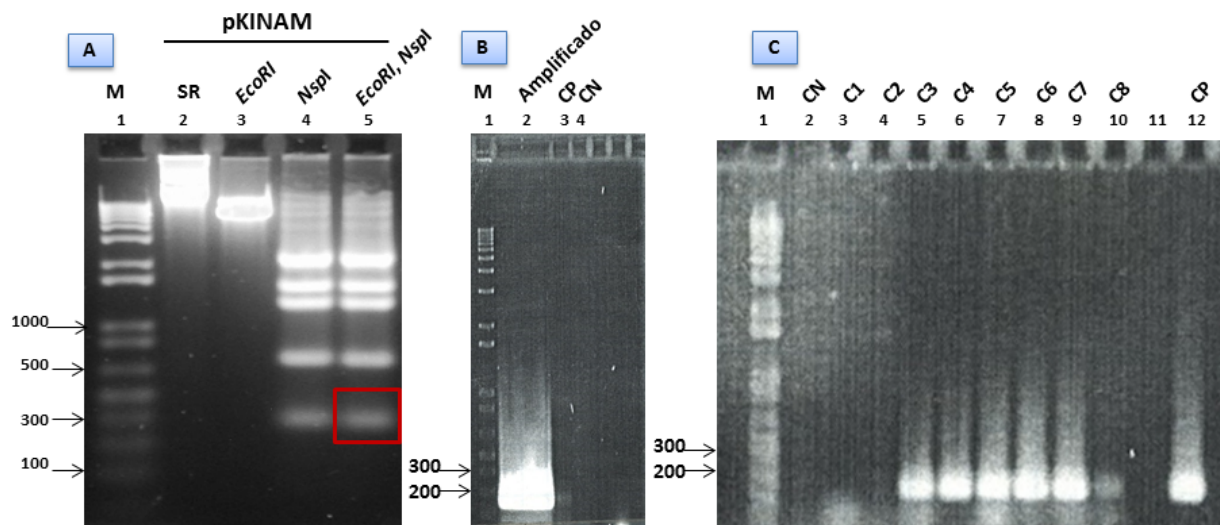


Figura 13 Clonación del fragmento de ADN que contenía el gen *cor* con las Histidinas adicionales e inserción en el plásmido de expresión pPROEX-1. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. (A) Digestión de pKINAM. Carril 1, marcador de peso molecular (M); carril 2, sin restringir (SR) usado como control; carril 3, con *EcoRI* el plásmido se observa linealizado; carril 4, con *NspI* corte en la secuencia de *cor* y en los cuatro sitios *NspI* del plásmido; carril 5, doble digestión *EcoRI* y *NspI*, la banda de interés ~300 pb se resalta con un cuadrado rojo. (B) Amplificación de *cor*. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, amplificado de *cor* con los oligonucleótidos Fw-*cor* y Rv-CCHT; carril 3, control negativo de reacción. Se amplificó el producto de la ligación de *cor* digerido con *EcoRI/NspI* y ligado con los oligonucleótidos Fw-CCHT y Rv-CCHT. (C) PCR de colonia de clonas transformantes. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo (CN) de reacción; carriles 3 a 10 producto de PCR de clonas candidatas con amplificación positiva en las clonas 3 a 7; carril 12, control positivo (CP) de reacción.

De las clonas positivas que por PCR se amplificó *cor*, se purificaron seis. La expresión de Cor se evaluó goteando diluciones de fagos FhuA dependientes sobre el tapiz bacteriano de cada una de éstas, observándose la Sie. Se purificó el ADN plásmidico de una cepa que excluyó a los fagos FhuA dependientes y se secuenció el inserto utilizando el oligonucleótido Fw-pPROEXsec (ver Tabla S2), después de verificar el marco de lectura en el electroferograma (Figura S1), a dicho plásmido se le identificó como pPHCcor. Este plásmido presenta dos banderas de Histidinas, una proveniente del vector, localizada dos codones río abajo del codón

de inicio [58]. El 6xHis se expresa junto con la región de clonación múltiple y el sitio de reconocimiento de la proteasa rTEV, la cual traduce un péptido de 28 a.a, previo al codón de inicio para la Metionina de Cor. La otra bandera de Histidinas está en la región COOH terminal de la proteína, adyacente al sitio *NspI*. El plásmido pPHCcor presentó características similares al plásmido pKINAM, su expresión no alteró el crecimiento de la bacteria, y la función biológica de Cor a la Sie fue equivalente (véase Tabla 14).

Tabla 14
Fenotipo de Sie del plásmido pPHCcor

CEPA	Grupo de Inmunidad Receptor requerido para infectar	BACTERIOFAGOS				
		mEp 167	HK022	mEp506	mEp409	mEp173
		VI	HK022	XV	VII	VII
		FhuA	FhuA	FhuA	LamB	FhuA
W3110		+++	+++	+++	+++	+++
W3110/pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
W3110/pKINAM		-	-	-	+++	-
W3110/pPHCcor		-	-	-	+++	-

+++ Formación de placas de lisis

- Sin formación de placas de lisis

7.1.2 Inducción de Cor

Para evaluar el tiempo al que se expresa Cor a partir del plásmido pPHCcor post inducción, se tomaron muestras del cultivo inducido con IPTG y de los cultivos control a diferentes tiempos. Como controles se utilizaron las cepas, W3110, W3110/pPROEX y W3110/pPHCcor sin IPTG. Las muestras se cargaron en un SDS-PAGE, Figura 14(A). Se visualiza la acumulación de una proteína a partir de la hora uno post inducción con IPTG entre los marcadores de 5 y 15 kDa, esta se mantiene constante hasta las ocho horas que se siguió la inducción, el peso esperado de la proteína inducida es de 9 kDa. Figura 14 (B) Inmunodetección con el anticuerpo poli-Histidinas. En los carriles 6 al 10 (que corresponden al extracto de proteína inducida con IPTG a diferentes tiempos) se observan dos bandas, la superior o de mayor peso molecular corresponde a la proteína con dos banderas de Histidinas, la expresada a partir del plásmido que va desde el codón de inicio inmediato al SD del plásmido se expresa junto con un péptido de 28 aminoácidos antes de la Metionina de inicio de Cor, y la otra bandera de Histidinas esta cercana al extremo carboxilo de la proteína Cor. Por lo que la banda que migra

más (con un peso molecular menor) corresponder a la proteína madura que solo tiene la bandera de Histidinas próxima al carboxilo terminal. Según lo descrito para lipoproteínas por Hayashi y Wu, 1990 [39]; Tokuda y Matsuyama, 2004 [40] los primeros 16 a.a.(péptido señal) de la prolipoproteína se escinden después de que en la Cisteína 17 se forma un enlace tióéster entre el grupo sulfidrilo y un diacilglicerol, reacción catalizada por la prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Lgt); y el péptido señal es escindido por la lipoproteína señal peptidasa (LspA o Señal peptidasa II), por último la transacilasa de fosfolípidos / apolipoproteína transacilasa (Lnt) efectúa la aminoacilación en la misma Cisteína que pasa a ser el primer a.a. de la Lipoproteína madura.

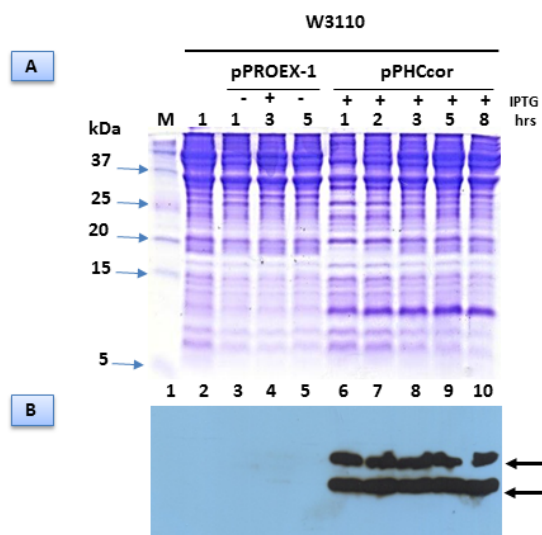


Figura 14 Sobreexpresión de Cor en W3110/pPHCcor. (A) SDS-PAGE del extracto total. Gel tris-tricina al 16.5% T, 6% C, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular; los extractos de proteína total se cargaron en los carriles 2 al 10, carril 2, W3110; carriles 3 y 4 W3110/pPROEX sin y con IPTG, respectivamente; carril 5, W3110/pPHCcor 5 horas sin inducción, carriles 6 al 10 W3110/pPHCcor con IPTG 1, 2, 3, 5 y 8 horas respectivamente. Entre los marcadores de peso de 5 y 15 kDa se observa la sobreproducción de una proteína. (B) Western blot de Cor. La expresión de Cor es detectada por el anticuerpo polihistidinas se manifiesta por la presencia de dos bandas en la placa. Las flechas indican la posición del péptido sobreexpresado.

7.2 Mutagénesis de pPHCcor para generar las mutantes C17F, A18D, C17FA18D, A57E, N62D, S62R y Δ 57-59

El análisis bioinformático de Cor_{mEp167} muestra que en la porción NH₃ terminal, porta la secuencia LSGC del lipobox, característico de la secuencia señal (SS) de lipoproteínas de membrana [LVI][ASTVI][GAS]C, reportada por Konovalova y Silhavy (2015) [66]. Con la finalidad de indagar la posible modificación post-traducciona que sufre Cor, se realizó la

mutagénesis sitio dirigida, según lo reportado por Hayashi y Wu (1990) [39] (ver materiales y métodos), de la secuencia señal LSGC, en la Cys17 (posición +1), en la Ala18 (posición +2) y la doble Cys17-Ala18; en dominio conservado las mutaciones Ala57Glu, Asn62Asp, Ser67Arg y la delección de los aminoácidos 57-59. Los oligonucleótidos utilizados para cada reacción se enlistan en la Tabla S2. En la Figura 15 se observa el producto de PCR de la mutagénesis sitio dirigida, este se transformó en células XL1-Blue; de las clonas transformantes se aisló una de cada reacción, el ADN plasmídico se purificó y se secuenció, el marco de lectura y el cambio de nucleótidos para las mutaciones C17F, A18D, C17FA18D, Δ 57-59, N62D y S67R, se verificaron por los electroferogramas, Figuras S2 al S7, respectivamente.

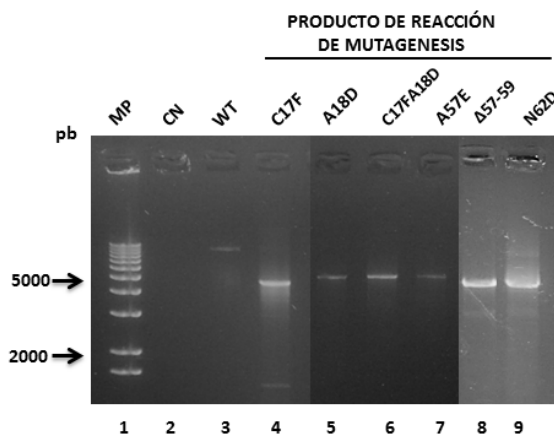


Figura 15 Producto de la PCR de la reacción de mutagénesis. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El plásmido pPHCcor se mutagenizó con el QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE). 5 μ l de la reacción se cargaron en gel. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo (CN); carril 3, plásmido silvestre (WT); carril 4, amplificado de C17F; 5 amplificado A18D; carril 6 amplificado C17FA18D; carril 7, amplificado A57E; carril 8, Δ 57-59; carril 9, N62D.

Los tapices de las mutantes en la región “lipobox” mostraron un crecimiento “difuso” (datos no mostrado), por lo que se cuantificó la absorbancia a OD_{600nm} respecto al tiempo post-inducción de las proteínas mutantes, como controles pPROEX-1 y pPHCcor; en la Tabla 15 se muestran los valores de absorbancia obtenidos.

Tabla 15
Valores de absorbancia a OD_{600nm} de Cor silvestre y mutantes

TIEMPO EN HORAS Post-inducción	W3110/				
	pPROEX-1	pPHCcor	pPHCcorC17F	pPHCcorC17FA18D	pPHCcorA18D
0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
1	1.059	0.856	0.481	0.476	0.539
2	1.498	1.211	0.493	0.57	0.664
3	1.88	1.497	0.497	0.644	1.048
4	2.49	2.114	0.501	1.12	1.64
5	2.675	2.396	0.509	1.584	2

En la Figura 16 se muestran los graficas de los valores de absorbancia respecto al tiempo post-inducción, claramente se observa una inhibición en el desarrollo bacteriano cuando se sobreexpresan las proteínas mutantes, siendo la más drástica, la C17F.

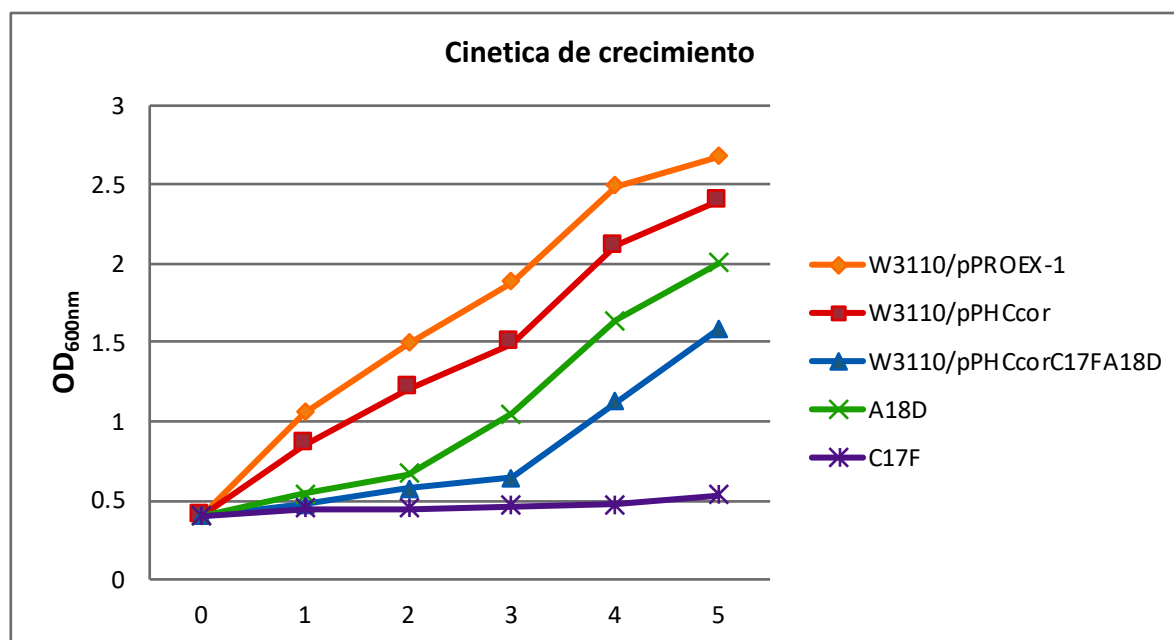


Figura 16 Grafica de cinética de crecimiento de Cor y mutantes derivadas. Se tomaron muestras post-inducción cada hora de los cultivos indicados y se midió la absorbancia a OD_{600nm}. En el eje de las X el tiempo en horas, en el de Y unidades de densidad optica a 600nm.

Para establecer el efecto de las mutaciones en la Sie se realizó el ensayo por goteo de los fagos FhuA dependientes con diferentes diluciones; se observó que todas las mutantes de *cor* presentaron el fenotipo Cor- (véase Tabla 16), o sea, los fagos FhuA dependientes se desarrollaron normalmente.

Tabla 16
Fenotipo de mutantes en Cor

CEPA	Receptor requerido para infectar	BACTERIOFAGOS				
		mEp167	HK022	mEp506	mEp409	mEp173
		FhuA	FhuA	FhuA	LamB	FhuA
W3110		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPHCcor		-	-	-	+++	-
W3110 / pPCcorC17F		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPCcorA18D		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPCcorC17FA18D		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPHCcorA57E		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPHCcorN62D		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPHCcorS67R		+++	+++	+++	+++	+++
W3110 / pPHCcorΔ57-59		+++	+++	+++	+++	+++

+++ Formación de placas de lisis

- Sin formación de placas de lisis

7.2.1 Western Blot de mutantes

Para evaluar si la infección con los fagos FhuA dependiente, de las cepas transformadas con los plásmidos mutantes se relacionaba con una baja o nula producción de la proteína, se realizó la inmunodetección con anticuerpos polihistidinas, de muestras de extracto total de proteínas a tres horas post-inducción. La Figura 17(A) muestra el gel de proteínas silvestre y mutantes; la Figura 17(B) el Western blot, cargado con las mismas muestra que en 17(A), se observa la presencia de dos bandas en los carriles 3, 5, 7, 8, 9 y 10 similar a lo observado en el Western blot de la inducción del Cor silvestre y una sola banda en los carriles 4 y 6 que corresponde a las mutantes C17F y la doble mutante C17FA18D indicando que la C17F no puede ser procesada. La cantidad de proteína en las mutantes es similar respecto a la visualizada en el Cor silvestre.

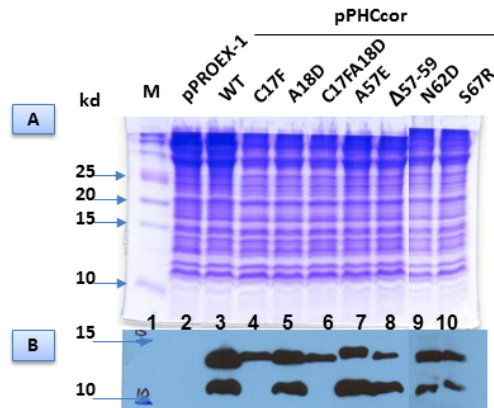


Figura 17 Expresión de proteína en la cepa W3110 con plásmidos mutantes de *cor*. (A) SDS-PAGE de extracto total 3 horas post-inducción. Gel tris-tricina al 16.5% T, 6% C, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular que se indican junto a las fechas; carril 2, pPROEX-1 (control negativo de expresión); carril 3, pPHCcor con la proteína silvestre; carriles 4 a 10, proteínas mutantes. (B) Western blot de Cor y mutantes. La expresión de Cor silvestre y mutantes es detectada por el anticuerpo polihistidinas y se manifiesta por la presencia de dos o una banda en la placa.

7.3 Cor es una proteína de membrana.

En un trabajo previo, Uc-Mass *et al.*, (2004) reportaron que células que expresan a Cor^+ , comparadas con las Cor^- , presentaron la misma tasa de adsorción para los fagos FhuA dependientes. Sin embargo, en cepas Cor^+ la formación de placas líticas fue nula. Cuando el ADN del fago fue introducido en las cepas Cor^+ , utilizando el método de la electroporación, se desarrolló la progenie viral, sugiriendo que la exclusión mediada por Cor, debe de ser a nivel de la envoltura celular, en la etapa inicial de la entrada del ADN a la célula; así la localización celular de Cor nos diría que tan importante sería la envoltura en la Sie.

Con la finalidad de determinar la localización de Cor en la célula, se realizó el fraccionamiento celular descrito por Aono *et al.*, 1997 [67], a partir de tres cultivos bacterianos W3310/pPROEX-1, W3110/pPHCcor y JW3996 (*lamB*⁻), en el gel de proteínas se cargó el extracto total clarificado, la fracción citoplasmática y la fracción membranal de cada cepa. En el Western blot de la Figura 18 (A), revelado con el anticuerpo anti-poli-histidinas se pueden observar las 2 configuraciones de Cor en las tres fracciones indistintamente (carriles 3, 6 y 9). En la porción citoplásmatica en menor proporción (carril 6) y en la fracción membranal muy enriquecida (carril 9). Para corroborar que la fracción membranal era la correspondiente, se realizó el Western blot con las mismas condiciones que las anteriores, pero utilizando en este caso, el anticuerpo anti_LamB Figura 18 (B). El anticuerpo anti_LamB detecta

indistintamente monómeros de LamB y OmpA (Ricci et al., 2012) [68]. Para asegurar la especificidad del anticuerpo, se utilizó la cepa control JW3996 (*lamB*⁻). En los carriles del extracto total clarificado de W3110/pPROEX-1, W3110/pPHCcor se observan las bandas de OmpA y LamB carril 2 y 3, y en el carril 4 correspondiente a JW3996 (*lamB*⁻) se observa solo la banda de OmpA. En la fracción citoplasmática carriles 5, 6 y 7, la señal es equivalente a la del extracto total, pero en una menor proporción. En la fracción membranal, se observa la señal con mucha mayor intensidad carriles 8, 9 y 10, y equivalentemente en el carril 10, no se aprecia la banda correspondiente a LamB. Este resultado indica que en el fraccionamiento celular, la separación de las fracciones, se hizo adecuadamente, y de que Cor se transporta a la membrana celular.

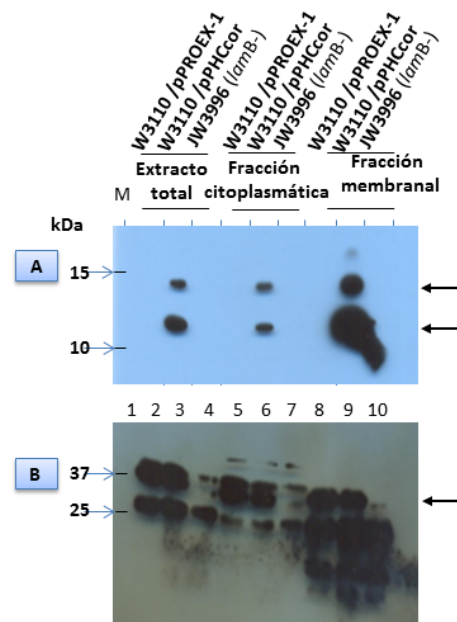


Figura 18 Localización intracelular de Cor. Western blot para Cor y maltoporina LamB de extracto total clarificado, fracción citoplasmática y fracción membranal (A) Las fracciones celulares reveladas con el anticuerpo poli-histidina, carril 1 marcador de peso; carriles 2, 3 y 4, extracto total clarificado de W3310/pPROEX-1, W3110/pPHCcor y JW3996 (*lamB*⁻) respectivamente; carriles 5, 6 y 7, fracción citoplasmática de W3310/pPROEX-1, W3110/pPHCcor y JW3996 (*lamB*⁻) respectivamente; carriles 8, 9 y 10, fracción membranal de W3310/pPROEX-1, W3110/pPHCcor y JW3996 (*lamB*⁻) respectivamente, las flechas indican la señal de Cor. (B). Western Blot con las mismas muestras que en A, pero reveladas con anti-LamB que reconoce además a OmpA, la flecha indica la señal de LamB y la banda inferior corresponde a OmpA. Los geles se prepararon al 10% T, 3% C, amortiguador tris-tricina.

7.3.1. Cor esta enriquecido en la fracción de OM

Según lo reportado para proteínas de membrana por Yamaguchi et al., (1988) [38], mutaciones en el péptido señal de la proteína y en el primer aminoácido de la proteína madura, limitan el procesamiento post-traduccional y modifican la localización celular respectivamente; el cambio en la Cisteína de la “lipobox” impide el procesamiento de la proteína y la presencia de un ácido Aspártico en la posición +2 de la proteína madura es responsable de permanencia en la IM. Las mutantes de Cor en dichas posiciones presentaron un fenotipo Cor- y para especificar la localización subcelular en OM o IM de Cor y las mutantes C17F, A18D y A57E a partir de la fracción total de membrana se solubilizó la IM con el detergente Sarcosil y por ultracentrifugación se separó la OM (ver material y métodos, sección 6.11).

El Western blot de la Figura 19 se reveló con anticuerpo anti-polihistidinas y se observa que la proteína madura (menor peso) de Cor y la mutante A57E están enriquecidas en la fracción de OM mientras que la mutante C17F está en mayor proporción en la IM.

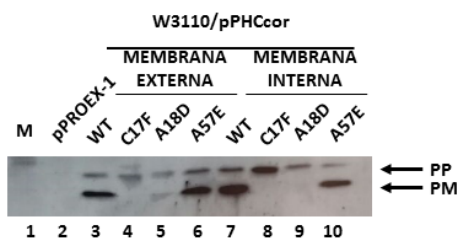


Figura 19 Western blot revelado con anticuerpo anti-polihistidinas. Carril 1, marcador; carril 2, fracción membranal de pPROEX-1, control negativo de señal; carriles 3 a 6 OM de Cor silvestre, mutantes C17F, A18D y A57E, respectivamente; carriles 7 a 10 IM de Cor silvestre, mutantes C17F, A18D y A57E, respectivamente. La flecha superior indica la preproteína (PP) y la inferior la proteína madura (PM). El gel tris-tricina se preparó al 16.5% T, 6% C.

7.4 Purificación de Cor

Con el propósito de tener la proteína Cor purificada para ser utilizada en experimentos posteriores, a partir de un litro de cultivo inducido se separó la fracción de membrana total y se solubilizó con n-Dodecyl β -D-maltoside, en la Figura 20 se observa el gel de proteínas teñido con azul de Comassie de muestras obtenidas durante el proceso de purificación,

corresponden al extracto de membrana total, solubilizada, “flow through”, lavados y a partir del carril 9 las fracciones eluidas de la columna.

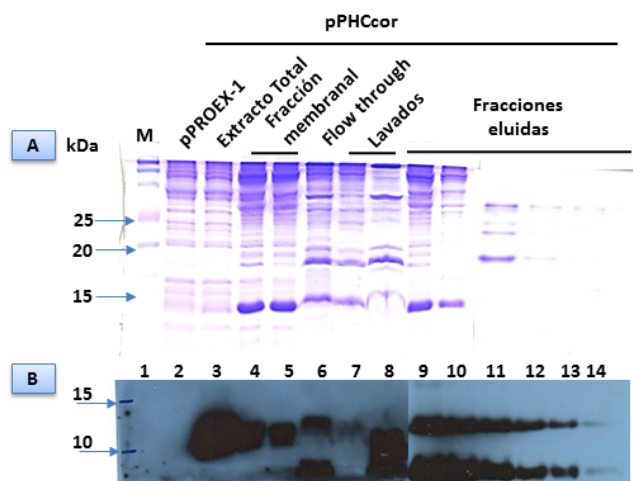


Figura 20 Purificación de Cor. (A) Proceso de purificación. SDS PAGE tris-tricina al 16.5% T, 3% C, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, (M) marcador de peso molecular que se indican junto a las fechas; carril 2, pPROEX-1 control negativo de expresión; carril 3, extracto total de W3110/ pPHCcor; carriles 4, 5, fracción membranal solubilizada; carril 6, “flow through”; carriles 7, 8, lavados; carriles 9 a 14 fracciones eluidas. (B) Western blot La expresión de Cor silvestre y mutantes es detectada por el anticuerpo anti-polihistidinas.

7.5 Cor reconoce fuertemente a una OMP que migra entre los 25 y 37 kDa

Para determinar si la exclusión mediada por Cor es el resultado de la interacción proteína-proteína, se realizó el ensayo de Overlay, según lo descrito por Cruz et al., (2009) [63], con algunas modificaciones (ver material y métodos). Los geles de poliacrilamida fueron preparados sin SDS, según lo descrito por Jansen et al., (2000) [64]. El gel se cargó con el extracto celular total clarificado, la fracción de OM y la fracción de membrana citoplasmática, de las cepas W3110, C600 (*fhuA*⁻) y C600/pUCJA (*fhuA*⁺) Figura 6.10 (A). Las dos fracciones membranales se obtuvieron después de solubilizar la fracción de membrana total (ver material y métodos). El gel se realizó por triplicado, uno para teñir, los dos restantes se transfirieron a membrana, de estas una se utilizó para inmunodetección de Cor y la otra para el ensayo de Overlay. En el carril 2 de la Figura 21 (B) y (C) en ambas placas se visualiza la señal de Cor, que fue utilizado como control positivo del ensayo. El Overlay de la figura 21 (C), que en resumen se realizó: primeramente, las proteínas fueron transferidas a la membrana, posteriormente fueron incubadas con Cor (6xHisCor6xHis y/o Cor6xHis), después con anticuerpo anti-polihistidinas y anti-raton y finalmente se reveló la

placa. En los carriles 2 al 4 se cargó la fracción total de membrana. En los carriles 5 al 7 se cargó la fracción de OM en estos carriles la intensidad de la señal es mayor respecto a los carriles en los que se cargó la fracción total de membrana. En los carriles 8 al 10 se cargó la fracción de IM (no presentó señal). La señal que se visualiza en los carriles 3 al 7, y entre los marcadores de PM de 25 y 37 kDa, es la afinidad que presenta Cor por una proteína específica de OM. Es de notar que en los carriles 5, 6 y 7 se utilizaron la fracción enriquecida de OM de las cepas W3110, C600 y C600/pUCJA (*fhuA+*), respectivamente. C600 (*fhuA-*) tiene una señal débil, sin embargo, la señal en W3110, es equivalente a C600/pUCJA (*FhuA+*).

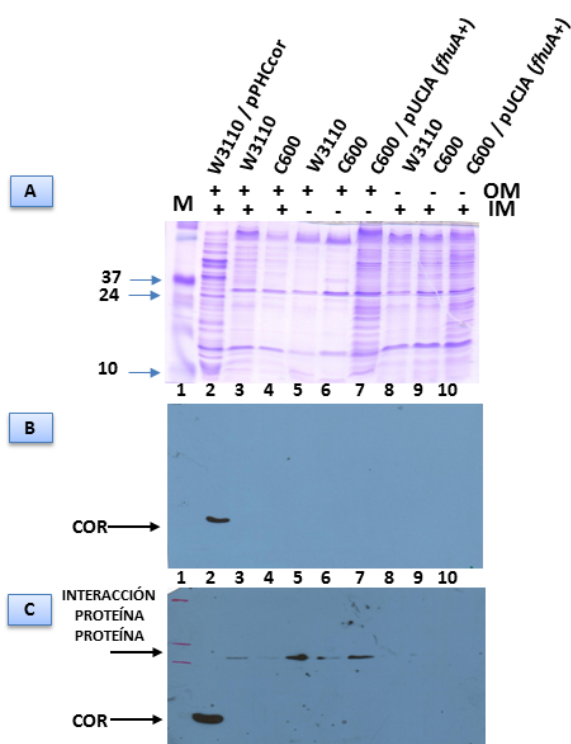


Figura 21 Overlay con Cor detectado con anticuerpo anti-polihistidinas. (A) SDS-PAGE 12%, teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2, 3, 4, membrana total (OM+,IM+) W3110/pPHCcor, W3110 y C600, respectivamente; carriles 5, 6, 7 fracción de OM+, W3110, C600 y C600/pUCJA(*fhuA+*) respectivamente; carriles 8, 9, 10 fracción de IM+ de W3110, C600 y C600/pUCJA(*fhuA+*). (B) Immunodetección para Cor se realizó con las mismas muestras y condiciones que el gel (A), la flecha indica la presencia de Cor, radiografía utilizada como control positivo de anticuerpo anti-polihistidinas. (C) Western Blot para el ensayo de Overlay de Cor. El ensayo fue realizado con las mismas muestras y bajo las mismas condiciones anteriores, con excepción de la incubación primaria con 6xHisCor6xHis y/o Cor6xHis. La flecha superior se relaciona con un péptido entre 25 y 37 kDa.

7.6 Seis proteínas de OM copurifican con Cor

Para identificar la proteína putativa que la lipoproteína Cor detectó en el ensayo de Overlay, se realizó el ensayo de Copurificación (ver material y metodos), En los carriles 2, 5 y 8 de la Figura 22 se observa el extracto de las proteínas de la fracción membranal de W3110, W3110/pPROEX-1 y W3110/pPHCcor, respectivamente que se utilizó para realizar el ensayo, en los carriles 3, 4, 6, 7, 9 y 10, se muestran las fracciones eluidas de proteínas de las bacterias

anteriores, las bandas de interés son las que solo se observan en los carriles 9, 10 y que no se observan en los otros carriles en que se cargó la elución de W3110, W3110/pPROEX-1. Las proteínas que se observan en todos carriles de las fracciones eluidas se consideraron como fondo. Las proteínas eluidas del extracto membranal de W3110/pPHCcor menores de 60 kDa fueron escindidas del gel SDS-PAGE y enviadas a identificar por espectrometría de masas LS_ESI_MS/MS. Las proteínas identificadas se muestran en la parte contigua de la Figura 22; todas son OMPs. Los péptidos identificados correspondieron para LamB, OmpC, OmpA, OmpW, Slp y a Cor. En los péptidos de LamB, OmpW y Slp se detectaron, además, los fragmentos de Cor que van del a.a. 57 al 77. La banda de migración más rápida se identificó como Cor, el porcentaje de cobertura fue del 58%, la secuencia reportada empezó en el a.a. 24 de Cor. El porcentaje de cobertura para los otros péptidos están descritos en la Figura 22. En un segundo ensayo de copurificación se identificó nuevamente a péptidos de OmpC, pero en adición, ahora a péptidos de OmpF.

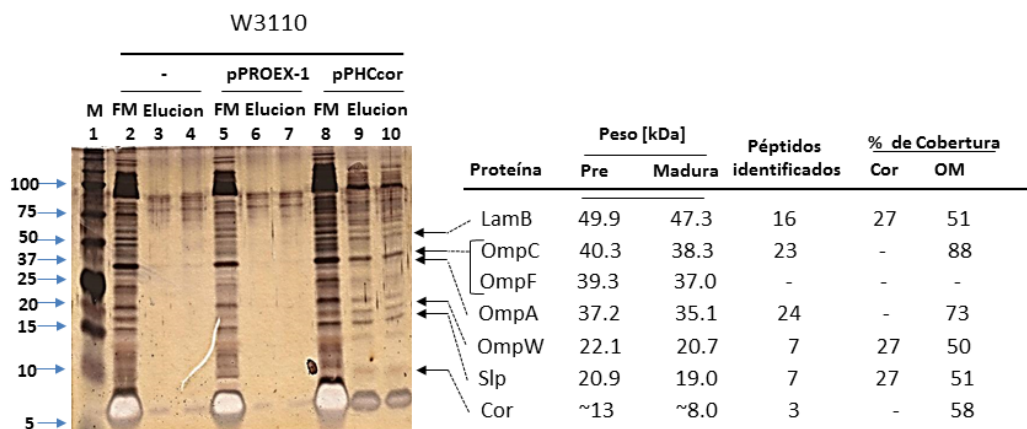


Figura 22 Coopurificación de proteínas con Cor. SDS-PAGE tris-tricina al 16.5% T, 3% C, teñido con plata, carril 1 marcador de peso; carriles 2, 5 y 8 proteínas de membrana total solubilizadas con n-Dodecyl β -D-maltoside de las cepas W3110, W3110/pPROEX-1 y W3110/pPHCcor; carriles 3 y 4, proteínas eluidas del ensayo con W3110; carriles 6 y 7, proteínas eluidas del ensayo con W3110/pPROEX-1; carriles 9 y 10 proteínas eluidas del ensayo con W3110/pPHCcor.

7.7 Cor requiere de al menos 6 proteínas para ejercer su acción.

Para establecer si alguna de las proteínas identificadas por la espectrometría de masas estaba relacionada con la exclusión de fagos FhuA dependientes, se hicieron los ensayos de goteo en las cepas mutantes de la colección Keio (Baba et al., 2006) [55] con fagos mEp167, mEp416 y ϕ 80, FhuA dependientes; además con los fagos mEp332 y λ (FhuA independientes), y que

fueron utilizados como controles positivos de la infección. Las mutantes ensayadas corresponden a genes deletados que ya no codifican para las proteínas respectivas, como los que codifican para proteínas del sistema transportador de ferricromo-Fe³⁺ y otras OMPs relacionadas. Estas se transformaron con los plásmidos pPROEX-1 y pPHCcor. Todas las cepas mutantes transformadas con pPROEX-1 fueron infectadas por los fagos FhuA dependientes véase Tabla 17, a excepción de la JW0146 (*fhuA*-); el fago mEp332 no infectó a la cepa JW2203 (*ompC*-) y el fago λ tampoco infectó a la cepa JW3996 (*lamB*-), verificando el correcto fenotipo de las cepas.

Tabla 17
Infección de diferentes fagos en cepas deficientes en diversos genes transformadas con pPROEX-1

CEPA	Grupo de inmunidad: Receptor para infectar:	BACTERIOFAGOS				
		mEp332	mEp167	λ	$\phi 80$	mEp416
		λ OmpC	VI FhuA	λ LamB	$\phi 80$ FhuA	XIII FhuA
W3100		+++	+++	+++	+++	+++
BW25113		+++	+++	+++	+++	+++
C600		+++	-	+++	-	-
BW25113 / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW0940(<i>ompA</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW02203(<i>ompC</i> ⁻) / pPROEX-1		-	+++	+++	+++	+++
JW0912(<i>ompF</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW1248(<i>ompW</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW0146(<i>fhuA</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	-	+++	-	-
JW0149(<i>fhuB</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW0148(<i>fhuD</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW1088(<i>fhuE</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW3996(<i>lamB</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	-	+++	+++
JW3938(<i>btuB</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW5110(<i>tolB</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++
JW3474(<i>slp</i> ⁻) / pPROEX-1		+++	+++	+++	+++	+++

+ Formación de placas de lisis

- Sin formación de placas de lisis

7.7.1 Expresión de Cor a partir de pPHCcor en cepas mutantes de la colección Keio

Por Western blot se verificó en todas las cepas mutantes, transformadas con pPHCcor, Cor se estuviera expresando. En el carril 4 de la Figura 23, se cargó el extracto total de proteínas de W3110/pPHCcor y en los carriles del 5 al 10, los extractos totales de las mutantes JW0940(*ompA*⁻), JW2203(*ompC*⁻), JW0912(*ompF*⁻), JW1248(*ompW*⁻), JW1088(*fhuE*⁻) y JW3996(*lamB*⁻), todas transformadas con pPHCcor. En el Western blot se observa que Cor se está expresando en todas las mutantes.

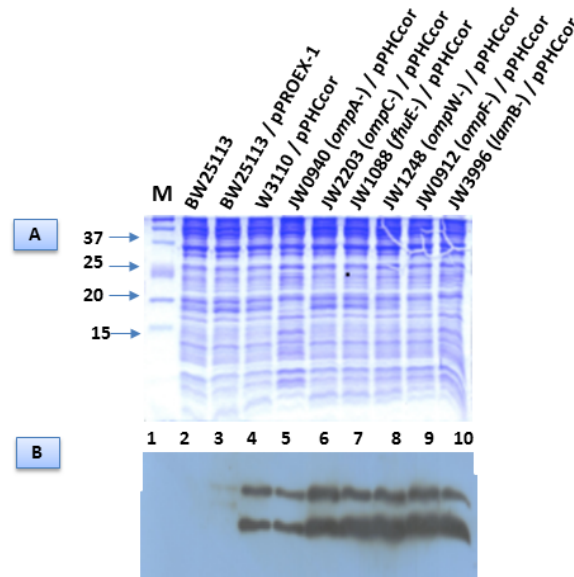


Figura 23 Expresión de la proteína Cor en BW25113 y en las mutantes derivadas. (A) SDS-PAGE tris-tricina al 16.5% T, 3% C, teñido con azul de Coomassie de extracto celular total 1 hora post inducción. Carril 1, marcador de peso (M); carril 2, 3 BW25113 y esta transformada con pPROEX-1, respectivamente, ambos controles negativos de expresión de Cor; carril 3, W3110/pPHCcor, control positivo de expresión; carriles 5 a 10, JW0940 (*ompA*⁻), JW2203 (*ompC*⁻), JW1088 (*fhuE*⁻), JW1248 (*ompW*⁻), JW0912 (*ompF*⁻) y JW3996 (*lamB*⁻), respectivamente, todas transformadas con pPHCcor. (B) Western Blot usando las mismas muestras y las mismas condiciones que en (A), se aprecian dos bandas, la banda superior corresponde a la pre-prolipoproteína de Cor y la banda inferior corresponde a la lipoproteína de Cor

7.7.2 Exclusión-Infección de fagos FhuA dependientes en cepas de la colección Keio transformadas con pPHCcor

Una vez comprobada la expresión de Cor, se realizó el ensayo de goteo sobre cada una de las mutantes transformadas con pPHCcor, para observar el comportamiento de la infección/exclusión, de los fagos FhuA dependientes. Sorpresivamente, en las mutantes JW0940(*ompA*⁻), JW2203(*ompC*⁻), JW0912(*ompF*⁻), JW1248(*ompW*⁻), JW1088(*fhuE*⁻) y

JW3996(*lamB*⁻), las cuales contenían el fondo genético FhuA⁺, y aun cuando se sobre-expresó a Cor, todas éstas fueron infectadas por los fagos FhuA dependientes (véase Tabla 18 y Figura 24). Por otro lado, la Sie de fagos FhuA dependientes, por Cor, en las otras mutantes JW0149 (*fhuB*), JW0148 (*fhuD*⁻) JW3938 (*btuB*⁻), JW5100 (*tolB*⁻), y JW3474 (*slp*), se realizó similar que, en la cepa silvestre.

Tabla 18

Fenotipo de cepas deficientes en varios genes transformadas con pPHCcor

CEPA	BACTERIOFAGOS				
	mEp332	mEp167	φ80	mEp416	λ
	λ OmpC	VI FhuA	φ80 FhuA	XIII FhuA	λ LamB
W3100	+++	+++	+++	+++	+++
BW25113	+++	+++	+++	+++	+++
C600	+++	-	-	-	+++
BW25113 / pPROEX-1	+++	+++	+++	+++	+++
BW25113 / pPHCcor	+++	-	-	-	+++
JW0940(<i>ompA</i> ⁻) / pPHCcor	+++	+++	+++	+++	+++
JW02203(<i>ompC</i> ⁻) / pPHCcor	-	+++	+++	+++	+++
JW0912(<i>ompF</i> ⁻) / pPHCcor	+++	+++	+++	+++	+++
JW1248(<i>ompW</i> ⁻) / pPHCcor	+++	+++	+++	+++	+++
JW0146(<i>fhuA</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	-	+++
JW0149(<i>fhuB</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	-	+++
JW0148(<i>fhuD</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	-	+++
JW1088(<i>fhuE</i> ⁻) / pPHCcor	+++	+++	+++	+++	+++
JW3996(<i>lamB</i> ⁻) / pPHCcor	+++	+++	+++	+++	-
JW3938(<i>btuB</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	-	+++
JW5110(<i>tolB</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	+++	+++
JW3474(<i>slp</i> ⁻) / pPHCcor	+++	-	-	-	+++

+ Formación de placas de lisis - Sin formación de placas de lisis

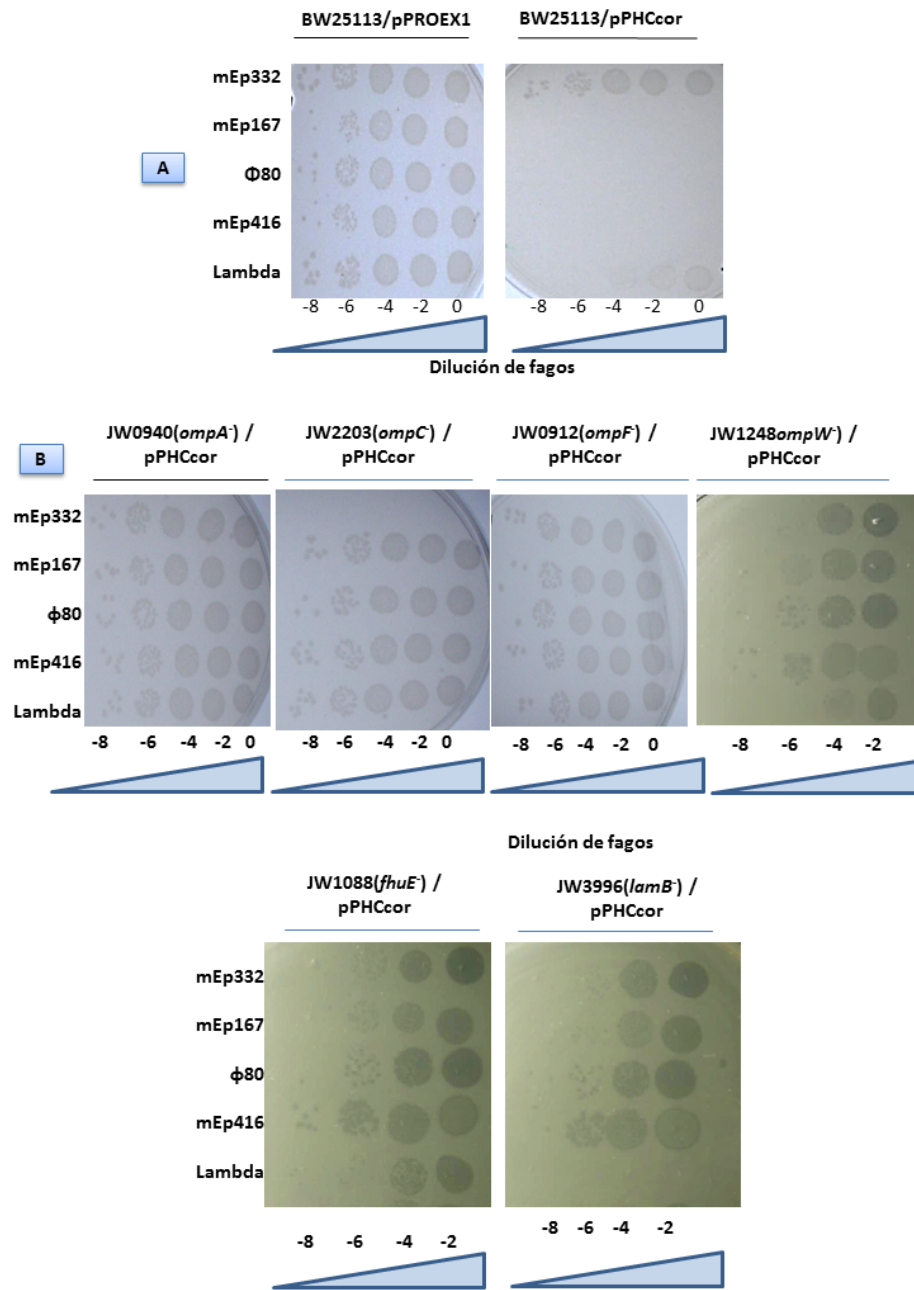


Figura 24 Ensayo de exclusión/infección en cepas mutantes en OMPs. Tapices de cepas goteadas con fagos para visualizar la Sie. (A) BW25113 transformada con pPROEX-1 y pPHCcor, utilizadas como control positivo de infección y control de especificidad de fagos, respectivamente. (B) Cepas mutantes JW0940(*ompA*⁻), JW02203(*ompC*⁻), JW0912(*ompF*⁻), JW1248(*ompW*⁻), JW1088(*fhuE*⁻) y JW3996 (*lamB*⁻) transformadas con pPHCcor; placas de lisis correlacionadas con los datos de la Tabla 18.

7.7.3 Plásmidos complementarios de la colección ASKA para cepas de la colección Keio

Posterior al ensayo de exclusión/infección, las mutantes: JW0940 (*ompA*⁻), JW2203(*ompC*⁻), JW1248(*ompW*⁻), JW1088(*fhuE*⁻) y JW3996(*lamB*⁻) se lisogenizaron con el fago mEp167, y se les transformó con su plásmido complementario de la ASKA Collection (Kitagawa et al., 2005) [69] respectivo a cada mutante; previa complementación los plásmidos fueron restringidos con *SfiI* para verificar que el inserto en cada uno correspondiera con el tamaño de cada gen; en la Figura 25 se muestra el gel de agarosa con los plásmidos restringidos y el tamaño de cada inserto liberado.

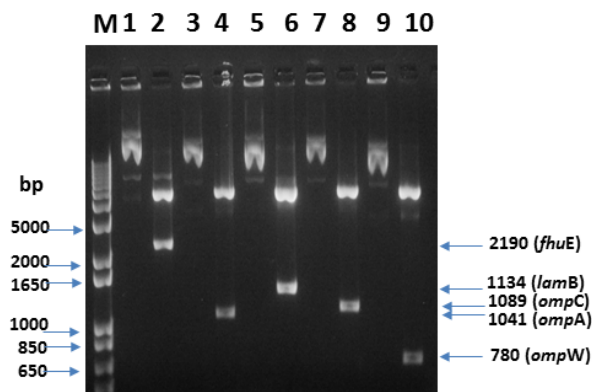


Figura 25 Restricción de plásmidos complementarios con *SfiI*. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9 plásmidos *pfhuE*, *pompC*, *plamB*, *pompA*, y *pompW* sin restringir; carriles 2, 4, 6, 8 y 10 plásmidos *pfhuE*, *pompC*, *plamB*, *pompA*, y *pompW* restringidos con *SfiI*, en los últimos se observa la liberación del inserto, la masa molecular se indica con una flecha para cada uno.

7.7.4 Complementación de cepas de la colección Keio lisógenas para mEp167

En el ensayo de complementación (véase Tabla 19) se puede apreciar que la infección de fagos FhuA dependientes, ahora es revertida. Cor vuelve a ser funcional inhibiendo la infección de fagos FhuA dependientes, como se aprecia para mEp167 y otros fagos; mEp237 y mEp410. Aun sin inducción con el IPTG, la complementación es observada, sugiriendo que la fuga transcripcional para cada uno de los factores es suficiente para complementar la función. La inhibición del desarrollo de los fagos FhuA dependientes por Cor del profago, fue observada similar a lo observado por Uc-Mass et al., (2004) [43].

Por otro lado, e interesantemente, en la cepa JW0940 [(*ompA*⁻), (mEp167)] / *pompA*, cuando se sobreexpresa a *OmpA* se excluye el fago mEp332 el cual es *OmpC* dependiente, pero *OmpA* y *FhuA* independiente (véase Tabla 19), se sugiere que Cor ahora podría excluir a otros fagos *FhuA* independientes, como es el caso de mEp332.

Tabla 19
Fenotipo de cepas deficientes en diversos genes complementadas y lisogenizadas con mEp167.

CEPA	BACTERIOFAGOS				
	mEp332	mEp167	λ	mEp237	mEp410
Grupo de inmunidad:	Λ	VI	λ	X	XII
Receptor para infectar:	OmpC	FhuA	LamB	FhuA	FhuA
JW0940 (<i>ompA</i> ⁻) / <i>pompA</i>	+++	+++	+++	-	-
JW2203 (<i>ompC</i> ⁻) / <i>pompC</i>	+++	+++	+++	+++	+++
JW1248 (<i>ompW</i> ⁻) / <i>pompW</i>	+++	+++	+++	+++	+++
JW1088 (<i>fhuE</i> ⁻) / <i>pfhuE</i>	+--	+++	+--	+++	+++
JW3996(<i>lamB</i> ⁻) / <i>plamB</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Sin IPTG					
JW0940 [(<i>ompA</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompA</i>	+--	-	+++	-	-
JW2203 [(<i>ompC</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompC</i>	+++	-	+++	-	-
JW1248 [(<i>ompW</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompW</i>	+++	-	+++	-	-
JW1088 [(<i>fhuE</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pfhuE</i>	SDB	SDB	SDB	SDB	SDB
JW3996 [(<i>lamB</i> ⁻), (mEp167)] / <i>plamB</i>	+++	-	+++	-	-
Con IPTG					
JW0940 [(<i>ompA</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompA</i>	-	-	+++	-	-
JW2203 [(<i>ompC</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompC</i>	+++	-	+++	-	-
JW1248 [(<i>ompW</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pompW</i>	SDB	SDB	SDB	SDB	SDB
JW1088 [(<i>fhuE</i> ⁻), (mEp167)] / <i>pfhuE</i>	SDB	SDB	SDB	SDB	SDB
JW3996 [(<i>lamB</i> ⁻), (mEp167)] / <i>plamB</i>	+++	-	+++	-	-
+ Formación de placas de lisis					
- Sin formación de placas de lisis					
SDB Sin desarrollo bacteriano					

7.8 Ensayos complementarios

7.8.1 Localización celular de Cor por gradiente de sacarosa

En adición a la solubilización de la IM con sarcosyl, se determinó la localización de Cor utilizando la técnica de gradiente de sacarosa según lo reportado por Reveg et. al., 2012 [70]; gradiente de 30 a 55%, 170,000 g, 17 horas, rotor SW40. El botón del gradiente corresponde a la OM y la membrana citoplasmática se concentra aproximadamente en el 35%. En los carriles 5 a 9 se corrieron algunas de las fracciones colectadas, en el carril 10, la pastilla, Cor se visualiza desde la fracción 4, Figura 26 (B), carril 6, sin embargo, la mayor concentración se observa en la pastilla, misma que corresponde a la OM. Como control de fragmentación se realizó la Inmunodetección de proteínas de OM con el anti-LamB que también reconoce OmpA, estas dos proteínas se identificaron a partir de la fracción 6, Figura 26 (C) carril 7, de igual manera mayor concentración se visualiza en la pastilla, estos resultados confirman la localización de Cor en la OM.

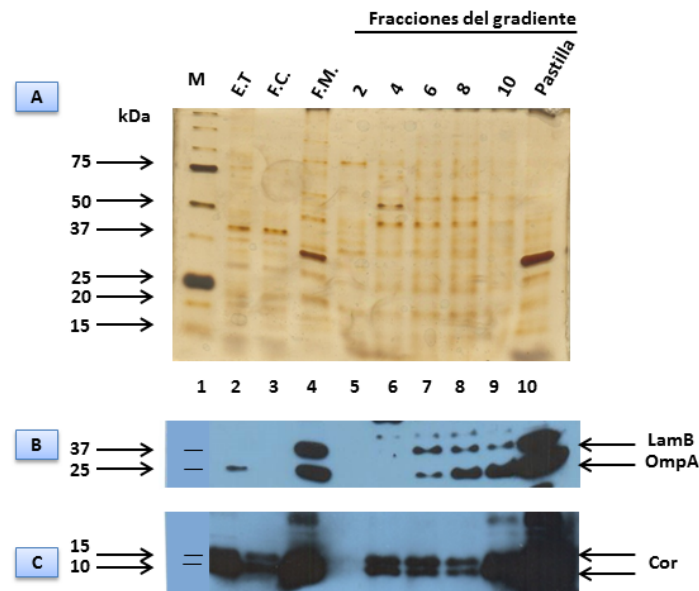


Figura 26 Cor es una proteína de membrana. Gradiente de sacarosa. (A) SDS PAGE tris-tricina al 16.5% T, 3% C, teñido con plata; carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, extracto total (E.T); carril 3, fracción citoplasmática (F.C); carril 4, fracción de membrana total (F.M) utilizada para realizar el gradiente; carriles 5 al 9 fracciones obtenidas después de centrifugar el gradiente; carril 10, pastilla sedimentada. (B) Radiografía de Western blot revelado con el anticuerpo anti-poli-histidinas. (C) Radiografía de Western blot revelado con anti-LamB que también reconoce OmpA.

7.8.2 Inmunoprecipitación de Cor

En un primer intento por identificar *in vitro* interacciones proteína-proteína con Cor se utilizó la técnica de inmunoprecipitación. Primero 10 µl de proteína G se incubaron con 2.5 µL de anticuerpo anti-polihistidinas en un volumen de 500 µl ajustado con buffer, para formar el complejo matriz-anticuerpo se incubaron 4 horas a 4°C, después para eliminar el buffer, se centrifugaron 5 minutos a 10 000 xg y el sobrenadante se retiró, se adicionaron 100 µg de proteínas de membrana solubilizadas en 20 mM de -Dodecyl β-D-maltosido, el volumen se ajustó a 500 µl con buffer, la mezcla se incubó 2 horas a 4°C, entonces se centrifugó 20 segundos a 14, 000 xg y se lavaron 2 veces, finalmente se adicionaron 10 µL de buffer de carga, se calentaron a ebullición 10 minutos y se cargaron en un SDS PAGE. En la Figura 27 se muestra el gel del ensayo, las flechas indican la presencia de proteínas que solo se identificaron en el inmunoprecipitado de W3130/pPHCcor. La mayor parte de proteínas observadas son fondo lo que limitó la elección de esta técnica.

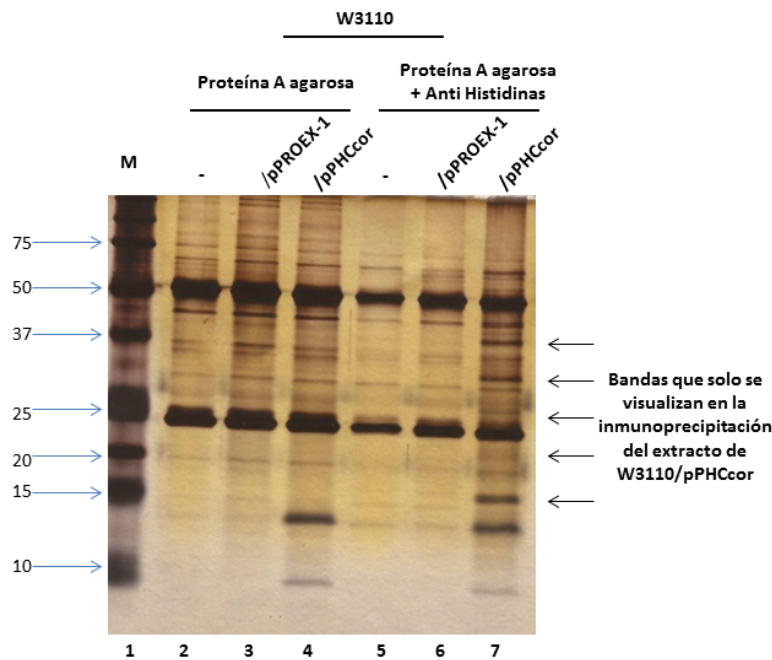


Figura 27 Inmunoprecipitación de Cor con anticuerpo anti-polihistidinas. SDS PAGE tris-tricina al 16.5% T, 6% C, teñido con plata. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2, 3, 4, control negativo de inmunoprecipitación, sin anticuerpo anti-polihistidinas, de W3110, /pPROEX-1 y /pPHCcor, respectivamente; carriles 5, 6, 7, inmunoprecipitado con anticuerpo anti-polihistidinas de W3110, /pPROEX-1 y /pPHCcor, respectivamente.

7.8.3 Estandarización de coopurificación

En la Tabla 20 se muestra las diferentes condiciones en que se realizó el ensayo de coopurificación para encontrar la condición más favorable de obtener complejos y eliminar la mayor cantidad de proteínas que se unen inespecíficamente a las perlas.

Tabla 20

Condiciones ensayadas para estandarización de coopurificación.

Condición	Cantidad de proteína (µg)	Tiempo de incubación para acople perlas-complejo de proteínas (horas)	Composición de buffer de lavado			Cantidad de Lavados
			Concentración de imidazol (mM)	Concentración de Tween 20 (%)	Concentración de n-Dodecyl β-D-maltoside (mM)	
1	40	4	50	-	2	4
2	20	3	100	0.05	2	6
3	20	2	50	0.05	2	4

Observaciones

- 1) El ensayo se realizó en tubos eppendor de 1.5 ml.
- 2) Para la estandarización se utilizaron volúmenes de 20 µl de perlas magnéticas Agarosa Ni-NTA.
- 3) Antes de empezar el acople las perlas primero se separaron de la solución de conservación, después se enjuagaron con agua miliQ, por último, se equilibraron 30' en NTI-10G con 2 mM de n-Dodecyl β-D-maltoside.
- 4) El volumen de muestra se ajustó a 200µl.
- 5) La incubación para el acople perlas-complejo de proteínas se realizó a 4°C y agitación constante de aproximadamente 20 revoluciones por minuto.
- 6) Los recambios de buffer en cada lavado se realizaron a intervalos de 30' a 4°C y agitación constante de aproximadamente 50 revoluciones por minuto.
- 7) La separación de perlas-mezcla se realizó utilizando una gradilla magnética.

En el SDS PAGE teñido con plata de la figura 28 se corrieron las proteínas que coopurificaron al utilizar las condiciones enumeradas en la Tabla 20, con las condiciones 1 y 3 las proteínas que coopurifican se visualizan muy similares, pero con un fondo mayor en la condición 1 y con la condición 2 la cantidad de proteínas que se visualizan en muy poca en comparación con las otras, de esta manera se considero la condición 3 como la optima para realizar el ensayo.

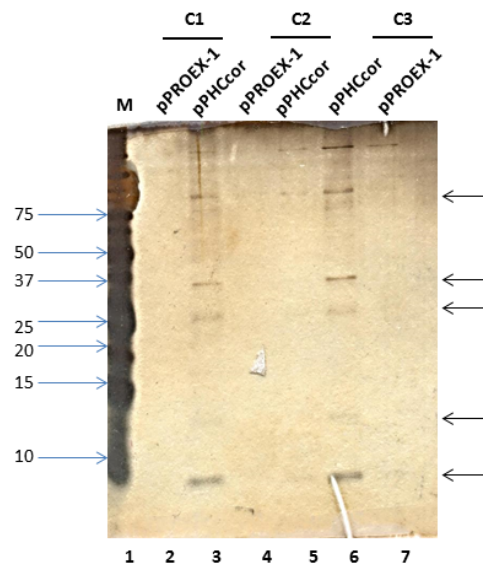


Figura 28 Estandarización de coopurificación. SDS PAGE tris-tricina al 16.5% T, 3% C, teñido con plata. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 al 7 proteínas eluidas de los ensayos con W3110/pPROEX-1 (carriles pares) y W3110/pPHCcor (carriles impares), carriles 2, 3, ensayo realizado con las condiciones # 1 (C1); carriles 4, 5, ensayo realizado con las condiciones # 2 (C2); carriles 6, 7, ensayo realizado con las condiciones # 3 (C3).

8. DISCUSIÓN

Uc-Mass y cols. (2004) reportaron que el bacteriófago mEp167 depende del receptor FhuA para infectar. Además, el producto del gen *cor* del profago mEp167 excluye a la superinfección de otros fagos FhuA dependientes, y que Cor puede bloquear la introducción del sideróforo ferricromo-Fe³⁺ al citoplasma. Wietzorrek et al., (2006) [21] al analizar la región NH₃ terminal de Cor en varios fagos lambdoides, observaron que tenían una secuencia señal (SS), características de lipoproteínas. La SS de las lipoproteínas tiene la secuencia consenso [LVI][ASTVI][GAS]C y es conocida como “lipobox” (Konovalova y Silhavy, 2015) [66]. A la posición del a.a. Cys del lipobox se le ha asignado +1 (Inouye et al., 1983) [71], y el destino de la lipoproteína hacia la OM ó IM, es dado por el aminoácido en la posición +2. Un residuo de Asp en +2 causará que la lipoproteína se retenga en la IM (Takuda and Matsuyama 2004; Konovalova y Silhavy, 2015 [66]). La proteína Cor del fago mEp167 consta de 77 a.a., y tiene la secuencia de aminoácidos LSGC característico del lipobox. En la posición +1 está la Cys, y en la posición +2 la Ala, y de acuerdo a la proposición anterior, el destino de Cor es sugestivo que sea en la OM. En este trabajo primeramente se construyó el plásmido pPHCcor conteniendo la bandera de Histidinas en el extremo carboxilo terminal para monitorear a Cor; en el ensayo sobre la exclusión a la superinfección con los fagos FhuA dependientes: HK022, mEp167, mEp173 y mEp506 todos fueron excluidos por el Cor expresado a partir de pPHCcor, similar a lo observado por Uc-Mass et al., (2004) Tabla 14. En la Figura 14 (A) se muestra el gel del extracto total de proteínas de la cepa W3110 pPHCcor inducida con IPTG a diferentes tiempos, se puede apreciar desde la 1^a h, una banda ~13 kDa, que posiblemente sea la expresión correspondiente a Cor. Para verificar que esta banda correspondía a Cor, se realizó el Western blot utilizando anticuerpos anti-polihistidinas. En los carriles correspondientes a la inducción de pPHCcor en la Figura 14 (B), se puede apreciar dos bandas bien definidas y perfectamente separadas, una de ~ 13 y la otra de ~ 8.5 kDa. La presencia de las mutantes *corC17F*, *corA18D*, o la doble mutante *corC17F-A18D* expresada en plásmidos no excluyeron a los fagos FhuA dependientes ensayados, el mismo fenotipo es observado en las mutantes de la región conservada de Cor A57E, N62D, S67R y Δ 57-59 (Tabla 16), indicando que por los aminoácidos mutados, esta región es esencial para el funcionamiento de Cor. En el Western blot de la Figura 17, se observaron dos bandas relacionadas a Cor: la pre-prolipoproteína/prolipoproteína y la lipoproteína [nomenclatura referido en Kovacs-Simon, et

al., (2011) [72]. En la mutante *corC17F*, únicamente se observa una banda, sugiriendo ser la pre-prolipoproteína, debido a que en la ausencia de Cys17 no debe ser reconocida por la enzima fosfatidil diacilglicerol transferasa (Lgt), y como consecuencia no debe ser procesada por la señal peptidasa II (LspA), quedando como una proteína de mayor peso molecular ~ 13 kDa (Fig. 17; carril 4). En el fraccionamiento celular se encuentra enriquecida en la fracción de IM (Figura 19, carril 8). En la mutante *corA18D* se puede apreciar dos bandas, similar a lo observado con la Cor silvestre, la pre-prolipoproteína/prolipoproteína y la lipoproteína (Figura 17 carril 5), sin embargo, la lipoproteína Cor mutante *corA18D* fue incapaz de llevar a cabo la Sie, sugiriendo que no es reconocida por el transportador LolCDE para su translocación a la OM (Hayashi y Wu, 1990) [39]. En el fraccionamiento celular se encuentra en mayor proporción en la fracción de IM con respecto a la observada en la OM (Figura 19, carril 9, 5). Estos resultados apoyan fuertemente de que Cor debe de ser una lipoproteína de OM.

En un intento por conocer la proteína blanco de Cor, se realizó el ensayo de Overlay (ver material y metodos). La autorradiografía del Western blot, proveniente del ensayo con la cepa W3110/pPHCcor (control positivo), y sin la incubación con Cor, se pudo apreciar una única banda correspondiente a la migración de Cor (Figura 21 carril 2). Interesantemente, la autorradiografía del Western blot, incubados con Cor (6xHisCor6xHis y/o Cor6xHis), y proveniente de los extractos de membrana total y OM, se pudo observar una banda adicional a Cor que hibridó entre los 25 y 37 kDa (Figura 21 carriles 3 al 7) siendo la señal más intensa en los carriles 5, 6 y 7 que corresponde a la fracción de OM. Vostrov, et al (1996) [45] sugirieron la posible interacción de Cor con FhuA de ~78 kDa; sin embargo, en el carril en los que se corrieron las proteínas de la cepa W3100/pPHCcor y en la que sobreexpreso FhuA no se observó una hibridación adicional a la observada, ni en los otros carriles ni en el peso aproximado de 70 kDa. Así, para averiguar el polipéptido de esta banda, se realizó el ensayo de Copurificación. El racional es que conforme se van eluyendo las fracciones, se irán desapareciendo las bandas de proteínas que se unen inespecíficamente a la matriz. Si en las últimas fracciones, la intensidad de las bandas permanece constante suponemos que estas bandas pudieran ser acarreadas por Cor (la solubilización de la fracción membranal fue realizada con el detergente no iónico n-Dodecyl β -D-maltoside, el cual separa los complejos proteína-proteína en su forma nativa).

La copurificación del extracto membranal se realizó con las cepas W3110, W3110/pPROEX-1 y W3110/pPPHCcor (Figura 22). Las proteínas provenientes de las eluciones de la

copurificación de W3110/pPHCcor (Figura 22; carril 9 y 10), tuvieron bandas adicionales que no se presentaron en sus controles (W3110 y W3110/pPROEX-1). En el análisis por espectrometría de masas LC_ESI_MS / MS (MS) se identificaron los siguientes fragmentos peptídicos se emparejaron con las proteínas: para LamB 16 péptidos (pts) con un 51% de cobertura, para OmpC 23 pts con 88%, para OmpA 24 pts con 73%, para OmpW 7 pts con 50%, para Slp 7 pts con 51%, y para Cor 3 pts con 58%. Por lo tanto, OmpA, OmpC, OmpW, LamB y Slp se asociaron fuertemente con Cor (Fig 22) Curiosamente, dos fragmentos de Cor (de 57 a 64 aa y de 65 a 77 aa) se asociaron con LamB, OmpW y Slp cuando estas bandas proteicas fueron cortadas, procesadas y analizadas por MS, lo que sugiere una asociación más estrecha. A partir de un segundo ensayo de MS, adicionalmente, se identificó el OmpF. Tomado en cuenta la migración de las proteínas en el gel de la copurificación y la única señal observada en la placa del Overlay, se sugiere que ésta podría ser alguna de las porinas: OmpA, OmpC u OmpF.

Para determinar si alguna de las proteínas identificadas por masas estaba relacionada con la exclusión de fagos FhuA dependientes, se pidieron las cepas mutantes JW0940*ompA*⁻, JW2203*ompC*⁻, JW0912*ompF*⁻, JW1248*ompW*⁻, JW3474*sl*⁻ y JW3996*lamB*⁻, derivadas de BW25113 de la colección Keio (Baba et al., 2006) [55], En adición las cepas mutantes JW0149*fhuB*⁻ y JW0148*fhuD*⁻ del sistema transportador de ferricromo-Fe³⁺, y las OMPs como JW1088 *fhuE*⁻, JW5100*tolB*⁻ y JW3938 *btuB*⁻, se transformaron con el plásmido pPROEX-1 y pPHCcor. Todas las cepas mutantes transformadas con el plásmido control pPROEX-1 fueron infectadas normalmente por los fagos FhuA dependientes, a excepción de la BW25113 (*fhuA*⁻) (Tabla 4). Lo que indica que estos factores no participan en el proceso infectivo.

Sin embargo, en el ensayo de infección/exclusión, únicamente en las 6 cepas mutantes (*ompA*⁻, *ompC*⁻, *ompF*⁻, *ompW*⁻, *fhuE*⁻ y *lamB*⁻), transformadas con pPHCcor, los fagos FhuA dependientes, no presentaron la Sie (Tabla 5), aun cuando las cepas tuvieron el fondo genético FhuA⁺, y la proteína Cor se sobre-expresó, tal como fue verificada por la señal positiva de Cor del Western blot (Figura 23). Este resultado sugiere que, para que Cor⁺ actúe y excluya en forma eficiente a los fagos FhuA dependientes, requiere de la participación de al menos éstos 6 factores.

En el ensayo de complementación, primeramente, se lisogenizó cada una de éstas mutantes con el profago mEp167, y se les transformó con el plásmido del gen complementario (Tabla

19). En el ensayo de infección/exclusión de fagos FhuA dependientes, la Sie ahora es revertida, o sea, Cor vuelve a ser funcional inhibiendo la infección de fagos mEp167, mEp237 y mEp416 FhuA dependientes. Es de notar que la exclusión se observó aun sin inducir el plásmido complementario y en las mismas condiciones en la cepa JW1088 [(*fhuE*⁻),(mEp167)] / *pfhuE*, el crecimiento fue casi nulo, evaluado por la presencia de un tapiz bacteriano difuso. Por otro lado, e interesantemente, en la cepa JW0940 [(*ompA*⁻),(mEp167)] / *pompA*, cuando se sobreexpresa a OmpA se excluye el fago mEp332 OmpC dependiente (Tabla 19); se sugiere que un exceso de OmpA, altera la proporción que tiene con respecto a OmpC, y permite que Cor pueda excluir a fagos OmpC dependientes, como es el caso del fago mEp332. Así, Cor debe de estar relacionada de alguna forma con OmpA y OmpC. Si así es el caso, éste último resultado refuerza los resultados anteriores.

Dado que la lipoproteína foránea Cor requiere del Complejo de al menos 6 OMPs, para ejercer su acción sobre FhuA, se propone al menos dos posibilidades en su acción: 1. Cor se une preferencialmente a una porina [como lo muestra en ensayo de Overlay (Figura 21)], ésta a su vez ejerce la acción sobre otra(s) porina, hasta que finalmente afecte la función de FhuA. Si alguna de éstas está ausente, la acción de Cor sobre FhuA se verá interrumpida, permitiendo la infección de fagos FhuA dependientes. 2. La siguiente posibilidad se detalla en 4 pasos: I. En condiciones normales estas porinas están distribuidas posiblemente rodeando a FhuA en una forma normal u “ordenada” (FhuA es reconocida por fagos infectivos), II. En ausencia de cualquiera de estas porinas, habrá un reacomodo “semi-ordenado” de las porinas respecto a FhuA, sin afectar la funcionalidad de FhuA, III. Cuando se expresa la lipoproteína Cor, deberá de producirse un reacomodo equivalente al “semi-ordenado” anterior, donde Cor puede actuar sobre FhuA, y se lleve a cabo la Sie, y IV. Sin embargo, si a cada una de las mutantes (por separado), se le adiciona el factor foráneo Cor, estos dos reacomodos (diferentes y “semi-ordenados”, deberá de tomarse en cuenta) y por lo tanto pasa a un reacomodo que se propone “caótico”, ya que el resultado es la inhabilitación de Cor sobre FhuA, y por consiguiente permite nuevamente la infección de fagos FhuA-dependientes, aún en presencia de Cor.

La acción y/o participación de proteínas foráneas dentro de la célula puede ser completamente inesperada, así la expresión, sobreexpresión o modificación de ésta puede conducir a comportamientos complejos, desde una alteración o modificación al metabolismo hasta la inhibición del crecimiento celular o su muerte. Por ejemplo: la expresión del polipéptido ORF4.1 de 83 a.a., proveniente del colifago mEp021 permite un crecimiento normal a la

célula; sin embargo, el péptido de 82 a.a. (ORF 4.2), con la delección únicamente de la primera Metionina, inhibe el crecimiento de la célula (Martínez-Peñañiel et al., 2012) [73]. Wagemans et al., (2014) [74] identifican 6 ORFans del genoma del fago LUZ7 de *Pseudomonas aeruginosa* que al expresarlas cada una en forma independiente, actúan como bactericidas. En este trabajo, la mutante *corC17F* dificulta el crecimiento de la célula.

La idea de proponer a las porinas formando redes de interacción, ya sea en forma lineal o espacial alrededor de otras porinas, no es nueva, sin embargo, el proponer arreglos ordenados, semi-ordenados a caóticos, puede ser plausible. Estudios globales de proteomas, o de interacción proteína-proteína, alterando factores celulares como las mutantes nulas y/o añadiendo factores foráneos como Cor, podrán dar una mayor riqueza e información sobre su distribución en la que constantemente están sometidas las células en su ambiente natural.

El transporte de ferricromo y la infección por fagos dependientes de FhuA son inhibidos por Cor (Uc Mass et al., 2004). Sie mediado por Cor, posiblemente involucre alguna interacción con su receptor principal (Vostrov et al., 1996) [45]. No se ha documentado ninguna evidencia de la interacción de Cor con sus proteínas diana. Los resultados presentados en este trabajo indican que *in vitro* las OMP LamB, OmpA, OmpC, OmpF, OmpW y Slp interactúan con Cor (Figura 22). La participación de estos OMP en Sie por fagos dependientes de FhuA se corrobora *in vivo* en las cepas mutantes “knockout” que sobreexpresan Cor, donde la reducción de exclusión es llevada a cabo, sin embargo, la excepción es para el mutante Slp.

Para el mutante Slp, Sie de fagos dependientes de FhuA por Cor, la exclusión no se pierde ni se reduce, similar al observado en W3110 que expresa el tipo silvestre Cor. Slp es un OMP que se expresa en fase estacionaria (Price y St John, 2010) [75]; como el ensayo se realizó con células en fase logarítmica, sugiere que esta condición emula el crecimiento de tipo salvaje W3110, donde Slp es escaso o está ausente.

Sorprendentemente, Sie para el fago mEp332 OmpC-dependiente se observó en la cepa {JW0940 [(ompA-), (mEp167)] / pOmpA} que expresa Cor + y sobreexpresa OmpA (véase la Tabla 19). Si Cor, que está asociado a la inhibición de la infección por fagos dependiente de FhuA, cómo ahora puede excluir al fago dependiente de OmpC (mEp332), ésta es una pregunta que está abierta. Para mEp237 y mEp410 que son fagos dependientes de FhuA, no pudieron infectar células que sobreexpresan OmpA [JW0940 (ompA -) / pOmpA] (véase la Tabla 6). Estas observaciones sugieren que de alguna manera Cor, FhuA, OmpA y OmpC pueden estar asociados formando una red de interacción.

En cuanto a las interacciones proteína-proteína entre OMP, Kleanthous et al., 2005 [34] Informan algunas interacciones promiscuas entre β -barril de OMP generan un ensamblaje supramolecular o microdominios (Kleanthous et al., 2015 [34]). Parent, et al., [76] informaron que aunque el receptor principal del fago Sf6 de *Shigella flexneri* es el antígeno-O de LPS, la presencia de OmpA y OmpC aumentan la eficacia de la infección (Parent, et al., 2014) [76]. Zhang et al., 2008 [77] identificaron una interacción OmcA-MtrC (citocromos de OM) en *Shewanella oneidensis* MR-1.

Finalmente explicar o proponer un modelo de comportamiento de cómo Cor requiere estos factores para inhibir los fagos dependientes de FhuA, no es una tarea fácil. Los resultados presentados en este trabajo sugieren que: 1. Cor no actúa directamente sobre FhuA y 2. Que al menos estos seis OMP diferentes pueden requerirse para excluir los fagos dependientes de FhuA. Teniendo en cuenta que las OMP pueden distribuirse en una simetría hexagonal, como las celdas de un panal [Klebba (2016)] [78]; proponemos que FhuA puede estar rodeado por estos 6 OMP diferentes y que la ausencia de alguno de ellos da como resultado un desarreglo en esta distribución que altera la conexión entre Cor y FhuA, permitiendo la infección de fagos dependientes de FhuA. Si la formación en la distribución OMP es de simetría hexagonal, y si esta está asociada con la exclusión; y si otros tipos adicionales de OMP están implicados, queda por determinarse.

9. CONCLUSIONES

- I. La exclusión mediada por Cor a partir de pPHCcor, con dos etiquetas de Histidinas, una en el amino y otra en el Carboxilo fue similar a la observada por pKINAM.
- II. Se lograron visualizar dos bandas bien definidas y perfectamente separadas de Cor, los resultados sugieren que la banda que migra menos corresponde a la pre-prolipoproteína y la banda que migra más rápido a la lipoproteína madura.
- III. Cor es una proteína que se transporta a la membrana celular y se encuentra enriquecida en la fracción de OM mientras que la mutante C17F, no es procesada y solo se visualiza en la IM.
- IV. La sobreexpresión de las proteínas mutantes de Cor C17F, A18D y C17F-A18D, disminuyen la tasa de desarrollo celular, y se relacionan a la funcionalidad de la proteína para efectuar la Sie ya que permiten la infección de los fagos FhuA dependientes.
- V. Cor interactúa con una proteína OMP que migra entre los 25 y 37 kDa.
- VI. Seis proteínas de OM y Slp copurifican con Cor.
- VII. Cor requiere de al menos 5 proteínas de OM LamB, OmpC, OmpF, OmpA y OmpW para ejercer su acción.

10.PERSPECTIVAS

- I.** Construcción de cepas doble mutantes en diferentes combinaciones de las proteínas que se identificaron en este trabajo, necesarias para que Cor excluya fagos FhuA dependientes.
- II.** Determinar si las mutantes LamB⁻, OmpA⁻, OmpC⁻, OmpF⁻, OmpW⁻ y Slp⁻ tienen efecto en la captación de ferricromo en cepas FhuA⁺.
- III.** Realizar ensayos de competencia con las proteínas identificadas para determinar si Cor sirve como proteína de andamiaje o Cor se une a un complejo presente en la célula.

11.REFERENCIAS

1. Kasman LM, Whitten RA. (2018). Bacteriophages. Treasure Island: StatPearls.
2. Xu J, Gui M, Wang D, Xiang Y. (2016) The bacteriophage ϕ 29 tail possesses a pore-forming loop for cell penetration. *Nature*, Jun 23;534(7608):544-7.
3. Kameyama Luis, Oviedo Norma, Guarneros, G., (2001). Bacteriófago lambda, *Microbios en Línea* (págs. 1-5) UNAM.
4. Buckling A., Brockhurst M. (2012) Bacteria–Virus Coevolution. In: Soyer O. (eds) *Evolutionary Systems Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 751. Springer, New York, NY.
5. Breitbart M, Rohwer F (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*,13 (6): 278 – 284.
6. Smartt Abby E., Xu Tingting, Jegier Patricia, Carswell Jessica J., Blount Samuel A., Sayler Gary S., Ripp Steven (2012) Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Anal Bioanal Chem* 402:3127-3146.
7. Vega Thurber Rebecca (2009) Current insights into phage biodiversity and biogeography. *Current Opinion in Microbiology* 2009, 12:582-587.
8. Heller K, Braun V (1979) Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to *E. coli*F, results from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. *J Bacteriol* 139:32-38.
9. Lenski RE (1984) Two-step resistance by *E. coli*B to bacteriophage T2. *Genetics* 107:1-7.
10. Reyes-Cortés R, Martínez-Penafiel E, Martínez-Perez F, de la Garza M, Kameyama L (2012) A novel strategy to isolate cell-envelope mutants resistant to phage infection: bacteriophage mEp213 requires lipopolysaccharides in addition to FhuA to enter *E. coli*K-12. *Microbiology* 158:3063-3071.
11. Silverman JA, Benson SA (1987) Bacteriophage K20 requires both the OmpF porin and lipopolysaccharide for receptor function. *J Bacteriol* 169:4830-4833.
12. Sukupolvi S (1984) Role of lipopolysaccharide in the receptor function for bacteriophage Ox2. *FEMS Microbiol Lett* 21:83-87.
13. Letarov A V, Kulikov E. E. (2017) Adsorption of Bacteriophages on Bacterial Cells. *Biochemistry (Moscow)*, 2017, 82, (13): 1632-1658.

14. Saigo K (1978) Isolation of high-density mutants and identification of nonessential structural proteins in bacteriophage T5; dispensability of L-shaped tail fibers and a secondary major head protein. *Virology* 85: 422–433.
15. Bhardwaj Anshul, Olia Adam S and Cingolani Gino (2014) Architectura of viral genome-delivery molecular machines. *Current Opinion in Structural Biology* 25:1-8.
16. Scandella D, Arber W (1976) Phage lambda DNA injection into E. coli pel- mutants is restored by mutations in phage genes V o H. *Virology* Jan; 69(1):206-15.
17. Samsonov VV, Sineoky SP (2002) DcrA and dcrB E. coli genes can control DNA injection by phages specific for BtuB and FhuA receptors. *Res Microbiol* 153:639-646.
18. Cumby N, Reimer K, Mengin-Lecreulx D, Davidson AR, Maxwell KL (2015) The phage tail tape measure protein, an inner membrane protein and a periplasmic chaperone play connected roles in the genome injection process of E. coli phage HK97. *Mol Microbiol* 96:437-447.
19. Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016) Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, 10(12), 2854–2866.
20. Decker K, Krauel V, Meesmann A, Heller KJ (1994) Lytic conversion of E. coli by bacteriophage T5: blocking of the FhuA receptor protein by a lipoprotein expressed early during infection. *Mol Microbiol* 12:321-332.
21. Wietzorrek Andreas, Schwarz Heinz, Heremann Christina and Braun Volkman (2006) The Genome of the Novel Phage Rtp, with a Rosette-Like Tail Tip, Is Homologous to the Genome of phage T1. *Journal of Bacteriology*, 188(4):1419-1436.
22. Labrie Simon J, Samson Julie E, Moineau Sylvain (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* May; 8(5):317-27.
23. Susskind MM, Wright A, Botstein D (1971) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of Salmonella typhimurium. II. Genetic evidence for two exclusion systems. *Virology* 45:638-652.
24. Susskind MM, Botstein D, Wright A (1974) Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of Salmonella typhimurium. *Virology* 62:350-366
25. Hofer B, Ruge M, Dreiseikelmann B (1995) The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. *J Bacteriol* 177:3080-3086.

26. Cumby N, Edwards AM, Davidson AR, Maxwell KL (2012) The Bacteriophage HK97 gp15 Moron Element Encodes a Novel Superinfection Exclusion Protein. *J Bacteriol* 194:5012-5019.
27. Dy Ron L., Richter Corinna, Salmond George P.C., Fineran Peter C. (2014) Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annu. Rev. Virol.* 1:307-31
28. Hyman Paul and Abedon Stephen T. (2010) Bacteriophages Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology*, Volumen 70, Chapter 7: 217-242.
29. Maxwell KL (2016) Phages Fight Back: Inactivation of the CRISPR-Cas Bacterial Immune System by Anti-CRISPR Proteins. *PLoS Pathog* 12(1):1005282.
30. Ruiz Natividad, Kanhe Daniel AND Silhavy Thomas (2006) Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nature Reviews Microbiology* volume4, pages57–66 (2006).
31. Gibbs Karine A., Isaac Daniel D., Xu Jun, Hendrix Roger W., Silhavy Thomas J., Theriot Julie A (2004) Complex spatial distribution and dynamics of an abundant *E. coli* outer membrane protein, LamB. *Molecular Microbiology* 53(6),1771-1783.
32. Kim Kelly H., Aulakh Suraj and Paetzl Mark (2012) The bacterial outer membrane β -barrel assembly machinery. *Protein science* 2012 21:751-768.
33. Fairman James W., Noinaj Nicholas, and Buchanan Susan K (2011) The structural biology of β -barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol.* 2011 August ; 21(4): 523–531.
34. Kleanthous C, Rassam P, Baumann CG (2015) Protein-protein interactions and the spatiotemporal dynamics of bacterial outer membrane proteins. *Curr Opin Struct Biol* 35:109-115.
35. Chaturvedi Deepti, Mahalaskshmi Radhakrishnan (2017) Transmembrane β -barrels: Evolution, folding and energetics. *Biomembranes* 1859 2467-2482.
36. Bos Martine P., Robert Viviane and Tommassen Jam (2007) Biogenesis of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:191-214.
37. Okuda Suguru and Tokuda Hajime (2011) Lipoprotein Sorting in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2011.65:239-259.
38. Yamaguchi, K., Yu, F., and Inouye, M. (1988) A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell* 53, 423-432

39. Hayashi, S., and Wu, H.C. (1990) Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22, 451-471.
40. Tokuda H, Matsuyama S (2004) Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 1694:1-9
41. Narita Shin-ichiro, Tokuda Hajime (2006) An ABC transporter mediating the membrane detachment of bacterial lipoproteins depending on their sorting signals. *FEBS Letters* 580: 1167-1170.
42. Kameyama L, Fernandez L, Calderon J, Ortiz-Rojas A, Patterson TA (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* 263:100-111.
43. Uc-Mass A, Loeza EJ, de la Garza M, Guarneros G, Hernandez-Sanchez J, Kameyama L (2004) An orthologue of the *cor* gene is involved in the exclusion of temperate lambdoid phages. Evidence that *Cor* inactivates *FhuA* receptor functions. *Virology* 329:425-433.
44. Kozyrev DP, Svarchevskii AN, Zaitsev EN, Rybchin VN (1982) Lysogenic conversion induced by phages phi 80. A description of the phenomenon and cloning of the conversion gene. *Genetika* 18(4):555-60.
45. Vostrov AA, Vostrukhina OA, Svarchevsky AN, Rybchin VN (1996) Proteins responsible for lysogenic conversion caused by coliphages N15 and phi80 are highly homologous. *J Bacteriol* 178:1484-1486.
46. Malinin Alu, Vostrov AA, Vasel'ev AL, Rybchin VN (1993) Characteristics of the bacteriophage N15 lysogenic conversion gene and identification of its product *Genetika* 29(2):257-65.
47. Braun V, Killmann H, Herrmann C (1994) Inactivation of *FhuA* at the cell surface of *E. coli* K-12 by a phage T5 lipoprotein at the periplasmic face of the outer membrane. *J Bacteriol* 176:4710-4717.
48. Mondigler Martin, Ayoub Ahmed T., Heller Knut (2006) The DNA region of phage BF23 encoding receptor binding protein and receptor blocking lipoprotein lacks homology to the corresponding region of closely related phage T5. *J. Basic Microbiol.* 46 (2006) 2, 116-125.

49. Hernandez-Sanchez J, Bautista-Santos A, Fernandez L, Bermudez-Cruz RM, Uc-Mass A, Martinez-Penafiel E, Martinez MA, Garcia-Mena J, Guarneros G, Kameyama L (2008) Analysis of some phenotypic traits of feces-borne temperate lambdoid bacteriophages from different immunity groups: a high incidence of cor+, FhuA-dependent phages. *Arch Virol* 153:1271-1280.
50. Carter, D.M., Gagnon, J.N., Damlaj, M., Mandava, S., Makowski, L., Rodi, D.J., Pawelek, P.D., and Coulton, J.W. (2006) Phage display reveals multiple contact sites between FhuA, an outer membrane receptor of *Escherichia coli*, and TonB. *J Mol Biol* 357, 236-251.
51. Carter, D.M., Miousse, I.R., Gagnon, J.N., Martinez, E., Clements, A., Lee, J., Hancock, M.A., Gagnon, H., Pawelek, P.D., and Coulton, J.W. (2006) Interactions between TonB from *E. coli* and the periplasmic protein FhuD. *J Biol Chem* 281, 35413-35424.
52. Pawelek, P.D., Croteau, N., Ng-Thow-Hing, C., Khursigara, C.M., Moiseeva, N., Allaire, M., and Coulton, J.W. (2006) Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* 312, 1399-1402.
53. Killmann H, Videnov G, Jung G, Schwarz H, Braun V (1995) Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *J Bacteriol* 177:694-698.
54. Endriß Franziska, Braun Volkmar (2004) Loop Deletions Indicate Important for FhuA Transport and Receptor Functions in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 186, No. 4, p 4818-4823.
55. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL, Mori H (2006) Construction of *E. coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* 2:2006.0008.
56. Silhavy TJ, Berman, M.L. and Enquist, L.W. (1984) *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor, NY.
57. Birnboim, H. C., & Doly, J., (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
58. Polayes D, Hughes AJ (1994) Efficient protein expression and simple purification using the pPROEX-1 super(TM) system. *FOCUS* 16:81-84.

59. Hanahan D (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover DM (ed) DNA cloning. IRL, Press Oxford, pp 109-135.
60. Hanahan D, Jessee J, Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *E. coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63-113.
61. Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379.
62. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 76(9):4350-4.
63. Cruz Castañeda Areli, Hernández Sánchez Javier, Olivares Trejo José J. (2009) Cloning and identification of a gene coding for a 26-kDa hemoglobin-binding protein from *Entamoeba histolytica*. *Biochimie* 91: 383-389.
64. Jansen Carmen, Wiese Andre, Reubsæet Lieke, Dekker Niek, de Cock Hans, Seydel Ulrich, Tommassen Jan (2000) Biochemical and biophysical characterization of in vitro folded outer membrane porin PorA of *Neisseria meningitidis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1464:284-298.
65. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1:2856-2860.
66. Konovalova A, Silhavy TJ (2015) Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
67. Aono Rikizo, Tsukagoshi Norihiko, Yamamoto Mami (1997) Involvement of Outer Membrane Protein Tolc, a Possible Member of the *mar-sox* Regulon, in Maintenance and Improvement of Organic Solvent Tolerance of *E. coli* K-12. *Journal of Bacteriology* 180(4): 938-944.
68. Ricci DP, Hagan CL, Kahne D, Silhavy TJ (2012) Activation of the *E. coli* beta-barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3487-3491.
69. Kitagawa M, Ara T, Arifuzzaman M, Ioka-Nakamichi T, Inamoto E, Toyonaga H, Mori H (2005) Complete set of ORF clones of *E. coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Res* 12:291-299.

70. Regev T, Myers N, Zarivach, Fishov I (2012) Association of the chromosome initiator DnaA with the *E. coli* inner membrane in vivo: quantity and mode of binding. *PLoS One*. 7(5): e36441.
71. Inouye S, Nakazawa A, Nakazawa T (1983) Molecular cloning of regulatory gene *xylR* and operator-promoter regions of the *xylABC* and *xylDEGF* operons of the TOL plasmid. *J Bacteriol* 155:1192-1199.
72. Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL (2011) Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 79:548-56.
73. Martínez Peñafiel E, Fernández Ramírez F, Ishida C, Reyes Cortés R, Sepúlveda Robles O, Guarneros Peña G, Bermúdez Cruz RM, Kameyama L (2012) Overexpression of *lpe* protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death. *Biochemie*. 94(6):1262-73.
74. Wagemans J, Blasdel BG, Van den Bossche A, Uytterhoeven B, De Smet J, Paeshuyse J, Cenens W, Aertsen A, Uetz P, Delattre AS, Ceysens PJ, Lavigne R. (2014) Functional elucidation of antibacterial phage ORFans targeting *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Microbiol*. 16(12):1822-35.
75. Price GP, St John AC (2000) Purification and analysis of expression of the stationary phase-inducible *slp* lipoprotein in *Escherichia coli*: role of the Mar system. *FEMS Microbiol Lett* 193:51-5.
76. Parent KN, Erb ML, Cardone G, Nguyen K, Gilcrease EB, Porcek NB, Pogliano J, Baker TS, Casjens SR (2014) *OmpA* and *OmpC* are critical host factors for bacteriophage Sf6 entry in *Shigella*. *Mol Microbiol* 92:47-60.
77. Zhang H, Tang X, Munske GR, Zakharova N, Yang L, Zheng C, Wolff MA, Tolic N, Anderson GA, Shi L, Marshall MJ, Fredrickson JK, Bruce JE (2008) In vivo identification of the outer membrane protein *OmcA*-*MtrC* interaction network in *Shewanella oneidensis* MR-1 cells using novel hydrophobic chemical cross-linkers. *J Proteome Res* 7:1712-1720.
78. Klebba PE (2016) ROSET Model of TonB Action in Gram-Negative Bacterial Iron Acquisition. *J Bacteriol* 198: 1013-1021.
79. Bachmann BJ (1972) Pedigrees of some mutant strains of *E. coli* K-12. *Bacteriol Rev* 36:525-557.

80. Jensen KF (1993) The E. coliK-12 "*wild types*" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. J Bacteriol 175:3401-3407.
81. Appleyard RK (1954) Segregation of New Lysogenic Types during Growth of a Doubly Lysogenic Strain Derived from E. coliK12. Genetics 39:440-452.
82. Matsushiro A (1963) Specialized transduction of tryptophan markers in E. coliK12 by bacteriophage ϕ 80. Virology 19:475-482.
83. Dhillon TS, Dhillon EK (1976) Temperate coliphage HK022. Clear plaque mutants and preliminary vegetative map. Jpn J Microbiol 20:385-396

APÉNDICE I: LISTADO DE CEPAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Tabla 21
Cepas, bacteriófagos y plásmidos utilizados en este estudio

Cepas	Genotipo o marcador relevante	Referencia
W3110	F ⁻ λ ⁻ rph ⁻	Bachmann (1972) [79]; Jensen (1993) [80]
C600	<i>leuB6 thi-1 lacY1 supE44 thr-1 rfbD1 fhuA21</i>	Appleyard (1954) [81]
BW25113	<i>rrnB3, ΔlacZ4787, hsdR514</i> <i>Δ(araBAD)567, Δ(rhaBAD)568, rph-1</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006 [55]
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB</i> <i>lacIq ZΔM15 Tn10 (Tetr)</i>	Stratagene
JW0940 (<i>ompA</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔompA772::kan</i>	
JW2203 (<i>ompC</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔompC768::kan</i>	
JW0912 (<i>ompF</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔompF746::kan</i>	
JW1248 (<i>ompW</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔompW764::kan</i>	
JW0146 (<i>fhuA</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔfhuA766::kan</i>	Baba <i>et al.</i> , 2006 [55]
JW0149 (<i>fhuB</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔfhuB769::kan</i>	
JW0148 (<i>fhuD</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔfhuD768::kan</i>	
JW1088 (<i>fhuE</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔfhuE764::kan</i>	
JW3996 (<i>lamB</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔlamB732::kan</i>	
JW3938 (<i>btuB</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔbtuB754::kan</i>	
JW5100 (<i>tolB</i> ⁻)	BW25113 <i>ΔtolB789::kan</i>	
JW3474 (<i>slp</i> ⁻)	BW25113 <i>Δslp761::kan</i>	
Bacteriófagos		
λ	<i>imm_λ</i>	CSH Collection
Φ80	<i>imm_{Φ80}</i>	Matsushiro (1963) [82]
HK022	<i>imm_{HK022}</i>	Dhillon and Dhillon, 1976 [83]
Fagos mEp	Varios grupos de inmunidad	Kameyama, <i>et al.</i> , 1999 [42]
Plásmidos		
pPROEX-1	<i>lacI^Q, pTrc</i>	Polayes y Huges, 2004 [58]
pUCJA	<i>cat^R fhuA⁺</i>	Uc-Mass, <i>et al.</i> , 2004 [43]
pKINAM	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167}</i>	Uc-Mass, <i>et al.</i> , 2004 [43]
pPHCCor	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorC17F	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167TGT17}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorA18D	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167GCT18}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorC17FA18D	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167TGT17GCT18}-6XHis</i>	Este estudio

pPHCCorA57E	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167GCC57}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorN62D	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167AAC62}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorS67R	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167AGT67}-6XHis</i>	Este estudio
pPHCCorΔ57-59	<i>bla lacI^Q pTrc cor_{mEp167Δ57GCCGATAT}-6XHis</i>	Este estudio
JW0940-AM	<i>cat lacI^Q pT5-lac (pOmpA)</i>	ASKA Collection [69]
JW2203-AM	<i>cat lacI^Q pT5-lac (pOmpC)</i>	
JW1248-AM	<i>cat lacI^Q pT5-lac (pOmpW)</i>	
JW3996-AM	<i>cat lacI^Q pT5-lac (lamB)</i>	
JW1080-AM	<i>cat lacI^Q pT5-lac (pfluE)</i>	

Tabla 22
Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia	Utilización
Fw-pPROEXsec	5'ATCTGTGGAATTGTGAGC-3'	Secuenciación de plásmidos
Fw-cor	5'GGAATTCAAATGAAAAGGCTAATTATCAGCA'-3	Amplificación de cor
Fw-CCHT	5'TAAACATCATCATCATCACCATTAAGGATCCA-3'	Clonación de 6His
Rv-CCHT	5'AGCTTGGATCCTTAATGGTGATGATGATGATGTTTACATG-3'	Clonación de 6His
Fw-MUTC17A18D	5'GCATGGCGATCGCTTTAATGCTGTCTGGTTKTGMTGGTGTACT TGAGAAACAGGAACCTATTTGC-3'	Mutagénesis de C17F, A18D, C17FA18D
Rv-MUTC17FA18D	5'GCAAATAGGTTCTGTTTCTCAAGTACACCAKCAMAAACCAGA CA GCATTAAAGCGATCGCCATGC-3'	Mutagénesis de C17F, A18D, C17FA18D
Fw-MUTA57	5'CGAAAACAAAACCAGACTCAATACCGNNTATCCCTTC AACTGGCGTTGGGTAAGTGC-3'	Mutagénesis de A57E
Rv-MUTA57	5'GCACTTACCCAACGCCAGTTGAAGGGATATYCGMCCGGTAT TGAGTCTGGTTGTTTGTTCG-3'	Mutagénesis de A57E
Fw-62AACGAC	5'GGGCCGATATCCCTTCGACTGGCGTTGGGTAAGTGC-3'	Mutagénesis N62D
Rv-62AACGAC	5'GCACTTACCCAACGCCAGTCGAAGGGATATCCGGCCC-3'	Mutagénesis N62D
Fw-D-Cor	5'AAACAAAACAACCAGACTCAATACCGGCCGTTCAACTGGCGT TGGGTAAGTG-3'	Delección 57-59
Rv-D-Cor	5'CACTTACCCAACGCCAGTTGAACGGCCGGTATTGAGTCTGGTT GTTTTGTTT-3'	Delección 57-59

Tabla 23
Secuencia de cor_{mEp167}

ATGAAAAGGCTAATTATCAGCATGGCGATCGCTTTAATGCTGTCTGGTTGTGCTGGTGTACTTGAGAAAC
AGGAACCTATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGACCATGAGAATAACGTTATGATTTACGGCGTTTCG
AAAACAAAACAACCAGACTCAATACCGGCCGATATCCCTTCAACTGGCGTTGGGTAAGTGCGAACACA
TTCACAAGCACGACATGTAAATAA

APENDICE II: ELECTROFEROGRAMAS

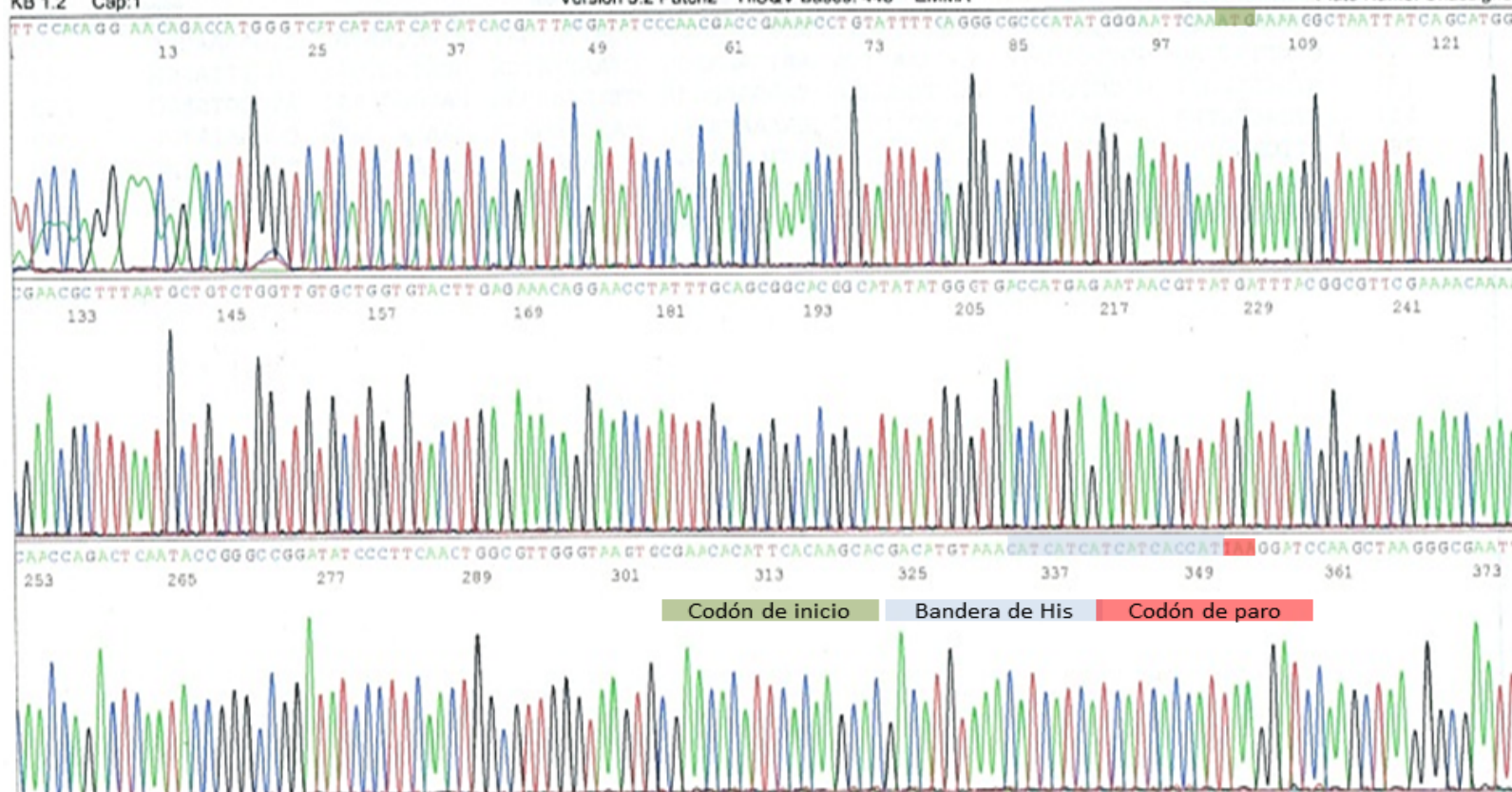
1. Plásmido pPHCcor



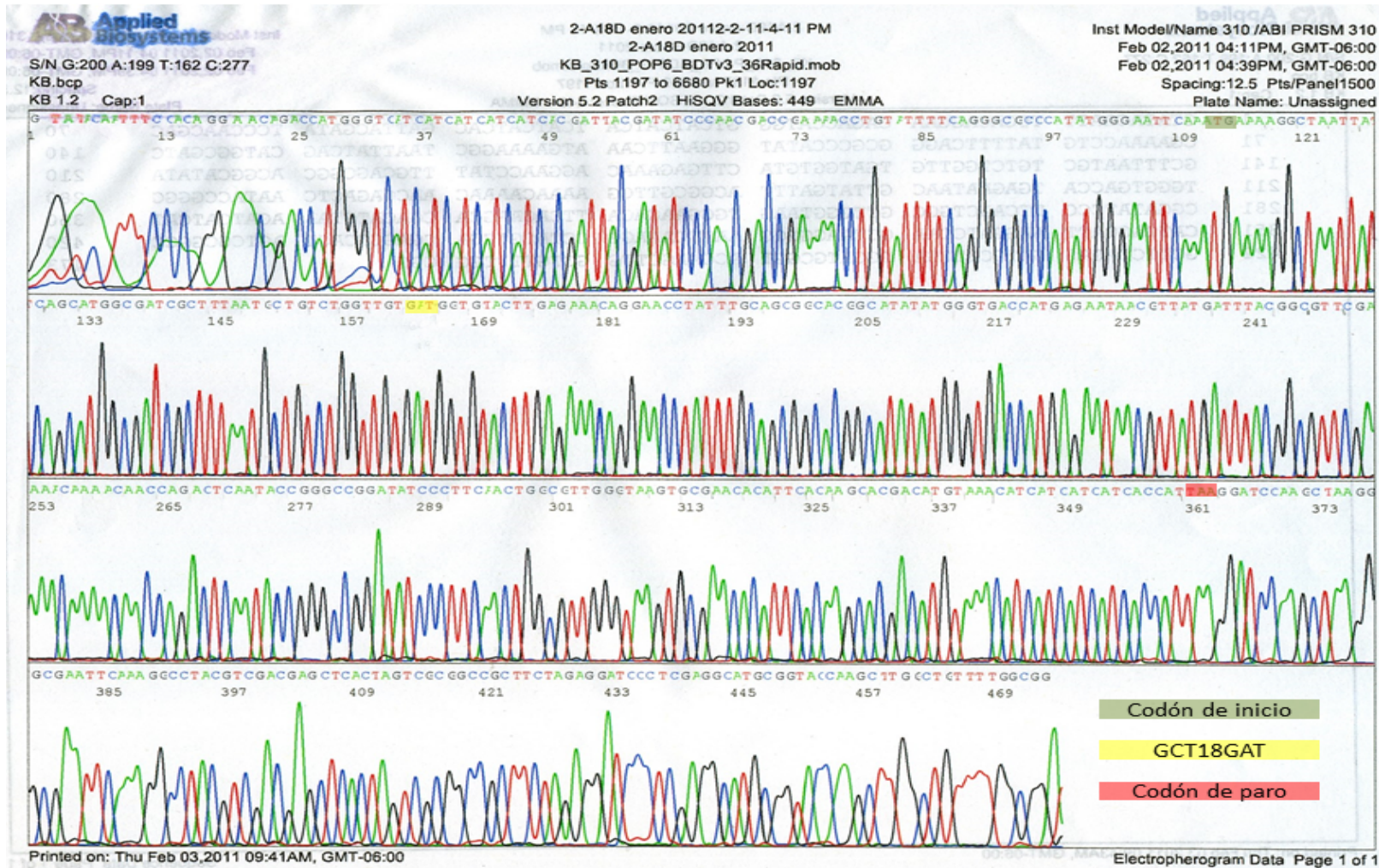
S/N G:118 A:130 T:96 C:159
KB.bcp
KB 1.2 Cap:1

C17F, A18D Histag 1-22-15-11-4-04 PM
C17F, A18D Histag 1-2
KB_310_POP6_BDTv3_50Std.mob
Pts 1383 to 7400 Pk1 Loc:1266
Version 5.2 Patch2 HISQV Bases: 448 EMMA

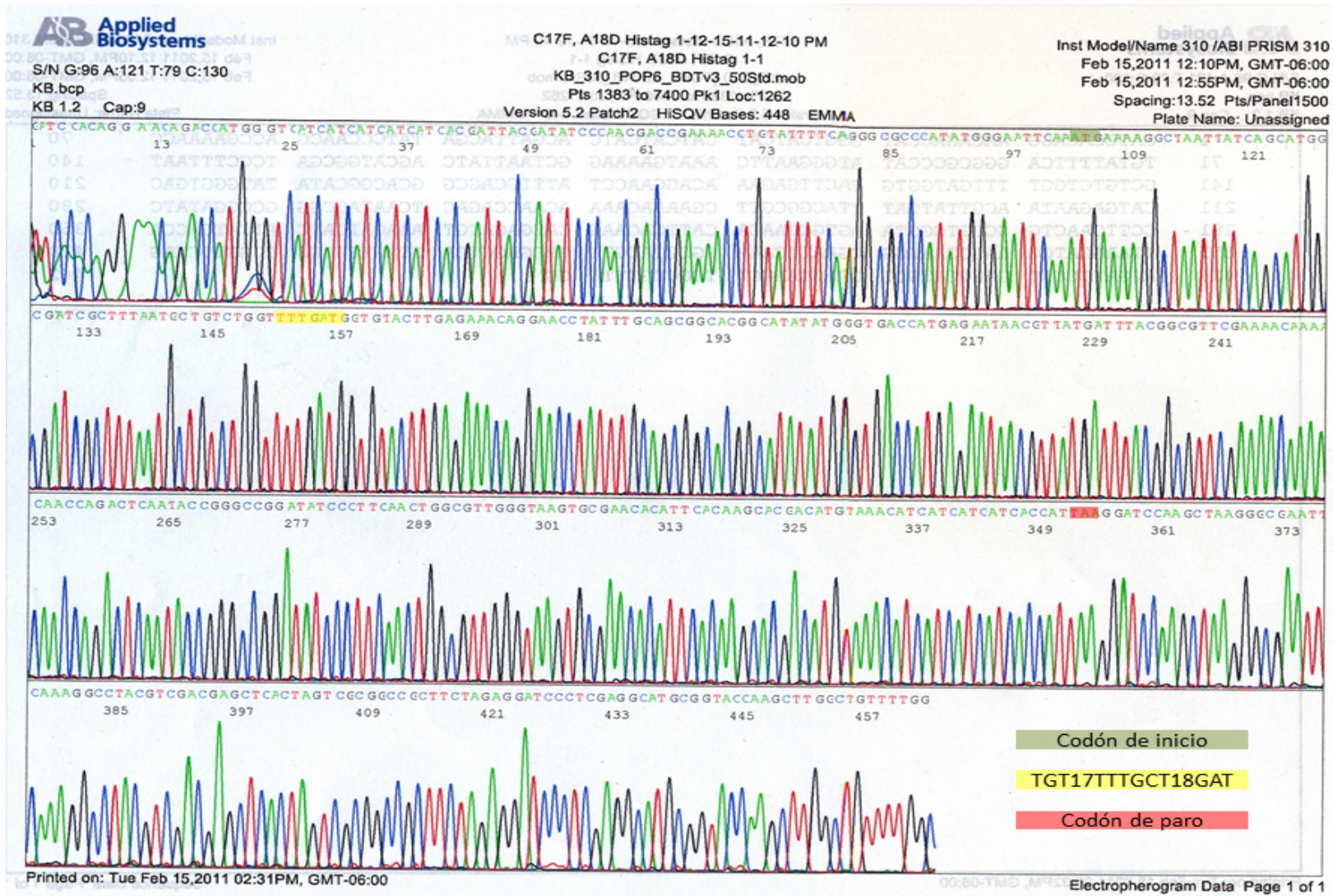
Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
Feb 15,2011 04:04PM, GMT-06:00
Feb 15,2011 04:51PM, GMT-06:00
Spacing:13.54 Pts/Panel1500
Plate Name: Unassigned



3. Plásmido pPHCcorGCT18GAT



4. Plásmido pPHCcorTGT17TTT GCT18GAT



6. Plásmido pPHCcorAAC62GAC

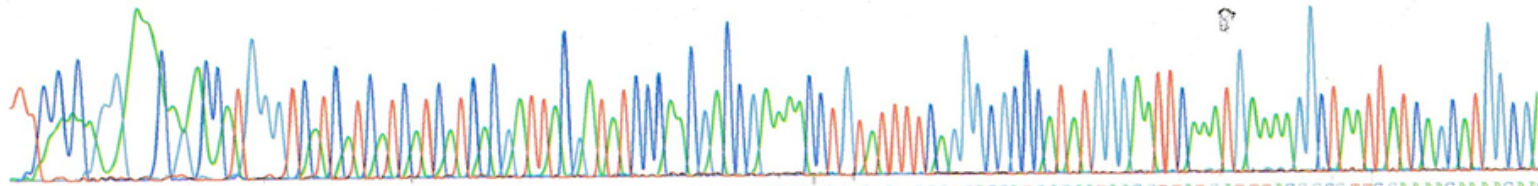


S/N G:307 A:308 T:389 C:398
 KB.bcp
 KB 1.2 Cap:5

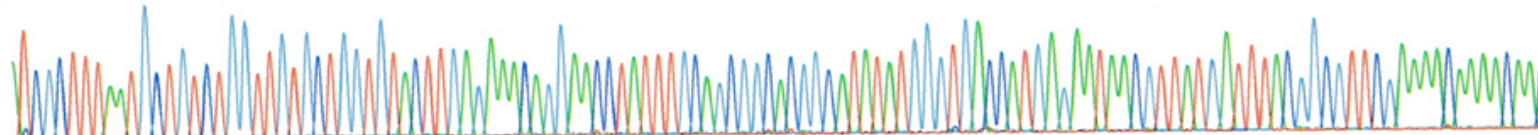
62 AAC10 ATC8-3-12-6-48 PM
 62 AAC10 ATC
 KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
 Pts 1268 to 6680 Pk1 Loc:1196
 Version 5.2 Patch2 HiSQV Bases: 439 EMMA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
 Aug 03.2012 06:48PM, GMT-06:00
 Aug 03.2012 07:08PM, GMT-06:00
 Spacing:12.55 Pts/Panel1500
 Plate Name: Unassigned

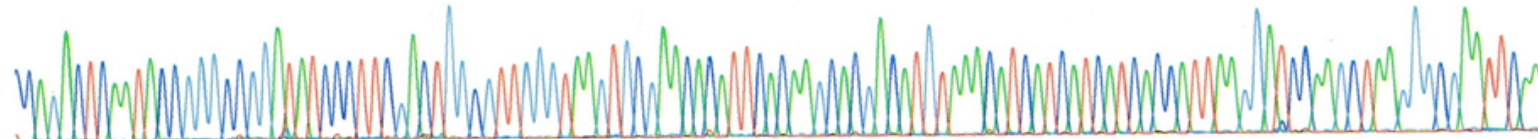
TITCCJAAAGG AACAGJCCATGGGTCITCITCATCFTCATCACGATTTCGATATCCCAACAGACC GAAPFCCTGTFTTTTCAGGGCCGCCCATATGGGATTTCAAGTAAAAAGGCTAATTTTCAGCATGGCG



ATCCCTTTAATGCTGTCTGGTTGTGCTGGTGTACTTGAGAAACAGGAACCTATTTGCAGCGGCACGGCPTATATGGGTGACCATGAGATAACGTATGATTTACGGCGTTCGAAAPCAAACAT



CCAGACTCAATACCGGCGCGGATATCCCTTCAGTGGCGTTGGTAAAGTGCGAACACATTCCAAAGCACGACATGTAACATCATCATCACCACTGGATCCAAGCTAAGGCGGATTCPA

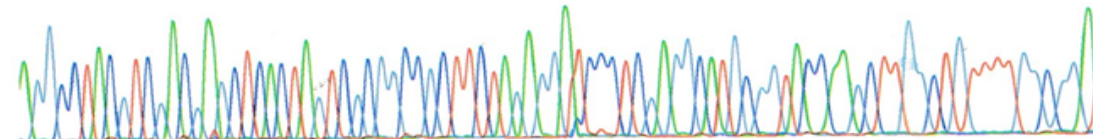


AGGCCCTACGTGGACGAGCTCAC TAGTC CCGGC CGC TTC TAGAG GATCCCTCG AGGCFTCCGGTACC AAGCTTGCTGTTTTGGCGGA

Codón de inicio

AAC62GAC

Codón de paro



Printed on: Mon Aug 06.2012 08:05AM, GMT-06:00

Electropherogram Data Page 1 of 1

7. Plásmido pPHCcorAGT67AGA

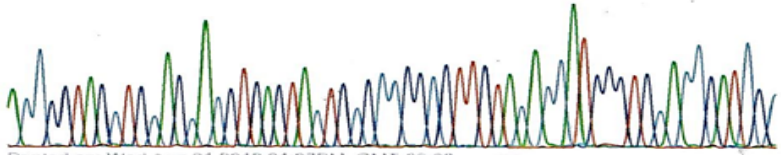
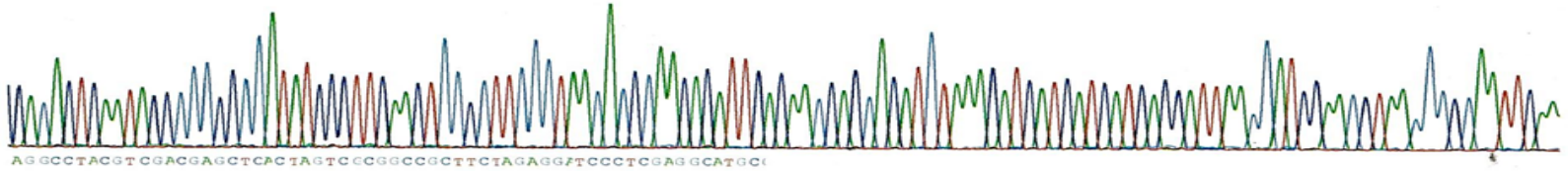
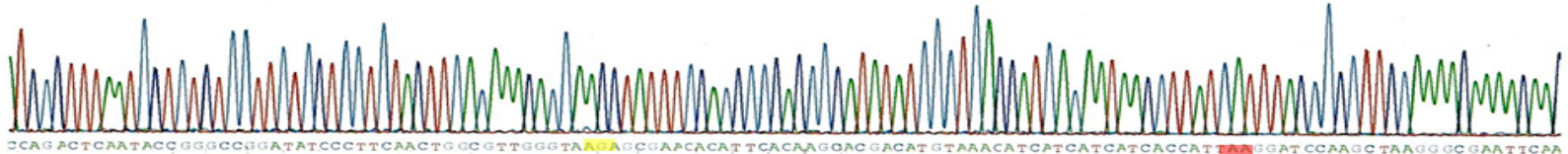
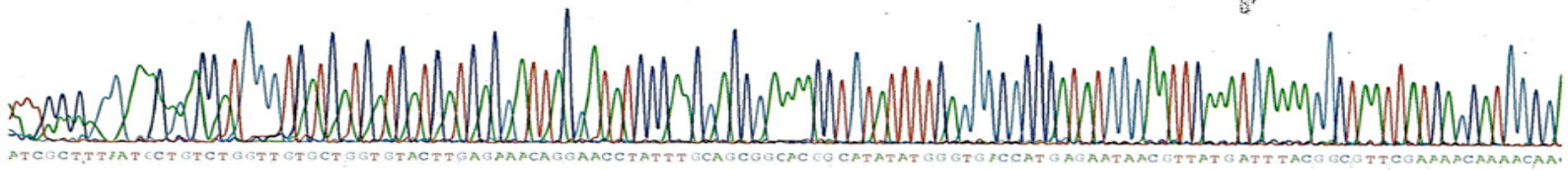


S/N G:124 A:126 T:132 C:135
 KB.bcp
 KB 1.2 Cap:2

67 AAC10 ATC8-1-12-12-26 PM
 67 AAC10 ATC
 KB_310_POP6_BDTv3_36Rapid.mob
 Pts 1295 to 6680 Pk1 Loc:1085
 Version 5.2 Patch2 HiSOV Bases: 413 EMMA

Inst Model/Name 310 /ABI PRISM 310
 Aug 01.2012 12:26PM, GMT-06:00
 Aug 01.2012 12:47PM, GMT-06:00
 Spacing:12.92 Pts/Panel1500
 Plate Name: Unassigned

ATITCAACA GCA AAAA CKAT GGG TCFTCATCTTCATCAGGATTTCGATATCCCACGACCGAAAFCTGTITTTTCAGGGCGCCCATATGGGATTTCAATAAAAGGCTATTATCAGCATGGCG



Codón de inicio
 AGT67AGA
 Codón de paro

