

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



Cinvestav

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**“Determinación de la función de la proteína LexA-*like* del fago
H66 como posible represor transcripcional”**

Tesis que presenta:

M. en C. Sandra Angélica Ortega Oliva

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

Con la especialidad en:

Genética y Biología Molecular

Director de la tesis

Dr. Gabriel Guarneros Peña

México, Ciudad de México

Septiembre, 2020

ASESORES

Dra. Rosa María del Refugio Bermúdez Cruz

Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV, Zacatenco

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular
CINVESTAV, Zacatenco

Dr. David René Romero Camarena

Centro de Ciencias Genómicas
UNAM

Dr. Rodolfo García Contreras

Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM

El presente trabajo se realizó en los laboratorios 3 y 8 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Zacatenco, bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña.

El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto 255255 y el fondo SEP-Cinvestav de apoyo a la investigación FIDSC2018/37. La autora agradece la beca otorgada por el CONACyT durante el periodo de elaboración del proyecto (CVU 362706).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Dr. Gabriel Guarneros, quien en todo momento mantuvo el reto en alto, por su crítica en el desarrollo de este proyecto y su participación en mi formación dentro de la investigación.

A todo el comité tutorial, Dr. David Romero, Dr. Luis Kameyama, Dra. Rosa Bermúdez y Dr. Rodolfo García, quienes en todo momento aportaron su tiempo, apoyo y experiencia a este trabajo.

A los auxiliares, Marco Magos, José Bueno y Eva Jacinto, por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio.

Al apoyo técnico del laboratorio, Flor Revillas, cuyo arduo e invaluable trabajo permite el desarrollo de nuestros experimentos.

A Guadalupe Aguilar por su apoyo en la unidad de ácidos nucleicos, por su siempre atenta y eficiente ayuda en la obtención de secuencias.

Al apoyo de Rosa García, por su trabajo en la cocina bacteriológica.

Al apoyo administrativo por parte del cuerpo de secretarias, Gabriela Mora, Montserrat Rodríguez y Esther Angulo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Marco Carballo, Irais Ramírez, Jair Martínez, que siempre estuvieron dispuestos a discutir este proyecto, por su apoyo técnico y emocional.

*A mis padres,
mis pilares principales
por su confianza, amor y apoyo inconmensurables*

*A Fernando,
por un millar de razones*

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE FIGURAS	ii
ÍNDICE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como modelo de estudio	1
1.2 Bacteriófagos	1
1.3 Relación Bacteria-fago	3
1.4 Bacteriófago H66	4
1.5 Respuesta SOS y proteína LexA	5
1.6 Proteínas homólogas a LexA	7
2. ANTECEDENTES	8
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVO GENERAL	10
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	10
6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	10
7. MATERIALES Y MÉTODOS	11
7.1 Análisis in silico	11
7.2 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo	11
7.3 Construcción de plásmidos	13
7.4 Generación de los fagos deletantes para el ORF14	15
7.5 Enriquecimiento de proteínas	16
7.6 Ensayo de sobrevivencia a luz UV	17
7.7 Ensayos de retardamiento (EMSA)	17
7.8 Ensayos de competencia	18
7.9 Evaluación del fago libre en cepas lisógenas	19
7.10 Análisis de la inserción del fago en el genoma de la bacteria	19
7.11 Inducción del ciclo lítico a partir de bacteria lisógena	20
8. RESULTADOS	21
8.1 Gp14 es conservada en fagos F116- <i>like</i> y es homóloga al NTD de LexA	21
8.2 La proteína Gp14 interfiere con la respuesta SOS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	25
8.3 Gp14 reconoce la caja SOS del gen <i>lexA</i> de <i>P. aeruginosa</i>	29
8.4 La sobreproducción de Gp14 inhibe la inducción del profago H66	33
8.5 Gp14 no es esencial para el fago H66	34
8.6 El genoma de H66 presenta cajas SOS que son reconocidas por Gp14	41
8.7 Los ORF32 y ORF70 son conservados en los fagos F116- <i>like</i>	44
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	56
11. PERSPECTIVAS	57
12. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS	58
13. ANEXO	64
13.1 CORROBORACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	65

13.1.1 Cepas mutantes PAO1	65
13.1.2 Caracterización fago H66.....	70
13.1.3 Secuenciación de las construcciones	71
13.2 Lista de <i>primers</i> empleados. Tabla A1. Característica de <i>primers</i> usados. .	78
13.3 Construcción vector suicida para la recombinación homóloga.....	81

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ciclos replicativos de los fagos.....	3
Figura 2. Mapa del genoma del fago H66.....	5
Figura 4. Análisis BLASTn de <i>gp14</i>	21
Figura 5. Presencia de profagos F116- <i>like</i> en cepas de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 6. Alineamiento de aminoácidos de Gp14 y los dominios amino-terminales de las proteínas LexA _{Ec} y LexA _{Pa}	24
Figura 7. Gp14 es homólogo al NTD de LexA _{Ec}	25
Figura 8. Gp14 es producida a partir de la construcción pHERD26T-Gp14.....	27
Figura 9. Ensayo de sobrevivencia a luz UV.....	29
Figura 10. Gp14 se une a las cajas SOS de <i>lexA</i>	30
Figura 11. Cinéticas de unión proteína-ADN para estimación de K_d	31
Figura 12 Ensayo de competencia LexA _{Pa} y Gp14.....	32
Figura 13. La sobreproducción de Gp14 inhibe el inicio la inducción del profago.....	34
Figura 14. Construcción de los fagos recombinantes.....	36
Figura 15. Morfología de la placa infectiva de los fagos recombinantes.....	37
Figura 16. Los fagos H66 y H66- Δ generan placas pequeñas y claras en la cepa PW7144.....	38
Figura 17. H66- Δ mantiene su capacidad de inserción en las cepas hospederas.....	39
Figura 18. La ausencia de Gp14 rinde títulos menores de fago espontáneo para H66- Δ	40
Figura 19. El profago H66- Δ no es inducido por MMC cuando Gp14 está sobreproducida.....	41
Figura 20. H66 presenta cajas SOS que son reconocidas por Gp14.....	43
Figura 21. Gp14 y LexA _{Pa} compiten por las cajas SOS presentes en el genoma de H66.....	44
Figura 22. Alineamiento de los homólogos del ORF32 y 70 de los fagos F116- <i>like</i>	45
Figura 23. Estructuras predichas para las proteínas de H66.....	47
Figura 24. Análisis comparativo de Gp14 con gp6.....	49
Figura A1. Las cepas mutantes PW6037 y PW7144 presentan inserción del transposón IS <i>phoA</i> /hah.....	66
Figura A2. Caracterización genética de la cepa PW6037 (<i>lexA</i> ⁻).....	67
Figura A3. Caracterización genética de la cepa PW7144 (<i>recA</i> ⁻).....	68
Figura A4. Caracterización de la cepa mutante PAO1_LexA_S125A.....	69
Figura A5. Perfiles de restricción del ADN genómico de H66.....	70
Figura A6. Electroferograma de la construcción pHERD26T-Gp14.....	71
Figura A7. Secuencia parcial de la construcción pPROEX-LexA.....	71
Figura A8. Secuencia del fago recombinante H66 Δ en la región de homología 1.....	72
Figura A9. Secuencia del fago recombinante H66 Δ en la región de homología 2.....	73
Figura A10. Secuencia del fago recombinante H66 Δ en la región de homología 1.....	74
Figura A11. Secuencia del fago recombinante H66 Δ en la región de homología 2.....	75

Figura A12. Secuencia del fago recombinante H66 Φ en la región de homología 1.	76
Figura A13. Secuencia del fago recombinante H66 Φ en la región de homología 2.	77
Figura A14. Diagrama de flujo para la estrategia de construcción del vector suicida.	81

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Números de acceso de las secuencias analizadas.....	11
Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos.....	12

RESUMEN

El presente trabajo analizó a la proteína Gp14 del fago H66, cuya similitud con el dominio amino terminal (NTD) de la proteína bacteriana LexA fue determinada *in-silico*. LexA es una proteína conservada que, junto con RecA, regula el sistema SOS que permite la reparación de daño sobre el material genético bacteriano. Para corroborar la función asignada a Gp14 se evaluó, inicialmente, si presentaba características similares a las reportadas para el NTD de la bacteria, cuya acumulación altera la respuesta SOS. Al evaluar el efecto de la acumulación de Gp14 en la sobrevivencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, la bacteria hospedera de H66, se determinó un bajo crecimiento celular después de irradiación con luz UV, indicando que la respuesta SOS es deficiente. La falta de recuperación celular, ante el daño por luz UV, se correlacionó con la capacidad de Gp14 de unirse al ADN en secuencias reconocidas por el NTD de LexA (cajas SOS), demostrado por ensayos de retardamiento, donde Gp14 presenta una afinidad menor que la proteína LexA completa. La respuesta SOS también participa en la inducción de profagos con represores tipo CI-like, tal como H66. La acumulación de Gp14 evitó la inducción de H66 ante la presencia de Mitomicina C, corroborando que su sobreproducción interfiere con la respuesta SOS bacteriana. En el segundo abordaje de Gp14 se evaluó su participación en las funciones del fago. Se encontró que Gp14 no es esencial ya que un fago mutante que carece del gen *gp14* es funcional, sin embargo, generó un menor título viral espontáneo a partir de una cepa lisógena. Adicionalmente, se demostró la presencia de al menos dos cajas SOS en el genoma de H66, que son conservadas en los fagos de la familia F116. Ambas cajas fueron reconocidas tanto por Gp14 como por LexA donde, al igual que las cajas SOS del genoma bacteriano, Gp14 es menos afín. Se desconoce la función de los genes fágicos regulados por cajas SOS, *gp32* y *gp70*, ya que el análisis *in-silico* no presentó semejanza con proteínas conocidas. Se demostró que Gp14 afecta la respuesta SOS de la bacteria, probablemente reprimiendo genes SOS de la bacteria y que además podría regular genes del fago que poseen cajas SOS. Se requieren mayores análisis experimental para determinar los procesos biológicos del fago en el que participa Gp14, así como su mecanismo de acción.

ABSTRACT

This work analyzes the protein Gp14 of phage H66. The homology of Gp14 with the amino terminal domain (NTD) of the bacterial LexA protein was determined in-silico. LexA is a conserved protein that, together with RecA, regulates the SOS system that allows repair of damage in bacterial genome. The first approach to corroborate the assigned function to Gp14 was to determine if it presented similar characteristics to those reported for the bacterium NTD, whose accumulation alters the SOS response. The effect of Gp14 accumulation was evaluated on the survival of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, the host bacterium of H66. Low cell growth was determined after UV light irradiation indicating a reduced SOS response. Lack of cell recovery, after UV damage, correlated with the specific binding of Gp14 to the DNA sequences recognized by the LexA NTD (SOS boxes), demonstrated by retardation assays, where Gp14 has a lower affinity than the complete LexA protein. The SOS response also participates in the induction of prophages with CI-like repressors, such as H66. Gp14 accumulation prevented H66 induction in the presence of Mitomycin C, confirming that its overproduction interferes with the bacterial SOS response. In a second approach for Gp14 analysis, its participation in the phage functions was evaluated. Gp14 was found to be non-essential since a mutant phage lacking the *gp14* gene is functional, however it generated a lower spontaneous viral titer from a lysogen. Additionally, the presence of at least two SOS boxes in the H66 genome, which are conserved in the phage of the F116 family, was demonstrated. Both boxes were recognized by both proteins, Gp14 and LexA, where, like the SOS boxes of the bacterial genome, Gp14 has lower affinity. The function of phage genes regulated by SOS boxes, *gp32* and *gp70*, is unknown, since *in-silico* analysis did not allow to assign homology to any known protein. Gp14 was shown to affect the bacterium's SOS response, probably by repressing the bacterium's SOS genes. It may also regulate phage genes that possess SOS boxes. Further experimental analysis is required to determine the biological processes of the phage in which Gp14 participates, as well as its mechanism of action.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Pseudomonas aeruginosa* como modelo de estudio.

La gammaproteobacteria *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, polarmente flagelado. Presenta un tamaño de aproximadamente 1 μm de diámetro y 4-5 μm de longitud. En general es una bacteria aerobia, mesofílica, capaz de crecer a pH neutro y con capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono (Gellatly y Hancock, 2013; Madigan, 2004; Sokatch, 1986). *P. aeruginosa* se caracteriza por ser un patógeno oportunista, común en hospitales. Su presencia se ha demostrado en una variedad de infecciones humanas incluyendo infección en pacientes con fibrosis quística, infección de vías urinarias, infección en quemaduras, queratitis infecciosa, así como en cáncer de pulmón (Coutinho *et al.*, 2008; Hart y Winstanley, 2002). Su relevancia médica se centra en la multirresistencia a antibióticos que se asocia a un incremento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Ashish, *et al.*, 2012; Hamouche y Sarkis, 2012). Una alternativa a los antibióticos, propuesta para contraatacar a las bacterias multirresistentes, consiste en el uso de los predadores naturales de las bacterias: los bacteriófagos (Chanishvili, 2012).

1.2 Bacteriófagos

Los bacteriófagos, o fagos, son virus capaces de infectar únicamente a las bacterias (D'Herelle y Roux, 2011). Además de ser ubicuos, son parásito absolutos (Clokic, *et al.*, 2011). Son las entidades más abundantes sobre la Tierra con un estimado de 10^{30} partículas (Hendrix, 2002). Todos los fagos están constituidos de ácidos nucleicos y proteínas, pero difieren entre sí en su estructura, naturaleza del ácido nucleico (ADN o ARN) y localización dentro de la célula (dentro o fuera del cromosoma bacteriano) (Lipton y Weissbach, 1969). Con respecto a la estructura, los fagos pueden clasificarse con base en la morfología de la partícula vírica en i) *Caudovirales* o fagos con cola, que a su vez se subdividen en *Miovirus* (cola larga

contráctil), *sifovirus* (cola larga flexible) y *podovirus* (cola corta) y *ii*) Fagos sin cola que se subdividen con base en su forma en poliédricos, filamentosos y pleomórficos (PFP) (Ackermann, 2009). Los bacteriófagos son tan diversos que actualmente son clasificados no sólo con base en sus características morfológicas sino también con las genómicas (Salmond y Fineran, 2015).

Para poder infectar una bacteria, los fagos inicialmente deben interactuar con los receptores de la célula hospedera, adsorberse y posteriormente inyectar su genoma. Los pasos subsecuentes dependerán de la estrategia de replicación del fago. Si el fago es virulento lleva a cabo un ciclo lítico para su replicación, por otro lado, si es temperado lleva a cabo un ciclo lisogénico (Fig. 1). En el ciclo lítico, después de la inyección del genoma, se activa un proceso que involucra la producción de nueva progenie del fago, culminando en la liberación de las nuevas partículas víricas y la muerte de la célula hospedera. En el caso de los fagos temperados, estos pueden seguir dos vías alternativas: i) iniciar un ciclo lítico con un resultado final de lisis celular y liberación de progenie, similar a los fagos virulentos; o ii) iniciar un ciclo lisogénico donde el genoma forma una asociación estable con el hospedero, denominada lisogenia. El genoma del fago puede permanecer de forma libre (tipo plásmido, denominado episoma) o bien integrado en el cromosoma de la bacteria, donde recibe el nombre de profago. En el estado de lisogenia, el genoma del fago se replica en sincronización con la replicación del genoma de la bacteria hospedera. El profago puede permanecer por tiempo indefinido dentro del cromosoma del hospedero gracias a la producción de una proteína represora. Bajo condiciones de estrés, los profagos pueden salir del estado lisogénico y producir más viriones a través del ciclo lítico (Campbell, 2003; Salmond y Fineran, 2015). De esta forma los bacteriófagos, como depredadores naturales de bacterias, influyen directamente en el tipo y densidad poblacional bacteriana dentro de un ambiente específico.

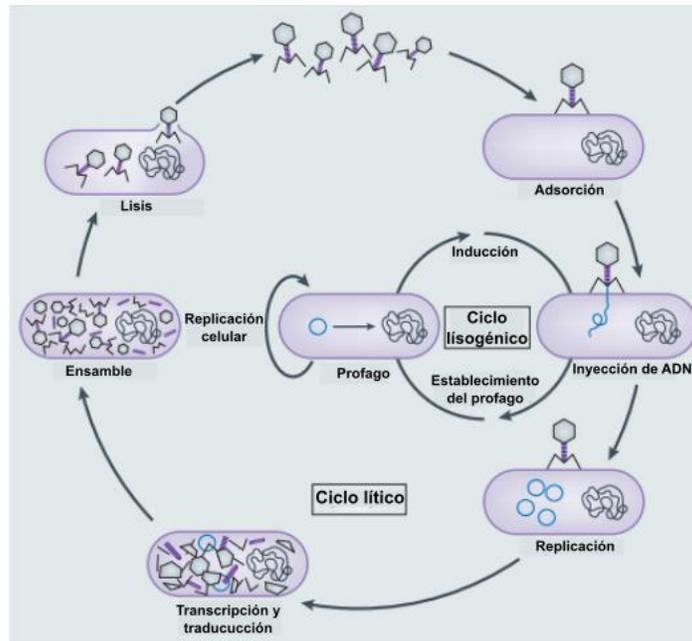


Figura 1. Ciclos replicativos de los fagos. (Tomado y modificado de Salmond, 2015).

1.3 Relación Bacteria-fago

Además del control de la población bacteriana mediante lisis, los fagos también pueden alterar la fisiología de las bacterias, sobre todo los fagos temperados. La adquisición de profagos en el cromosoma bacteriano puede permitir, en algunos casos, la ganancia de genes específicos que confieren características fenotípicas capaces de proporcionar ventajas adaptativas, este proceso se denomina conversión lisogénica (Brüssow, Canchaya y Hardt, 2004). Los análisis metagenómicos han permitido evidenciar la presencia de profagos en diversos genomas bacterianos (Canchaya *et al*, 2004; Tariq *et al.*, 2019), así como definir el genoma fundamental (*core*) y accesorio en diferentes familias de fagos y bacterias (Ackermann *et al.*, 2008; Cazares *et al.*, 2014; Cruz-Plancarte *et al.*, 2016). La predicción de ORFs y asignación de funciones por análisis bioinformáticos, basados en la comparación de secuencias y estructura con ORFs conocidos, muestran que algunos genes fágicos corresponden a proteínas con similitud o relación con proteínas de sus bacterias hospederas. Algunos ejemplos incluyen la proteína co-chaperona del fago T4 (Georgopoulos et Hohn, 1978), proteínas relacionadas a la

fotosíntesis (Lindell *et al.*, 2005), proteínas relacionadas a regulación de la replicación del ADN (Gill *et al.*, 2012), proteínas relacionadas al *quorum sensing* (Hargreaves *et al.*, 2014) y proteínas que presentan una versión corta o trunca de las proteínas bacterianas (Fornelos *et al.*, 2018). Así mismo, los estudios de metagenómica han permitido visualizar las poblaciones fágicas presentes en microambientes específicos, por ejemplo, el análisis del viroma presente en el esputo de pacientes con y sin fibrosis quística (CF, por sus siglas en inglés) mostró que se compone principalmente de bacteriófagos de especies muy variadas, donde las poblaciones difieren entre los pacientes que presentan CF de los que no. El análisis de los genes fágicos en cuestión reveló perfiles metabólicos similares a los de su bacteria hospedera (*P. aeruginosa*) (Willner *et al.*, 2009).

1.4 Bacteriófago H66

El fago temperado H66, aislado de la cepa clínica HIM-6 de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital infantil de México (Sepúlveda-Robles, 2012) es capaz de infectar a la cepa *P. aeruginosa* PAO1, donde mantiene su característica de fago temperado. Presenta una morfología, en micrografía electrónica, similar a la familia de los podovirus (Carballo-Ontiveros, datos no publicados). Su genoma (Genbank número de acceso KC262634) consta de 65,270 pares de bases y presenta similitud en secuencia nucleotídica y aminoacídica con fagos de la familia F116-*like* (Maya-Lucas, 2012), que incluye a los fagos LKA5 y phiC725A (Pourcel *et al.*, 2017). El análisis de la secuencia del fago H66 identificó 72 posibles regiones codificantes (ORFs) (Fig. 2). Entre los ORFs predichos se asignó función, bioinformáticamente, a 27 de ellos como son la proteína represora *CI-like*, la integrasa, proteínas de cápside, y el ORF 14 también denominado *gp14*. El gen *gp14* llama la atención pues parece ser una versión trunca o corta de la proteína LexA bacteriana. Siendo LexA clave en el control de la respuesta SOS, es de interés que H66 porte genes con características similares.

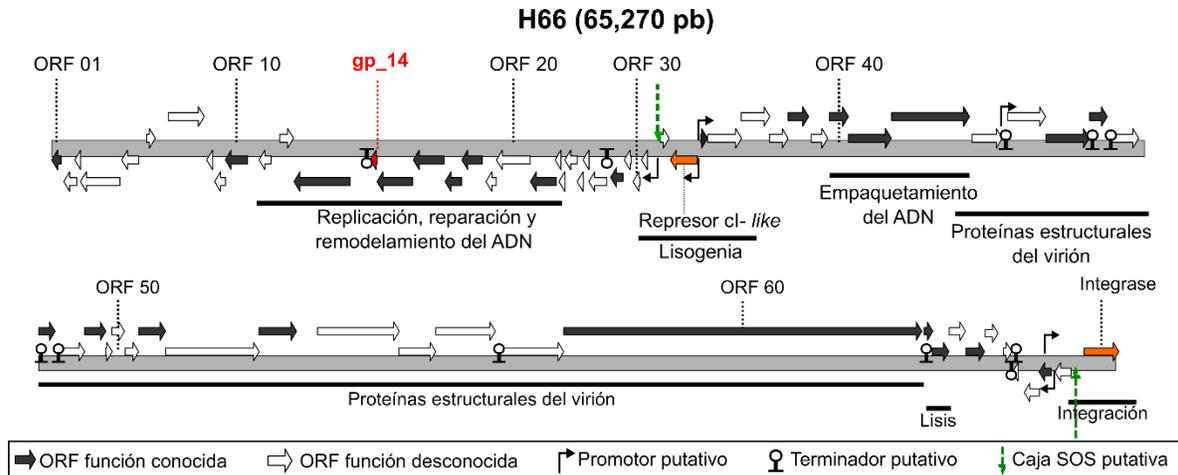


Figura 2. Mapa del genoma del fago H66. El genoma del fago se encuentra dividido en dos secciones. En la parte superior del esquema se coloca el número guía de cada ORF. Se resalta en rojo el ORF 14 y en naranja los ORFs 32 (represor *CI-like*) y 71 (integrasa). El resto de acotaciones se muestran en la parte inferior de la imagen.

1.5 Respuesta SOS y proteína LexA

La respuesta SOS es un sistema inducible de reparación de daño al ADN, descrito por primera vez en la bacteria *Escherichia coli* (Radman, 1975). En este sistema de reparación, las proteínas LexA y RecA son clave en el mecanismo molecular (Kelley, 2006; Kreuzer, 2013). En *E. coli*, LexA (LexA_{Ec}) es una proteína de 200 aminoácidos que consta de dos dominios, el amino terminal (NTD) y el carboxilo terminal (CTD) unidos por una región flexible (Little y Hill, 1985). El NTD presenta una estructura tipo *winged* HTH (wHTH) que le permite el reconocimiento de secuencias palindrómicas específicas sobre el ADN, denominadas cajas-SOS (Hurstel, *et al.*, 1990; Ptitsyn *et al.*, 1982; Schnarr *et al.*, 1991). Las cajas SOS se encuentran distribuidas en todo el genoma bacteriano y pueden estar sobrepuestas o cercanas a promotores de los genes involucrados en la respuesta SOS (Gillor *et al.*, 2008; Simmons *et al.*, 2008). La unión de LexA_{Ec} a estos sitios genera una represión transcripcional de los genes que se encuentran río abajo (Brent y Ptashne, 1981; Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000). Por su parte, el CTD permite la dimerización de la proteína y el auto-procesamiento de LexA, pues en este dominio se encuentran el sitio activo (S119 y K156) y sitio diana (A84 y G85) que permiten el corte auto-

catalítico, el cual está involucrado en la des-represión de los promotores que contiene cajas SOS (Luo *et al.*, 2001; Schnarr *et al.*, 1988). En el citosol LexA se encuentra en forma de dímeros, y es en esta conformación como reconoce y se une a las cajas SOS (Mohana-Borges *et al.*, 2000).

En *E. coli* la respuesta SOS se inicia con un daño que incide sobre el material genético, generando la formación de ADN de cadena sencilla (ssDNA). RecA reconoce y se une al ssDNA, formando filamentos ssDNA-RecA. La proteína RecA presente en dichos filamentos es denominada RecA activa (RecA*). RecA* interactúa con los dímeros de LexA, que se encuentran libres en el citosol de la bacteria, los cuales cambian de conformación propiciando el auto-procesamiento de LexA (Butala *et al.*, 2011). El corte de LexA expone marcadores de degradación presentes en ambos dominios, por lo que son eliminados rápidamente por las proteasas Lon, para el CTD, y ClpXP, para el NTD (Neher *et al.*, 2003). La disminución de la poza de dímeros libres de LexA, desencadena la disociación de los dímeros unidos a las diferentes cajas SOS. Gracias a las diferentes afinidades de la proteína hacia los promotores, la des-represión de los diferentes genes pertenecientes a la respuesta SOS se da de manera orquestada, es decir, en un orden y temporalidad específico. La coordinación y expresión de los genes SOS permite la reparación del daño al ADN en dos etapas o puntos de control: i) reparación de ADN de alta fidelidad y ii) reparación de ADN de baja fidelidad o proclive a mutaciones. Ambos puntos de control permiten que el material genético pueda ser preservado (Kreuzer, 2013; Simmons *et al.*, 2008). En el caso de *E. coli* son 30 los genes reportados como pertenecientes a la respuesta SOS con cajas SOS canónicas (Fernández de Henestrosa *et al.*, 2000). En el caso de *P. aeruginosa*, la proteína LexA (LexA_{Pa}) muestra gran similitud a LexA_{Ec} pero la respuesta SOS parece controlar sólo 15 genes en *P. aeruginosa* PAO1 (Cirz *et al.*, 2006). La relevancia de la respuesta SOS en los diferentes grupos filogenéticos bacterianos es evidente por su alta conservación, en particular de proteínas homólogas a LexA (Erill *et al.*, 2007).

1.6 Proteínas homólogas a LexA

Existen diferentes ejemplos de proteínas con homología a LexA. Estas proteínas muestran capacidad de dimerización y función de represión de genes río abajo de sus sitios de unión, cuya regulación depende de un daño sobre el ADN y por ende su inactivación se asocia a la activación de la proteína RecA. Ejemplo de estas son las proteínas bacterianas UmuD de *E. coli* y otras bacterias, que participan en diferentes estadios de la respuesta SOS (Hare *et al.*, 2012; Mustard y Little, 2000); PrtR que regula la expresión de genes relacionados a la síntesis y liberación de piocinas y la proteína codificada en PA0906 que regula 6 genes de función aún no determinada, ambas codificadas en genes de *Pseudomonas aeruginosa* (Penterman *et al.*, 2014) y la proteína UmuDpR codificada en un plásmido de *P. aeruginosa* capaz de interferir con la respuesta SOS de la bacteria (Díaz-Magaña *et al.*, 2015). Así mismo, se tienen diversos represores de fagos temperados homólogos a LexA, el ejemplo canónico es el represor CI del colifago lambda (Oppenheim, Kobiler, Stavans, Court et Adhya, 2005; Ptitsyn *et al.*, 1982). Existen casos particulares de bacteriófagos que utilizan la proteína LexA de su bacteria hospedera como proteína represora, tal es el caso del fago CTX de *Vibrio cholerae* (Kimsey y Waldor, 2009) y el fago GIL01 de *Bacillus thuringiensis* (Fornelos *et al.*, 2011). La regulación del ciclo lítico de los fagos mediante los represores, ya sean los propios o la proteína LexA bacteriana, depende de su interacción con la proteína RecA activa. Esta dependencia en la regulación muestra la relación existente entre la inducción de progenie de los fagos y la respuesta SOS de las bacterias (Kokjohn y Miller, Little, 1984; Rokney *et al.*, 2008; Sassanfar y Roberts, 1990). Es notorio que estas proteínas muestran homología con LexA en toda la longitud de su estructura presentando un dominio amino y carboxilo terminal similares. Es por ello que llama la atención la presencia de gp14 del fago H66, ya que la homología de su proteína con respecto a LexA se restringe únicamente al dominio amino terminal. Esto permite pensar en una proteína fágica que asemeja una versión trunca de la proteína bacteriana.

2. ANTECEDENTES

Gracias a los análisis metagenómicos y metabolómicos ha sido posible encontrar evidencia de genes fágicos con relación u homología con proteínas bacterianas. Sin embargo, existen pocos ejemplos en los que se tenga comprobación experimental de que proteínas homólogas presenten funciones similares. Uno de los principales casos es el de la co-chaperona del fago T4 (Gp31). Esta proteína interactúa con la chaperona GroEL de *E. coli* y es necesaria para el correcto plegamiento de la proteína principal de la cápside. A pesar de que no presenta similitud en la secuencia aminoacídica, presenta homología estructural a la co-chaperona GroES de *E. coli*, además la puede sustituir funcionalmente en una mutante termosensible, por lo cual se demuestra que la proteína del fago y la proteína bacteriana presentan la misma función. (Georgopoulos et Hohn, 1978; Van der Vies, Gatenby y Georgopoulos, 1994). Recientemente se reportó la proteína Gp6 del fago GIL01 de *Bacillus thuringiensis*, esta proteína presenta homología estructural con el dominio amino terminal (NTD) de la proteína LexA. A diferencia de la proteína bacteriana LexA, se reportó que Gp06 presenta una función de activador transcripcional tras su unión a una secuencia específica en el genoma del fago, diferente a las cajas SOS. Para que el promotor, que es regulado por Gp06, presente activación requiere, además de la unión de Gp6, de la incidencia de un daño al ADN (Fornelos *et al.*, 2018). Gp06 es un ejemplo de una proteína fágica que representa una versión trunca de la proteína de la bacteria, sin embargo, su participación en la regulación de genes de su hospedero no fue evaluada. En nuestro grupo de trabajo, mediante genómica comparativa, se determinó que el fago temperado H66 de *P. aeruginosa* porta a *gp14* cuyo producto, originalmente denominado *LexA-like*, presenta homología estructural al NTD de LexA. Esta homología permite suponer una función de unión al ADN con posibilidad de interferir con la respuesta SOS de la bacteria. Dada la relevancia de la respuesta SOS en las bacterias y su relación con los ciclos replicativos de los fagos, resulta interesante el estudio de Gp14 ya que su presencia podría antagonizar o colaborar con la propia LexA de la bacteria, resaltando la relevancia de proteínas fágicas en la regulación de genes bacterianos. El presente

trabajo muestra los resultados, de ensayos *in vitro* e *in vivo*, del efecto de Gp14 sobre la respuesta SOS de su bacteria hospedera.

3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la asignación de funciones a los diferentes ORFs de un genoma se realiza, primordialmente, mediante herramientas bioinformáticas. Sin embargo, es necesaria la comprobación experimental de dichas asignaciones. En el caso de los genomas de bacteriófagos, resulta relevante la presencia de proteínas homólogas a las bacterianas. Es importante determinar si dichos genes homólogos a los bacterianos, presentan las mismas funciones biológicas. Esto permitirá comprender a fondo los mecanismos inter e intra moleculares que llevan a cabo los bacteriófagos en relación con sus células hospederas, así como el efecto sobre las mismas.

4. HIPÓTESIS

La proteína Gp14, del fago H66, presenta similitud estructural con el dominio de unión al ADN de la proteína LexA bacteriana. La estructura predicha para Gp14 le permitirá reconocer secuencias específicas en los genomas, concretamente las denominadas cajas SOS, que son reconocidas por la proteína LexA. A través de dicha unión Gp14 podrá interferir en la regulación normal de la proteína LexA, así como participar en la regulación transcripcional tanto de genes bacterianos como genes del fago.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la proteína Gp14 del fago H66, presenta función similar a las proteínas LexA bacterianas.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterización de la proteína Gp14 mediante análisis bioinformático.
2. Evaluación del efecto *in vivo*, de la presencia de Gp14 sobre la respuesta SOS de la bacteria hospedera.
3. Análisis *in vitro* de la capacidad de reconocimiento y unión a las cajas SOS por la proteína Gp14.
4. Estudio de la participación de Gp14 en la biología del fago H66.

6. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

En la figura 3 se muestran los pasos generales que se llevaron a cabo para cubrir los objetivos particulares del proyecto.

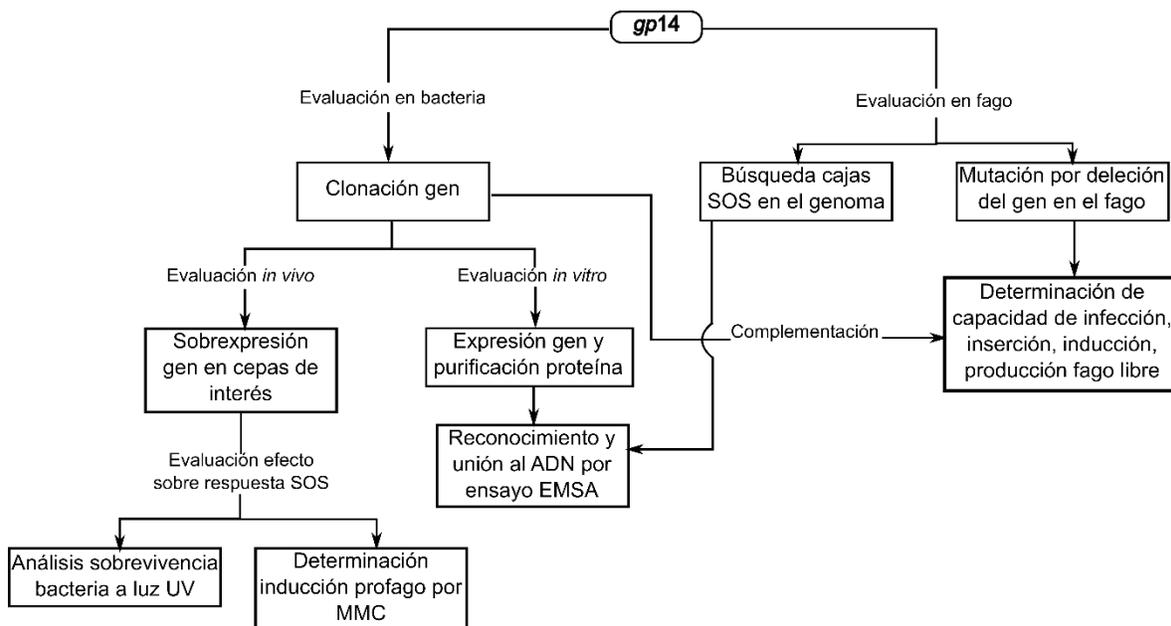


Figura 3. Esquema general de trabajo. Se describen las diferentes etapas del trabajo, llevadas a cabo para analizar las funciones de la proteína Gp14.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis in silico

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron obtenidas de la base de datos *GenBank*. Los números de acceso se muestran en la Tabla 1. Los análisis de alineamiento local fueron llevados a cabo con BLASTn y BLASTp, del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La visualización de los alineamientos se realizó por *Jalview*. La predicción del modelo estructural de la proteína Gp14, así como la comparación estructural con la estructura del cristal de la proteína LexA bacteriana se realizó a través del *software* I-TASSER, y la visualización se llevó a cabo por *Pymol*. La búsqueda de las secuencias consenso correspondientes a las cajas SOS se llevó a cabo con el *software Motif Alignment Search Tool* (MAST), con la base de datos *collectf*.

Tabla 1. Números de acceso de las secuencias analizadas.

Nombre entidad	No. Acceso Genbank	Naturaleza secuencia
F116	AY625898.1	Nucleótidos (genoma)
H66	NC_042342.1	Nucleótidos (genoma)
LKA5	KC900378.1	Nucleótidos (genoma)
phiC725A	LT603684.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain Pa58	CP021775.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain 97	CP031449.2	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain AR442	CP029090.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain DHS01	CP013993.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain FDAARGOS_570	CP033835.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain 6762	CP030075.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain N15-01092	CP012901.1	Nucleótidos (genoma)
<i>P. aeruginosa</i> strain Pa1207	CP022001.1	Nucleótidos (genoma)
Gp14 (<i>lexA-like</i>)	YP_009638929	Aminoácidos
LexA de <i>P. aeruginosa</i>	NP_251697	Aminoácidos
LexA de <i>E. coli</i>	NP_418467.1	Aminoácidos

7.2 Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas y plásmidos utilizados se enlistan en la Tabla 2. Los cultivos bacterianos fueron realizados en medio Luria-Bertani (LB: Triptona 10 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L). Para el mantenimiento de los plásmidos el medio fue suplementado con el antibiótico apropiado, dependiendo de la bacteria y plásmido.

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos

Cepa, Fago o plásmido	Genotipo o fenotipo	Referencia u origen
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i>(rK⁻mK⁺), λ⁻</i>	Stock del laboratorio
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 PAO1(H66) PW7144	PAO1 silvestre (WT) Lisógena del fago H66 construida sobre PAO1 Tet ^R , RecA mutante (PA3617:: <i>lsphoA/hah</i>) construida sobre PAO1.	(Jacobs <i>et al.</i> , 2003) Éste trabajo (Jacobs <i>et al.</i> , 2003)
Plásmidos		
pPROEX	Amp ^R , 6(his) N-terminal, origen pBR322, inducible por IPTG	Stock del laboratorio
pPROEX-LexA _{Pa}	Derivado de pPROEX, contiene el ORF LexA de <i>P. aeruginosa</i> en los sitios <i>KpnI-HindIII</i>	Éste trabajo
pUCP24	Gm ^R , origen pBR233, origen pRO1600, constitutivo.	
pHERD26T	Tet ^R , origen pBR322, origen pRO1600, inducible por arabinosa.	(Qiu <i>et al.</i> , 2008)
pHERD26T-Gp14	Derivado de pPROEX, contiene el ORF14 del fago H66 en los sitios <i>NcoI-HindIII</i>	Éste trabajo
pJET1.2/blunt	Amp ^R , rep(pMB1)	Thermo Fisher Scientific Éste trabajo
pJET-reco α	Derivado de pJET1.2/blunt. Gm ^R contiene el fragmento para recombinación del fago H66 con el gen <i>aacC1</i> . Se pierde el terminador nativo de H66 y el gen <i>aacC1</i> se encuentra en la misma dirección que el resto de genes del operón y mantiene su propio promotor.	Éste trabajo
pJET-reco β	Derivado de pJET1.2/blunt. Gm ^R contiene el fragmento para recombinación del fago H66 con el gen <i>aacC1</i> . Se pierde el terminador nativo de H66. El gen <i>aacC1</i> se encuentra en dirección contraria al resto de genes del operón y mantiene su propio promotor. El terminador nativo de H66 se pierde.	Éste trabajo
pJET-reco γ	Derivado de pJET1.2/blunt. Gm ^R contiene el fragmento para recombinación del fago H66 con el gen <i>aacC1</i> . El gen <i>aacC1</i> se encuentra en dirección contraria al resto de genes del operón y mantiene su propio promotor. El terminador nativo de H66 se mantiene.	Éste trabajo
Bacteriófagos		
H66	Podofago F116-like. Cepa hospedera PAO1	Éste trabajo
H66- γ	Derivado de H66. Δ ORF14:: <i>Gm^R</i>	Éste trabajo

Amp^R- resistencia a ampicilina

Gm^R-resistencia a gentamicina

Tet^R-resistencia a tetraciclina

Para las cepas de *E. coli*: Ampicilina 100 µg/mL, gentamicina 15 µg/mL, tetraciclina 15 µg/mL. Para las cepas de *P. aeruginosa*: gentamicina 50 µg/mL, tetraciclina 100 µg/mL a menos que se indique otra concentración. La evaluación del crecimiento bacteriano se siguió mediante la determinación de densidad óptica a 600nm (OD_{600nm}, DU® 640 spectrophotometer BECKMAN). Las muestras se tomaron en intervalos de una hora. En caso de ser necesario se realizaron diluciones 1:10 en medio LB fresco.

7.3 Construcción de plásmidos

Para la construcción del vector pHERD26T-Gp14 se amplificó, por PCR, el fragmento *NcoI-HindIII* del gen *gp14*, con los primers Gp14_Fwd y Gp14_Rvs (Anexo, Tabla A1 *primers* 1 y 2) y polimerasa High Fidelity (Jena Bioscience). El fragmento amplificado por PCR y el vector pHERD26T fueron digeridos con las enzimas *NcoI* y *HindIII* (Jena Bioscience) y visualizados en gel, para su posterior purificación (PCR purification kit, Jena Bioscience) y ligación (T4 ligase, Jena Bioscience). La inserción de la etiqueta de seis histidinas (6His) en el extremo carboxilo terminal del ORF14 se realizó por mutagénesis dirigida sobre la construcción pHERD26T-Gp14 (QuickChange Lightning, Stratagene), bajo las instrucciones del proveedor, con los *primers* 6his_Gp14_a y 6his_Gp14_b (Tabla A1, *primers* 3 y 4).

Para la construcción de pPROEX-LexA_{Pa}, se amplificó, por PCR, el fragmento *KpnI-HindIII* del gen *lexA* (PA3007) de *P. aeruginosa* PAO1 con los *primers* LexA_Fwd y LexA_Rvs (Tabla A1, *primers* 5 y 6). El fragmento de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* (Jena Bioscience) y *HindIII* y, después de su visualización en gel y recuperación, ligado en el vector pPROEX restringido con las mismas enzimas. La clonación sitio dirigida en pPROEX permite que el extremo amino terminal del PA3007 se fusione con el marco de lectura insertando la etiqueta 6His.

La construcción de los diferentes plásmidos pJET-reco incluye la generación de un fragmento de ADN mediante la técnica de *splicing overlap extension PCR* (SOE-

PCR (Horton *et al.*, 1990) y la inserción del fragmento en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific). Para la realización del SOE-PCR se diseñaron *primers* con temperaturas de fusión (T_m) similares para amplificar las tres regiones de interés: las dos zonas de recombinación, RH1 y RH2, y el gen de resistencia a gentamicina. El diseño de los *primers* permite la fusión de los tres fragmentos en una reacción de PCR adicional. Los *primers* utilizados se muestran en el anexo (Tabla A1, *primers* 15-25) (figura Anexo A14). De manera breve, los *primers* GmR_Fwd y GmR_Rvs (15 y 16) amplifican el gen de resistencia a gentamicina *aacC1*; las parejas 17-18 y 21-22 amplifican la región de 300 pb correspondiente a las bases vecinas del extremo 5' del ORF14 (RH1). Los *primers* 18 y 22 contienen en su extremo 5' bases homólogas al gen *aacC1*. Las parejas 19-20, 23-24 y 25-24, amplifican 300 pb con homología a los nucleótidos vecinos al extremo 3' del ORF14 (RH2). Los *primers* 20, 23 y 25 contienen en su extremo 5' bases homólogas al gen *aacC1*. Los tres fragmentos fueron obtenidos en reacciones PCR individuales (High Fidelity polymerase, Jena Bioscience), se verificó la integridad del fragmento, así como la ausencia de amplicones inespecíficos, mediante visualización en gel de agarosa al 1%. Para la fusión de fragmentos, se realizó una reacción PCR de 25 ciclos con la mezcla de reacción de 100 ng de cada amplicón (RH1, RH2 y *aacC1*), los *primers* 17-20 o 21-24, según la construcción (10 pM cada uno), mezcla de dNTPs (1 mM), polimerasa y el buffer correspondiente (High Fidelity polymerase, Jena Bioscience). La obtención del amplicón RH1-*aacC1*-RH2 fue verificada por gel de agarosa al 1%. El fragmento RH1-*aacC1*-RH2 fue clonado en el vector pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific) bajo las indicaciones del proveedor. La construcción generada se denominó pJET-reco. La construcción pJET-reco posee el origen de replicación pMB1, funcional sólo en enterobacterias (Kues y Stahl, 1989) permitiendo que actúe como vector suicida en *P. aeruginosa*.

Las construcciones pHERD26T-Gp14 y pPROEX-LexA_{Pa}, se utilizaron para los ensayos de sobreproducción y enriquecimiento de las proteínas. Las construcciones pJET-reco se utilizaron para la eliminación del ORF14 del fago H66 mediante recombinación homóloga. Todas las construcciones se propagaron y seleccionaron en *E. coli* DH5 α , con la selección del antibiótico correspondiente. La purificación de

las construcciones fue realizada mediante Wizard® plus, DNA purification kit (Promega). Las construcciones fueron analizadas por secuenciación (*Bigdye Terminator* Thermofisher Scientific). Las características de los *primers* empleados se detallan en la Tabla A1 del anexo.

7.4 Generación de los fagos deletantes para el ORF14

Para la eliminación genómica de *gp14* del fago H66, se siguió una versión modificada de Rice *et al.* (Rice *et al.*, 2009). Como vector suicida se utilizaron las construcciones pJET-reco. Células electrocompetentes de la cepa PAO1(H66) mediante una variación de la técnica de Choi (Choi y Schweizer, 2005), fueron transformadas con 500 ng de plásmido pJET-reco, o 100 ng de plásmido pUCP24 (control positivo). Como control negativo se utilizaron células sin plásmido. Posterior a la electroporación, las células se recuperaron en 1mL de LB fresco, durante 2 h con agitación a 37°C. Se cosechó la totalidad de células, por centrifugación (7,000 rpm, 5 min), y se sembraron en agar LB con gentamicina (50µg/mL LB-Gm⁵⁰). Las placas se mantuvieron a 37°C por 24 horas. Las colonias que crecieron en presencia del antibiótico se resembraron, en tres pases consecutivos, sobre agar LB-Gm⁵⁰, para su posterior análisis por PCR de colonia, mediante el uso de los *primers* RecoSeq_Fwd y RecoSeq_Rvs (Anexo Tabla A1, *primers* 26 y 27). El conjunto de *primers* generan un fragmento de 820 pb cuando contiene la región silvestre (*gp14*), o un fragmento de 1500 pb si la doble recombinación se llevó a cabo exitosamente. Las candidatas que presentaron el fragmento de 1500 pb, así como resistencia a gentamicina se consideraron candidatas positivas. Se probó que las candidatas recombinantes fueran capaces de producir fago libre y que dicho fago podía infectar nuevas células de *P. aeruginosa* PAO1. Las lisógenas que fueron positivas para la prueba de producción de fago se analizaron por secuenciación en la región de ADN involucrada en la recombinación. Las lisógenas PAO1(H66) que se corroboraron correctas en el proceso de recombinación fueron denominadas PAO1(H66-α), PAO1(H66-β), o PAO1(H66-γ), de acuerdo a la construcción utilizada para la recombinación.

7.5 Enriquecimiento de proteínas

Para la expresión de la proteína Gp14, la construcción pHERD26T-Gp14 se transformó por electroporación en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, la sobreexpresión se realizó por adición del inductor arabinosa a una concentración final del 0.2 % (13.3mM). La sobreexpresión de LexA se realizó en *E. coli* DH5 α , a partir de la construcción pPROEX-LexA_{Pa}, utilizando como inductor IPTG a una concentración 0.1 mM. Las bacterias se crecieron en LB suplementado con el antibiótico correspondiente a cada plásmido (ver Tabla 3) a 37°C con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (OD_{600nm}) de 0.3. A cada cultivo se agregó el inductor y se mantuvieron a 37°C con agitación por cuatro horas. Para la recuperación de ambas proteínas, portadoras de la etiqueta 6His, se recuperó el botón celular del cultivo por centrifugación (5,500 g, 15 minutos) y se llevó a la lisis bajo condiciones nativas. Brevemente, el botón celular se resuspendió en *buffer lisis* frío (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8.0), se adicionó lisozima a 1 mg/mL y se incubó 30 minutos en hielo. La muestra se sonicó en agua/hielo en pulsos con amplitud de 10 micrones por 10 segundos, con descanso de un minuto. El lisado celular se centrifugó (11,000 g, 30 minutos, 4°C) para eliminar los residuos de la lisis. El enriquecimiento se realizó a partir del sobrenadante obtenido del lisado y por cromatografía de afinidad mediante el uso de resina de níquel (Quiagen) siguiendo las indicaciones del proveedor. El lisado celular se colocó en contacto con la resina de níquel en agitación (200 rpm, ON, 4°C). La mezcla resina-lisado se colocó en columna cromatográfica y se dejó asentar (~1h), Se permitió el flujo de la columna por gravedad y se eliminó el exceso de líquido. Se realizaron tres lavados a la resina con 3 mL con *buffer* lavado 1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH=8.0) y tres lavados con 2 mL de *buffer* de lavado 2 (*buffer* 50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 50 mM imidazol, pH=8.0). Finalmente, se eluyeron las proteínas de interés con *buffer* de elución (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 100 mM imidazol, pH=8.0). En el caso de la proteína Gp14, posterior al enriquecimiento con la resina, fue concentrada mediante centrifugación y el uso de filtros de 10 kDa (Amicon). Ambas proteínas se dializaron con tres lavados de 600 mL, cada uno, de solución de diálisis (0.01M Tris-HCl, 5% glicerol, lavados en frío de ~12h). Las

proteínas obtenidas se cuantificaron por método colorimétrico *Lowry* (DC™ Protein assay, Biorad). Se verificó su enriquecimiento en geles SDS-PAGE-urea al 16%, y se identificaron por análisis *western-blot* con anticuerpos anti-6his (Sigma-Aldrich). Para su almacenamiento se agregó glicerol (en relación 1:1) y se guardaron a -20 °C. Las proteínas enriquecidas se utilizaron en los ensayos de retardamiento (EMSA).

7.6 Ensayo de sobrevivencia a luz UV

Se realizaron cultivos ON de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y PW7144, transformadas o no con el vector pHERD26T o pHERD26T-Gp14. Se realizó una dilución 1:100 de cada cultivo en medio LB fresco y se incubaron los cultivos a 37°C con agitación (Gyrotory Water Bath Shaker G76D, New Brunswick Scientific) hasta alcanzar una $OD_{600nm} = 1.0$ (UFC/mL $\sim 10^9$). En ese punto se realizaron diluciones seriadas en medio TMG (NaCl 0.2 M, Tris-HCl 1mM, Mg_2SO_4 0.05 mM, gelatina 0.1%, pH-7.4). Las diluciones de cada cultivo fueron goteadas, en volúmenes de 5 μ L, sobre cajas LB o LB/ara 0.2%. Se permitió que las gotas se secaran. Un juego de cajas fue irradiado en su superficie con luz UV (lámpara UVP-UV G-54, 6 watts, con longitud de onda 254nm) a una distancia de 40 cm. La caja se dejó bajo la luz ultravioleta durante 10 segundos. El otro juego de cajas no fue irradiado. Las cajas fueron protegidas de la luz visible e incubadas ON a 37°C, para la evaluación del crecimiento de colonias.

7.7 Ensayos de retardamiento (EMSA)

Los ensayos de retardamiento incluyen análisis de las cajas SOS del gen PA3007 (*lexA*), las cajas SOS putativas del fago H66 y la región promotora del gen de resistencia a tetraciclina. Fragmentos de 120 pb de las regiones señaladas, fueron amplificadas mediante reacción PCR (High Fidelity polimerase, Jena Bioscience) y los *primers* BoxSOS_Fwd, BoxSOS_Rvs, Box32_Fwd, Box32_Rvs, Box70_Fwd, Box70_Rvs, PromTet_Fwd y PromTet_Rvs (Tabla A1, *primers* 7-14). Los productos de PCR fueron purificados con el Kit PCR purification (Jena Bioscience) y

cuantificado por espectrometría (nanodrop). Cantidades constantes de ADN (100 nM) se hicieron interaccionar con concentraciones crecientes de proteína LexA_{Pa} o Gp14. Para la interacción con la región promotora del gen *lexA* se utilizaron concentraciones crecientes de LexA (0, 0.93, 1.9, 2.8, 3.7, 4.6, 5.3, 6.5 y 7.4 μM) y de Gp14 (0, 13.1, 17.5, 21.9, 26.3, 30.6, 35, 39.4 y 43.8 μM). Para las regiones promotoras del fago H66 se emplearon concentraciones de LexA 0, 0.46, 0.93, 1.39, 1.85, 2.31, 2.78, 3.29 y 3.70 μM y de Gp14 0, 4.4, 8.8, 13, 17.5, 21.9, 26.3, 30.6 y 35 μM . Las mezclas de reacción se realizaron en volúmenes de 10 μL en presencia de *buffer* de reacción 1x (MgCl₂ 5M, EDTA 25 mM, DTT 2.5 mM, NaCl 250 mM, Tris-HCl pH 7.5 50 mM). Las reacciones se mantuvieron a temperatura ambiente por 1 hora, se adicionó *buffer* de carga (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2% azul bromofenol, 40% glicerol) a concentración final 1x. La formación de los complejos se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8%, en condiciones nativas (TBE 0.5x (Tris-Borato 4.5mM, EDTA 1mM), 250V, 12 minutos a temperatura ambiente). Los geles estaban precorridos por 1h a 100V. Los complejos se evidenciaron por tinción con bromuro de etidio y visualización con luz UV. Para la determinación de las constantes de equilibrio los geles de cada condición se realizaron por triplicado y la concentración de complejos y ADN libre se cuantificaron por análisis de imagen con el programa *ImageJ*. Los datos obtenidos se analizaron con gráficos de concentración proteína (abscisa) vs concentración complejo (ordenada). La cinética obtenida se modeló matemáticamente bajo la fórmula

$$[DNA] = [DNA]_{min} + \frac{([DNA]_{max} - [DNA]_{min}) \cdot [proteína]^n}{k_d^n + [proteína]^n},$$

para obtener la constante de disociación (K_d).

7.8 Ensayos de competencia

Para los ensayos de competencia se siguió una estrategia similar a los ensayos de retardamiento, con la diferencia de que ambas proteínas se colocaron durante la mezcla de reacción. En una primera etapa se mantuvo constante la concentración de la proteína LexA y la proteína Gp14 se colocó en las concentraciones crecientes

indicadas en la sección anterior. La segunda etapa consistió en mantener constante la concentración de Gp14 y variar LexA en concentraciones crecientes. Cada reacción se realizó con 100 nM de ADN y se mantuvo en volúmenes de 10 μ L en presencia del *buffer* de reacción utilizado en los ensayos EMSA, bajo las mismas condiciones. La visualización de los complejos se realizó por geles PAGE nativos al 8%. Las cantidades específicas de proteínas empleadas se indica en la sección de resultados.

7.9 Evaluación del fago libre en cepas lisógenas

Se realizó un cultivo ON de las lisógenas PAO1(H66) y PAO1(H66- γ) en medio LB a 37°C con agitación. El cultivo de la lisógena de H66- γ se suplementó con gentamicina. De cada lisógena se realizó una dilución 1:100 en medio LB fresco y se mantuvieron a 37°C en agitación. El crecimiento bacteriano se monitoreó por medición de OD_{600nm} hasta alcanzar un valor de 0.4. En ese momento se tomó 1 mL de cultivo el cual se enfrió y centrifugó (14,000 rpm por 3 minutos, 4°C). Se recuperaron 500 μ L del sobrenadante e inmediatamente después se hicieron diluciones seriadas del mismo en medio TMG. Para obtener los títulos virales de cada muestra, las diluciones se gotearon sobre tapices de *P. aeruginosa* PAO1 en agar T ϕ suave. Las cajas se incubaron a ON a 37°C, para posterior conteo de placas y cálculo de los títulos.

7.10 Análisis de la inserción del fago en el genoma de la bacteria

Para la evaluación cualitativa de la presencia del fago en el genoma de su hospedera se utilizó la técnica previamente descrita (Cazares, 2016). Brevemente, a partir de ADN obtenido de las lisógenas de interés y de PAO1, se realizaron reacciones PCR con los *primers* F-PAO1-H66-long, R-PAO1-H66 (02) y F-PAO1-H66-short, que hibridan sobre el genoma de la bacteria, y los *primers* R-H66-pro-left y F-H66-pro-right que hibridan en los extremos del genoma del fago (Tabla A1, *primers* 28-32). De no de existir un profago en el sitio, la mezcla de *primers* 28-29 o 30-29 generan un amplicones de 500 y 381 pb, respectivamente, pero de existir un profago las condiciones de la reacción no permitirán amplificar la totalidad del

genoma, lo que se reflejará como ausencia de amplicón. Si se usan combinaciones de los *primers* 30-31, 30-32 o 28-32, se generan fragmentos de 555, 470 y 635 pb, respectivamente, indicativo de la presencia del profago. Las mezclas de reacción incluyen 200 ng de ADN molde, dNTPs 10 pM, 10 μ M de cada primer, 1x *buffer* de reacción, y 0.1 μ L Taq polimerasa (Jena Bioscience) en volúmenes de reacción de 10 μ L. La reacción se llevó a cabo en 25 ciclos bajo las especificaciones del proveedor y la T_m indicada, de acuerdo a los *primers* utilizados. El producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 1% con tinción con bromuro de etidio.

7.11 Inducción del ciclo lítico a partir de bacteria lisógena

Se realizaron cultivos ON de bacterias lisógenas PAO1(H66) y PAO1(H66- γ), transformadas o no con los vectores pHERD26T o pHERD26T-Gp14. Los cultivos ON se suplementaron con el antibiótico correspondiente a la selección de plásmidos. Se hizo dilución en medio LB fresco de cada una de las cepas y se cultivaron (37°C en agitación) hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4, momento en el cual se agregó arabinosa a una concentración final del 0.2%, y se mantuvo en las mismas condiciones de cultivo por 15 minutos. Pasado el tiempo cada cultivo fue dividido en dos volúmenes iguales, uno de ellos se mantuvo en las condiciones de crecimiento, mientras que al segundo se agregó MMC a una concentración final de 4 μ g/mL, para inducir al profago, y se mantuvo en las condiciones de crecimiento. A partir de la adición de MMC fue considerado el tiempo cero. Se tomó 1 mL de muestra de cada cultivo en periodos de una hora, desde el tiempo cero hasta 5 horas posteriores. Cada muestra fue centrifugada (14,000 rpm, 3 minutos, 4°C), de las cuales sólo se recuperaron 500 μ L del sobrenadante. Se hicieron diluciones seriadas de cada uno de los sobrenadantes en medio TMG. Cada muestra fue titulada en tapices de *P. aeruginosa* PAO1 en agar suave. Las cajas fueron incubadas ON a 37°C, para posterior conteo de placas y cálculos de título. De manera paralela, para cada uno de los cultivos, se monitoreó el crecimiento celular con el seguimiento de la OD_{600nm} cada hora.

8. RESULTADOS

8.1 Gp14 es conservada en fagos F116-like y es homóloga al NTD de LexA

La designación original de *gp14* como *lexA-like* (Maya-Lucas, 2012) nos dirigió a realizar el análisis bioinformático a mayor profundidad. De primera instancia se realizó un alineamiento local de la secuencia de 210 nucleótidos del gen *gp14* con respecto a la base de datos no redundante del *Genbank*. Los resultados muestran que los mayores porcentajes de identidad se presentaron con respecto al genoma de las cepas de fagos vegetativos F116-like (Fig. 4). Además, regiones del genoma de diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaban identidades mayores al 95% con respecto a *gp14*, este resultado sugería que en dichas regiones de los genomas bacterianos podrían estar presentes profagos.

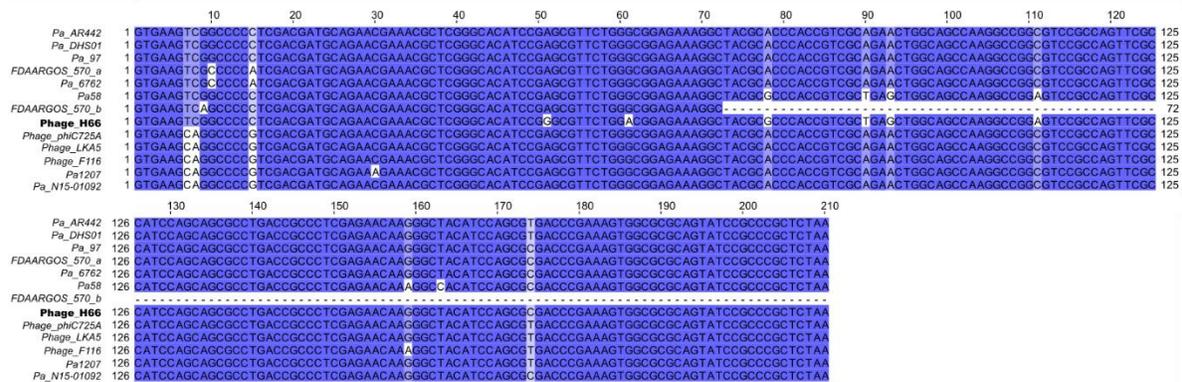


Figura 4. Análisis BLASTn de *gp14*. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de *gp14* del fago H66 (centro negritas), con respecto a secuencias al genoma de fagos vegetativos (parte inferior) y secuencias de cepas de *P. aeruginosa* (parte superior) muestran regiones con porcentajes de identidad mayores al 95%.

Para corroborar esta hipótesis se tomaron como muestra las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, 97, AR442, DHS01, FDAARGOS_570, 6762, N15-01092, y Pa1207, obtenidas del análisis BLASTn con el gen *gp14*, de las cuales se obtuvieron sus genomas y se realizó la búsqueda de profagos F116-like realizando un alineamiento con el genoma del fago H66, mediante el uso de MUMer. El alineamiento demostró que las regiones con homología a *gp14* correspondían a profagos F116-like (Fig. 5), presentando un 64% de identidad. De manera interesante, la cepa FDAARGOS_570 indicó la presencia de dos fagos tipo F116 (denominados

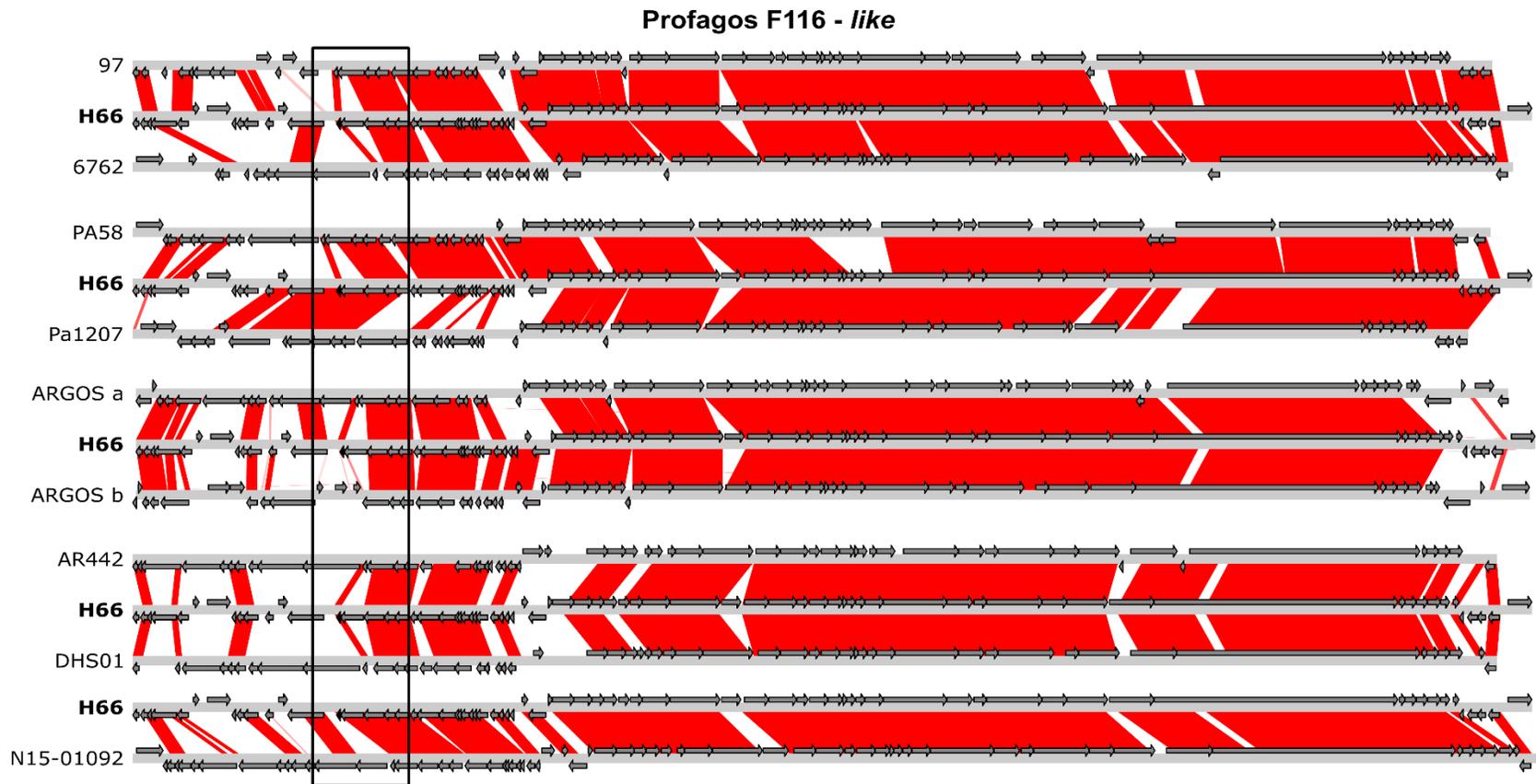


Figura 5. Presencia de profagos F116-like en cepas de *P. aeruginosa*. Las regiones del genoma de las cepas positivas a la presencia de homólogos a *gp14* fueron analizadas por BLASTn contra el genoma de H66. Se muestran los alineamientos en conjuntos de tres, al centro de cada conjunto la secuencia del genoma de H66 y a los extremos la región del genoma de las diferentes cepas en rojo se muestra las regiones de identidad mayores al 64%. A la izquierda se muestra la identificación de cada genoma utilizado. En el genoma de H66 se delimita con un recuadro la región donde se encuentra *gp14* (flecha negra) y sus homólogos.

FDAARGOS_570_a y FDAARGOS_570_b) en posiciones diferentes, ambos profagos presentaron homólogos a *gp14*, sin embargo, el profago b tiene una versión trunca (Fig. 4). La traducción *in silico* de los genes homólogos a *gp14* muestran secuencias de aminoácidos con un 99% de identidad con respecto a Gp14. Este conjunto de resultados muestra que *gp14*, perteneciente al bloque de replicación y reparación del ADN, está altamente conservado en la familia de fagos F116.

Para obtener información sobre la función de la proteína codificada en *gp14*, se analizó la secuencia de 69 aminoácidos de Gp14 en un análisis BLASTp contra una base de datos no redundante del *Genbank*. Si bien, la mayoría de los resultados de alineamiento con mayor porcentaje de identidad se dirigen a proteínas hipotéticas de tamaño similar al de Gp14, otra parte de los alineamientos señalan identidad de alrededor del 40% con los primeros 69 aminoácidos de proteínas LexA de bacterias como *Pseudomonas graminis*. Más importante aún, el análisis muestra la presencia de dominios conservados, específicamente el dominio HTH de la familia de proteínas LexA, en la secuencia de Gp14. En el caso de las proteínas hipotéticas, encontramos que la mayoría corresponde a profagos presentes en las cepas bacterianas. Gracias al dato sobre la presencia del dominio HTH y su similitud con otras proteínas LexA se decidió realizar la comparación de Gp14 con LexA de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (LexA_{Pa}), hospedera del fago H66, y con LexA de *E. coli* (LexA_{Ec}), la proteína arquetipo en el estudio de esta familia de proteínas. Dado que el dominio HTH de las proteínas LexA se confina al dominio amino terminal (NTD), el cual coincide en longitud con la proteína Gp14, se realizó el alineamiento entre las tres secuencias, pero considerando sólo los 69 primeros aminoácidos de las proteínas bacterianas. El análisis arrojó una identidad mayor al 30% entre Gp14 y el NTD de ambas proteínas, mientras que los NTD de las proteínas bacterianas alcanzan 64% de identidad entre sí (Fig. 6).

La mayoría de los aminoácidos conservados se confinan en las regiones de las hélices 2 y 3, sin embargo, no coinciden en su totalidad con los aminoácidos

reportados con interacción en la secuencia de las cajas SOS, de tal forma que sólo 3 de los 15 aminoácidos reportados se conservan.

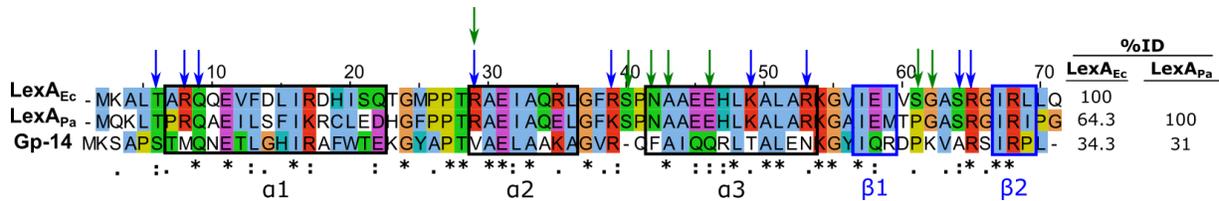


Figura 6. Alineamiento de aminoácidos de Gp14 y los dominios amino-terminales de las proteínas LexA_{Ec} y LexA_{Pa}. A la izquierda se identifican cada secuencia, a la derecha de los alineamientos se muestran los porcentajes de identidad con respecto a cada proteína bacteriana. En la parte superior se señalan con flechas azules los aminoácidos reportados que presentan interacción con el esqueleto fosfodiéster del ADN, y en flechas verdes los aminoácidos que interaccionan directamente con las bases (Zhang *et al.*, 2010). En recuadros se resaltan los aminoácidos que conforman los diferentes elementos estructurales del dominio HTH reportados para LexA_{Ec}, en negro las hélices alfa y en azul las láminas beta (Fogh *et al.*, 1994). En la parte inferior se muestran los símbolos convencionales para señalar los aminoácidos conservados en las tres secuencias (*), en dos secuencias (:) y cambios sinónimos en una de las secuencias(·).

La siguiente etapa del análisis consistió en realizar la predicción de la estructura de Gp14 y comparar con la estructura reportada para la proteína LexA_{Ec} (Zhang *et al.*, 2010). El modelo de la secuencia de Gp14 se determinó mediante el *software I-TASSER*, donde los modelos se evalúan a través del *C-score*, el cual tiene valores entre -5 y 2, entre mayor sea el valor mejor será la predicción del modelo. El modelo elegido para Gp14 presentó un *C-score* de 0.28, y mostró una proteína conformada por 3 α -hélices y 2 láminas- β en su extremo carboxilo terminal (Fig. 7). Al realizar una superposición del modelo de Gp14 contra la estructura cristal de LexA_{Ec} (PDB ID: 3JSO), se obtuvo un valor de *TM-score* de 0.6315 entre ambas. *TM-score* es una métrica para la similitud estructural de dos modelos de proteínas, mide la similitud del plegamiento global de forma independiente a la longitud de las estructuras comparadas. Los valores van de 0 a 1, donde 1 es el acoplamiento perfecto entre dos estructuras. Valores menores a 0.17 corresponde a proteínas no relacionadas elegidas al azar. Si el valor es mayor que 0.5, se asume el mismo plegamiento indicando similitud estructural, por lo cual, Gp14 presenta similitud con la estructura del NTD de LexA_{Ec}.

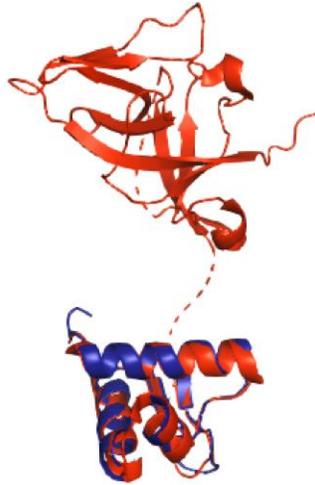


Figura 7. Gp14 es homólogo al NTD de LexA_{Ec}. Se muestra la sobreposición de la estructura cristal de un monómero de LexA (rojo) y la estructura predicha para Gp14 (azul). Se observa la concordancia entre los diferentes elementos y la ausencia del dominio carboxilo terminal del Gp14

Los resultados *in-silico* sugirieron que Gp14 podría tener una actividad similar al NTD de la proteína LexA bacteriana, por lo cual se decidió evaluar el efecto de la presencia de la proteína sobre los procesos relacionados a la proteína LexA.

8.2 La proteína Gp14 interfiere con la respuesta SOS de *P. aeruginosa* PAO1

Dado que la proteína arrojaba evidencia de ser una versión trunca de las proteínas LexA bacterianas, se postuló la hipótesis de que Gp14 tendría la capacidad de unirse a las cajas SOS, reconocidas por LexA_{Pa}. La unión de Gp14 podría interferir con el proceso normal de la respuesta SOS de la bacteria, específicamente reprimiendo los genes SOS. Dado que Gp14 carece del dominio carboxilo terminal (CTD) de la proteína bacteriana es probable que, después de un estímulo que genere la activación de la respuesta SOS, Gp14 permanezca unida a las cajas SOS al no ser sensible a dicho estímulo. La represión de los genes SOS se vería reflejada como la inhabilidad de la bacteria de reparar el daño sobre el ADN, impactando en la sobrevivencia de la célula. Para probar la hipótesis se decidió realizar un ensayo de sobrevivencia a luz UV sobre cepas *P. aeruginosa* transformadas con los

vectores pHERD26T y pHERD26T-Gp14. Como control de una cepa deficiente en la respuesta SOS se utilizó la cepa PW7144, la cual carece de la proteína RecA, por lo cual no puede activarse la respuesta SOS.

Previo a desarrollar el ensayo de sobrevivencia fue necesario demostrar que la construcción pHERD26T-Gp14 producía Gp14, la cual se encuentra bajo la regulación del promotor pBAD inducible por arabinosa. La cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, transformada con la construcción, se utilizó para evaluar si la sobreproducción de Gp14 tenía un impacto sobre el crecimiento de la bacteria. Además, sobre el mismo ensayo de inducción se corroboró la expresión de la proteína mediante geles SDS-PAGE. Dado que Gp14 es de un tamaño menor a 8 kDa, su visualización en geles fue difícil, sobre todo porque el vector pHERD26T, utilizado como control negativo, presenta el fragmento α -lacZ (7KDa) bajo el promotor pBAD (Qiu *et al.*, 2008), por lo que ambas proteínas se expresan en presencia del inductor dificultando determinar las diferencias en los perfiles de proteína de las cepas transformantes para los vectores pHERD26T y pHERD26T-Gp14. Para evidenciar la producción de Gp14, se optó por la inserción de una etiqueta de 6 histidinas (6His) en el extremo carboxilo terminal de la proteína, lo cual permitió su enriquecimiento por cromatografía de afinidad y detección mediante *western blot* (Fig. 8a).

El resultado permitió definir que la proteína incrementó su concentración con respecto al tiempo en presencia de arabinosa. La cinética de crecimiento, seguida por medición de la densidad óptica a 600nm (OD_{600nm}), no mostró efecto tóxico en las condiciones de expresión, con una concentración final de 0.2% de arabinosa durante 4 horas post-adición del inductor (Fig. 8b). El incremento en la concentración del inductor a 1% (66.6 mM) mostró un ligero retraso en el crecimiento de la bacteria después de 6 horas de inducción (Fig. 8c).

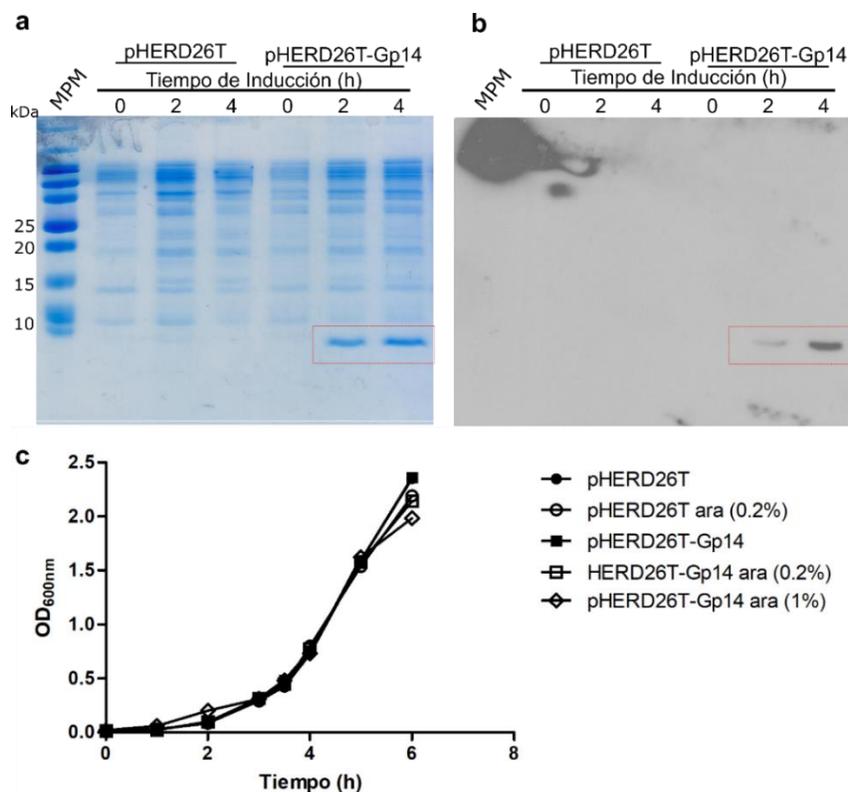


Figura 8. Gp14 es producida a partir de la construcción pHERD26T-Gp14. a) SDS-PAGE de las fracciones de proteínas eluidas posteriores al enriquecimiento con la resina de Ni-NTA a las 0, 2 y 4 horas post inducción con arabinosa. A la izquierda se muestra el control de vector vacío y a la derecha la construcción que porta Gp14. Encerrado en un recuadro se muestra la proteína Gp14 que coincide con el tamaño de acuerdo al marcador de peso molecular (MPM). **b)** Ensayo *western blot* para detección de la etiqueta 6His. Un gel en iguales condiciones que el inciso b fue transferido a membrana para determinación con anticuerpos. Se muestra la autorradiografía obtenida. En un recuadro se muestra la proteína que es positiva al reconocimiento. **c)** Cinética de crecimiento de la cepa PAO1 transformante para los plásmidos pHERD26T (círculos) y pHERD26T-Gp14 (cuadros) en ausencia (color sólido) o presencia de L-arabinosa (ara) como inductor a dos diferentes concentraciones (0.2% y 1%).

Una vez corroborada la expresión de Gp14 se llevaron a cabo los ensayos de sobrevivencia. Utilizando las cepas PAO1 y PW7144 (RecA⁻) transformantes para pHERD26T y pHERD26T-Gp14, llevadas hasta una OD_{600nm} = 1.0, se realizaron diluciones seriadas y se gotearon sobre cajas LB y LB/ara 0.2%. Sobre las cajas, las células fueron irradiadas con luz UV (para detalles ver materiales y métodos). Como control negativo un juego de cajas no fue sometido a irradiación con luz UV. Todas las cajas fueron incubadas ON a 37°C protegidas de la luz y analizadas posteriormente.

La caja sin inductor y sin irradiación con luz UV mostró que todos los cultivos presentaban UFC/mL similares (Fig. 9a). En ausencia del inductor, pero con irradiación de luz UV, la cepa PAO1 disminuye su crecimiento en un orden de magnitud, mostrando capacidad de lidiar ante el daño generado por la luz UV (Fig. 9, comparar carril 1 de los paneles a y b). Por su parte, la cepa PW7144, no es capaz de lidiar ante el daño provocado por la luz UV, reflejándose como ausencia de crecimiento (Fig. 9b, carriles 4-6). El comportamiento de ambas cepas es independiente de los vectores que portan. La incapacidad de recuperación de la cepa PW7144 se debe a que en la ausencia de RecA no es posible producir RecA*, por lo cual la respuesta SOS no puede iniciar (Bell, 2005; Cox, 2007). Al evaluar la sobreproducción de Gp14 se encontró que la sola sobreexpresión de la proteína, generada por la presencia de arabinosa, representa un impacto sobre la viabilidad de las células las cuales disminuyeron su crecimiento en dos órdenes de magnitud con respecto a las células transformadas con el vector pHERD26T (Fig. 9c comparar carriles 2 y 3), el mismo efecto se observó en la cepa mutante RecA⁻ donde el daño es mayor al disminuir el crecimiento en 5 órdenes de magnitud (Fig. 9c comparar carril 3 y 6). Al agregar en el experimento la irradiación con luz UV, la sobreproducción de Gp14 potenció la inhibición del crecimiento de la cepa silvestre, reduciendo en 4 órdenes de magnitud con respecto a la cepa transformada con pHERD26T (Fig. 9d comparar carriles 2 y 3), y 2 órdenes con respecto a si misma sin irradiación con luz UV (Fig. 9 comparar carril 3 de los paneles c y d). Estos resultados sustentaron que, cuando Gp14 es sobreexpresada, se compromete la viabilidad de las células silvestres de *P. aeruginosa* PAO1, concordando con la hipótesis de interferir con la respuesta SOS, sin embargo, aún no se determinaba si Gp14 reconocía y se asociaba a las cajas SOS de la bacteria.

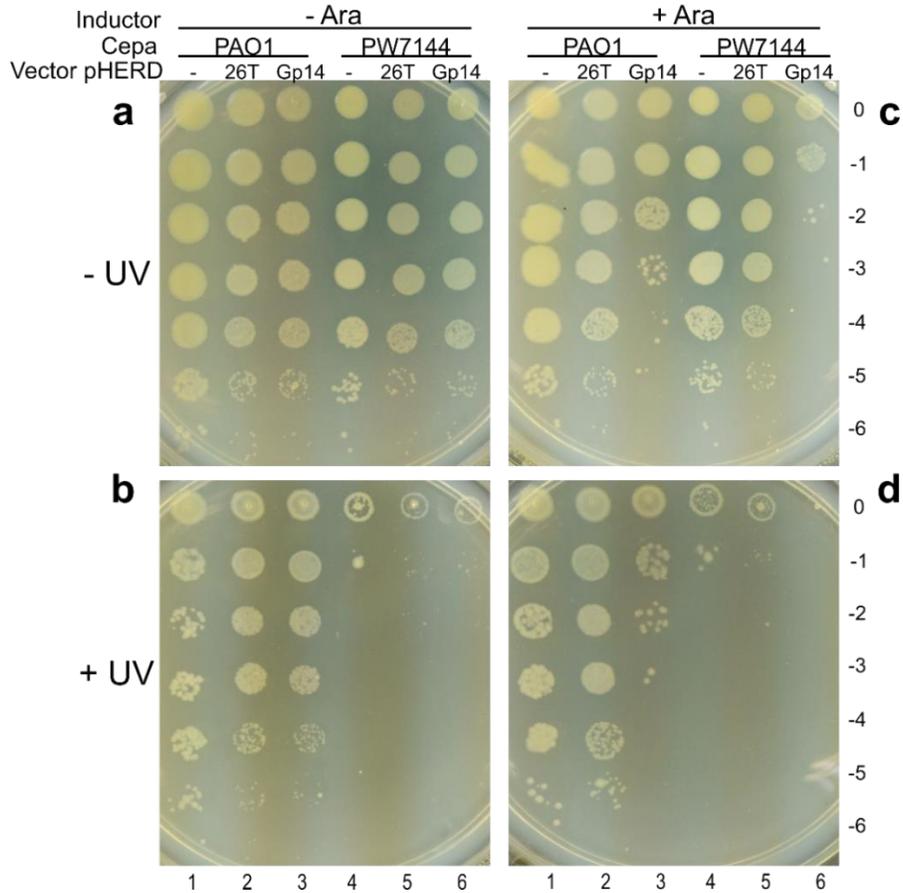


Figura 9. Ensayo de sobrevivencia a luz UV. Se muestran el resultado del crecimiento de las cepas PAO1 y PW7144, transformadas con los vectores pHERD26T (26T) o pHERD26T-Gp14(Gp14), después de ser sometidas a las siguientes condiciones **a)** Ausencia de arabinosa y no irradiación con luz ultravioleta. **b)** Ausencia de arabinosa e irradiación con luz ultravioleta. **c)** Arabinosa al 0.2% sin irradiación de luz UV. **d)** Arabinosa al 0.2% e irradiación con luz UV. En la parte superior se indican las cepas y el plásmido empleado en cada carril, la numeración de los carriles se indica al fondo de la imagen. A la derecha se muestran las diluciones empleadas de acuerdo a las filas.

8.3 Gp14 reconoce la caja SOS del gen *lexA* de *P. aeruginosa*

Para comprobar que Gp14 es capaz de reconocer las cajas SOS canónicas, reconocidas por LexA_{Pa}, se realizó un ensayo de retardamiento. Para ello se utilizó la región reguladora del gen *lexA* de *P. aeruginosa* (PA3007). Mediante PCR se obtuvo ADN de doble cadena con un tamaño de alrededor de 100 nucleótidos. La secuencia elegida contiene dos cajas SOS, una de ellas sobrepuesta a la región -10 del promotor (Fig. 10a), se sabe para *E. coli* que cada caja SOS es reconocida por un dímero de LexA_{Pa}. Como control negativo se eligió una secuencia promotora que carece de la presencia de cajas SOS, utilizándose la región reguladora del gen de resistencia a tetraciclina del vector pBR322, la cual también se amplificó por

PCR. Para el ensayo se emplearon tanto la proteína bacteriana LexA_{Pa}, control positivo de reconocimiento, como Gp14, la proteína en estudio, enriquecidas mediante el uso de la resina de níquel. Concentraciones crecientes LexA_{Pa} y Gp14 se pusieron en contacto con ambas regiones de ADN y los complejos formados fueron evaluados en geles de poliacrilamida. Ambas proteínas fueron capaces de formar complejos con la región promotora de *lexA* apreciándose dos bandas con diferente migración con respecto al ADN libre (Fig. 10 b y c). El número de bandas se asocia al número de cajas SOS presentes en la región de ADN. Así mismo, se observó que los complejos formados entre el ADN y Gp14 migran con mayor velocidad con respecto a los formados con LexA_{Pa}, tal como se espera por las diferencias de tamaño de las proteínas, mientras un monómero de LexA_{Pa} pesa 27 kDa uno de Gp14 tiene 8 kDa. La diferencia importante entre ambas proteínas se refleja en que se requiere una mayor cantidad de Gp14 para poder obtener interacción con la región de ADN, esto puede sugerir que la función de Gp14 depende de su concentración y/o acumulación. La interacción del ADN con ambas proteínas fue específica, puesto que al colocar bajo las mismas condiciones que la región promotora que carece de caja SOS no se observó la formación de complejos.

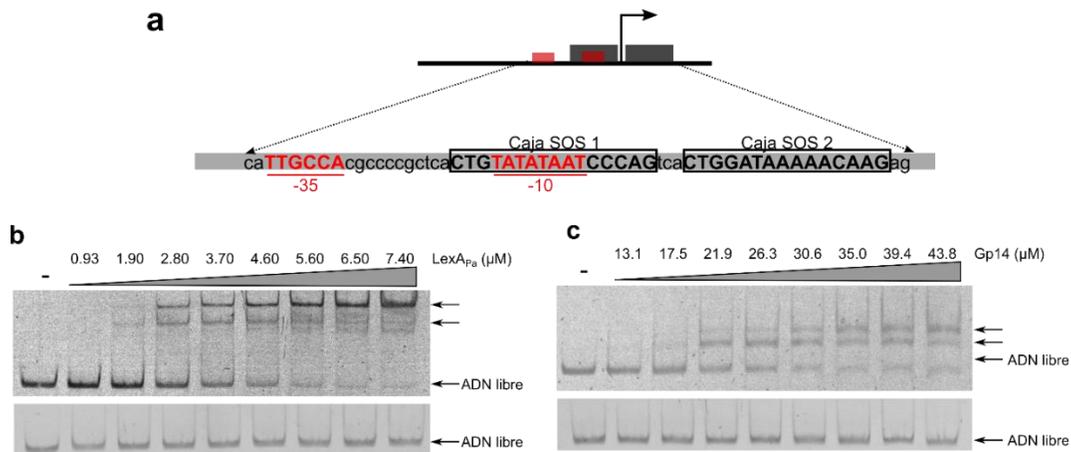


Figura 10. Gp14 se une a las cajas SOS de *lexA*. **a)** Esquema representativo de la región reguladora del gen *lexA* de *P. aeruginosa* utilizada en los ensayos EMSA. En rojo se señalan los sitios -10 y -35 del promotor, en recuadros negros se señalan las posiciones de las cajas SOS, las cuales difieren en secuencia. **b)** Ensayo de retardamiento utilizando la proteína LexA_{Pa} y la región promotora de *lexA*. En la parte inferior se muestra el ensayo con la región promotora del gen de tetraciclina. **c)** Ensayo EMSA de la región promotora de *lexA* en presencia de la proteína Gp14. En la parte inferior el control de la región promotora del gen de resistencia a tetraciclina. Para b y c, a la derecha, con flechas, se marca las posiciones del ADN libre y los complejos formados. En la parte superior se muestra la concentración de proteína empleado en cada caso.

Ya que se requirió mayor concentración de Gp14 para obtener complejos, se dedujo que la afinidad de la proteína es menor con respecto a la LexA_{Pa}. Para corroborarlo se analizaron las cinéticas de unión, por triplicado, y se cuantificó la formación de complejos para finalmente determinar la constante de disociación K_d . Las cinéticas obtenidas para ambas proteínas se utilizaron para el modelamiento matemático que permitió la estimación de la constante (Fig. 11). Se estableció que la K_d corresponde a la concentración a la cual el 50% de las cajas SOS se encuentran ocupadas, teniendo en cuenta que cada región de ADN tiene dos cajas SOS y no son de secuencia idéntica, de tal forma que se determinó la K_d para LexA_{Pa} en la región reguladora del gen *lexA* tiene un valor de 3.403 μM y la de Gp14 26.42 μM . Recordando que valores de magnitud mayor para la K_d es equivalente a menor afinidad de la proteína por el ADN, se corroboró que Gp14 presenta una afinidad 8 veces menor que LexA_{Pa} para le región promotora de *lexA*.

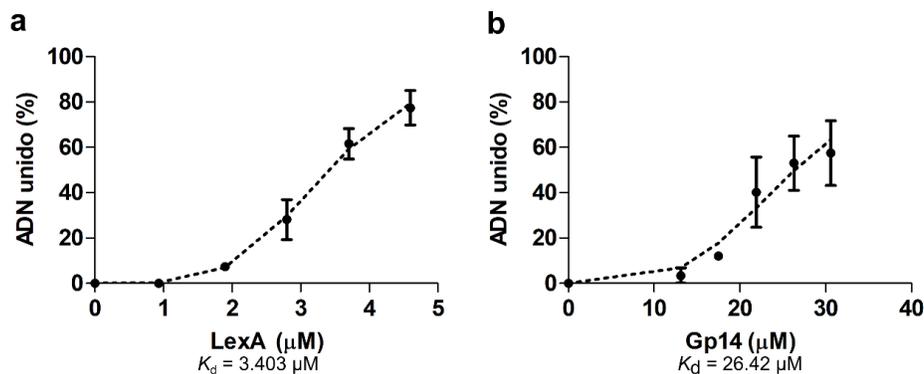


Figura 11. Cinéticas de unión proteína-ADN para estimación de K_d . Se muestran las cinéticas obtenidas de triplicados de los ensayos EMSA y cuantificación de los complejos a partir de las imágenes obtenidas para **a)** Cinética de unión de la región promotora de *lexA* en presencia de LexA_{Pa} y **b)** Cinética de unión de la región promotora *lexA* en presencia de Gp14.

Para reforzar la idea de que Gp14 está uniéndose a la caja SOS, se llevó a cabo un ensayo de competencia en el cual se colocaron ambas proteínas para la interacción directa con el ADN. La formación de cada tipo de complejo puede distinguirse gracias a la diferencia de tamaños de las proteínas. El ensayo se realizó con dos variantes, la primera manteniendo constante la concentración de LexA_{Pa} y colocando Gp14 en concentraciones crecientes; en el segundo caso se invirtieron

las proteínas. En ambos ensayos se observó la formación de los complejos ADN-LexA_{Pa} y ADN-Gp14 (Fig. 12), donde los últimos son predominantes sin importar cuál de las dos proteínas se mantenía constante. Ya que para poder observar la interacción con Gp14 se requieren concentraciones altas, esto puede favorecer la formación del complejo a pesar de la baja afinidad de la proteína. Este resultado también resalta el hecho de que la concentración de Gp14 es importante para llevar a cabo su función. Se descarta que ambas proteínas se unan al mismo tiempo ya que no se generaron complejos ADN-proteína de mayor tamaño que los ADN-LexA_{Pa}. La observación en la reducción de la intensidad de las bandas correspondientes a complejos ADN-LexA_{Pa}, al agregar Gp14, indica que esta última desplaza a la LexA_{Pa} unida, sugiriendo que ambas proteínas compiten por el mismo sitio de unión.

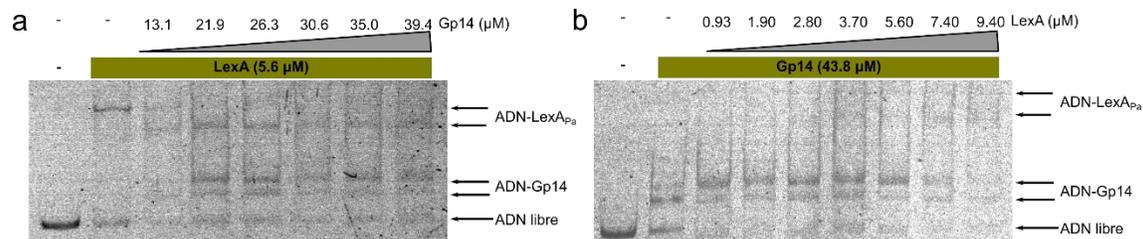


Figura 12 Ensayo de competencia LexA_{Pa} y Gp14. Se muestran las imágenes correspondientes a los ensayos de unión en presencia de ambas proteínas donde **a)** Se mantiene la concentración de LexA_{Pa} constante y Gp14 se coloca en concentraciones crecientes y **b)** Gp14 se mantiene en concentraciones constantes en presencia de concentraciones crecientes de LexA_{Pa}. Para ambos geles se muestra en la parte superior las concentraciones de las proteínas empleadas. A la derecha se indican con flechas los diferentes sitios de migración de los complejos formados.

Los resultados *in vitro* mostrados hasta este punto demostraron capacidad de unión de Gp14 al ADN bacteriano, específicamente sobre la caja SOS del gen *lexA* de *P. aeruginosa*. La competencia existente sobre la unión de Gp14 o LexA_{Pa} a la caja SOS correlaciona con la disminución en la sobrevivencia de bacterias que sobreexpresan la proteína Gp14, después de la incidencia de luz UV. Además, la unión de Gp14 a la caja SOS sugiere que puede interferir en otras cajas SOS del genoma bacteriano. Este resultado sumado al ensayo de sobrevivencia a luz UV señalan una participación de la proteína fágica en la regulación de los genes de respuesta

SOS de la bacteria, de manera específica inhibiéndola mediante su unión a las cajas SOS.

8.4 La sobreproducción de Gp14 inhibe la inducción del profago H66

El ciclo lítico del fago H66 es regulado por el represor *CI-like*, el cual es un homólogo al represor CI del fago lambda. Este tipo de represores tiene similitud con respecto a la proteína LexA, tanto estructural como funcional, ya que para su inactivación requieren la incidencia de un daño sobre el ADN con la consecuente activación de RecA (RecA*), de esta forma la inducción del profago depende de la respuesta SOS (Wegrzyn *et al*, 2012). La inactivación del represor *CI-like* permite que el fago inicie el ciclo lítico y, así, la formación de nuevas partículas víricas. Como consecuencia de la inducción hay un incremento del título del fago libre sumado a la lisis bacteriana. De tal forma que, como otra perspectiva para evaluar si Gp14 interfiere en la respuesta SOS, se llevó a cabo un ensayo de inducción del profago a partir de una lisógena con el uso de mitomicina C (MMC). Bacterias PAO1(H66) transformadas con pHERD26T o pHERD26T-Gp14, se crecieron a una $OD_{600nm}=0.4$, momento en el que se agregó arabinosa a una concentración final del 0.2% para permitir la expresión de Gp14 durante 15 minutos. Después de la inducción de Gp14, el ciclo lítico fue inducido por adición de MMC, los títulos de fago se determinaron en intervalos de una hora después de la adición de MMC. Se observó que las células transformadas con pHERD26T incrementan el título del fago libre de manera exponencial después de dos horas de la adición de MMC de manera independiente de la adición de arabinosa (Fig. 13a). Sin embargo, las células transformadas con pHERD26T-Gp14, cuando se induce la producción de Gp14 por adición de arabinosa y a pesar de estar presente la MMC, mantienen un título de fago libre bajo, el cual parece depender o estar ligado al crecimiento celular indicando que la inducción del profago esta reprimida por la sobreproducción de Gp14 (Fig. 13b). De esta forma se corroboró indirectamente la participación de Gp14 en la inhibición de la respuesta SOS. Es importante señalar que el fenómeno de inhibición del ciclo lítico se observó sólo cuando la proteína se produjo en exceso, debido a la inducción con arabinosa, ya que al evaluarse la inducción del ciclo lítico

con niveles de proteína correspondientes a la fuga transcripcional del vector (sin arabinosa) el profago sigue siendo sensible a la presencia de MMC (Fig. 13c y d).

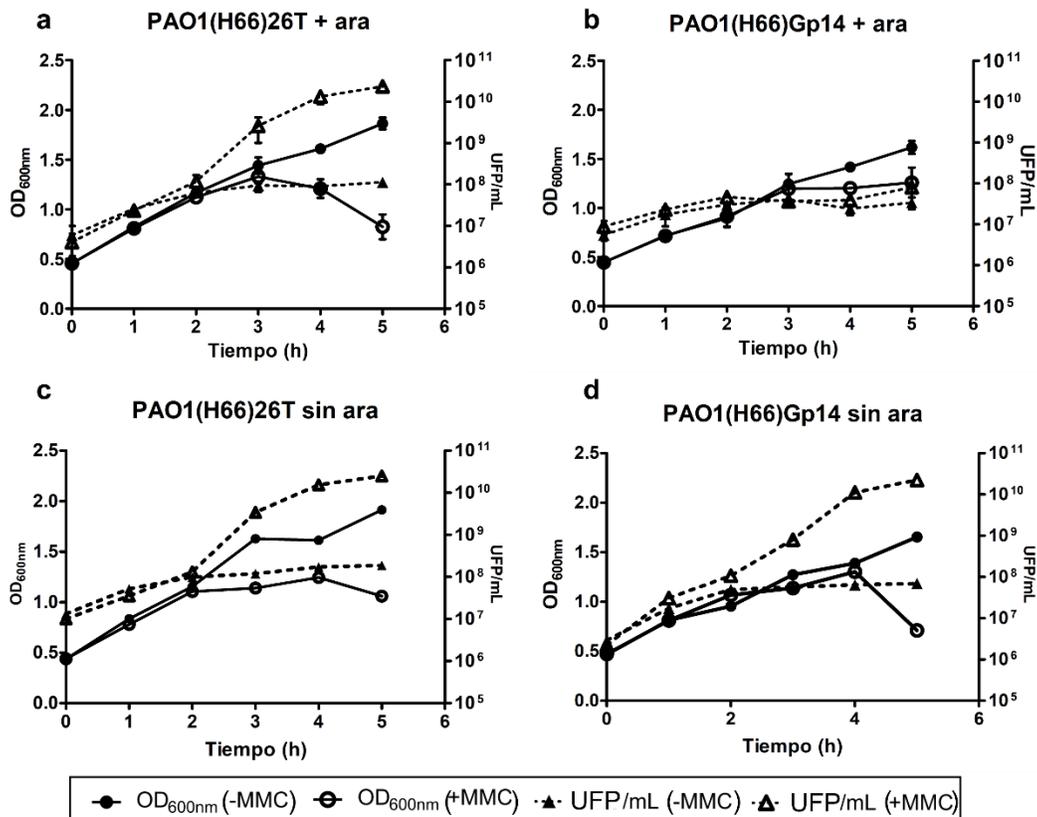


Figura 13. La sobreproducción de Gp14 inhibe el inicio la inducción del profago. Se muestran las cinéticas de crecimiento bacteriano en LB con arabinosa al 0.2% (+ ara) y sin arabinosa (sin ara) monitoreado por medición de OD_{600nm} (eje principal, líneas continuas) y el título de fago determinado en UFP/mL (eje secundario, líneas punteadas) para las cepas lisógenas **a y c)** PAO1(H66) transformada con el vector pHERD26T (26T) en ausencia (símbolos sólidos) o presencia de MMC (símbolos blancos) y **b y d)** PAO1(H66) transformada con la construcción pHERD26T-Gp14 (Gp14) en ausencia (símbolos sólidos) o presencia de MMC (símbolos blancos).

8.5 Gp14 no es esencial para el fago H66

Hasta este punto se había logrado asociar la sobreproducción de Gp14 con la represión de la respuesta SOS de la bacteria, sin embargo, se carecía de pistas sobre su función en la biología del fago. Dado que *gp14* es conservado en el genoma de los fagos tipo F116 se decidió evaluar si la proteína es esencial. Para

ello se realizó la sustitución de *gp14*, sobre la lisógena PAO1(H66), por un gen de resistencia a gentamicina (*aacC1*) que porta su propio promotor. Mediante recombinación homóloga se realizaron tres construcciones diferentes denominadas PAO1(H66- α), PAO1(H66- β) y PAO1(H66- γ). En las tres lisógenas, la recombinación se llevó a cabo en la misma región, entre los ORF 13 y 15, pero con diferencias importantes (Fig. 14). En el fago silvestre, H66, los últimos cuatro nucleótidos del extremo 3' del ORF15 se sobreponen con el extremo 5' del ORF14 (*gp14*) además en el extremo 3' de *gp14* se reporta un terminador putativo (Fig. 14a). En el fago recombinante H66- α el gen *aacC1* se insertó de tal forma que sustituye en su totalidad al gen *gp14*, desde su codón de inicio hasta el codón de paro, en su misma dirección. Esta modificación generó que el ORF15 perdiera su codón de paro y la fusión de la nueva secuencia de nucleótidos genera una adición de 7 codones codificantes en su extremo carboxilo terminal, previos a la aparición del nuevo codón de paro (Fig. 14b). Además de la modificación en el ORF15, la recombinación también eliminó el terminador. En el caso del fago H66- β el gen *aacC1* se posicionó en sentido contrario al resto de genes del bloque y se evitó la eliminación del codón de paro del ORF15 (Fig. 14c). Finalmente, para el fago H66- γ se tienen las mismas características que el fago H66- β aunado a que se mantiene el terminador al final de *gp14* (Fig. 14d).

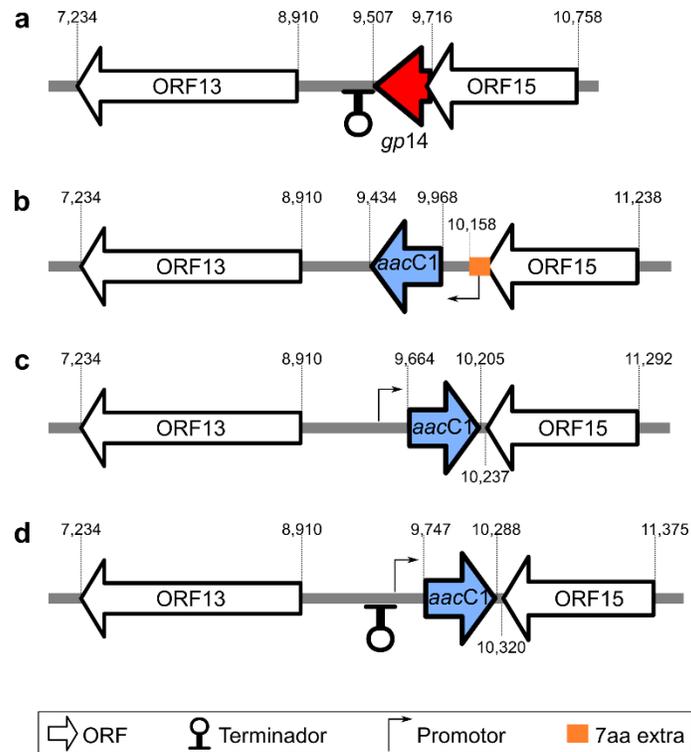


Figura 14. Construcción de los fagos recombinantes. a) Región silvestre del fago H66 del ORF13 al ORF15 sobre la cual se construyeron los fagos recombinantes, el gen *gp14* se resalta en rojo b) Modificaciones en la zona de recombinación para el fago recombinante H66- α . c) Diagrama de los cambios del fago recombinante H66- β . d) Representación de las características del fago H66- γ , en la zona de recombinación. En a, b y c, el gen sustituto *aacC1* se muestra en azul. El resto de la simbología se muestra en la parte inferior de la imagen.

Todas recombinantes, obtenidas a partir de la lisógena, fueron seleccionadas por resistencia a gentamicina, además de ser capaces de producir progenie. Este resultado demostró que *gp14* no es esencial para la producción de nuevos viriones. Se realizó extracción de ADN, de los fagos recombinantes para la secuenciación de la región de recombinación y se corroboró que las modificaciones en *gp14* estaban presentes (Anexo, figs. A8-A13). Todos los fagos recombinantes vegetativos fueron capaces de infectar y lisogenizar bacterias de la cepa hospedera *P. aeruginosa* PAO1, transduciendo la resistencia a gentamicina. La morfología de la placa infectiva resultó ser de tamaño similar a la del fago silvestre, de 1 a 2 mm de diámetro, con centro turbio a excepción del fago H66- α que presentó placas claras (Fig. 15). Dado que el fago recombinante que contiene menos modificaciones es el fago H66- γ , se decidió utilizar sólo este ejemplar para el resto de los análisis.

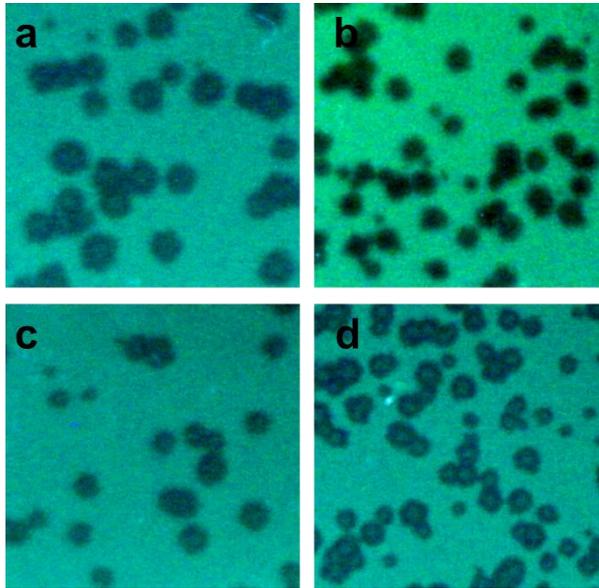


Figura 15. Morfología de la placa infectiva de los fagos recombinantes. Se muestran las placas de lisis obtenidas al realizar infección sobre tapices de la cepa PAO1 de muestras de fago **a)** H66, **b)** H66- α , **c)** H66- β , **d)** H66- γ .

Los fagos H66 y H66- γ fueron empleados para infectar la cepa PW7144 (RecA⁻), en ambos casos se observaron placas de lisis, sin embargo, presentaron características fenotípicas que difieren a las observadas en la cepa PAO1. De inicio su tamaño es mucho menor y no se observa un centro turbio (Fig. 16). Aunado a lo anterior, cuando se intentó el aislamiento de lisógenas en la cepa PW7144 sólo fue posible obtener lisógenas PW7144(H66- γ), gracias a la selección de resistencia a gentamicina presente en el fago recombinante. Las lisógenas PW7144(H66- γ) presentaban inmunidad contra los fagos H66 y H66- γ , además eran capaces de producir partículas virales que infectaban a la cepa PAO1, aunque en títulos bajos (~200 UFP/mL). En el caso de las candidatas a lisógena PW7144(H66), aunque algunas cepas presentaban inmunidad contra los fagos H66 y H66- γ , la prueba de producción de fago era negativa por lo que no lograron confirmarse como verdaderas lisógenas.

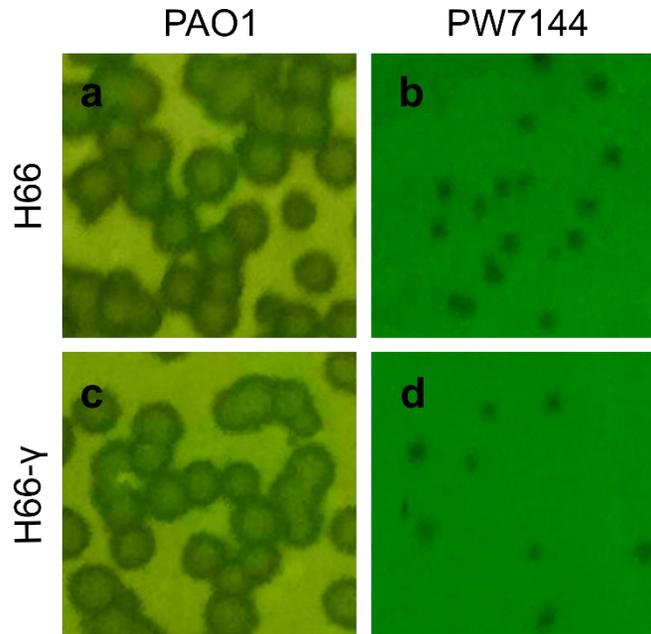


Figura 16. Los fagos H66 y H66- γ generan placas pequeñas y claras en la cepa PW7144. Se muestra la diferencia en la morfología de la placa infectiva de los fagos silvestre y recombinantes sobre tapices de bacteria PAO1 y PW7144 (RecA⁻) **a)** H66 sobre PAO1, **b)** H66 sobre PW7144 **c)** H66- γ sobre PAO1 **c)** H66- γ sobre PW7144.

Previamente se había demostrado que los fagos F116-*like*, y en especial H66 se integran en un sitio específico del genoma de H66 (Fig. 17a) (Cazares, 2016), por lo que se consideró que la ausencia de lisógenas PW7144(H66) podrían relacionarse a la falta de RecA en la cepa PW7144. A través de pruebas de inserción, mediante análisis PCR y el uso coordinado de *primers* diseñados para determinar la inserción del fago con base a su combinación (ver materiales y métodos), se corroboró que el fago sigue siendo capaz de integrarse como profago (Fig. 17b). De manera interesante se mostró que las lisógenas PAO1(H66) y PAO1(H66- γ), donde está presente RecA, tiene dos poblaciones bacterianas una libre de profago (Fig. 17b carriles 3, 4, 7 y 8) y otra con profago insertado (Fig. 17b carriles 12, 13, 16, 17, 20 y 21). En el caso de las lisógenas PW7144(H66- γ), donde RecA no se produce, únicamente se encuentra evidencia de bacteria que contiene profago insertado (Fig. 17b, carriles 5, 9, 14, 18, 22), lo cual se asocia al bajo título viral determinado para las lisógenas. De manera cualitativa se puede observar que el fago se inserta en un sentido preferente, en el cual el ORF70 queda dirigido hacia

el extremo 3' del gen *DusA* de la bacteria y la integrasa hacia su extremo 5' (Ver carriles 11-22).

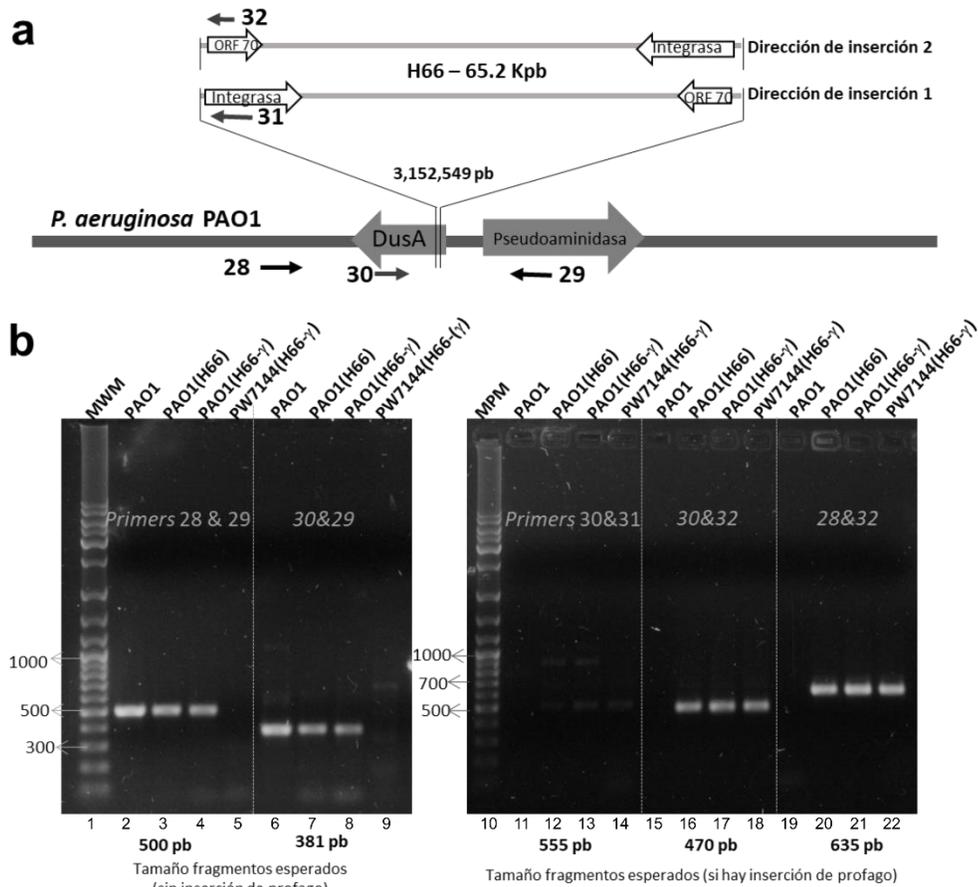


Figura 17. H66- γ mantiene su capacidad de inserción en las cepas hospederas. a) Diagrama del sitio de inserción del fago H66, predicho en la posición 3,152,549 del genoma de PAO1 (Cazares, 2016). En la parte superior se indican las posibles direcciones de inserción de H66, cuyos extremos se delimitan por el ORF70 y la integrasa. Con flechas y enumerados se muestran los *primers* ubicados en su región de hibridación. **b)** Gel de agarosa, muestra los productos de PCR obtenidos de las diferentes combinaciones de *primers*. En la parte superior se indica la muestra de ADN empleada, donde MPM -Marcador de peso molecular. PAO1 – cepa *P. aeruginosa* PAO1. PAO1(H66) – lisógena del fago H66 en la cepa PAO1, PAO1(H66- γ) – lisógena del fago H66- γ en la cepa PAO1. PW7144(H66- γ) – lisógena del fago H66- γ en la cepa *P. aeruginosa* RecA⁻. Sobre el gel se indica la combinación de *primers* empleados para cada sección delimitada. En la parte inferior se indica el número de carril, así como el tamaño de los productos esperados de acuerdo a la combinación de *primers* empleados y la inserción o no del fago.

Hasta este punto se observaba que el fago H66- γ es funcional en infección e integración. A pesar de saber que el fago recombinante era capaz de formar nuevas partículas víricas se desconocía el rendimiento de la progenie, por lo cual se procedió a evaluar el título viral de H66 y H66- γ . Se analizó la producción

espontánea de fago para las lisógenas PAO1(H66), PAO1(H66- γ) bajo las mismas condiciones de crecimiento. Se halló que la cantidad de fago obtenida a partir de PAOI(H66- γ) es al menos un orden de magnitud menor con respecto a PAO1(H66) (Fig. 18a). Dado que la única diferencia entre H66 y H66- γ es la presencia de *gp14*, se determinó si esta característica se relacionaba a la disminución del fago libre. Se llevó a cabo la complementación de ambas lisógenas con la construcción pHERD26T-Gp14, además del control pHERD26T. A raíz de la observación de los ensayos de sobrevivencia de luz UV, de que la sobreproducción de la proteína parecía ser tóxica, el ensayo se realizó en ausencia del inductor aprovechando la característica de los vectores pHERD, los cuales tienen fuga transcripcional. Los resultados mostraron que en PAO1(H66- γ) incrementa el título de fago libre cuando se complementa la proteína Gp14 (Fig. 18b). El resultado sugería que Gp14 podría participar en la regulación del ciclo lítico del fago o bien, que su presencia es necesaria para poder completar la correcta liberación del mismo.

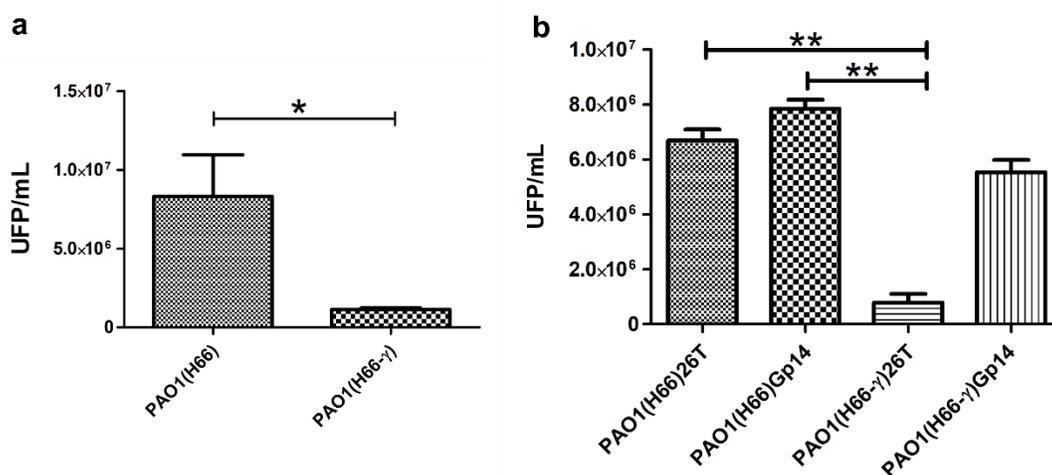


Figura 18. La ausencia de Gp14 rinde títulos menores de fago espontáneo para H66- γ . a) Evaluación de la producción espontánea de los fagos H66 y H66- γ , de tres ensayos representativos. b) Evaluación de fago espontáneo en las lisógenas PAO1(H66) y PAO1(H66- γ) transformadas con los vectores pHERD26T (26T) y pHERD26T-Gp14 (Gp14) de tres ensayos independientes. * $p < 0.05\%$, ** $p < 0.01\%$

Para determinar si Gp14 afectaba el ciclo lítico del fago se llevó a cabo el ensayo de inducción con MMC sobre la lisógena PAO1(H66- γ). La lisógena del fago

recombinante fue transformada con el vector pHERD26T o la construcción pHERD-Gp14, igual que el ensayo con la lisógena silvestre, después de 15 minutos de inducción de la proteína Gp14 se realizó la inducción del profago por adición de MMC y los títulos de fago se monitorearon en intervalos de una hora (Fig. 19). Se observó que la lisógena PAO1(H66- γ) transformada con pHERD26T, y que por lo tanto carece de Gp14, incrementa el título del fago libre en respuesta a la adición de MMC (Fig. 19a), sin embargo, la sobreproducción de Gp14, cuando la lisógena es transformada con la construcción pHERD26T-Gp14, mantiene reprimido la inducción del profago (Fig. 19b), de la misma manera como se observa en el caso de la lisógena del fago silvestre (Ver Fig. 13). De esta forma se concluyó que Gp14, no es esencial para llevar a cabo el ciclo lítico, puesto que el profago aún es sensible a MMC.

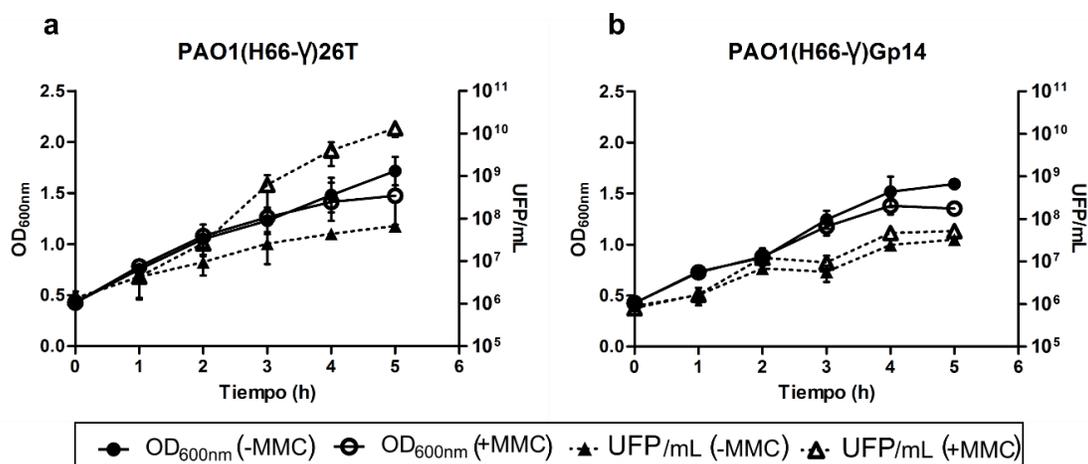


Figura 19. El profago H66- γ no es inducido por MMC cuando Gp14 está sobreproducida. Cinéticas de crecimiento bacteriano (líneas continuase) en LB ara 0.2% monitoreado por medición de OD_{600nm} y cinética del título de fago en UFP/mL (eje secundario, líneas punteadas) **a)** PAO1(H66- γ) transformada con el vector pHERD26T (26T) en ausencia (símbolos sólidos) o presencia de MMC (símbolos blancos) y **b)** PAO1(H66- γ) transformada con la construcción pHERD26T-Gp14 (Gp14) en ausencia (símbolos sólidos) o presencia de MMC (símbolos blancos).

8.6 El genoma de H66 presenta cajas SOS que son reconocidas por Gp14

Ya que la ausencia de Gp14 afecta la producción de fago espontáneo, se planteó la posibilidad de que la proteína regulara genes propios del bacteriófago. Para ello se realizó una búsqueda de posibles cajas tipo SOS en el genoma del fago H66.

Mediante el análisis con el *software* Motif Alignment & Search Tool (MAST), se buscó la presencia de regiones de ADN con homología a las cajas SOS reportadas para *P. aeruginosa* (Cirz *et al.*, 2006). El *software* compara la secuencia consenso de la caja SOS con la secuencia del genoma del fago H66. Mediante análisis probabilístico, determina si el parecido entre las secuencias es sólo el resultado de una coincidencia azarosa o de homología, para ello asigna un *E-value*, entre más se acerque este valor a cero indica que no es una coincidencia al azar. Una vez identificada la secuencia, genera un alineamiento para señalar los nucleótidos conservados, mediante el signo +. Para poder considerarse como cajas SOS putativas y ser evaluadas experimentalmente, las secuencias predichas por MAST, también debían sobreponerse o estar cercanas a una región promotora y no sobreponerse a marcos abiertos de lectura. De las diversas secuencias propuestas por MAST, únicamente dos cumplieron con las características (Fig. 2, flechas verdes). La primera, se ubica a 15 nucleótidos río arriba del ORF32, la cual presentó un *E-value* de 6.8×10^{-8} . La segunda se encuentra a 16 nucleótidos río arriba del ORF70, con un *E-value* 1.7×10^{-10} . Ambas cajas SOS putativas, se analizaron mediante *softberry*, el cual predijo la presencia de regiones promotoras que se sobreponen a las posibles cajas SOS (Fig. 20a y b). Estas regiones fueron analizadas por EMSA para determinar si eran reconocidas por las proteínas LexA_{Pa} y Gp14. Las regiones promotoras se amplificaron por PCR y el producto se hizo interaccionar con las proteínas enriquecidas. Ambas proteínas, LexA_{Pa} y Gp14, reconocieron y se unieron a las cajas SOS de los ORF32 y ORF70 (Fig. 20c y d respectivamente). El resultado sugiere que las regiones pueden servir de sitio de unión para ambas proteínas. La determinación de las K_d para la caja del ORF32 fueron de 2.071 μM para LexA y 9.08 μM para Gp14, y para la caja del ORF70 los valores de K_d fueron 2.004 μM para LexA y 9.08 μM para Gp14 (Fig. 20 e y f). Al igual que la caja SOS del gen *lexA* se requirieron concentraciones mayores de Gp14 para observar la interacción ADN-proteína, lo cual se reflejó en una estimación de K_d mayor para la proteína Gp14 con respecto a LexA_{Pa}, 4 veces mayor para el ORF32 y 7.5 para el ORF70, señalando que LexA_{Pa} es más afín a las regiones reguladoras de ambos ORFs. Cabe resaltar que entre las dos cajas SOS, se

observa que la afinidad de Gp14 parece ser mayor a la caja del ORF32, ya que la constante de afinidad es 2 veces menor con respecto a la calculada para el ORF70.

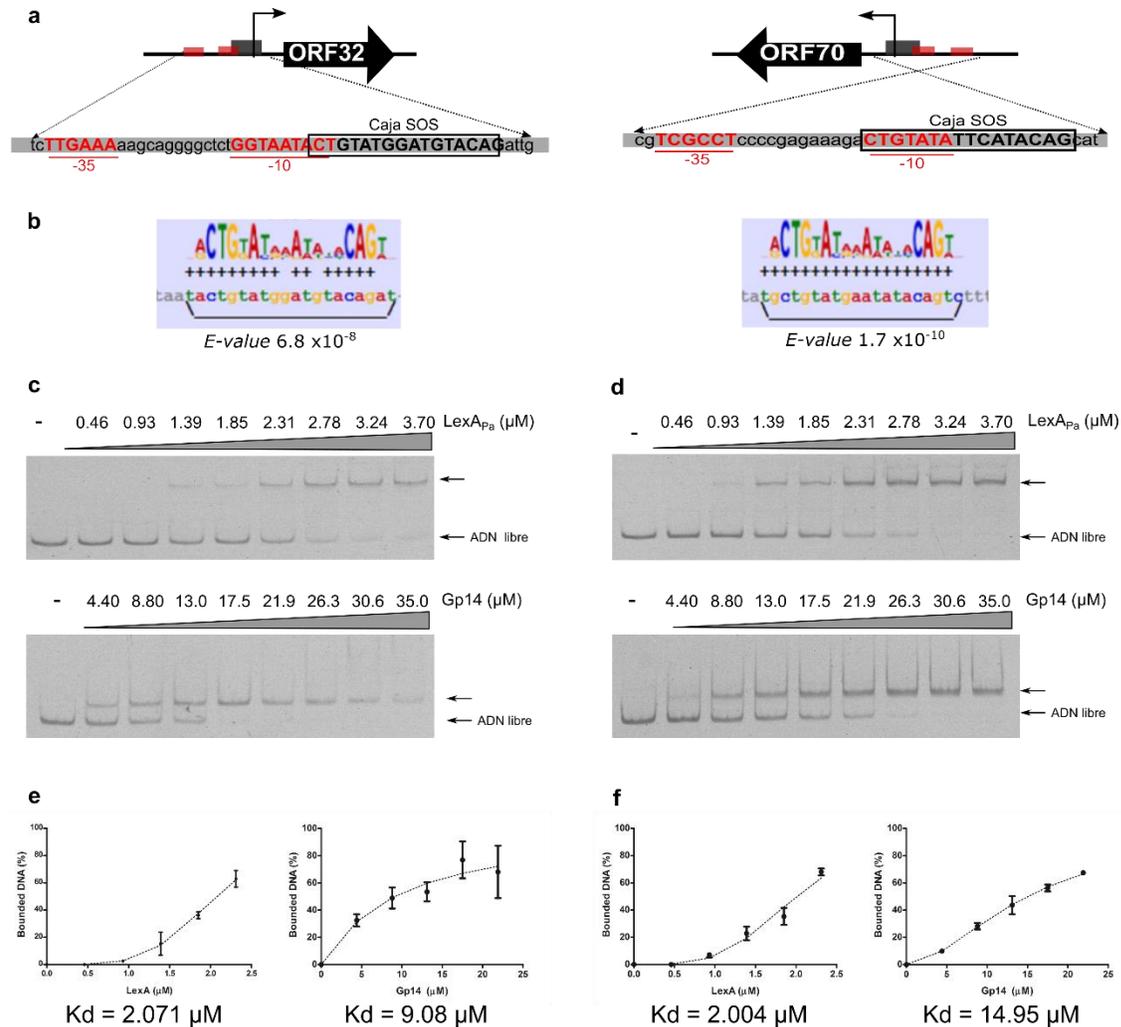


Figura 20. H66 presenta cajas SOS que son reconocidas por Gp14. a) Representación gráfica de las regiones promotoras del ORF32 y 70, en la parte inferior se indica la secuencia de nucleótidos para cada una. Resaltada en rojo se muestran los promotores predichos por *softberry*, en mayúsculas y encerrado en recuadro las cajas SOS predichas. **b)** Alineamiento realizado por MAST de las secuencias SOS consenso (mayúsculas parte superior) y la secuencia del fago (minúsculas, parte inferior). A la izquierda el alineamiento de la caja SOS del ORF32 y a la derecha la del ORF70. Los nucleótidos conservados se indican con el signo +. En la parte inferior se muestra el *E-value* determinado por el programa. **c)** Ensayo EMSA de la región promotora del ORF32 en presencia de la proteína LexA_{Pa} (gel superior) o Gp14 (gel inferior). **d)** Ensayo EMSA de la región promotora del ORF70 en interacción con LexA_{Pa} (gel superior) o Gp14 (gel inferior). Para **c)** y **d)** las concentraciones empleadas de las proteínas se muestran la parte superior de cada gel. La migración del ADN libre y los complejos ADN-proteína se señalan a la derecha. **e)** Cinéticas de unión del promotor del ORF32 y la proteína LexA_{Pa} (izquierda) o Gp14 (derecha) para la estimación de la *k_d* que se muestra debajo de cada gráfica. **f)** Cinética de unión del promotor del ORF70 con la proteína LexA_{Pa} (izquierda) o Gp14 (derecha), la *k_d* determinada para cada gráfica se muestra en la parte inferior. Para **e)** y **f)** las cinéticas se obtuvieron del análisis de imagen de tres gels.

Al llevar a cabo el ensayo de competencia, entre Gp14 y LexA_{Pa}, para cada una de las cajas SOS, se repitió el fenómeno en el que los complejos ADN-Gp14 parecen favorecerse por la cantidad de proteína empleada (Fig. 21). Además, Gp14 parece desplazar a LexA_{Pa} que se encuentra unida en los complejos, por lo que nuevamente se infiere que reconocen la misma secuencia. De esta forma, ambas proteínas parecen estar participando en la regulación de genes bacterianos y fágicos, muy probablemente reprimiéndolos. Se requiere ahondar en el trabajo experimental para determinar el mecanismo de Gp14 y corroborar si, como LexA_{Pa}, Gp14 también funciona como represor.

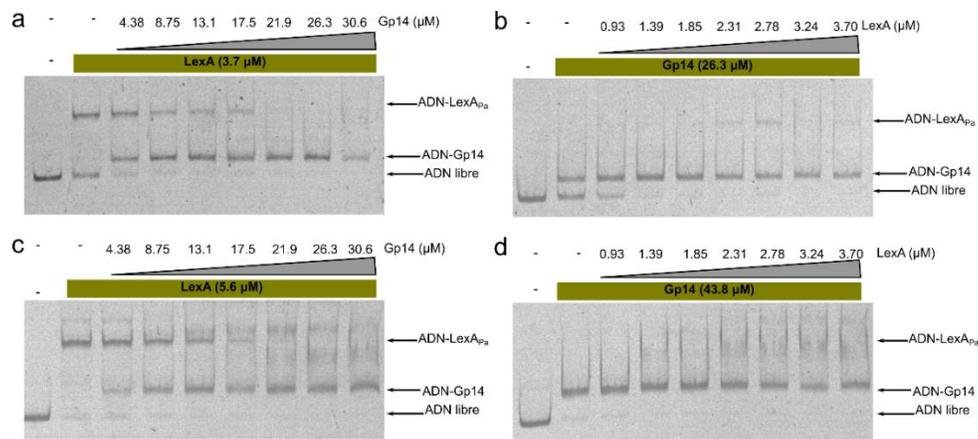


Figura 21. Gp14 y LexA_{Pa} compiten por las cajas SOS presentes en el genoma de H66. Ensayos de unión en presencia de ambas proteínas **a)** EMSA del promotor ORF32 en presencia de LexA_{Pa} constante y Gp14 se coloca en concentraciones crecientes y **b)** EMSA del promotor ORF32 con Gp14 a concentraciones constantes y concentraciones crecientes de LexA_{Pa}. **c)** EMSA del promotor ORF70 en presencia de LexA_{Pa} constante y Gp14 se coloca en concentraciones crecientes y **d)** EMSA del promotor ORF70 con Gp14 a concentraciones constantes y concentraciones crecientes de LexA_{Pa}. Para todos geles se muestra en la parte superior las concentraciones de las proteínas empleadas. A la derecha se indican con flechas los diferentes sitios de migración de los complejos formados.

8.7 Los ORF32 y ORF70 están conservados en los fagos F116-like

Como previamente se había observado, los ORFs 32 y 70 están conservados en los genomas de los fagos F116-like (Fig. 2). Con la intención de obtener mayor información se analizaron a profundidad *in-silico*.

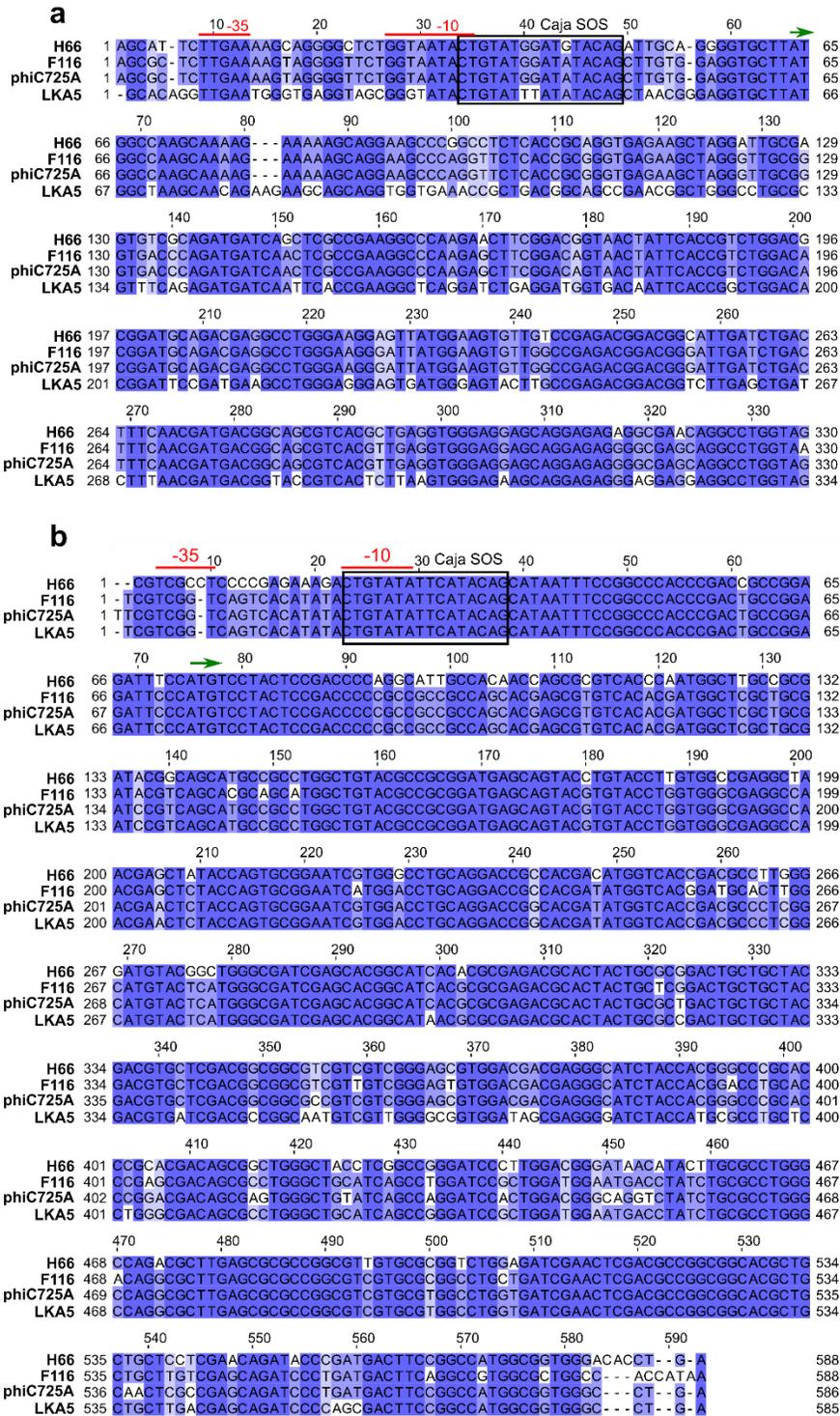


Figura 22. Alineamiento de los homólogos del ORF32 y 70 de los fagos F116-like. a) Alineamiento múltiple de homólogos al ORF32. b) Alineamiento múltiple de homólogos al ORF 70. Todas las secuencias incluyen la región reguladora. Las regiones -10 y -35 se marcan con una línea roja en la parte superior de los alineamientos. Las cajas SOS se encierran en un recuadro. Con una flecha verde, en la parte superior, se indica la posición del codón de inicio de cada ORF. En azul fuerte se indican los nucleótidos conservados.

El ORF32 (*gp32*) corresponde a una proteína de 88 aminoácidos con un peso molecular de 9.9 KDa, por su parte el ORF70 (*gp70*) es una proteína de 171 aminoácidos con peso molecular de 19.3 KDa. En primera instancia se realizó el alineamiento de los ORFs, homólogos a 32 y 70, del grupo de fagos tipo F116. El alineamiento mostró que entre los genes homólogos hay porcentajes de identidad mayores al 95% (Fig. 22). Los genes del Fago LKA5 resultaron ser los menos conservados de todo el grupo. De manera interesante se observó que, tanto para *gp32* como *gp70*, se mantienen conservadas las regiones reguladoras que incluyen a los promotores y las cajas SOS. La caja SOS de los homólogos a *gp70* es conservada en todo el grupo (Fig. 22b). Para *gp32* la caja SOS mantiene conservados los nucleótidos correspondientes al repetido invertido característico de los extremos, pero presenta variaciones en la región espaciadora (Fig. 22a).

Al analizar la secuencia de Gp32 y Gp70 por BLASTp, los alineamientos indicaron similitud con proteínas hipotéticas reportadas para cepas de *P. aeruginosa*, ninguna de ellas con función asignada. Para Gp32 se presentó un dominio conservado perteneciente a la super familia DUF1654, de función desconocida. En el caso de Gp70 no se encontraron dominios conservados. La predicción de las estructuras de las proteínas, a través de I-TASSER, mostraron para Gp32 una estructura conformada por 3 hélices- α y 3 láminas- β (Fig. 23a), cuyo mejor modelo presentó el valor de C-score de -2.53. Algo interesante a resaltar es que los primeros siete aminoácidos en su extremo amino terminal, presentan una región rica en lisinas (MAKQKKK). En el caso de Gp70, se determinó una estructura conformada por 7 hélices- α interconectadas (Fig. 23b), con un C-score de -4.22. Para predecir posibles funciones de las proteínas se realizó un análisis a través de HHpred, el cual busca homología de las proteínas y predice estructura a través de modelos ocultos de Markov (HMM por sus siglas en inglés) comparando las proteínas de interés con aquellas de la base de datos PDB. A pesar de señalarse ciertas proteínas con posible asociación a Gp32 o Gp70, ninguna presentó valores confiables de análisis. En el caso de Gp32, el mejor alineamiento se obtuvo de su

aminoácido 11 al 72 que presentó identidad del 11% con los aminoácidos 30 al 100 de la proteína cinasa activada por mitógeno (2NPT_B), una proteína de humano con tamaño 100 aminoácidos. El alineamiento presentó un *E-value* de 18. Para Gp70, sus aminoácidos 14 al 70 arrojó identidad del 11% con los aminoácidos 87 al 145 de la subunidad alfa de la tiocianato hidrolasa, proteína de 157 aminoácidos de *Thiobacillus thioparus*, con un *E-value* de 19 para el alineamiento. Ya que los alineamientos de las estructuras presentan *E-value* mayores a 1 se concluyó que la relación entre las estructuras es azarosa. De esta manera los análisis *in-silico* para las funciones de Gp32 y Gp70 no son concluyentes, por lo que se deberá dirigir un abordaje experimental para determinar sus funciones.

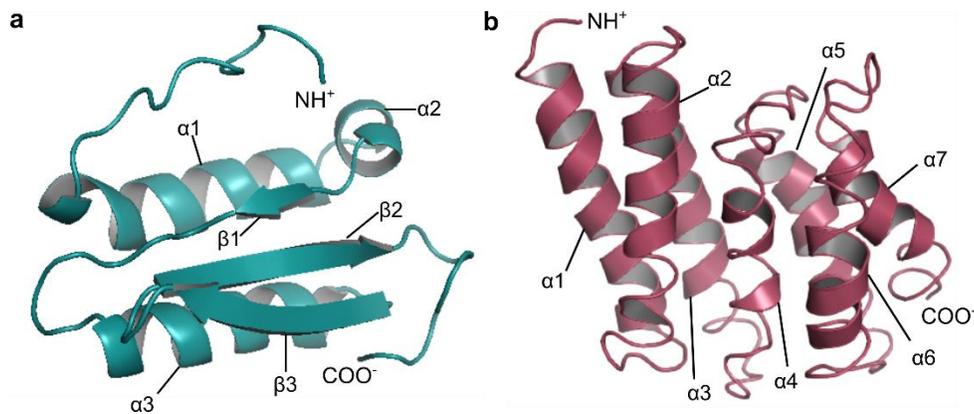


Figura 23. Estructuras predichas para las proteínas de H66 a) Gp32 y b) Gp70. Los extremos amino (NH^+) y carboxilo (COO^-) se indican en la figura.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la función de la proteína Gp14 del fago H66. Nuestros resultados sugieren que Gp14 podría tener un papel que interfiere con el metabolismo bacteriano y regula la expresión de los genes del fago. Gp14 representa una versión corta de la proteína bacteriana LexA, al tener homología con su dominio amino-terminal (NTD). La homología entre proteínas de fagos y bacterias pueden ser indicio de una ancestría en común, que a su vez podría relacionarse con la coevolución de ambas entidades (Krupovic *et al.*, 2011). Un ejemplo claro de homólogos entre huésped y hospedero es la co-chaperona Gp31 del bacteriófago T4, que sólo comparte una identidad de 14% con la secuencia de aminoácidos de la proteína GroES de *E. coli*, sin embargo, la conformación estructural de ambas proteínas es similar (Hunt *et al.*, 1997) permitiendo que presenten la misma función en el plegamiento de las proteínas tanto fágicas como bacterianas. Este ejemplo destaca el hecho de que la estructura de las proteínas es relevante en la función que desempeñan. En el caso de Gp14 resultó de sumo interés el tamaño de la proteína y la homología a solo un dominio de una proteína bacteriana.

Alcances del análisis in-silico como base para la predicción de funciones de genes

Las técnicas de secuenciación masiva han permitido conocer los genomas completos de diferentes organismos, en consecuencia, se presenta la acumulación de información genética. La genómica comparativa ha aprovechado el acceso a dicha información que, al analizarse a través de los recursos informáticos, ha podido determinar grados de relación evolutiva entre distintas entidades. También ha permitido la predicción de diferentes marcos abiertos de lectura y la asignación de funciones putativas mediante la búsqueda de similitudes entre genomas o regiones de ellos, a nivel nucleótidos o aminoácidos, o bien a través de análisis de la estructura peptídica. A pesar de la acumulación de genomas de diferentes especies y de la posible asignación de funciones a los ORFs putativos, la comprobación experimental de dichas funciones es aún incipiente y es uno de los grandes retos que tiene la biología molecular (Fadrosh *et al.*, 2008; Gilbert *et al.*, 2017).

En el caso de Gp14, el análisis bioinformático mostraba pistas que sugerían una fuerte asociación al NTD de LexA (Fig. 6 y 7). A pesar de contar con cierta predicción funcional, el reto principal estuvo representado por la falta de asociación de la proteína a un fenotipo que facilitara el abordaje experimental para la comprobación de sus funciones. Aunado a lo anterior, durante el desarrollo del proyecto surgió el reporte de la proteína Gp6 de *B. thuringiensis*, la cual también presenta homología estructural al NTD de LexA pero, contrario a LexA, con función de activador transcripcional (Fornelos *et al.*, 2018). De manera sorprendente, el análisis de Gp14 con respecto a Gp6 señaló homología estructural, pero una baja identidad de aminoácidos (30%), además de que la secuencia reconocida por Gp6 difiere de aquella propia de las cajas SOS (Fig. 24).

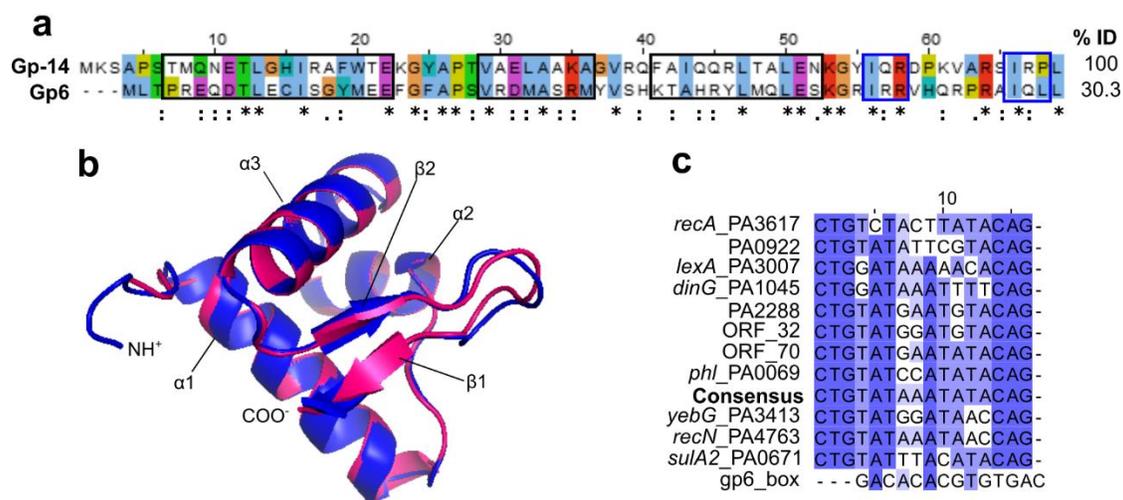


Figura 24. Análisis comparativo de Gp14 con Gp6. **a)** alineamiento de aminoácidos, en la parte inferior se indican los aminoácidos conservados con *, en recuadros negros se indican la ubicación de las hélices- α y en azul las láminas- β . **b)** Predicción y sobreposición de las estructuras de Gp14 (azul) y gp6 (magenta) obtenidas por *I-TASSER*. **c)** Alineamiento de los nucleótidos de las diferentes cajas SOS reportadas para *P. aeruginosa* y su comparación con la secuencia consenso reportada para gp6 (Fornelos *et al.*, 2018).

Tanto Gp14 como Gp6, presentan conservación del dominio HTH. Este tipo de dominio también se presenta en el extremo amino terminal (NTD) de LexA. En la proteína bacteriana este dominio pertenece específicamente a las variantes Winged-HTH (wHTH) (Aravind *et al.*, 2005; Gajiwala y Burley, 2000). La

comparación de Gp14 con el NTD de LexA_{Ec} mostró 24 aminoácidos conservados (Fig. 6). Con respecto a los aminoácidos involucrados en el reconocimiento de ADN, Gp14 mantiene diez (Q8, I15, E30, A32, R39, A42, A49, K53 R67 y R64) (Oertel-Buchheit *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2010), principalmente en las hélices α -2 y α -3 (Fig. 6, recuadros negros). Por su parte, la comparación de Gp14 con Gp6 muestra 20 aminoácidos conservados, ubicados principalmente en el espacio entre las hélices α -1 y α -2, y en la cadena β -1 (Fig. 24a). Las diferencias observadas en la distribución de los aminoácidos conservados entre Gp14 y Gp6, con respecto a LexA puede ser la clave en la diferencia de sus funciones. Dado que la hélice α -3 es la estructura más relevante en el reconocimiento de la secuencia de caja consenso SOS (Fogh *et al.*, 1994; Gajiwala y Burley, 2000; Zhang *et al.*, 2010), los aminoácidos conservados de Gp14 en esta hélice fortalecían la idea de que Gp14 es un represor de genes bacterianos SOS.

Para el caso de Gp14 la información recabada por el análisis *in-silico* permitió predecir su capacidad de unión al ADN, sin embargo, el análisis no fue suficiente para sugerir la posible secuencia consenso de la proteína o bien su participación como represor o activador, por lo cual la parte experimental sigue siendo fundamental. Por el contrario, el análisis para otras proteínas es más complicado, ya que a pesar de conocer su secuencia de aminoácidos y poder predecir sus estructuras, la información no es suficiente para poder asignar funciones. Sumado a lo anterior, la falta de un fenotipo específico hace que la aproximación experimental sea aún más difícil, tal es el caso de las proteínas Gp32 y Gp70 del fago H66 (Fig. 24).

Intrusión de Gp14 en la respuesta SOS de la bacteria

El punto de partida para el análisis experimental fue la hipótesis de la capacidad de unión de Gp14 al ADN y la homología con el NTD de LexA. Las bacterias, después de ser irradiadas con luz UV, reparan el daño generado en el ADN a través de la activación de la respuesta SOS, permitiendo la reactivación en la viabilidad celular, después de la inactivación del represor LexA (Maslowska, Makiela-Dzbenka y

Fijalkowska, 2019; Radman, 1975). En *E. coli* la acumulación de LexA NTD afecta la supervivencia celular ante un daño sobre el ADN (Neher *et al.*, 2003), lo cual se relaciona con las observaciones de que el NTD mantiene su capacidad de unión al ADN después de que se ha llevado el corte auto-catalítico en el CTD de la proteína LexA, siempre y cuando el NTD generado carezca de las señales de degradación para permitir su acumulación (Hurstel *et al.*, 1986). Del mismo modo, en *Staphylococcus aureus* la sobreproducción del NTD, a partir de un vector de expresión, reprime la expresión del gen *sosA*, regulado por LexA (Cohn *et al.*, 2011). En este trabajo se demostró que la sobreproducción de Gp14, *in vivo*, tuvo un efecto similar, donde se ve disminuida la recuperación de la célula después de hacer incidir luz UV (Fig. 9). A partir del fenotipo se sugirió que Gp14 bloquea la expresión de genes SOS bacterianos al reconocer y unirse a las cajas SOS y que esta interacción es responsable de la reducción en la reactivación de la viabilidad celular. Esta noción pareció confirmarse ya que al sobreproducir Gp14, a partir de una construcción, inhibió la inducción lítica del profago H66 (Fig. 13). Los represores de fagos con homología al CI de lambda requieren de un auto-procesamiento, equivalente al de LexA, para permitir la expresión de los genes líticos de fago (Craig y Roberts, 1980; Roberts y Roberts, 1975). Por lo tanto, el auto-procesamiento de CI, al igual que LexA, depende de la activación de la respuesta SOS (Little y Michalowski, 2010; Rokney *et al.*, 2008). Una posible interpretación de la falta de inducción de fago bajo la sobreproducción de Gp14 era que podría participar como el represor de inmunidad del fago H66. Este escenario no es posible ya que el genoma de H66 codifica un represor tipo CI (ORF33, Fig. 2) cuya expresión confiere inmunidad a la cepa PAO1 (Martínez-Martínez, datos no publicados), además la sobreproducción de Gp14 no confiere inmunidad contra la infección de H66 (datos no mostrados). Por lo tanto, el bloqueo de la inducción del profago H66 observada con la sobreproducción de Gp14 debe estar relacionado a la represión de la respuesta bacteriana SOS, lo cual se corrobora con los títulos bajos obtenidos en las cepas lisógenas construidas PW7144 (*recA*⁻), donde la respuesta SOS no es activa (Fig. 16).

La represión de la reactivación celular y de la inducción del profago va de la mano del resultado *in vitro* que demuestra que Gp14 se une a las cajas SOS del gen *lexA* (Fig. 10) y compite con LexA_{Pa} por el sitio de unión (Fig. 12). Del ensayo EMSA, para la sonda con las cajas SOS de *lexA*, se observó la generación de dos bandas de migración de manera independiente de la proteína empleada (Fig. 10). Este punto resalta la presencia de dos cajas SOS. En el caso del experimento con la proteína LexA_{Pa} se infiere que podría estar uniéndose como dímero, tal como se reportó para LexA_{Ec}. Para la proteína de *E. coli* el CTD de LexA permite la formación estable de dímeros en solución y, en esta configuración se une a cajas de SOS bacterianas (Mohana-Borges *et al.*, 2000; Schnarr *et al.*, 1985), la proteína de *P. aeruginosa* también posee un CTD, por lo que se predice su dimerización. En el caso de Gp14 el CTD está ausente, por lo tanto, no es esperada la formación de dímeros, de tal manera que sólo se puede sugerir que en cada caja se unen máximo dos monómeros de la proteína. Un dato importante fue la diferencia de afinidades; se determinó que LexA_{Pa} es más afín que Gp14, por lo que se requiere una concentración molar 10 veces mayor de Gp14, con respecto a LexA_{Pa}, para observar interacción con el ADN en el experimento EMSA. El resultado coincide con los reportes del NTD -LexA_{Ec} en comparación con la proteína completa LexA_{Ec}, donde se requiere un exceso molar de NTD 17 veces mayor con respecto a LexA para observar el efecto de la interacción completa de ADN-proteína con el promotor de *recA* (Hurstel *et al.*, 1986); y para la represión del promotor de *uvrA*, se requirió una concentración de NTD 10 veces mayor que LexA_{Ec} (Bertrand-Burggraf *et al.*, 1987). De este resultado resalta el hecho de que es posible que la sobreproducción de Gp14 sea necesaria para poder presentar un efecto sobre la célula. Sin embargo, este detalle resulta contradictorio ya que la sobreproducción de Gp14 a partir de un plásmido es tóxica para las células tras largos períodos de exposición al inductor, arabinosa, específicamente durante una incubación durante la noche (Fig. 9c). Sin embargo, en períodos cortos de inducción, de hasta 5 h, no se notaron efectos negativos (Fig. 8). El efecto tóxico podría estar asociado a la alta concentración de proteína Gp14 acumulada en la célula bajo la presencia continua de arabinosa y al largo período de incubación que puede favorecer la manifestación de toxicidad. Es

posible que la concentración de Gp14 tenga límites estrictos, tanto inferior como superior, para llevar a cabo su función adecuadamente, por lo que resulta interesante evaluar a futuro la temporalidad de expresión del mensajero, así como de la proteína en una lisógena.

Relevancia de Gp14 en el genoma de H66

El reporte de que una proteína fágica, similar a Gp14, presenta función en la regulación de genes del fago resaltó la importancia de evaluar la función de Gp14 en nuestro sistema. Del análisis *in-silico* sobresalía que *gp14* es conservada en fagos y profagos de la familia F116 (Fig. 5), por lo que se planteó la posibilidad de que *gp14* fuera esencial para el fago. Sin embargo, encontramos que el fago mutante H66 γ , que carece de *gp14*, es capaz de infectar, lisogenizar y producir nueva progenie, tanto de manera espontánea como inducida, señalando que Gp14 no es esencial para las funciones básicas del fago. De manera particular se encontró que el título de fago espontáneo fue de alrededor siete veces menor para H66 γ comparado al título del fago silvestre (Fig. 18a). Este efecto parece estar relacionado a la ausencia de Gp14 ya que, al complementar la proteína a través de un plásmido, el título de H66 γ parece restablecerse (Fig. 18b). Es importante señalar que la complementación se realizó a bajas concentraciones de Gp14, ya que sólo es el efecto observado con la proteína asociada a la fuga transcripcional del vector. Cuando se lleva a cabo la inducción de la sobreproducción de Gp14, mediante la adición de arabinosa, y se fomenta el ciclo lítico del profago por MMC el resultado es un bloqueo en la inducción del profago (Fig. 19). Esta observación, de nueva cuenta nos sugiere que el efecto Gp14 depende de su concentración, cabe resaltar que al implicar reducción de título del fago y que el gen pertenece al bloque de reparación y replicación del ADN (Fig. 2), es probable que esté afectando alguna etapa de síntesis de ADN.

Las pruebas con respecto a la respuesta SOS de la bacteria hospedera nos permiten ver que Gp14 tiene participación en la regulación de expresión de genes.

En un intento por evaluar los posibles genes que podrían estar regulados por Gp14 encontramos que el genoma de H66 alberga cajas SOS reconocidas, de forma interesante las cajas son reconocidas tanto por Gp14 y como por LexA_{Pa} (Fig. 20), estas cajas parecen regular la expresión de los genes *gp32* y *gp70* de los cuales, desconocemos su función. El hecho de que estas cajas SOS se superpongan con la región -10 de los promotores predichos, sugiere que la unión de las proteínas LexA o Gp14 reprime los genes bajo el control de la región promotora de la caja SOS, sin embargo, es necesaria la comprobación experimental para poder confirmar la hipótesis. La determinación de las constantes de disociación señaló que la proteína bacteriana es más proclive a unirse a estas cajas SOS (Fig. 20), y que la acumulación de Gp14 puede desplazar a LexA (fig. 21). Si LexA es más afín, es posible que la expresión de *gp32* y *gp70* estén reguladas primordialmente por LexA y, por lo tanto, estén ligadas a la respuesta SOS. El desplazamiento de LexA por Gp14, tal vez sea necesario para mantener una represión de *gp32* y *gp70* a pesar de que la respuesta SOS esté activa. A pesar del desconocimiento de la función de Gp32, llama la atención su cercanía al represor, además de que su región regulatoria parece ser más compleja al incluir el posible sitio de unión del represor (Martínez-Martínez, datos no publicados). Se requiere mayor investigación para probar si Gp14 está involucrado en la regulación de la expresión de Gp32 y Gp70, así como el circuito de regulación global de todas estas proteínas para esclarecer el mecanismo de función.

Desde la perspectiva de la bacteria, la expresión de los genes SOS se relaciona con el grado de daño causado en el ADN. En *E. coli*, la primera etapa de la respuesta SOS enciende genes, tales como *suIA*, que inhiben la división celular y permiten que se lleve a cabo la reparación de los daños al genoma. En la segunda etapa el daño al ADN es mayor por lo que la respuesta SOS persiste y comienza la expresión de genes, como *umuD* y *umuC*, que corresponden a polimerasas proclives a mutaciones que ayudan a que la bacteria logre sobrellevar los altos grados de daño al ADN, a costo de acumulación de mutaciones (Butala *et al.*, 2009; Witkowski *et al.*, 2016). Si el daño al genoma es aún mayor la última etapa de la respuesta SOS

estaría relacionada con la muerte celular mediada por la respuesta SOS (ALD por sus siglas en inglés). Este tipo de muerte celular esta mediada por la expresión de genes “Edin” (del inglés *Extensive damage induced genes*), regulados por la respuesta SOS (Ariel *et al.*, 2014). Es posible que la acumulación paulatina de Gp14 se requiera para interferir con la respuesta SOS e impedir la expresión de los genes Edin para garantizar y frenar la muerte celular. Así, Gp14 podría dar tiempo suficiente para la correcta replicación y perpetuidad de la información genética del fago H66, previo a la muerte de la célula.

10. CONCLUSIONES

- I. Gp14 es una proteína conservada en fagos y profago F116-*like*, y presenta homología con el dominio NTD de las proteínas LexA_{Ec} y LexA_{Pa}, permitiendo su predicción de unión al ADN.
- II. Gp14 es capaz de unirse a las cajas SOS del gen *lexA*. Esta unión se relaciona a la represión de la respuesta SOS bacteriana cuando Gp14 se sobre-expresa, lo que evita la reactivación del crecimiento celular posterior a la irradiación con luz UV.
- III. La afinidad de Gp14 hacia las cajas SOS es menor con respecto a LexA_{Pa}, por lo que su función parece depender de altas concentraciones de Gp14.
- IV. La inhibición de la inducción del profago H66 se asocia a la represión de la respuesta SOS debida a la sobreexpresión de Gp14.
- V. Gp14 es una proteína no esencial para el fago H66, cuya presencia permite mayor producción de fago espontáneo a partir de una lisógena.
- VI. Los genes *gp32* y *gp70* de H66 presentan cajas SOS que son conservadas en fagos de la familia F116.
- VII. Gp14 y LexA_{Pa} reconocen y se unen a las cajas SOS de los genes *gp32* y *gp70* de H66. LexA_{Pa} reconoce con mayor afinidad que Gp14 las cajas SOS del fago.
- VIII. Los análisis bioinformáticos, hasta el momento, son insuficientes para poder predecir la función de Gp32 y Gp70.

11. PERSPECTIVAS

- I. Estudiar el efecto de Gp14 en la transcripción de *gp32* y *gp70*
- II. Examinar la participación de LexA_{Pa} en la interacción con las cajas SOS del genoma de H66.
- III. Determinar la función de las proteínas Gp32 y Gp70.
- IV. Evaluar si Gp32 está asociado a la expresión del represor.
- V. Establecer la temporalidad de expresión de *gp14*, *gp32* y *gp70*.

12. BIBLIOGRAFÍA Y REFERENCIAS

- Ackermann, H.-W. (2009). Phage Classification and Characterization. En *Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions* (p. 127-140). Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-164-6_13
- Ackermann, H.-W., Noben, J.-P., Volckaert, G., Demeke, M., Lavigne, R., Hertveldt, K., Ceysens, P.-J. (2008). The intron-containing genome of the lytic *Pseudomonas* phage LUZ24 resembles the temperate phage PaP3. *Virology*, 377(2), 233-238. doi:10.1016/j.virol.2008.04.038
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M. M., Iyer, L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain : Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 231-262. doi:10.1016/j.femsre.2004.12.008
- Ariel, E., Ziva, K., Ann, S., Yoav, S., Hanna, E.-K. (2014). Apoptosis-Like Death, an Extreme SOS Response in *Escherichia coli*. *mBio*, 34(12), 2331-2336. doi:10.1128/mBio.01426-14.Editor
- Ashish, A., Shaw, M., Winstanley, C., Ledson, M. J., Walshaw, M. J. (2012). Increasing resistance of the Liverpool Epidemic Strain (LES) of *Pseudomonas aeruginosa* (Psa) to antibiotics in cystic fibrosis (CF)-A cause for concern? *Journal of Cystic Fibrosis*, 11(3), 173-179. doi:10.1016/j.jcf.2011.11.004
- Bell, C. E. (2005). MicroReview Structure and mechanism of *Escherichia coli* RecA ATPase, 58(September), 358-366. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04876.x
- Bertrand-Burggraf, E., Hurstel, S., Daune, M., Schnarr, M. (1987). Promoter properties and negative regulation of the *uvrA* gene by the LexA repressor and its amino-terminal DNA binding domain. *Journal of Molecular Biology*, 193(2), 293-302. doi:10.1016/0022-2836(87)90220-8
- Brent, R., Ptashne, M. (1981). Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), 4204-4208. doi:10.1073/pnas.78.7.4204
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W.D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(3), 560-602. doi:10.1128/MMBR.68.3.560-602.2004
- Butala, M., Žgur-Bertok, D., Busby, S. J. W. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(1), 82-93. doi:10.1007/s00018-008-8378-6
- Butala, Matej, Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J. P., Žgur-Bertok, D. (2011). Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39(15), 6546-6557. doi:10.1093/nar/gkr265
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 471-477. doi:10.1038/nrg1089
- Canchaya, C., Fournous, G., Brüssow, H. (2004). The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular Microbiology*, 53(1), 9-18. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04113.x
- Cazares, A. (2016). *Genómica comparativa y funcional de fagos que infectan Pseudomonas aeruginosa*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.
- Cazares, A., Mendoza-Hernández, G., Guarneros, G. (2014). Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics*, 15(1), 1146. doi:10.1186/1471-2164-15-1146

- Chanishvili, N. (2012). Phage Therapy—History from Twort and d’Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches. En M. Łobocka, W. Szybalski (dir.), *Bacteriophages, Part B* (p. 3-40). *Advances in Virus Research*. doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3
- Choi, K. H., Schweizer, H. P. (2005). An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiology*, 5, 1-11. doi:10.1186/1471-2180-5-30
- Cirz, R. T., O’Neill, B. M., Hammond, J. A., Head, S. R., Romesberg, F. E. (2006). Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *Journal of Bacteriology*, 188(20), 7101-7110. doi:10.1128/JB.00807-06
- Clokic, M. R. J., Millard, A. D., Letarov, A. V., Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45. doi:10.4161/bact.1.1.14942
- Cohn, M., Kjelgaard, P., Frees, D., Penadés, J. R., Ingmer, H. (2011). Clp-dependent proteolysis of the LexA N-terminal domain in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*, 157(2011), 677-684. doi:10.1099/mic.0.043794-0
- Coutinho, H. D. M., Falcão-Silva, V. S., Fernandes Gonçalves, G. (2008). Pulmonary bacterial pathogens in cystic fibrosis patients and antibiotic therapy: a tool for the health workers. *International Archives of Medicine*, 1(1), 1-24. doi:10.1186/1755-7682-1-24
- Cox, M. M. (2007). Regulation of bacterial RecA protein function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(1), 41-63. doi:10.1080/10409230701260258
- Craig, N. L., Roberts, J. W. (1980). *E. coli* recA protein-directed cleavage of phage λ repressor requires polynucleotide. *Nature*, 283, 26-30. Repéré à <https://doi.org/10.1038/283026a0>
- Cruz-Plancarte, I., Cazares, A., Guarneros, G. (2016). Genomic and Transcriptional Mapping of PaMx41, Archetype of a New Lineage of Bacteriophages Infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(22), 6541-6547. doi:10.1128/AEM.01415-16
- D’Herelle, M., Roux, M. (2011). On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. Note by M. F. d’Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences 1917. Bacteriophage*, 1(1), 3-5. doi:10.4161/BACT.1.1.14941
- Díaz-Magaña, A., Alva-Murillo, N., Chávez-Moctezuma, M. P., López-Meza, J. E., Ramírez-Díaz, M. I., Cervantes, C. (2015). A plasmid-encoded UmuD homologue regulates expression of *Pseudomonas aeruginosa* SOS genes. *Microbiology (United Kingdom)*, 161(7), 1516-1523. doi:10.1099/mic.0.000103
- Erill, I., Campoy, S., Barbé, J. (2007). Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(6), 637-656. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x
- Fadrosh, D., Heidelberg, K. B., Williamson, S. J., Rusch, D. B., Miller, C. S., Sutton, G., Frazier, M. (2008). The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: Metagenomic Characterization of Viruses within Aquatic Microbial Samples. *PLoS ONE*, 3(1), e1456. doi:10.1371/journal.pone.0001456
- Fernández de Henestrosa, A. R., Tomoo, O., Sayura, A., David, C., Jeffrey J., H., Haruo, O., Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 35(6), 1560-1572. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01826.x
- Fogh, R. H., Otteleben, G., Rüterjans, H., Schnarr, M., Boelens, R., Kaptein, R. (1994). Solution structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. *The EMBO Journal*, 13(17), 3936-3944. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06709.x
- Fornelos, N., Bamford, J. K. H., Mahillon, J. (2011). Phage-borne factors and host LexA regulate the lytic switch in phage

- GIL01. *Journal of Bacteriology*, 193(21), 6008-6019. doi:10.1128/JB.05618-11
- Fornelos, N., Browning, D. F., Pavlin, A., Podlesek, Z., Hodnik, V., Salas, M., Butala, M. (2018). Lytic gene expression in the temperate bacteriophage GIL01 is activated by a phage-encoded LexA homologue. *Nucleic Acids Research*, 46(18), 9432-9443. doi:10.1093/nar/gky646
- Gajiwala, K. S., Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), 110-116. doi:10.1016/S0959-440X(99)00057-3
- Gellatly, S. L., Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173. doi:10.1111/2049-632X.12033
- Georgopoulos, C. P., Hohn, B. (1978). Identification of a host protein necessary for bacteriophage morphogenesis (the *groE* gene product). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(1), 131-135. doi:10.1073/pnas.75.1.131
- Gilbert, R. A., Kelly, W. J., Altermann, E., Leahy, S. C., Minchin, C., Ouwkerk, D., Klieve, A. V. (2017). Toward understanding phage: Host interactions in the rumen; complete genome sequences of lytic phages infecting rumen bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(DEC), 1-17. doi:10.3389/fmicb.2017.02340
- Gill, J. J., Berry, J. D., Russell, W. K., Lessor, L., Escobar-Garcia, D. A., Hernandez, D., Young, R. (2012). The *Caulobacter crescentus* phage phiCbK: genomics of a canonical phage. *BMC genomics*, 13, 1-20. doi:10.1186/1471-2164-13-542
- Gillor, O., Vriezen, J. A. C., Riley, M. A. (2008). The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. *Microbiology*, 154(6), 1783-1792. doi:10.1099/mic.0.2007/016139-0
- Hamouche, E., Sarkis, D. K. (2012). Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie Biologie*, 60(3), e15-e20. doi:10.1016/j.patbio.2011.03.011
- Hare, J. M., Adhikari, S., Lambert, K. V., Hare, A. E., Grice, A. N. (2012). The *Acinetobacter* regulatory UmuDAb protein cleaves in response to DNA damage with chimeric LexA/UmuD characteristics. *FEMS Microbiology Letters*, 334(1), 57-65. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02618.x
- Hargreaves, K. R., Kropinski, A. M., Clokie, M. R. J. (2014). What does the talking? Quorum sensing signalling genes discovered in a bacteriophage genome. *PLoS ONE*, 9(1), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0085131
- Hart, C. A., Winstanley, C. (2002). Persistent and aggressive bacteria in the lungs of cystic fibrosis children. *British Medical Bulletin*, 61, 81-96. doi:10.1093/bmb/61.1.81
- Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: Evolution of the Majority. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 471-480. doi:10.1006/tpbi.2002.1590
- Horton, R. M., Cai, Z., Ho, S. N., Pease, L. R. (1990). Gene Splicing by Overlap Extension: Tailor-Made Genes Using the Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques*, 8(5), 528-535.
- Hunt, J. F., Van der Vies, S. M., Henry, L., Deisenhofer, J. (1997). Structural adaptations in the specialized bacteriophage T4 co-chaperonin Gp31 expand the size of the anfinsen cage. *Cell*, 90(2), 361-371. doi:10.1016/S0092-8674(00)80343-8
- Hurstel, S., Granger-Schnarr, M., Daune, M., Schnarr, M. (1986). In vitro binding of LexA repressor to DNA: evidence for the involvement of the amino-terminal domain. *The EMBO Journal*, 5(4), 793-798. doi:10.1002/j.1460-2075.1986.tb04283.x
- Hurstel, Serge, Granger-Schnarr, M., Schnarr, M. (1990). The LexA Repressor and Its Isolated Amino-Terminal Domain Interact Cooperatively with Poly[d(A-T)], a Contiguous Pseudo-

- Operator, but Not with Random DNA: A Circular Dichroism Study. *Biochemistry*, 29(7), 1961-1970.
doi:10.1021/bi00459a043
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., ... Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14339-14344.
doi:10.1073/pnas.2036282100
- Kelley, W. L. (2006). Lex marks the spot: The virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1228-1238.
doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05444.x
- Kimsey, H. H., Waldor, M. K. (2009). *Vibrio cholerae* LexA coordinates CTX prophage gene expression. *Journal of Bacteriology*, 191(22), 6788-6795.
doi:10.1128/JB.00682-09
- Kokjohn, T. A., Miller, R. V. (1988). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa recA* gene: the Les⁻ phenotype. *Journal of bacteriology*, 170(2), 578-582.
doi:10.1128/jb.170.2.578-582.1988
- Kreuzer, K. N. (2013). DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(11), 1-23.
doi:10.1101/cshperspect.a012674
- Krupovic, M., Prangishvili, D., Hendrix, R. W., Bamford, D. H. (2011). Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75(4), 610-635. doi:10.1128/MMBR.00011-11
- Kues, U., Stahl, U. (1989). Replication of plasmids in gram-negative bacteria. *Microbiological Reviews*, 53(4), 491-516.
- Lindell, D., Jaffe, J. D., Johnson, Z. I., Church, G. M., Chisholm, S. W. (2005). Photosynthesis genes in marine viruses yield proteins during host infection. *Nature*, 438(7064), 86-89.
doi:10.1038/nature04111
- Lipton, A., Weissbach, A. (1969). The bacteriophages. *The American Journal of Medicine*, 46(2), 264-274.
doi:10.1016/0002-9343(69)90010-2
- Little, J. W., Hill, S. A. (1985). Deletions within a hinge region of a specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(8), 2301-2305. doi:10.1073/pnas.82.8.2301
- Little, John W. (1984). Autodigestion of lexA and phage lambda repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 1375-1379.
- Little, John W, Michalowski, C. B. (2010). Stability and Instability in the Lysogenic State of Phage Lambda. *Journal of Bacteriology*, 192(22), 6064-6076.
doi:10.1128/JB.00726-10
- Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., ... Strynadka, N. C. J. (2001). Crystal Structure of LexA: A Conformational Switch for Regulation of Self-Cleavage. *Cell*, 106, 585-594.
- Madigan, M. T. (2004). *Brock biology of microorganisms*.
- Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenka, K., Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 60(4), 368-384.
doi:10.1002/em.22267
- Maya-Lucas, O. (2012). *Genómica y proteómica funcional in-silico del fago temperado H66 de Pseudomonas aeruginosa*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.
- Mohana-Borges, R., Pacheco, A. B. F., Sousa, F. J. R., Foguel, D., Almeida, D. F., Silva, J. L. (2000). LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific DNA in tightening protein-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7),

- 4708-4712. doi:10.1074/jbc.275.7.4708
- Mustard, J. A., Little, J. W. (2000). Analysis of *Escherichia coli* RecA Interactions with LexA, λ CI, and UmuD by Site-Directed Mutagenesis of recA, 182(6), 1659-1670. doi: 10.1128/JB.182.6.1659-1670.2000
- Neher, S. B. (2005). The Role of ClpXP-mediated Proteolysis in Resculpting the Proteome after DNA Damage. Visto en <https://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/31188/61271696-1721.1/31188/61271696-MIT.pdf?sequence=2>
- Neher, S. B., Flynn, J. M., Sauer, R. T., Baker, T. A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes and Development*, 17(9), 1084-1089. doi:10.1101/gad.1078003
- Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., Granger-Schnarr, M. (1992). Isolation and characterization of LexA mutant repressors with enhanced DNA binding affinity. *Journal of Molecular Biology*, 225(3), 609-620. doi:10.1016/0022-2836(92)90389-2
- Oppenheim, A. B., Kobilier, O., Stavans, J., Court, D. L., Adhya, S. (2005). Switches in Bacteriophage Lambda Development. *Annual Review of Genetics*. doi:10.1146/
- Penterman, J., Singh, P. K., Walker, G. C. (2014). Biological cost of pyocin production during the SOS response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 196(18), 3351-3359. doi:10.1128/JB.01889-14
- Pourcel, C., Midoux, C., Hauck, Y., Vergnaud, G., Latino, L. (2017). Large preferred region for packaging of bacterial DNA by phiC725A, a novel *Pseudomonas aeruginosa* F116-like bacteriophage. *PLoS ONE*, 12(1), 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0169684
- Ptitsyn, O. B., Finkelstein, A. V., Kirpichnikov, M. P., Skryabin, K. G. (1982). cl and lexA repressors consist of three cro-like domains. *FEBS Letters*, 147(1), 11-15. doi:10.1016/0014-5793(82)81001-6
- Qiu, D., Damron, F. H., Mima, T., Schweizer, H. P., Yu, H. D. (2008). P_{BAD}-based shuttle vectors for functional analysis of toxic and highly regulated genes in *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp. and other bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7422-7426. doi:10.1128/AEM.01369-08
- Radman, M. (1975). SOS Repair Hypothesis: Phenomenology of an Inducible DNA Repair Which is Accompanied by Mutagenesis. En *Molecular Mechanisms for Repair of DNA* (p. 355-367). Boston, MA : Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-2895-7_48
- Rice, S. A., Tan, C. H., Mikkelsen, P. J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Kjellberg, S. (2009). The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *The ISME journal*, 3, 271-282. doi:10.1038/ismej.2008.109
- Roberts, J. W., Roberts, C. W. (1975). Proteolytic cleavage of the. *Proteomics*, 72(1), 147-151.
- Rokney, A., Kobilier, O., Amir, A., Court, D. L., Stavans, J., Adhya, S., Oppenheim, A. B. (2008). Host responses influence on the induction of lambda prophage. *Molecular Microbiology*, 68(1), 29-36. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06119.x
- Salmond, G. P. C., Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777-786. doi:10.1038/nrmicro3564
- Sassanfar, M., Roberts, J. W. (1990). Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *Journal of Molecular Biology*, 212(1), 79-96. doi:10.1016/0022-2836(90)90306-7
- Schnarr, M., Oertel-Buchheit, P., Kazmaier, M., Granger-Schnarr, M. (1991). DNA binding properties of the LexA repressor. *Biochimie*, 73(4), 423-431. doi:10.1016/0300-9084(91)90109-E
- Schnarr, M., Pouyet, J., Granger-Schnarr, M., Daune, M. (1985). Large-Scale Purification, Oligomerization Equilibria, and Specific Interaction of the LexA

- Repressor of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 24(11), 2812-2818. doi:10.1021/bi00332a032
- Schnarr, Manfred, Granger-Schnarr, M., Hurstel, S., Pouyet, J. (1988). The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein. *FEBS Letters*, 234(1), 56-60. doi:10.1016/0014-5793(88)81302-4
- Sepúlveda-Robles, O. (2012). *Diversidad de los bacteriófagos de Pseudomonas aeruginosa: aislamiento, caracterización e identificación de nuevas especies*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco.
- Simmons, L. A., Foti, J. J., Cohen, S. E., Walker, G. C. (2008). The SOS Regulatory Network. *EcoSal Plus*, 3(1), 1-30. doi:10.1128/ecosalplus.5.4.3
- Sokatch, J. (dir.). (1986). *The Biology of Pseudomonas*. *The Biology of Pseudomonas*. Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-307210-8.x5001-5
- Tariq, M. A., Everest, F. L. C., Cowley, L. A., Wright, R., Holt, G. S., Ingram, H., Smith, D. L. (2019). Temperate Bacteriophages from Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections Show Disease-Specific Changes in Host Range and Modulate Antimicrobial Susceptibility. *mSystems*, 4(4). doi:10.1128/mSystems.00191-18
- Van der Vies, S. M., Gatenby, A. A., Georgopoulos, C. (1994). Bacteriophage T4 encodes a co-chaperonin that can substitute for *Escherichia coli* GroES in protein folding. *Nature*, 368(4), 654-656.
- Wegrzyn, G., Licznarska, K., Wegrzyn, A. (2012). Phage λ-New Insights into Regulatory Circuits. En *Advances in Virus Research* (vol. 82, p. 155-178). doi:10.1016/B978-0-12-394621-8.00016-9
- Willner, D., Furlan, M., Haynes, M., Schmieder, R., Angly, F. E., Silva, J., ... Rohwer, F. (2009). Metagenomic Analysis of Respiratory Tract DNA Viral Communities in Cystic Fibrosis and Non-Cystic Fibrosis Individuals. *PLoS ONE*, 4(10), e7370. doi:10.1371/journal.pone.0007370
- Witkowski, T. A., Grice, A. N., Stinnett, D. B., Wells, W. K., Peterson, M. A., Hare, J. M. (2016). UmuDAB: An Error-Prone Polymerase Accessory Homolog Whose N-Terminal Domain Is Required for Repression of DNA Damage Inducible Gene Expression in *Acinetobacter baylyi*. *Plos One*, 1-19. doi:10.1371/journal.pone.0152013
- Zhang, A. P. P., Pigli, Y. Z., Rice, P. A. (2010). Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 466(7308), 883-886. doi:10.1038/nature09200

13. ANEXO

13.1 CORROBORACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

13.1.1 Cepas mutantes PAO1

Para el desarrollo del proyecto, fueron solicitadas 3 cepas de la colección 'Pseudomonas aeruginosa PAO1 transposón mutant library' (Jacobs *et al.*, 2003). Parte de las mutantes de esta colección fueron generadas por la inserción del transposón IS*phoA/hah* (4,829 pb), el cual es derivado del elemento IS50L del transposón Tn5. El transposón IS*phoA/hah*, si se inserta apropiadamente en el gen blanco, genera fusiones con el gen de la fosfatasa alcalina (*phoA*). También posee secuencias de escisión mediadas por Cre, las secuencias reconocidas por Cre se encuentran ubicadas entre los sitios *loxP*. También codifica un fragmento de 63 codones del epítipo de la hemaglutinina de la influenza (*hah*), así como el gen de resistencia a tetraciclina (Fig. A1-a). Las cepas solicitadas incluyen a la cepa PW6037 con inserción del transposón en la base 192 del gen PA3007 (*lexA*), la cepa PW7144 con inserción del transposón en la base 246 del gen PA3617 (*recA*), y la cepa parental denominada MPAO1 que carece de transposón. Previo a su uso, las cepas fueron caracterizadas tanto fenotípica como genotípicamente.

Después de la recepción, las tres cepas fueron resembradas en agar LB, posteriormente las cepas PW6037 y PW7144 fueron seleccionadas de mediante la resistencia al antibiótico. Ambas cepas presentaron el fenotipo de resistencia a tetraciclina (60 µg/mL), corroborando la presencia del transposón. La siguiente etapa de caracterización consistió en la verificación del genotipo de las bacterias mutantes adquiridas. Para ello se extrajo ADN de cada una de las cepas y se diseñaron *primers* para la evaluación por PCR. Para determinar la presencia del transposón se diseñaron los *primers* *pho_fwd* y *pho_rvs* (Tabla A1, *primers* 33 y 34), los cuales amplifican de manera interna una sección de 1650 pb del transposón (Fig. A1-a). El producto de PCR fue obtenido únicamente para las cepas PW6037 y PW7144, pero no para MPAO1, evidenciando la presencia del transposón que correlaciona con la resistencia al antibiótico para las cepas mutantes (Fig. A1-b).

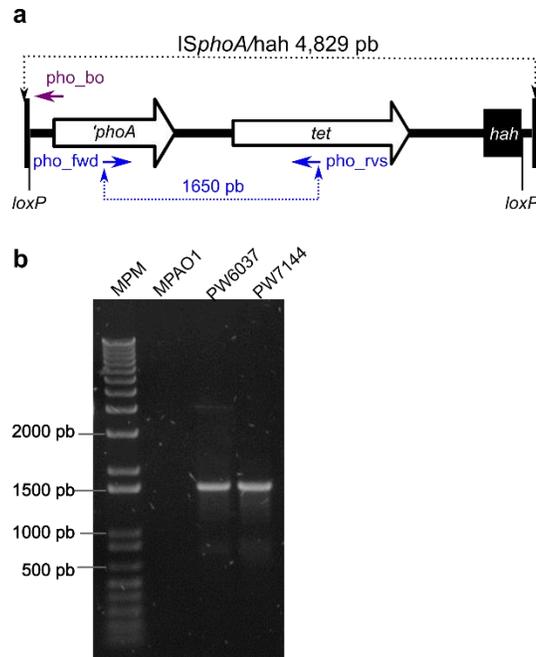


Figura A1. Las cepas mutantes PW6037 y PW7144 presentan inserción del transposón IS*phoA*/hah. **a)** Representación gráfica del transposón, se indican los genes de fosfatasa alcalina (*phoA*), y el gen de resistencia a tetraciclina (*tet*), el recuadro negro representa los codones de la hemaglutinina de la influenza (*hah*), se señalan los sitios *loxP*, así como los *primers* diseñados para el transposón, colocados en su ubicación de hibridación y dirección de extensión. **b)** Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR obtenido del uso conjunto de los *primers* *pho_fwd* y *pho_rvs*. El ADN utilizado como molde para cada reacción se indica en la parte superior del gel.

Para determinar que el transposón se encuentra en la región correcta, indicada por la información en el sitio de internet para la colección (<https://www.gs.washington.edu/labs/manoil/libraryindex.htm>), se utilizó el *primer* *phoA_bo* (Tabla A1, *primer* 35), el cual hibrida sobre el extremo 5' del transposón (Fig. A1-a), este *primer* en combinación con *primers* que hibridan en la periferia de los genes *lexA*, para PW6037, y *recA*, para PW7144, generan un producto de PCR definido sólo si el transposón está presente en la orientación correcta. En el caso de la cepa PW6037 (*lexA*⁻), se emplearon los *primers* Seq_LexA_fwd y Seq_LexA_rvs para la evaluación del gen PA3008 (Tabla A1 *primers* 36 y 37), Fig. A2-a). Estos cebadores generan un producto de 1,272 pb para un gen silvestre. El producto obtenido para la cepa silvestre MPAO1 y para la cepa mutante PW6037 fue idéntico (Fig. A2-b, carriles 2 y 3). El tamaño del amplicón señaló que la cepa PW6037 no presenta el transposón en la posición esperada. Al utilizar la combinación de *primers* *lexA_fwd-phoA*, no se obtuvo el fragmento de 723 pb

esperado (Fig. A2-b, carril 4), corroborando la ausencia del transposón en el sitio señalado.

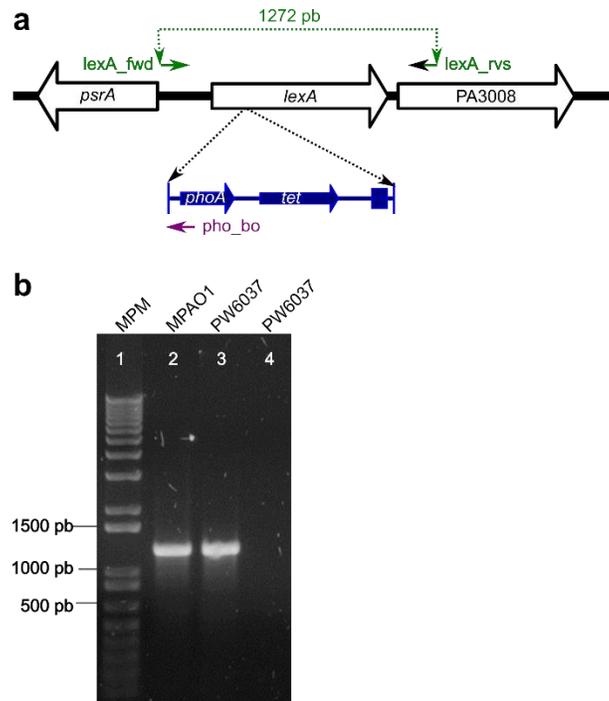


Figura A2. Caracterización genética de la cepa PW6037 (*lexA*). **a)** Diagrama representativo de la región del genoma de *P. aeruginosa* PA01 donde se encuentra el gen *lexA*. Con flechas punteadas se indica el sitio de inserción del transposón de 4.83 Kb, representado en azul en la dirección de inserción. En Verde se muestran los *primers* *lexA_fwd* y *lexA_rvs* en su ubicación de hibridación, también se indica el tamaño del producto esperado en un genotipo silvestre. En morado se muestra el lugar de hibridación del *primer* *pho_bo* el cual, en caso de estar insertado el transposón, en conjunto con el *primer* *lexA_fwd* genera un producto de 723pb. **b)** Visualización de los productos de PCR obtenidos de la combinación de *primers* *lexA_fwd* y *lexA_rvs* (carriles 2 y 3) o *primers* *lexA_fwd* y *pho_bo* (carril 4). El ADN utilizado como templado para las reacciones se indica en la parte superior del gel.

Para la cepa PW7144, se realizó un análisis similar, pero con los *primers* *Rec_fwd* y *Rec_rvs* (Tabla A1 *primers* 38 y 39, Fig. A3-a), la combinación de *primers* no generó el amplicón de 1727pb correspondientes al gen silvestre (Fig. A3-b), pero al utilizar la combinación de *primers* *Rec_rvs-phoA* se observó el producto de 1151pb esperado para la correcta inserción del transposón (Fig. A3-b). Los resultados indicaron que la mutante PW7144 (*recA*⁻) correspondía a la descripción de la colección, pero no así para la cepa PW6037, por lo cual sólo se trabajó con la cepa *recA*⁻.

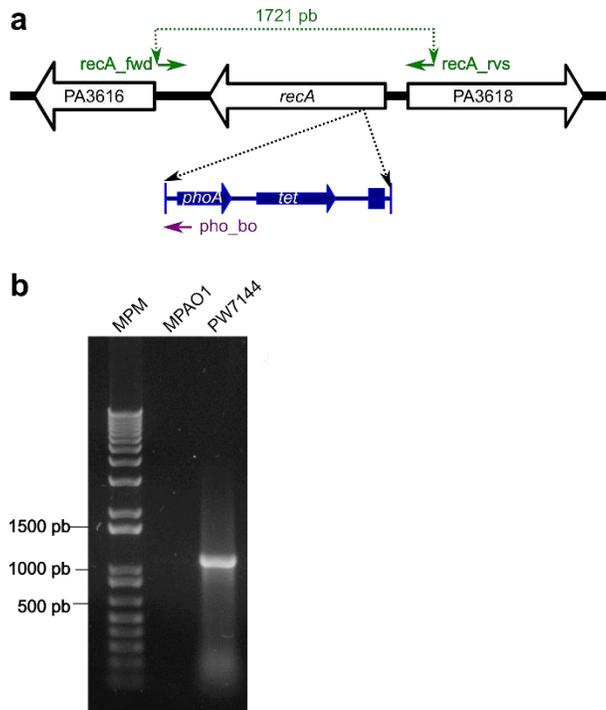


Figura A3. Caracterización genética de la cepa PW7144 (*recA*). **a)** Región genómica del gen *recA* de *P. aeruginosa* PA01. Se indica con flechas punteadas el sitio de inserción del transposón IS*phoA/hah*, esquematizado en azul. Se representan, en Verde, los *primers* *recA_fwd* y *recA_rvs* en su ubicación de hibridación, señalando el tamaño del producto esperado en un genotipo silvestre. En morado se muestra el lugar de hibridación del *primer* *pho_bo* el cual, en caso de estar insertado el transposón, en conjunto con el *primer* *recA_fwd* genera un producto de 1151 pb. **b)** Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR obtenido de la mezcla de *primers* *recA_fwd* y *pho_bo*. El ADN utilizado como templado para las reacciones se indica en la parte superior del gel.

En un intento por obtener la cepa PW6037, se recibió la mutante *P. aeruginosa* PA01 PW6037 transformada con la construcción pUCP20(UmuD), donada por el Dr. Cervantes de la Universidad Michoacana, la cual provenía originalmente de la misma colección de mutantes MPAO1 (Díaz-Magaña *et al.*, 2015). Al realizar la caracterización fenotípica y genotípica los resultados fueron idénticos a la cepa PW6037 que recibió nuestro laboratorio (datos no mostrados), por lo cual también fue descartada para su uso como control.

También fue solicitada la cepa *P. aeruginosa* PA01 LexAS125A, la cual presenta una mutación puntual en el aminoácido 125 de la proteína LexA, cambiando la serina por una alanina, el cambio elimina uno de los aminoácidos que permiten se lleve a cabo el corte auto-catalítico generando una proteína LexA que no se procesa después de un daño al ADN (Cirz *et al.*, 2006). La mutante PA01 LexA-S125A, porta

resistencia a gentamicina, ya que por recombinación homóloga se cambia el gen silvestre por el mutante junto con la adición del gen de resistencia (Fig. A4-a). En el laboratorio se recibieron las cepas PAO1_LexA_S125A y su par isogénico PAO1_LexA_wt, esta última presenta resistencia a gentamicina insertada por recombinación, pero con el gen silvestre *lexA*. Ambas cepas presentaron resistencia a gentamicina. Cuando se realizó una prueba de PCR con los *primers* Seq_LexA_fwd y Seq_LexA_rvs se obtuvo un fragmento de 2400pb (Fig. A4-b), mayor al observado en MPAO1 (1272 pb) que no presenta la inserción del gen de resistencia a gentamicina. Al secuenciar el gen *lexA* de ambas cepas ninguna presentó mutaciones en el codón correspondiente (Fig. A4-c), por lo que la cepa también fue descartada para su uso.

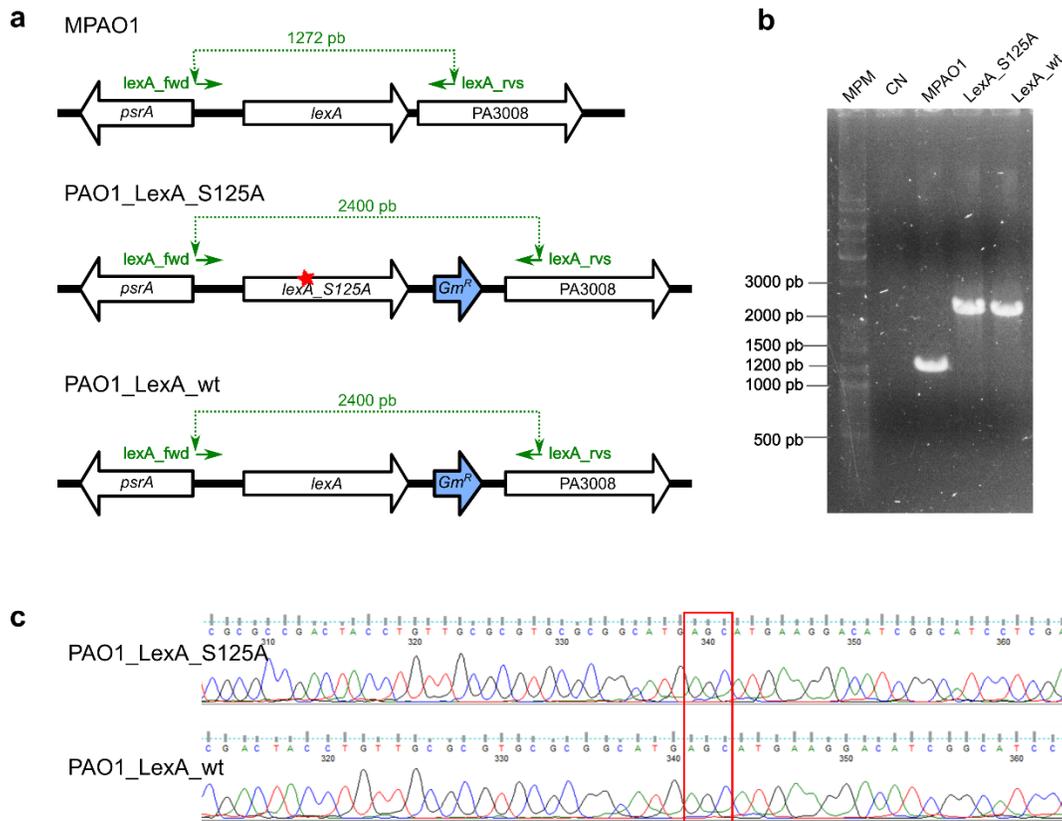


Figura A4. Caracterización de la cepa mutante PAO1_LexA_S125A. **a)** Esquema de la región involucrada en la generación de las mutantes (Cirz *et al.*, 2006). Se indican en verde la ubicación de hibridación de los *primers* utilizados para la evaluación por PCR, así como el tamaño de los fragmentos esperados. Con una estrella roja se simboliza el sitio de la mutación en el gen *lexA* para la cepa PAO1_LexA_S125A. **b)** Visualización de los productos de PCR obtenidos mediante el uso de los *primers* LexA_Fwd y LexA_Rvs (Tabla A1, *primers* 5 y 6). El ADN molde empleado se indica en la parte superior. **c)** Sección del electroferograma obtenido de la secuenciación del gen *lexA* para las cepas PAO1_LexA_S125A y PAO1_LexA_wt. Se resalta en recuadro rojo el codón correspondiente a la serina 125.

13.1.2 Caracterización fago H66

Como base para la caracterización del fago se realizó un análisis del perfil de restricción de su genoma. Para ello se realizó la extracción de ADN y se digirieron 500ng del material genómico con las enzimas *HindIII*, *EcoRI*, *NcoI* y *NdeI*. Los patrones obtenidos concuerdan con las predicciones *in-silico* determinadas para el genoma de H66 (número de acceso NC_042342.1) con el programa *NEB-cutter*v2.0 (Fig. A5). Con base en lo anterior se corroboró la identidad del fago para su uso en el trabajo.

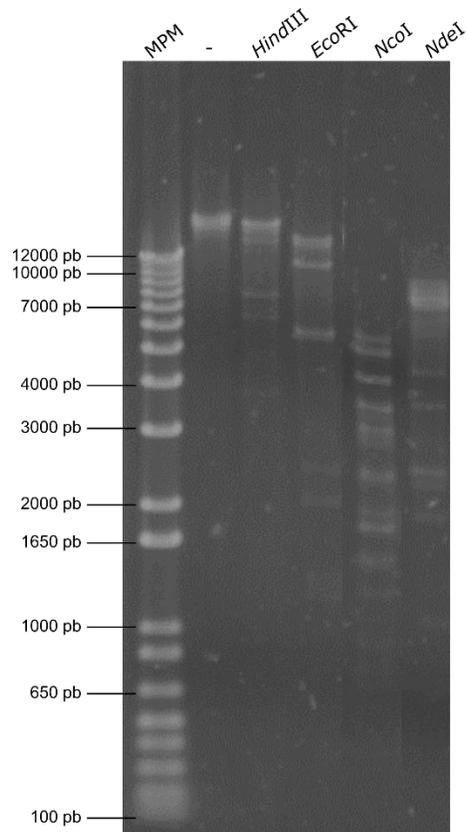


Figura A5. Perfiles de restricción del ADN genómico de H66. Gel de agarosa al 1% para la resolución de los fragmentos obtenidos por la restricción de 500 ng de ADN genómico de H66 con las enzimas indicadas en la parte superior del gel.

13.1.3 Secuenciación de las construcciones

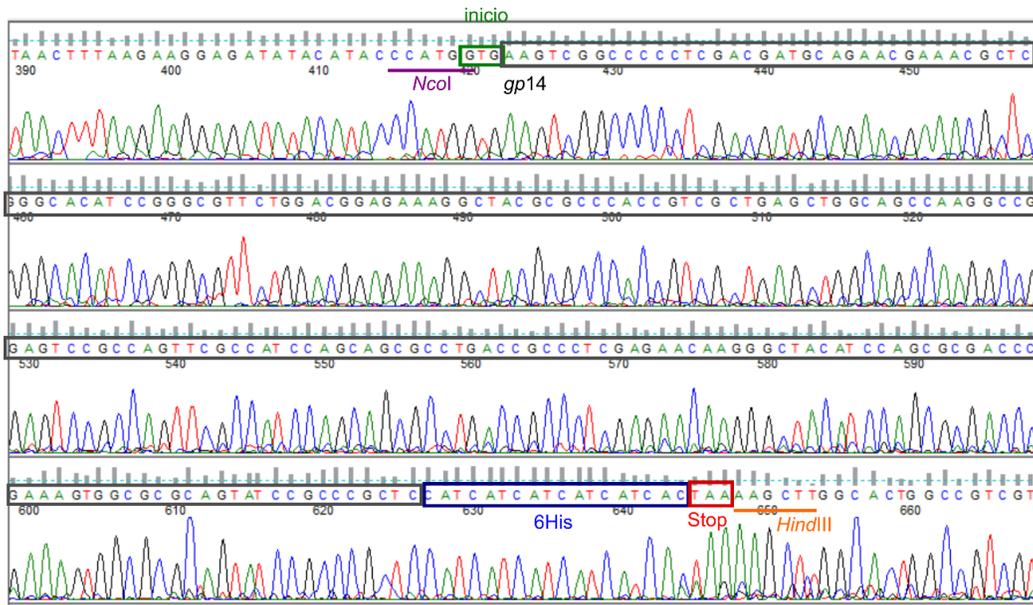


Figura A6. Electroferograma de la construcción pHERD26T-Gp14. En morado, sitio de restricción *NcoI*, verde codón de inicio, gris marco abierto de lectura de *gp14*, azul bases codificantes de la etiqueta 6His, rojo codón de paro y naranja sitio de restricción *HindIII*.

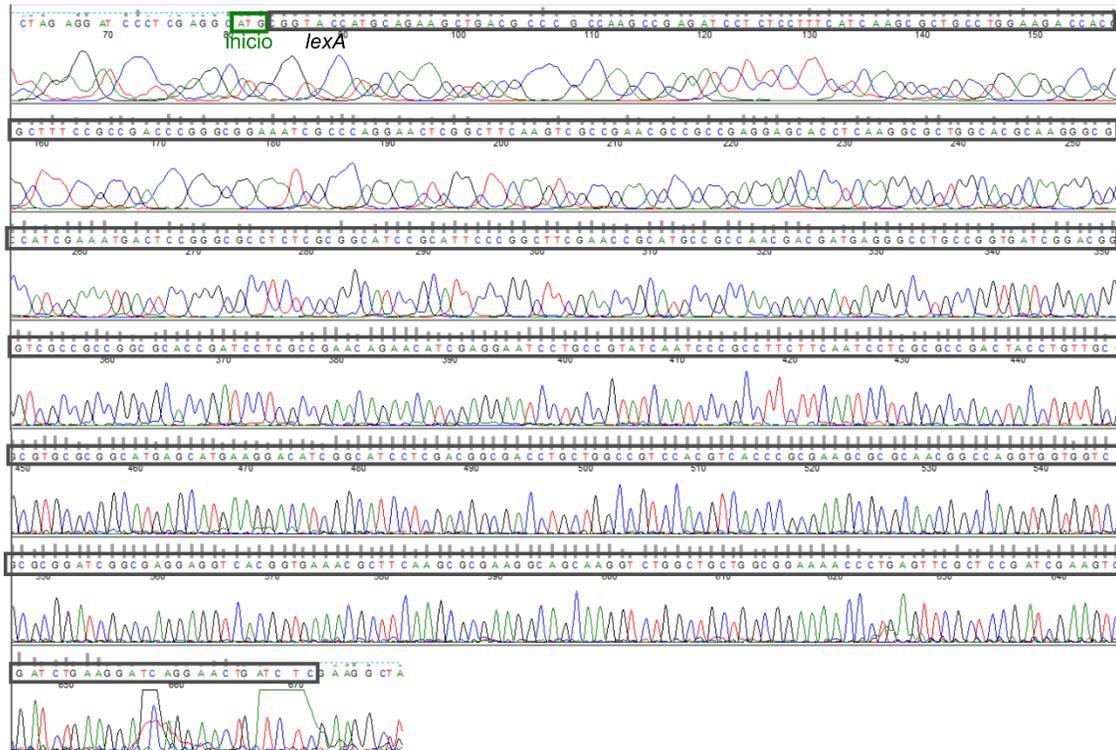


Figura A7. Secuencia parcial de la construcción pPROEX-LexA. Se muestra el electroferograma obtenido a partir del *primer* LexA_Rvs (Tabla A1, *primer* 6). En verde codón de inicio, gris 580/615 bases del gen PA3008 (*lexA*) de *P. aeruginosa*. La etiqueta de 6 histidinas (en el extremo amino de la proteína), las bases restantes del gen, así como los sitios de restricción de la clonación, no se alcanzan a apreciar en la secuenciación.

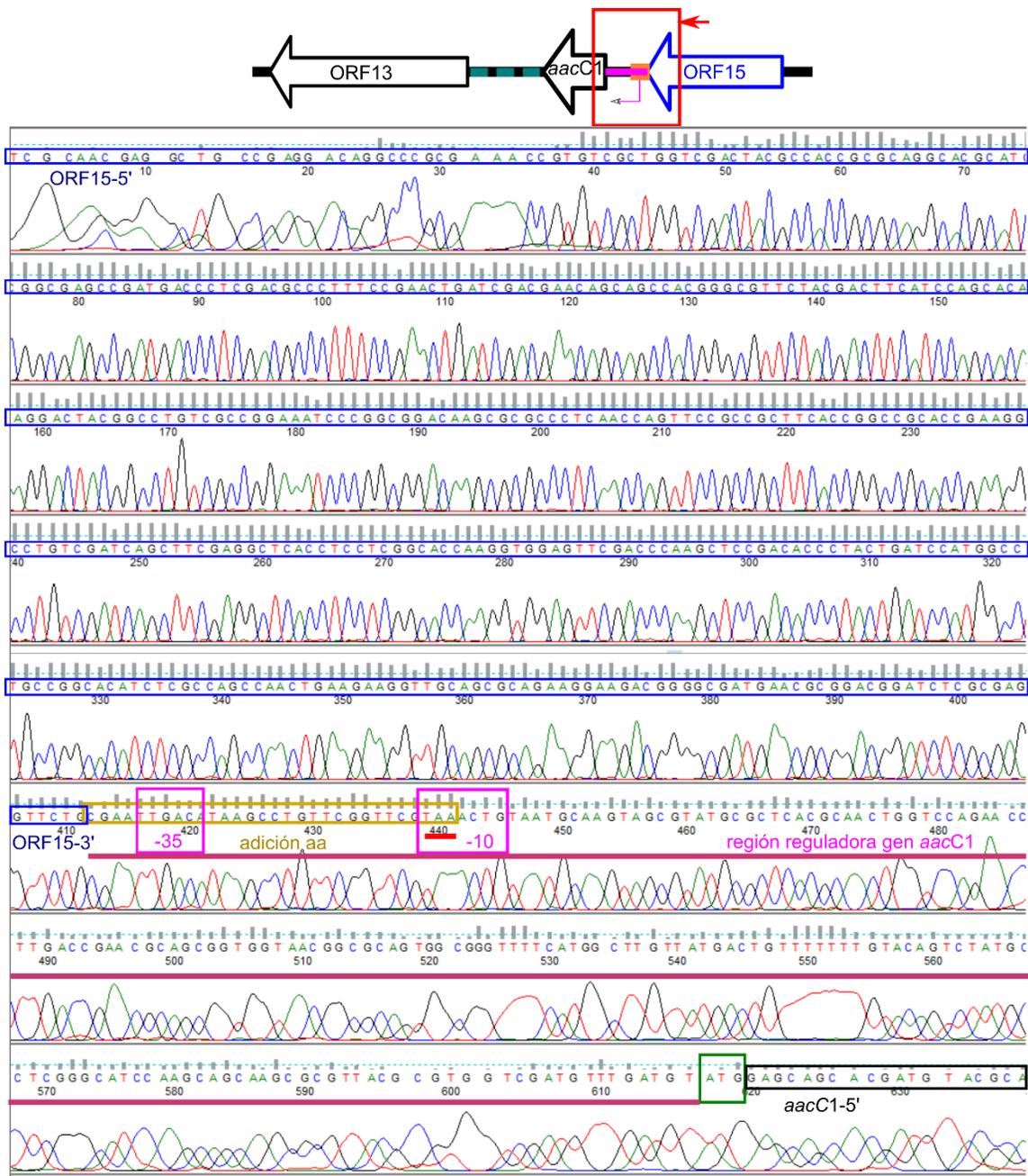


Figura A8. Secuencia del fago recombinante H66 α en la región de homología 1. En la parte superior se muestra el diagrama de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. Se resalta con un recuadro rojo la sección de la secuencia obtenida con el *primer* Reco_seq_fwd, cuya ubicación de hibridación y dirección de extensión se representa con la flecha roja. En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. En recuadro azul se delimitan los nucleótidos pertenecientes al ORF15. En amarillo se delimita el nuevo marco de lectura que adiciona, al final del ORF15, 7 aminoácidos nuevos. Se subraya en rojo el nuevo codón de paro. Estos nucleótidos forman parte de la secuencia añadida por el promotor del gen *aacC1* (resistencia a gentamicina). En rosa, se subraya la región reguladora del gen *aacC1*, resaltado en recuadros rosas los sitios -10 y -35 del promotor. En recuadro verde, el codón de inicio del gen *gp14*, el resto del marco de lectura se delimita con un recuadro en negro.

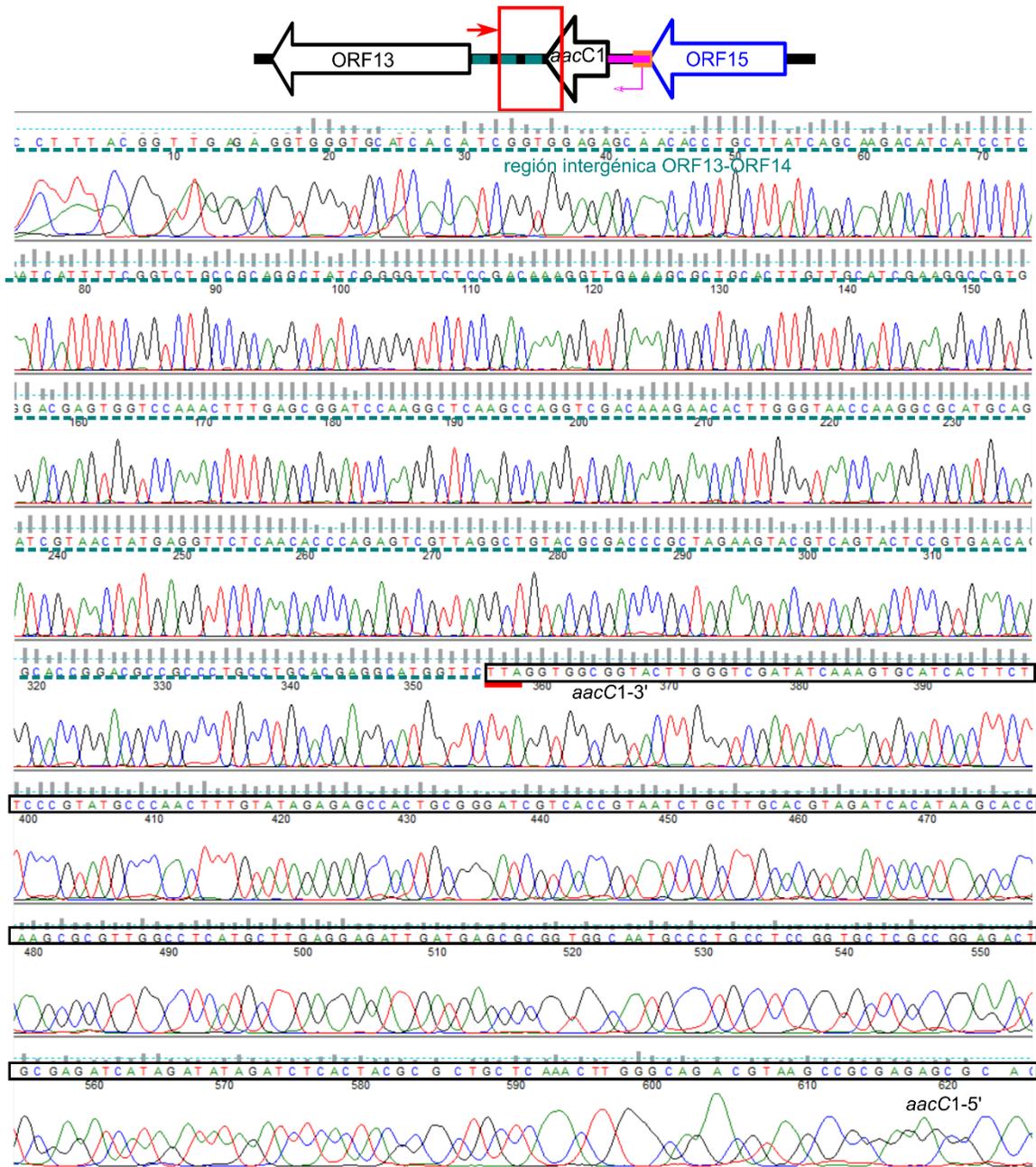


Figura A9. Secuencia del fago recombinante H66 α en la región de homología 2. En la parte superior, esquema de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. La sección obtenida por la reacción de secuenciación con el *primer* Reco_seq_rvs se resalta con el recuadro, cuya ubicación de hibridación y dirección de extensión se representa con la flecha roja. En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. Se subraya, con línea punteada color verde esmeralda, la región intergénica entre el ORF13 y *gp14*. Delimitado en recuadro negro la parte final del gen *aacC1* (secuencia complementaria), donde el codón de paro se subraya en rojo.

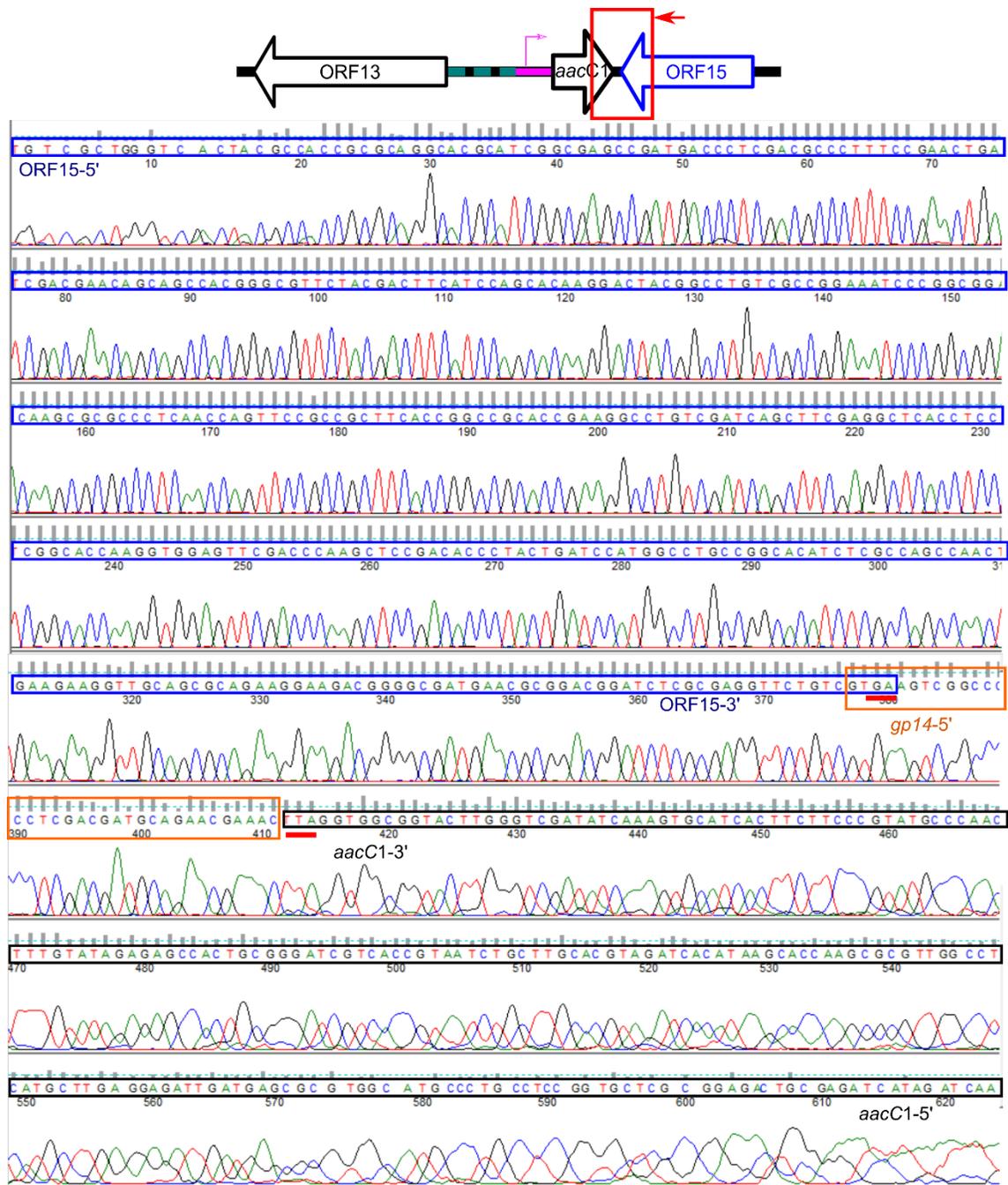


Figura A10. Secuencia del fago recombinante H66β en la región de homología 1. En la parte superior, esquema gráfico de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. Se resalta con un recuadro rojo la sección de la secuencia obtenida con el *primer* Reco_seq_fwd, (flecha roja). En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. En recuadro azul se delimitan los nucleótidos pertenecientes al ORF15, subrayado en rojo el codón de paro. En recuadro naranja se delimitan las bases correspondientes al inicio de *gp14*, que se superponen al ORF15. En recuadro negro se delimitan las bases del final del gen *aacC1* (secuencia complementaria), donde el codón de paro se subraya en rojo.

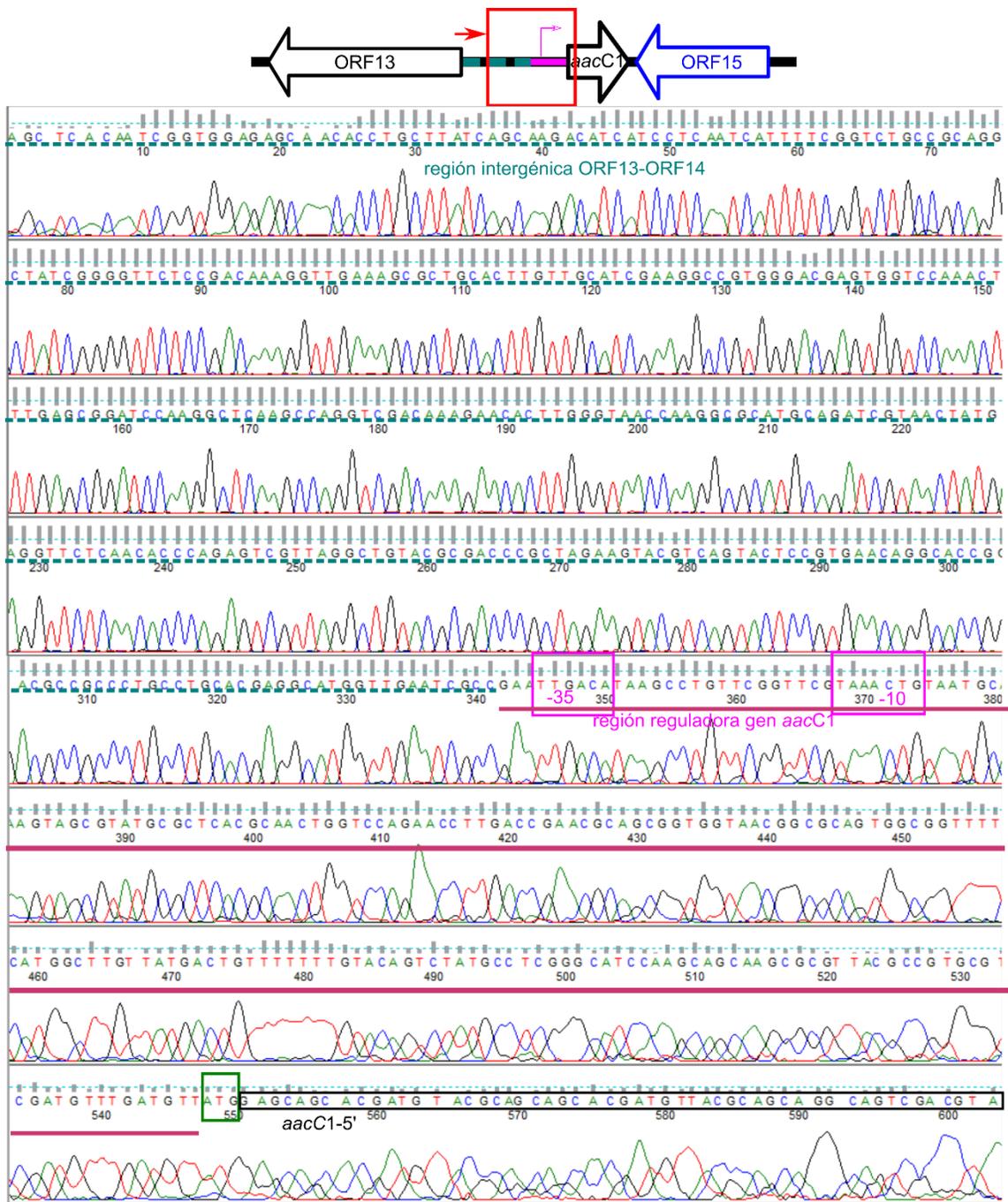


Figura A11. Secuencia del fago recombinante H66β en la región de homología 2. En la parte superior, representación de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. La sección obtenida por la reacción de secuenciación con el *primer Reco_seq_rvs* (flecha roja) se resalta con el recuadro rojo. En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. Subrayado con línea punteada color verde esmeralda, la región intergénica entre el ORF13 y *gp14*. Subrayado en rosa, la región reguladora del gen *aacC1*, resaltadas en cuadros rosa los sitios -10 y -35 del promotor. Delimitado en recuadro verde el codón de inicio del gen *aacC1*, en recuadro negro, las siguientes bases de *aacC1*.

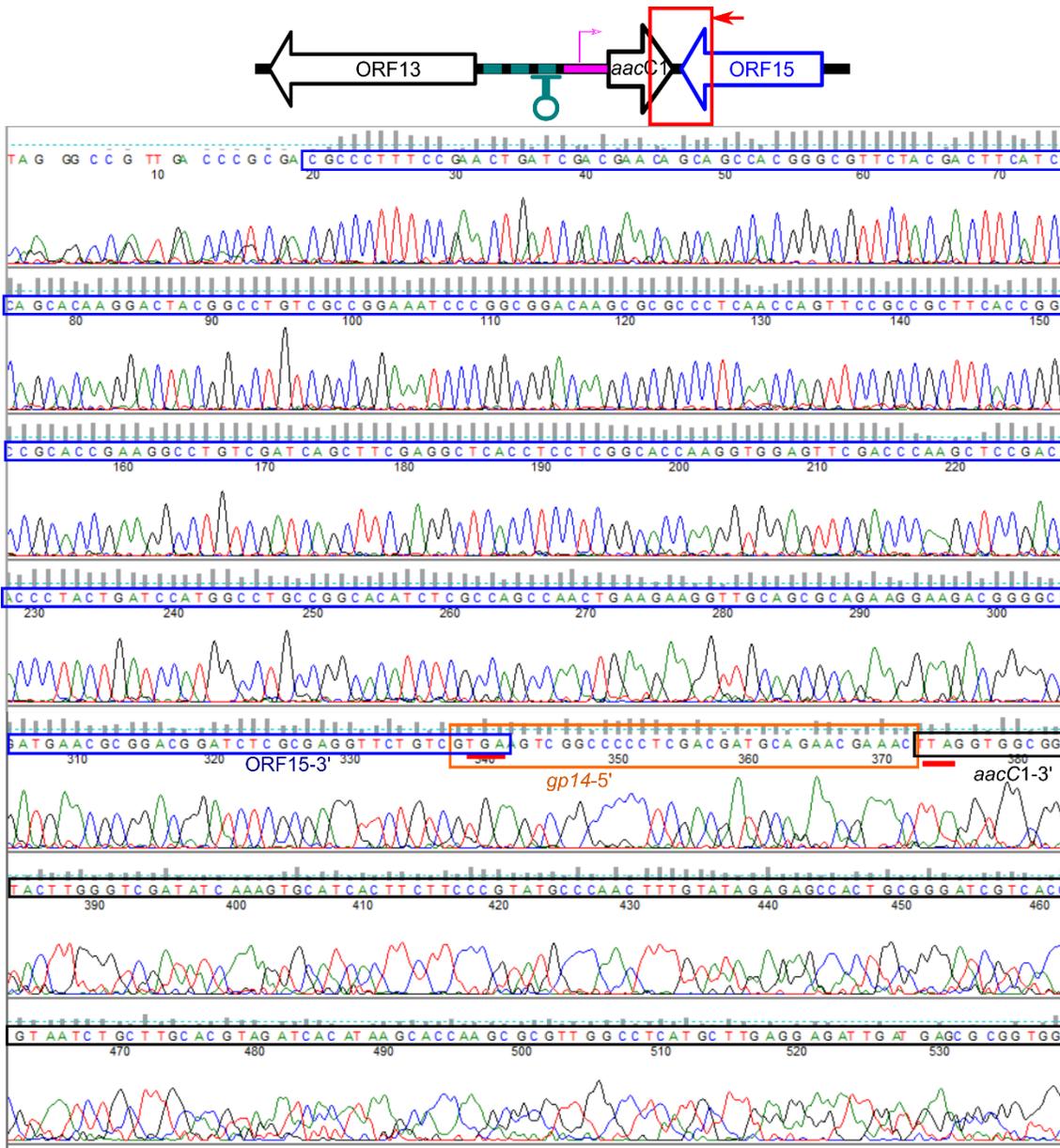


Figura A12. Secuencia del fago recombinante H66γ en la región de homología 1. En la parte superior, diagrama de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. Se resalta con un recuadro rojo la sección de la secuencia obtenida con el *primer* Reco_seq_fwd, (flecha roja). En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. En recuadro azul se delimitan los nucleótidos pertenecientes al ORF15, subrayado en rojo el codón de paro. En recuadro naranja se delimitan las bases correspondientes al inicio de *gp14*, que se superponen al ORF15. En recuadro negro se delimitan las bases del final del gen *aacC1* (secuencia complementaria), donde el codón de paro se subraya en rojo.

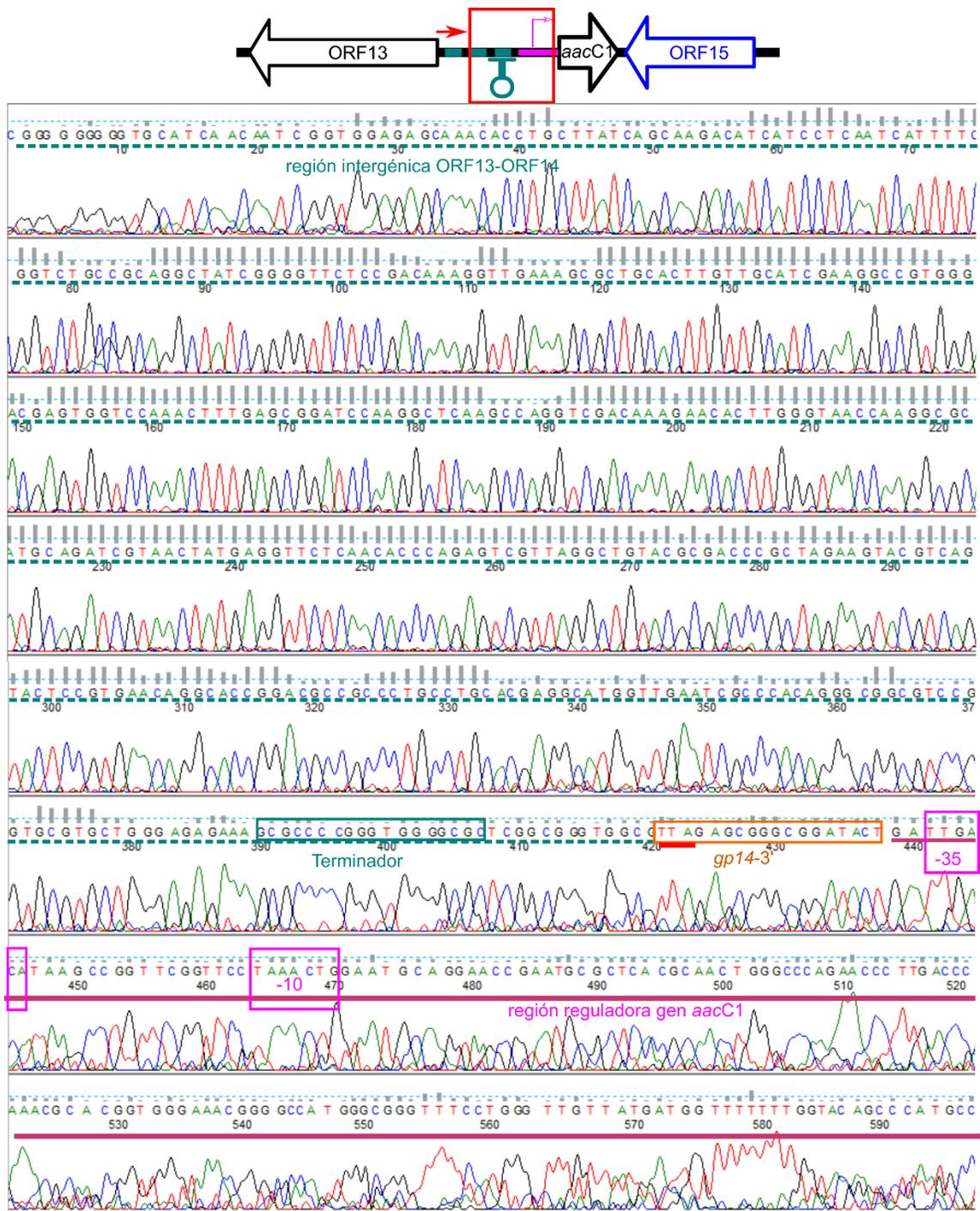


Figura A13. Secuencia del fago recombinante H66y en la región de homología 2. En la parte superior, esquema de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación homóloga. La sección obtenida por la reacción de secuenciación con el *primer* Reco_seq_rvs (flecha roja) se resalta con el recuadro rojo. En la parte inferior, electroferograma obtenido de la reacción de secuenciación. Subrayado con línea punteada color verde esmeralda, la región intergénica entre el ORF13 y *gp14*. Resaltado con el recuadro, verde esmeralda, el terminador putativo al final de *gp14*. En recuadro naranja, el extremo final de *gp14* (secuencia complementaria) donde se subraya en rojo el codón de paro. En rosa, se subraya la región reguladora del gen *aacC1*, en recuadros rosas los sitios -10 y -35 del promotor.

13.2 Lista de *primers* empleados. Tabla A1. Característica de *primers* usados.

No.	Nombre	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)	Ensayo	Información extra
1	Gp14_Fwd	CACCATGGTGAAGTCGGCCCC	63	Clonación <i>gp14</i>	Sitio de restricción <i>Nco</i> I en rojo. En conjunto con <i>primer 2</i> genera fragmento de 225 pb.
2	Gp14_Rvs	GC AAGCTTTAGAGCGGGCGGATACT	63	Clonación <i>gp14</i>	Sitio de restricción <i>Hind</i> III en rojo. En conjunto con <i>primer 1</i> genera fragmento de 225 pb.
3	6his_Gp14_a	CGCGCAGTATCCGCCGCTCCATCATCATCA TCATCACTAAAGCTTGGCACTGGCCGTCG	63	Mutagénesis dirigida adición 6his	Codones 6his en verde, codón paro en rojo. Para emplearse en conjunto con <i>primer 4</i> .
4	6his_Gp14_b	CGACGGCCAGTGCCAAGCTTTAAGTGATGAT GATGATGATGGAGCGGGCGGATACTGCGCG	63	Mutagénesis dirigida adición 6his	Codones 6his en verde, codón paro en rojo Para emplearse en conjunto con <i>primer 3</i> .
5	LexA_Fwd	CAGGTACCATGCAGAAGCTGACG	65	Clonación LexA _{Pa}	Sitio de restricción <i>Kpn</i> I en rojo. En conjunto con <i>primer 6</i> genera fragmento de 615 pb.
6	LexA_Rvs	GCAAGCTTTCAGCGCCGGATCAC	65	Clonación LexA _{Pa}	Sitio de restricción <i>Hind</i> III en rojo. En conjunto con <i>primer 5</i> genera fragmento de 615 pb.
7	BoxSOS_Fwd	AACTTCATCGGACGCAG	57	EMSA	Amplifica región reguladora LexA _{Pa} . En conjunto con <i>primer 8</i> genera fragmento de 96 pb.
8	BosSOS_Rvs	CTCTGTGTTTTTATCCAGTGAC	57	EMSA	Amplifica región reguladora LexA _{Pa} . En conjunto con <i>primer 7</i> genera fragmento de 96 pb.
9	Box32_Fwd	GTGAAATTATCAGCGG	57	EMSA	Amplifica región reguladora ORF32 H66. En conjunto con <i>primer 10</i> genera fragmento de 110 pb.
10	Box32_Rvs	CTGTACATCCATACAG	57	EMSA	Amplifica región reguladora ORF32 H66. En conjunto con <i>primer 9</i> genera fragmento de 110 pb.
11	Box70_Fwd	CAAGCCCCTCCCGGG	57	EMSA	Amplifica región reguladora ORF70 H66. En conjunto con <i>primer 12</i> genera fragmento de 120 pb.
12	Box70_Rvs	GCGGTCGGGTGGGCC	57	EMSA	Amplifica región reguladora ORF70 H66. En conjunto con <i>primer 11</i> genera fragmento de 120 pb.
13	PromTet_Fwd	TCATGTTTGACAGCTTATCATCG	61	EMSA	Amplifica región reguladora gen resistencia a tetraciclina. En conjunto con <i>primer 14</i> genera fragmento de 120 pb.
14	PromTet_Rvs	GCCGAGGATGACGATGAG	61	EMSA	Amplifica región reguladora gen resistencia a tetraciclina. En conjunto con <i>primer 13</i> genera fragmento de 120 pb.
15	GmR_Fwd	ATTGACATAAGCCTGTTCG	56	Construcción fagos recombinantes	Amplifica gen <i>aacC1</i> con su región promotora. En conjunto con <i>primer 16</i> genera fragmento de 650 pb.

No.	Nombre	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)	Ensayo	Información extra
16	GmR_Rvs	TTAGGTGGCGGTA CTTG	56	Construcción fagos recombinantes	Amplifica gen <i>aacC1</i> con su región promotora. En conjunto con <i>primer 15</i> genera fragmento de 650 pb.
17	LexA_H66_up_fwd	GTACAAGCAAGCAGGCTCTGATCGACGAAC AGCAGCC	65	Construcción fago recombinante H66 α	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 1 de <i>gp14</i> en conjunto con <i>primer 18</i> .
18	LexA_H66_up_rev	GTTTACGAACCGAACAGGCTCAGAACCTCG CGAGATCCGT	65	Construcción fago recombinante H66 α , construcción región de homología 1	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 1 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 17</i> , se pierde codón de paro ORF15. Negro, hibrida con gen <i>aacC1</i> (para fusión)
19	LexA_H66_down_fwd	ACCCAAGTACCGCCACCTAAGCGATTCAACC ATGCCTCGT	65	Construcción fago recombinante H66 α .	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 2 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 20</i> , se pierde terminador putativo. Negro, hibrida con gen <i>aacC1</i> (para fusión)
20	LexA_H66_down_rev	TACCAGGAAGCTGGGTCTGCTTATCAGCAA GACATCATCC	65	Construcción fago recombinante H66 α	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 2 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 19</i> .
21	ZH1_fwd	CTGATCGACGAACAGCAGCC	65	Construcción fagos recombinantes H66 β y H66 γ	Hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 1 de <i>gp14</i> , en conjunto con el <i>primer 22</i> .
22	ZH1_rev	ACCCAAGTACCGCCACCTAAGTTTCGTTCTG CATCGTCGAG	65	Construcción fagos recombinantes H66 β y H66 γ	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 1 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 21</i> , se mantiene codón de paro ORF15. Negro, hibrida con gen <i>aacC1</i> (para fusión)
23	ZH2_fwd	CCGAACAGGCTTATGTCAATTCGCGATTCA ACCATGCCTCGT	65	Construcción fagos recombinantes H66 β y H66 γ	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 2 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 24</i> , se pierde terminador putativo. Negro, hibrida con gen <i>aacC1</i> (para fusión).
24	ZH2_rev	CCTGCTTATCAGCAAGACATCATCC	65	Construcción fagos recombinantes H66 β y H66 γ	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 2 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 23</i>
25	ZH2_ter_gm	CCGAACAGGCTTATGTCAATTCAGTATCCGC CCGCTCTAACG	65	Construcción fago recombinante H66 γ , región de homología 2	Rojo, hibrida con genoma H66. Amplifica 300 pb región de homología 2 de <i>gp14</i> , en conjunto con <i>primer 23</i> , se mantiene terminador putativo. Negro, hibrida con gen <i>aacC1</i> (para fusión).
26	RecoSeq_Fwd	AAAGCCTTCAGCGACTTCGT	63	Construcción fagos recombinantes	Hibrida fuera de la región de recombinación, se utilizan para obtener secuencia.

No.	Nombre	Secuencia 5' → 3'	T _m (°C)	Ensayo	Información extra
27	RecoSeq_Rvs	TCGTGTTTCGATGACACCAAGG	63	Construcción fagos recombinantes	Hibrida fuera de la región de recombinación, se utilizan para obtener secuencia
28	F-PAO1-H66-long	TGAATACAGGTGCCGGACCG	63	Presencia del profago en PAO1	Hibrida sobre genoma PAO1 para producir fragmento de 500 pb en conjunto con <i>primer</i> 29. En lisógenas PAO1(H66) en conjunto con <i>primer</i> 32 genera fragmentos de 635 pb.
29	R-PAO1-H66	ATCATGTTGTGCTGGACCCG	63	Presencia del profago en PAO1	Hibrida sobre genoma PAO1 para producir fragmento de 500 pb en conjunto con <i>primer</i> 28.
30	F-PAO1-H66-short	ATAAAATCCCTCGCCCTGCTC	63	Presencia del profago en PAO1	Hibrida sobre genoma PAO1 para producir fragmento de 381 pb en conjunto con <i>primer</i> 29.
31	R-H66-pro-left	CATCCCCCAGCCATGTCG	63	Presencia del profago en PAO1	Hibrida sobre genoma de H66, en su extremo de la integrada. Genera fragmentos de 555 pb en conjunto con el <i>primer</i> 30 en una lisógena PAO1(H66).
32	F-H66-pro-right	CCCACGATTCCGCACTGGTA	63	Presencia del profago en PAO1	Hibrida sobre genoma de H66, en su extremo del ORF70. En una lisógena PAO1(H66) genera fragmentos de 470 pb en conjunto con el <i>primer</i> 30, o fragmentos de 635 pb con el <i>primer</i> 28.
33	pho_fwd	GCAGATGACCGACAAAGCCA	55	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida sobre el gen <i>phoA</i> en el transposón <i>IsphoA/hah</i> . Genera fragmentos de 1650 pb con <i>primer</i> 34.
34	pho_rvs	AGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAG	55	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida sobre el gen <i>tet</i> en el transposón <i>IsphoA/hah</i> . Genera fragmentos de 1650 pb con <i>primer</i> 33.
35	pho_bo	CGGGTGCAGTAATATCGCCCT	55	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida en el extremo 5' del transposón <i>IsphoA/hah</i> .
36	seq_LexA_fwd	ATCAGGTGCATCACCTGCTC	61	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida fuera del ORF de <i>lexA</i> .
37	seq_LexA_Rv	TGGATGGGCTGTTACAATGTC	61	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida fuera del ORF de <i>lexA</i>
38	RecA_Fwd	GCTGGCTACGTGACCTACTC	63	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida fuera del ORF de <i>recA</i>
39	RecA_Rvs	CTTTCGAGATAGCGGGATTCGT	63	Verificación cepas PAO1 mutantes	Hibrida fuera del ORF de <i>recA</i>

13.3 Construcción vector suicida para la recombinación homóloga

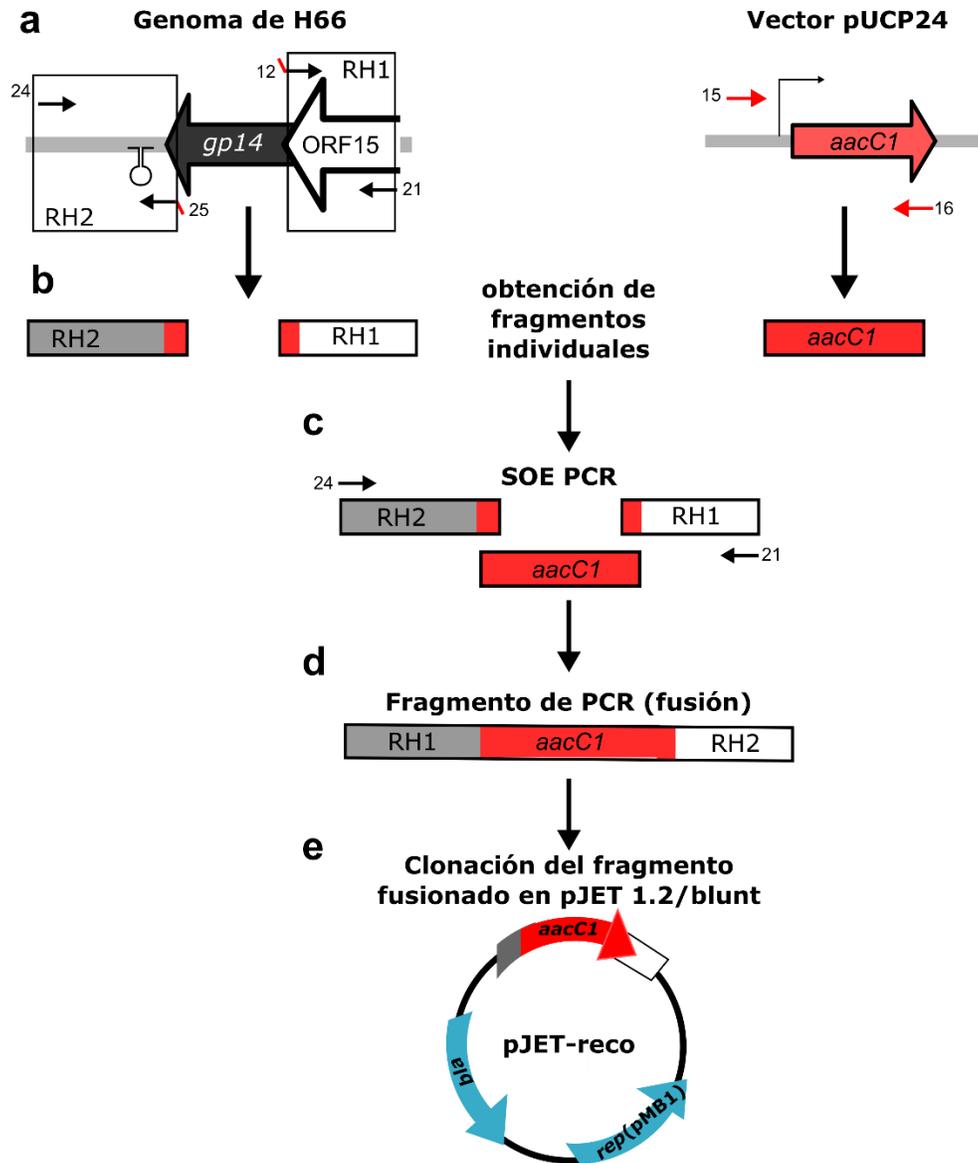


Figura A14. Diagrama de flujo para la estrategia de construcción del vector suicida. **a)** Representación gráfica de la región del genoma de H66 involucrada en la recombinación (izquierda), en recuadros se delimitan las regiones de homología 1 (RH1) y 2 (RH2), se ejemplifican los *primers* empleados para la construcción de H66 γ en su ubicación de hibridación (flechas); representación del gen de resistencia a gentamicina *aacC1* (derecha) amplificado a partir del vector pUCP24, se indica la región de hibridación de los *primers* utilizados (flechas rojas). **b)** Diagrama representativo de los fragmentos obtenidos de PCR individuales para cada par de *primers* empleado, las regiones rojas en RH1 y RH2 corresponden a secuencia con homología al gen *aacC1* que permite la fusión. **c)** Para generar la fusión de los tres fragmentos, estos se colocan en un mix de reacción en presencia de los *primers* externos, (SOE-PCR). **d)** Representación gráfica de la fusión de los fragmentos de PCR. Este fragmento de extremos romos puede clonarse en el vector comercial p-JET. **e)** Esquema del posible producto de clonación del fragmento fusionado para generar la construcción pJET-reco.