

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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE  
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Caracterización parcial de la interacción de la proteína  
Lpp<sup>mEp021</sup> con los receptores de membrana LamB, MalF y  
MalG de *Escherichia coli*”**

**T E S I S**

Que presenta

**Biol. Randy Seir Llanas Vázquez**

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

En la especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de tesis

**Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe**



## **ASESORES**

Dr. Javier Hernández Sánchez

(Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV)

Dr. Gabriel Guarneros Peña

(Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV)

## **FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo fue desarrollado en el Departamento de Genética y Biología Molecular en las instalaciones del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) unidad Zacatenco, en el laboratorio número 5 bajo la dirección del Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de una beca de maestría durante el periodo septiembre 2019-agosto 2021, con número de registro de becario/CV 997421.

Agradezco profundamente al CONACyT y al CINVESTAV-IPN por el financiamiento y apoyo brindado durante mis estudios de Posgrado en esta institución.

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente a mi familia

A mi madre Carolina Vázquez Méndez debido a que ha sido y sigue siendo un gran ejemplo de constancia y perseverancia, por tanto apoyo y comprensión a lo largo de mi vida, así como todos esos enormes momentos invaluable e inolvidables. Por haber sacado adelante una familia, con tanto esfuerzo, dedicación y amor.

A mi padre Jesús Llanas Turrubiarres porque la mayor inspiración de un buen investigador siempre es estar dudando y aprendiendo, por incitar en mí el espíritu de preguntar, investigar y resolver. Por haber hecho hasta lo imposible por asegurarnos un futuro próspero, sano, feliz y siempre, siempre tener algún motivo por el cual estar contentos.

A mi hermano Denizar Llanas Vázquez porque, aunque yo tenga un carácter y una forma de ser, siempre ha sabido tratarme de la mejor manera y siempre he tenido en el escudo del hermano mayor comprensivo y protector. Por todas esas platicas y conversaciones largas que van más allá de cualquier banalidad.

A mi pareja Gabriela Zavala Torres porque he aprendido demasiado sobre mí mismo, porque me motiva a ser siempre una mejor persona, por escucharme, quererme y siempre estar dispuesta a entenderme como soy. Entre buenos y malos momentos, pero sin lugar a duda la mejor persona que me ha podido acompañar.

A mis compañeros de generación de Genética y Biología Molecular por las sesiones de estudio y desestres, porque nadie puede entender mejor lo que se vive en el proceso de un posgrado y, aun así, tener tiempo para pensar en los demás.

A mis compañeros de laboratorio, Guadalupe, Honorio y Elissa, porque sin su apoyo no habría podido llevar a cabo este trabajo, por escucharme y siempre aportar buenas ideas. Aunque no convivimos tanto como me hubiese gustado, fueron unos compañeros de laboratorio excelentes que siempre recordare.

Al Dr. Kameyama por haberme permitido trabajar en su laboratorio y poder colmar mis deseos de trabajar con las entidades, desde mi parecer tan increíbles, como lo son los bacteriófagos.

A mis asesores el Dr. Gabriel Guarneros y el Dr. Javier Hernández por hacer de este trabajo lo mejor posible con observaciones tan acertadas como convenientes, que solo su experiencia y ardua labor han logrado definir.

A Gaby Mora por siempre contar con tiempo y dedicación hacia cada uno de los alumnos del departamento de genética, siempre con una sonrisa y siempre siendo muy considerada.

## **Dedicatoria**

Para mi padre Jesús Llanas a quien siempre llevare en el corazón, recordare con muchísimo amor y aprecio, y que siempre creyó en mí y me apoyo con todos los buenos sentimientos que siempre tuvo.

A mi tío Alberto Vázquez quien siempre tuvo ánimos de estar feliz, festejar la vida y escuchar música de rock.

A mi gran compañero Jorge Martínez que tuve el placer de conocer en el posgrado, estoy seguro de que llevaba un gran investigador dentro de el por el tiempo que lo conocí, siempre con deseos de superarse.

A estas tres grandes personas que estuvieron en mi vida en esta esta etapa.

Sé amable, porque toda persona que conoces está librando  
una gran batalla

-Platón

Por muy mala que parezca la vida, siempre hay algo que  
puedes hacer y tener éxito. Importa que no te rindas,  
mientras haya vida, habrá esperanza

-Stephen Hawking

<b>Índice general</b>	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>IV</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>VI</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VII</b>
<b>Resumen</b>	<b>VIII</b>
<b>Summary</b>	<b>X</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes y generalidades de los bacteriófagos	1
1.2. Ciclo replicativo de los bacteriófagos	1
1.3. Infección y reconocimiento del hospedero	3
1.3.1. Exclusión a la super infección	3
1.4. Receptores de membrana	7
1.5. Herramientas bioinformáticas	10
<b>2. Antecedentes</b>	<b>12</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>15</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>17</b>
<b>5. Objetivos</b>	<b>17</b>
5.1. General	17
5.2. Particulares	17
<b>6. Esquema general de trabajo</b>	<b>18</b>
<b>7. Metodología</b>	<b>19</b>
7.1. Análisis bioinformático de la lipoproteína Lpp <sup>mEp021</sup>	19
7.2. Bacteria, bacteriófagos, plásmidos y medios de cultivo	20
7.3. Purificación de bacteriófagos	21
7.4. Obtención de lisados de fagos	22
7.5. Titulación de bacteriófagos	22
7.6. Extracción de DNA viral mediante el protocolo de DEAE-celulosa	23

7.7.	Ensayo de restricción del DNA de mEp021	24
7.8.	Preparación de bacterias quimiocompetentes	24
7.9.	Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico	25
7.10.	Diferentes ensayos de infección/exclusión para mEp021	25
7.11.	Ensayo de toxicidad por la expresión de Lpp <sup>mEp021</sup> en la viabilidad celular	26
7.12.	Fraccionamiento celular y detección de lipoproteína Lpp <sup>mEp021</sup>	27
7.12.1.	Extracción de proteínas y fraccionamiento celular	27
7.12.2.	Preparación de gel de proteínas	27
7.12.3.	Tinción de plata	28
7.12.4.	Western-blot	28
7.12.5.	Revelado	29
7.13.	Clonación de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (MalG, MalF y LamB)	29
7.13.1.	Amplificación de los genes malG, malF y lamB	29
7.13.2.	Clonación de los genes en el vector de transición pJET1.2/blunt	31
7.13.3.	Análisis de candidatas por PCR de colonia	32
7.13.4.	Extracción de plásmido	32
7.13.5.	Selección de candidatas con inserto de interés por restricción	33
7.13.6.	Corte y purificación de las bandas	34
7.13.7.	Clonación de los genes de proteínas de membrana en el vector pBAD28	35
7.13.8.	Comprobación de colonias candidatas en pBAD28	35
7.13.9.	Deleción de la resistencia a ampicilina (Amp <sup>R</sup> )	36
7.14.	Ensayos de MacConkey	37
8.	Resultados	38
8.1.	Análisis bioinformático relacionado a la lipoproteína Lpp <sup>mEp021</sup>	38
8.1.1.	Identificación de lipoproteínas putativas de fagos provenientes del grupo I	38
8.1.2.	Alineamientos de distintas lipoproteínas obtenidas de las bases de datos	38
8.1.3.	Estructuras tridimensionales y alineación de proteínas	40
8.1.4.	Alineamiento de estructuras tridimensionales y matriz	41
8.1.5.	“Docking” molecular <i>in silico</i> de Lpp <sup>mEp021</sup> con proteínas de membrana	42
8.2.	Caracterización del fago mEp021 por restricción de genoma	43
8.3.	Ensayos de infección/exclusión para el bacteriófago mEp021 en distintas cepas	44
8.4.	Ensayos de toxicidad por la expresión de Lpp <sup>mEp021</sup> en la viabilidad celular	50

<b>8.5. Fraccionamiento celular y detección de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup></b>	<b>53</b>
<b>8.5.1. Expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en la cepa W3110</b>	<b>53</b>
<b>8.5.2. Inmunodetección de Lpp<sup>mEp021</sup> por Western-blot</b>	<b>55</b>
<b>8.6. Construcción de plásmidos complementarios a las cepas Keio (<i>malG</i>, <i>malF</i> y <i>lamB</i>)</b>	<b>57</b>
<b>8.6.1. Amplificación de los genes de proteínas de membrana</b>	<b>57</b>
<b>8.6.2. Clonación de los genes de proteínas de membrana en el vector pJET1.2/blunt</b>	<b>58</b>
<b>8.6.3. Clonación en el vector pBAD28</b>	<b>59</b>
<b>8.7. Ensayos de incorporación de maltosa en células que expresan Lpp<sup>mEp021</sup></b>	<b>61</b>
<b>8.8. Ensayos de incorporación de maltosa en cepas Keio complementadas</b>	<b>62</b>
<b>8.9. Ensayos de infección/exclusión en cepas Keio complementadas</b>	<b>66</b>
<b>9. Discusión</b>	<b>70</b>
<b>10. Conclusiones</b>	<b>79</b>
<b>11. Perspectivas</b>	<b>80</b>
<b>12. Literatura consultada</b>	<b>81</b>
<b>13. Apéndices</b>	<b>88</b>
<b>14. Anexo</b>	<b>94</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Ciclos de la propagación de los bacteriófagos.	2
Figura 2. Ruta canónica de la biosíntesis de lipoproteínas bacterianas.	6
Figura 3. Estructura de OmpA.	7
Figura 4. Estructura 3D del trímero del barril de hojas $\beta$ de LamB.	8
Figura 5. Representación de los componentes del sistema transportador de maltosa.	9
Figura 6. Algunas de las funciones de la bioinformática.	10
Figura 7. Procedimiento de las diluciones de un lisado de bacteriófagos.	23
Figura 8. Alineamiento de lipoproteínas de fagos del grupo de inmunidad I y de dos fagos lambdoides (mEp167 y mEp237).	38
Figura 9. Árbol filogenético de distintas lipoproteínas de exclusión a la infección.	40
Figura 10. Modelos de la estructura tridimensional de Lpp <sup>mEp021</sup>	41
Figura 11. Matriz de identidad en alineamientos de proteínas.	42
Figura 12. Ensayo <i>in silico</i> de “docking” molecular entre la lipoproteína Lpp <sup>mEp021</sup> y proteínas de membrana.	43
Figura 13. Integridad del genoma de mEp021 por patrón de restricción de DNA.	44
Figura 14. Ensayo de infección/exclusión en W3110 y W3110/pORF81.	43
Figura 15. Curvas de crecimiento.	49
Figura 16. Viabilidad celular de la cepa <i>E. coli</i> W3110.	50
Figura 17. Tinción con plata de gel de proteínas.	53
Figura 18. Tinción con plata de gel de proteínas de la fracción celular soluble.	54
Figura 19. Tinción con plata de gel de proteínas de la fracción celular insoluble.	55
Figura 20. Expresión e inmunodetección de la lipoproteína Lpp <sup>mEp021</sup> .	56
Figura 21. Western blot de Lpp <sup>mEp021</sup> -6xHis en la fracción insoluble.	57
Figura 22. Amplificación de los genes <i>malG</i> , <i>malF</i> y <i>lamB</i> .	58
Figura 23. Análisis de candidatas pJET1.2/ <i>malG</i> , pJET1.2/ <i>lamB</i> y pJET1.2/ <i>malF</i> .	59
Figura 24. Características del plásmido pBAD28 y restricción de candidatas pBAD28/ <i>malG</i> , <i>malF</i> o <i>lamB</i> .	61
Figura 25. Ensayos de incorporación de maltosa en bacterias mutantes complementadas.	64

**Figura 26. Ensayos de incorporación de maltosa al expresar dos vectores de clonación. 66**

**Figura 27. Posibles modelos representativos de los efectos observados de Lpp<sup>mEp021</sup>. 74**

## Índice de tablas

Tabla 1. Bacteria, bacteriofagos y plásmidos	21
Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados.	29
Tabla 3. Proteínas homólogas a Lpp <sup>mEp021</sup> a nivel de aminoácidos disponibles en bases de datos.	39
Tabla 4. Ensayos de infección/exclusión	46
Tabla 5. Ensayos de infección/exclusión con pORF81.	47
Tabla 6. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-6xHis.	48
Tabla 7. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-6xHisW71C.	49
Tabla 8. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-mCherry.	50
Tabla 9. Ensayos de incorporación de maltosa en distintas cepas.	62
Tabla 10. Coloración de las bacterias de la cepa Keio complementadas.	63
Tabla 11. Coloración de las bacterias de la cepa Keio complementada y con Lpp <sup>mEp021</sup> .	65
Tabla 12. Ensayos de infección/exclusión en cepas mutantes Keio ( <i>malG</i> y <i>malF</i> ) al ser complementadas.	68
Tabla 13. Ensayos de infección/exclusión en la cepa mutante <i>lamB</i> complementada.	69

## Abreviaturas

O/N	Overnight
P/V	Peso/Volumen
O.D.	Densidad óptica
°C	Grado Celsius
G	Gravedades
RPM	Revoluciones por minuto
UFP	Unidades formadoras de placas
UFC	Unidades formadoras de colonias
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Amp	Ampicilina
Kan	Kanamicina
Chl	Cloranfenicol
lb	Libras
gr	Gramos
µg	Microgramos
L	Litros
mL	Mililitros
µl	Microlitros
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Micromolar
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
kb	Kilobases
ng	Nanogramos
kDa	Kilodaltons
U	Unidades de enzima
KCl	Cloruro de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
TMG	Tris Magnesio Gelatina
TE	Buffer Tris-Etil Diamino Tetra acético
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
h	Horas
min	Minutos
seg	Segundos
m	Metros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
λ	Lambda
V	Volts

## Resumen

Las proteínas de exclusión a la superinfección se encuentran codificados en el genoma de algunos bacteriófagos y son expresados en bacterias lisogénicas. Estas han sido poco estudiadas, por lo que muchos de sus mecanismos moleculares se encuentran aún por determinarse. Estudios previos mostraron que al expresar la lipoproteína  $Lpp^{mEp021}$  en la cepa *E. coli* W3110, ésta es capaz de excluir la infección del fago mEp021, (independientemente del represor asociado a la inmunidad), sugiriendo que la exclusión puede presentarse por un mecanismo alterno, como el impedimento de la entrada de material genético viral a nivel de membranas. Se observó que en mutantes derivadas de BW25113, como en las cepas: JW3993(*malF*<sup>-</sup>), JW3992(*malG*<sup>-</sup>) y JW3996(*lamB*<sup>-</sup>), en presencia de  $Lpp^{mEp021}$ , permitieron la infección de mEp021, a diferencia de la parental BW25113. Lo que indica que la inhibición por  $Lpp^{mEp021}$  requiere de estos factores y podría estar asociada en forma directa con la interacción de estas proteínas. En este trabajo se planteó como objetivo recabar evidencias adicionales acerca de la posible interacción entre las proteínas MalG, MalF y LamB con la proteína  $Lpp^{mEp021}$ .

En este trabajo se realizó la construcción de los plásmidos pMalG, pMalF y pLamB a partir del vector pBAD28. Mediante ensayos de complementación de las cepas mutantes (previamente mencionadas), se observó que en cajas MacConkey-maltosa y arabinosa (como inductor del promotor en pBAD28), permitieron la fermentación de la maltosa. Lo cual indica que los plásmidos expresan las proteínas correspondientes y estas son fisiológicamente funcionales. Al utilizar estos plásmidos en ensayos de infección de mEp021 en las cepas: 1). JW3992(*malG*<sup>-</sup>)/pMalG + pORF81 ( $lpp^{mEp021}$ ), 2). JW3993(*malF*<sup>-</sup>)/pMalF + pORF81 ( $lpp^{mEp021}$ ), y 3). JW3996(*lamB*<sup>-</sup>)/pLamB + pORF81 ( $lpp^{mEp021}$ ). Interesantemente, y contrario a lo esperado, ¡no se observó el fenotipo de exclusión!, y en adición, dos de estas cepas, ¡perdieron la capacidad de fermentar maltosa! Estos resultados evidencian la presencia de una interacción directa de  $Lpp^{mEp021}$  y MalF/MalG del complejo MalFGK<sub>2</sub>, probablemente alterando la conformación estructural del mismo, afectando la translocación de la maltosa, así como el proceso infectivo de mEp021 a través de la membrana interna.

De manera general, estos resultados muestran las alternancias que puede tener una bacteria lisógena (en adición al represor), para evitar ser eliminada.

## Summary

Superinfection exclusion proteins are usually encoded in some bacteriophages genomes and expressed by lysogen bacteria. But have been poorly studied, in such a way that many of the molecular mechanism are yet to be determined. Previous studies showed that expression of lipoprotein Lpp<sup>mEp021</sup> in *E. coli* W3110 strain could exclude mEp021 phage infection (in a separate way to the immunity repressor), suggesting that phage exclusion was mediated by an alternate mechanism, as would be the case where proteins block the entry of phage DNA into host cell at membrane level. Also, mutant strains obtained from BW25113: JW3993(*malF*<sup>-</sup>), JW3992(*malG*<sup>-</sup>) and JW3996(*lamB*<sup>-</sup>) proved to be sensitive to mEp021 phage infection, even in those scenarios with Lpp<sup>mEp021</sup> expression, contrary to the results obtained with BW25113 WT. Indicating that Lpp<sup>mEp021</sup> to be able to exclude phage infection, bacteria have to contain those proteins, and may be associated with some kind of interaction between these proteins. In this study we establish as main objective to collect additional evidence concerning to the possible interaction between proteins MalG, MalF and LamB with lipoprotein Lpp<sup>mEp021</sup>.

In this work it was carried out the construction of plasmids pMalG, pMalF and pLamB from vector pBAD28. Through complementation tests of mutant's strains (previously mentioned), it was observed that in MacConkey-maltose plates arabinose added (as promoter inducer from pBAD28), that maltose fermentation was functional. This result indicates that expression of corresponding proteins is due to plasmids presence, and these are physiologically functional. Interestingly, when we test these plasmids in mEp021 infection assay in strains: 1). JW3992(*malG*<sup>-</sup>)/pMalG + pORF81 (*lpp*<sup>mEp021</sup>), 2). JW3993(*malF*<sup>-</sup>)/pMalF + pORF81 (*lpp*<sup>mEp021</sup>), & 3). JW3996(*lamB*<sup>-</sup>)/pLamB + pORF81 (*lpp*<sup>mEp021</sup>). Contrary to expected, no exclusion phenotype was observed! In addition, two of these strains, lost the potential to ferment maltose! Proving existence about directly interaction between MalFGK<sub>2</sub> complex component proteins MalF & MalG, and the lipoprotein Lpp<sup>mEp021</sup>, probably by altering its structural conformation, altering translocation of maltose, as well as infective process of mEp021 through inner membrane.

Overall, these results show distinct functions that lysogenic bacterium may present (in addition to repressor), towards avoiding eradication.



## **1. Introducción**

### **1.1. Antecedentes y generalidades de los bacteriófagos**

A partir del descubrimiento por William Twort en 1915 y la posterior identificación por Felix d'Herelle como un organismo antagónico a las bacterias, los bacteriófagos despertaron el interés por descifrar sus mecanismos y características moleculares a través de la investigación científica. Incluso, fueron descritos como la parte esencial en el establecimiento de las bases moleculares para el desarrollo de una nueva especialidad científica: la Biología Molecular (Mullins, 1972; Summers, 1999).

Estas entidades preservan la necesidad delimitante que tienen todos los virus, el requerimiento de un organismo hospedero donde pueda llevarse a cabo su ciclo de replicación. Es debido a esto que, las bacterias al presentar una distribución global, tal que, si bien está definida por su adaptabilidad a los diversos ambientes, es ubicua, por lo que, del mismo modo, los bacteriófagos se encuentran ampliamente distribuidos globalmente; siempre y cuando existan las bacterias que puedan ser infectadas (Clark, 2006). Algunos estudios enfocados en la abundancia viral en los océanos sugieren que existe una relación de 10 bacteriófagos por bacteria (Suttle, 2005) y han sido catalogados como la entidad biológica más abundante del planeta (Rohwer, 2003).

### **1.2. Ciclo replicativo de los bacteriófagos**

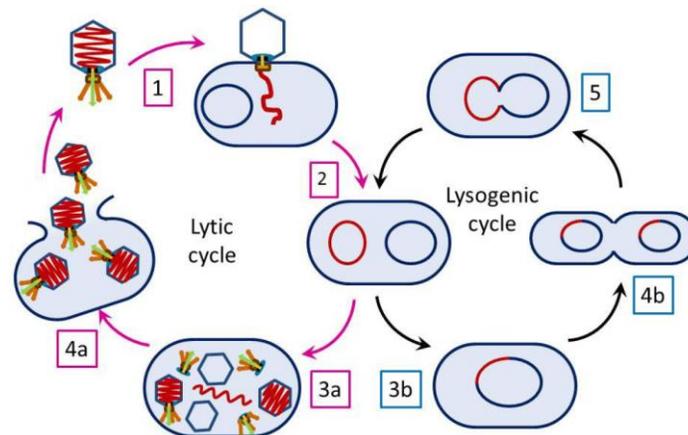
Hasta la fecha todos los bacteriófagos o fagos pueden ser clasificados en dos tipos/clases; virulentos y temperados, dependiendo del ciclo replicativo que lleven a cabo. El primero denominado ciclo lítico que generalmente concluye con la lisis de la célula trae consigo su muerte y la liberación de partículas virales maduras, las cuales pueden continuar con nuevos ciclos de propagación. Esto se realiza en cuestión de minutos u horas, posterior al primer evento de infección (Pieter-Jan, 2010). Puesto que, al entrar el material genético al citoplasma, inmediatamente sus genes son expresados, y se apodera de los componentes del metabolismo bacteriano para la elaboración de los nuevos viriones. Además, algunos fagos tienen codificado, dentro de su genoma, el mecanismo enzimático, compuesto principalmente por holinas y endolisinas, las cuales facilitan la desintegración de la



pared y membrana bacteriana (Abedon, 2012). Este ciclo se encuentra representado en la parte izquierda de la Figura 1.

El segundo tipo de ciclo replicativo lo constituyen los fagos temperados y se distinguen por su capacidad de subsistir dentro de la célula hospedera, en forma de profago (se presenta la definición abajo) o como material extracromosomal (plásmido), siendo el bacteriófago lambda ( $\lambda$ ) (Nash, 1981) y el fago P1 (Ikeda, 1968) ejemplos de estas formas de establecimiento, respectivamente. Estos pueden replicarse de manera pasiva en conjunto al genoma bacteriano, de modo que el profago es segregado a las células hijas tras una división binaria (Abedon, 2012). Lo anterior puede ser llevado a cabo indefinidamente a través de varias generaciones sin perjudicar al hospedero.

Un profago se define, en forma general, como la integración del genoma viral al cromosoma bacteriano. Este evento requiere de la proteína integrasa, de origen viral, que permitan el reconocimiento de dos sitios específicos de unión en ambos genomas (Gingery, 1967), además de algunos factores celulares como IHF, esenciales para la eficiente integración (Gardner, 1986; Thompson, 1986). Sin embargo, existen excepciones, como con el fago Mu, que posee la capacidad de integrar su genoma en múltiples sitios del cromosoma (Bukhari, 1976).



**Figura 1. Ciclos de la propagación de los bacteriófagos.** lítico (izquierda) y lisogénico (derecha). 1 – El fago se une a la célula hospedera e inyecta su material genético; 2 – El material genético del fago entra al ciclo lítico o lisogénico; 3<sup>a</sup> - Nuevo material genético y proteínas son sintetizadas, los nuevos viriones son ensamblados; 4<sup>a</sup> – La célula es lisada y se liberan los viriones; 3b y 4b – pasos del ciclo lisogénico: integración del genoma del fago al cromosoma bacteriano (origen del profago) y puede ser transferido con la división normal



de la bacteria; 5 – Debido a ciertas condiciones el profago es escindido del cromosoma bacteriano e inicia el ciclo lítico. Esquema tomado de Orlova, 2012.

### **1.3. Infección y reconocimiento del hospedero**

Previo a la entrada del material genético del virus a la célula, es requerido un reconocimiento específico del virus y de la superficie de la bacteria. La interacción puede ser llevada entre estructuras proteicas del fago y receptores específicos de membrana externa y/o polisacáridos, u otras estructuras, proceso conocido como adsorción (Bertozi, 2016).

El proceso de adsorción consta de dos tipos de interacciones, la primera es de manera rápida y reversible (Puck, 1951), y la segunda es electrostática e irreversible (Garen, 1951). El primer evento es causado por un reconocimiento rápido de la membrana externa y una fijación preliminar del virus, a través de enlaces electrostáticos débiles, lo cual, a su vez permite una posterior “búsqueda” de un receptor específico con mayor afinidad, con el cual formar interacciones mucho más fuertes; iónicas y polares (Rakhuba, 2010)

Así, posterior al reconocimiento del receptor principal se efectúa la eyección del material genético. El mecanismo por el cual los bacteriófagos logran trasladar su genoma, desde la membrana hacia citoplasma, varía según la especie (Letellier, 2004), algunos llevan a cabo movimientos contráctiles de su tallo, como es el caso del mio-fago T4 (Taylor, 2018), otros transportan proteínas propias, como el podo-fago T7, las cuales son utilizadas en la formación de canales específicos, y los sifo-fagos como el caso del fago  $\lambda$  que además, de requerir de un receptor de membrana externa, requieren de receptores de membrana interna.

#### **1.3.1. Exclusión a la super infección**

En la mayoría de las ocasiones el receptor fundamental para la eyección del genoma viral también es el de la absorción de nutrientes (Lenski, 1988; Killmann, 1995). Así, la resistencia a la adsorción también supone ciertas limitaciones tanto en sus funciones, como en la virulencia (León, 2015) o en la competencia por nichos ecológicos en comunidades bacterianas (Bohannan, 2002). Es importante hacer



notar que las mutaciones o alteraciones en la composición estructural de las proteínas de membrana externa no son las únicas formas de evadir una infección viral, otro mecanismo por el cual se puede evitar la entrada del material genético es a través del sistema de exclusión a la superinfección (Sie) (Labrie, 2010).

Este sistema se encuentra constituido por proteínas que se expresan del genoma del fago o profago, que se encuentre hospedando en la bacteria, aunque usualmente se presente en los virus temperados, también se han encontrado estos genes en organismos líticos (Emrich, 1968; Vallée & Cornett, 1972). La traducción de estos genes y el posterior transporte de la proteína hacia las membranas puede impedir el ingreso del material genético de otros virus hacia el citoplasma bacteriano (pudiendo evitar la infección de fagos del mismo tipo o especie) (Lu, 1994), o incluso, inhibir la infección de fagos que no se encuentren emparentados (McGrath, 2002; Carballo-Ontiveros, 2020), lo que permite inferir que, aun perteneciendo a diferentes grupos, utilizan sistemas equivalentes o similares para obstruir la introducción de genomas.

Existen diversos estudios de lipoproteínas expresadas por profagos, en donde los péptidos codificados presentan secuencias señal que las distinguen y permiten que sean modificadas y procesadas por moléculas de la bacteria (von Heine, 1989). Se hipotetiza que se lleva a cabo la maduración y el anclaje en las membranas celulares, de una manera homóloga, entre las lipoproteínas celulares y las proteínas sintetizadas a partir del genoma de un bacteriófago. De manera concisa: la presencia de la secuencia “lipobox” permite que sea reconocida por dos enzimas lípido-modificadoras. La secuencia suele estar compuesta por una serie de aminoácidos conservados entre especies: ([**L**/**V**/I][**A**/**S**/**T**/**V**/I][**G**/**A**/**S**]**C**). Esta señal junto con la porción N-terminal hidrófoba resultan importantes para que el péptido sea transferido a través de la membrana citoplasmática, por los translocos Sec o Tat, donde inicialmente, al encontrarse del lado del periplasma, se adiciona un diacilglicerol al grupo sulfhidrilo de la Cisteína por la enzima Lgt (fosfatidilglicerol/prolipoproteína diacilglicerol transferasa). Posteriormente, se lleva a cabo una escisión en la porción N-terminal, la cual es realizada por una peptidasa



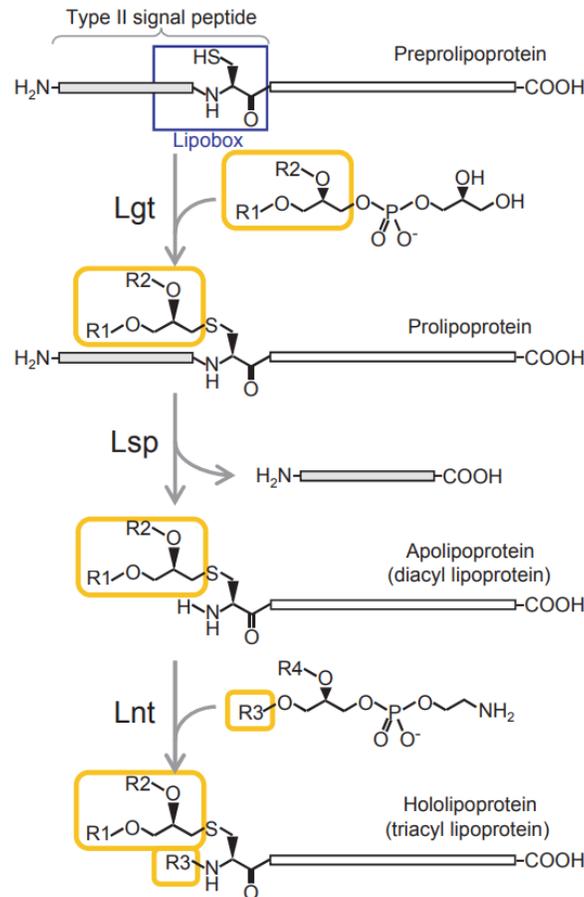
presente en el periplasma (Lsp, prolipoproteína peptidasa señal). Este evento distingue entre una proteína inmadura (prelipoproteína) y una lipoproteína madura (apolipoproteína) (Braun, 2019). Además, la presencia en el extremo amino terminal, del residuo de Cisteína (lípidomodificada) permite que la proteína sea anclada en la membrana celular, donde puede llevar a cabo roles importantes en la fisiología y virulencia bacteriana, incluyendo absorción de nutrientes, división celular y resistencia a antibióticos (Nakayama, 2012). Mientras que en bacterias Gram negativas permiten la activación de la respuesta del sistema inmune innato a través de diversos receptores “Toll-like 2” (TLR)2, dependiendo del grado de acilación de las lipoproteínas, y señales TLR que contribuyen al establecimiento de la inmunidad adaptativa, lo cual es generado a través de una cascada de señalización mediada por eventos de fosforilación que terminan en la activación del factor nuclear Nf- $\kappa$ B (Nguyen, 2016).

Finalmente, un ácido graso es transferido a partir de un fosfolípido disponible en membrana, hacia el grupo amino del residuo de Cisteína, por la enzima Lnt (fosfolípido/apolipoproteína tansacilasa), lo cual concluye en la generación de una lipoproteína madura tri-acilada, como se describe en la Figura 2. A partir de este punto y dependiendo del tipo de péptido señal, que se encuentra determinado por el aminoácido posterior (+2) a la Cisteína (+1), la lipoproteína puede permanecer anclada en membrana interna, donde lleva a cabo su función, como es el caso en el que la lipoproteína si cuenta con un residuo de Asparagina (+2) (Yamaguchi, 1988; Okuda, 2011), esta señal ocasiona que la lipoproteína sea retenida en membrana interna y es conocida como señal de anulación del sistema Lol (regla +2), y de igual manera, funge como una señal de diferenciación entre lipoproteínas de membrana interna y de membrana externa.

Por otra parte, y como sucede en la mayoría de las lipoproteínas de *E. coli*, estas pueden ser translocadas hacia membrana externa, esto sucede debido a la extracción de membrana interna por el complejo tipo ABC: LolCDE. Este sistema permite la liberación de las proteínas hacia el periplasma en forma de un complejo soluble al formar una unión con la chaperona LolA, este paso requiere de la hidrólisis



de ATP, lo cual es realizado por la ATPasa LolD (Yakushi, 200). Posteriormente, LolA dirige la lipoproteína hacia la proteína aceptora LolB (estructuralmente homóloga a LolA), que se encuentra embebida en la membrana externa y cuenta con una mayor afinidad con las lipoproteínas que LolA. Por último, LolB libera las lipoproteínas destinadas a membrana externa finalizando así su transporte (Konovalova, 2015).



**Figura 2. Ruta canónica de la biosíntesis de lipoproteínas bacterianas.** Posterior a la translocación por la maquinaria Sec o Tat, la primera enzima Lgt transfiere un diacilglicerol a partir de un fosfolípido de membrana, hacia el grupo sulfhidrilo de la Cisteína +1 de la secuencia conservada *lipobox*, formando un enlace tioéster. Posteriormente Lsp escinde el péptido señal en el N-terminal de la Cisteína +1 *S-diacilglicerol* de la prolipoproteína. Finalmente, la tercera enzima, Lnt, transfiere un grupo acilo a partir de otro fosfolípido hacia el recientemente generado grupo  $\alpha$ -amino de la Cisteína *S-diacilglicerol* de la apolipoproteína, resultando en la generación de una lipoproteína madura triacilada. Tomado de Nakayama, 2012.

Estudios sobre lipoproteínas de exclusión a la superinfección son relativamente escasos. Hasta la fecha se conocen las proteínas Cor de los fagos phi80, N15,

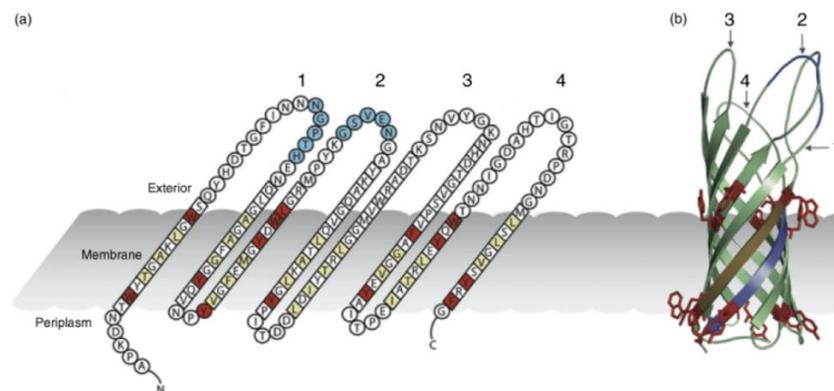


HK022, T1, T5 y mEp167, que inactivan el receptor FhuA, así como el sistema del fago TPJ-34, siendo este último, uno de los mejor estudiados (Bebeacua, 2013).

#### 1.4. Receptores de membrana

Se ha observado que el receptor primario del fago mEp021 podría tratarse de la proteína OmpA (datos no publicados), debido a la ausencia de placas de lisis en un tapiz bacteriano de la cepa mutante JW0940 (*ompA*<sup>-</sup>) perteneciente a la colección *Keio* (Baba, 2006).

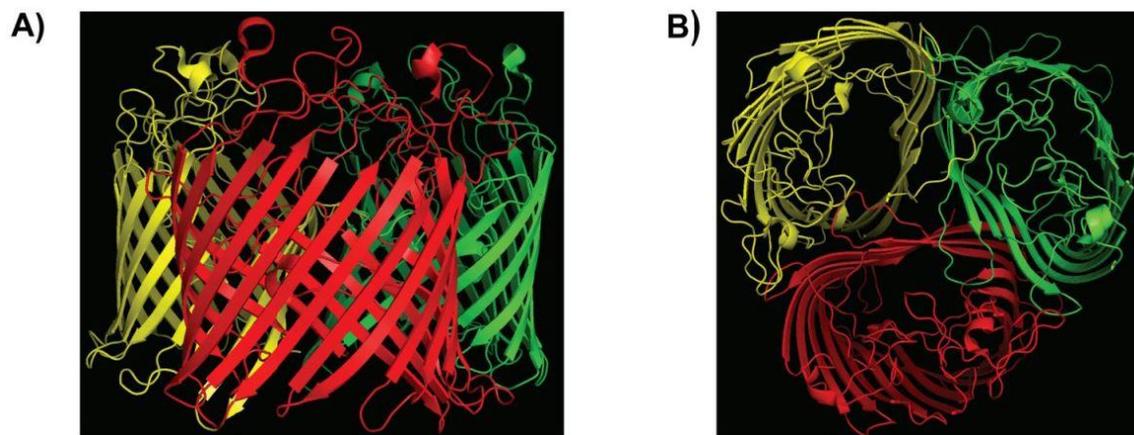
OmpA es codificada por el gen *ompA*. Esta al ser transportada hacia la membrana externa es embebida en esta y adopta una estructura tridimensional de barril  $\beta$  con 8 dominios transmembranales (Figura 3). Se ha evidenciado que las fracciones localizadas en la parte exterior de la célula son las que otorgan sus múltiples funciones, como el establecimiento de biopelículas y de adhesión (Smith, 2007). Además, se ha observado que cepas bacterianas con deleciones en el gen, presentan un fenotipo sensible al estrés (Wang, 2002), debido a que, junto con otras proteínas de membrana externa (OMP's), llevan a cabo la función de crear una barrera semipermeable y a su vez realizar funciones de transducción de señales. Por otra parte, se ha reportado que esta proteína actúa como receptor para distintos bacteriófagos (Morona, 1984).



**Figura 3. Estructura de OmpA.** (a) Modelo topológico de OmpA donde se muestran las características más destacables de la proteína. Los residuos en láminas  $\beta$  se representan en diamantes, en rojo la banda de anillos aromáticos y en amarillo residuos aromáticos. Los bucles se encuentran enumerados. (b). Estructura tridimensional de OmpA. Modificada de Smith, 2002.



Con relación al transporte de maltosa en *E. coli*, el complejo proteico de LamB, también denominado como “maltoporina”, se encuentra constituido por tres homotrimeros estructurados en forma de barriles- $\beta$  (Figura 4), los cuales permiten el transporte específico-selectivo de las moléculas. Al encontrarse situado en membrana externa tiene como función facilitar el acceso directo de los sustratos externos a la proteína de unión a maltosa (MBP por sus siglas en inglés o también conocida como MalE) ubicada en el periplasma (Martonosi, 2012). Además, mutaciones en la región *malB/lamB* del cromosoma bacteriano permitieron su reconocimiento como el receptor principal del bacteriófago  $\lambda$ , al conferir a las cepas mutantes resistencia a la infección de este bacteriófago (Chatterjee, 2012).



**Figura 4. Estructura 3D del trímero del barril de hojas  $\beta$  de LamB.** (A) Vista lateral y (B). Vista superior. Los tres monómeros se representan en diferentes colores (rojo, amarillo y verde). Modificada de Chatterjee, 2012.

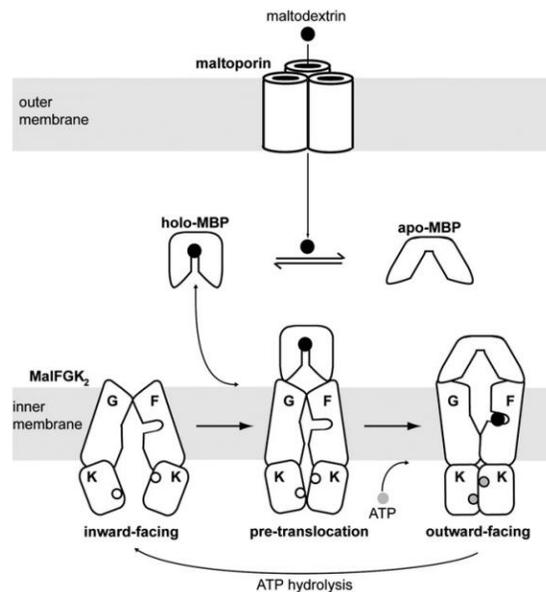
En la membrana interna se encuentra el sistema transportador de maltosa MalFGK<sub>2</sub>, el cual requiere de la hidrólisis de ATP para llevar a cabo su función. Es clasificado en la subfamilia CUT1, por las siglas en inglés “Carbohydrate Uptake Transporters”. Esta clasificación depende de la naturaleza química de los sustratos que transporta a través de la membrana (Schneider, 2001). La estructura general de este complejo proteico consiste en dos dominios transmembranales (TMDs, por sus siglas en inglés; también conocidos como MalF/MalG) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs, por sus siglas en inglés; MalK<sub>2</sub>), en este último se lleva a cabo el intercambio energético y la liberación de ADP, lo que permite una reestructuración conformacional que permite el paso de las moléculas de maltosa (Figura 5). Este



acontecimiento y los elementos involucrados han sido estudiados mediante programas computacionales de simulación (Wen, 2011).

Las moléculas que se encarga de transportar del medio externo hacia el citoplasma son maltosa y maltodextrinas, el reconocimiento específico de estos polímeros de D-glucosa es posibilitado por uno de los componentes del complejo; la proteína de unión a maltosa (MalE) (Kellermann, 1974). Interesantemente, estudios recientes reportaron que la presencia de una sola copia de MalE por complejo es suficiente para realizar sus funciones (Licht, 2019).

En síntesis, la maltosa es incorporada a la bacteria por difusión; del medio hacia el citoplasma a través de los poros de LamB en membrana externa, facilitando posteriormente la interacción sustrato-proteína entre el disacárido y MalE en el periplasma y, por consiguiente, se realiza su transporte hacia el complejo MalFGK<sub>2</sub>, ubicado en membrana interna, donde es translocada tras la hidrólisis de ATP. Este evento se encuentra representado en la Figura 5.

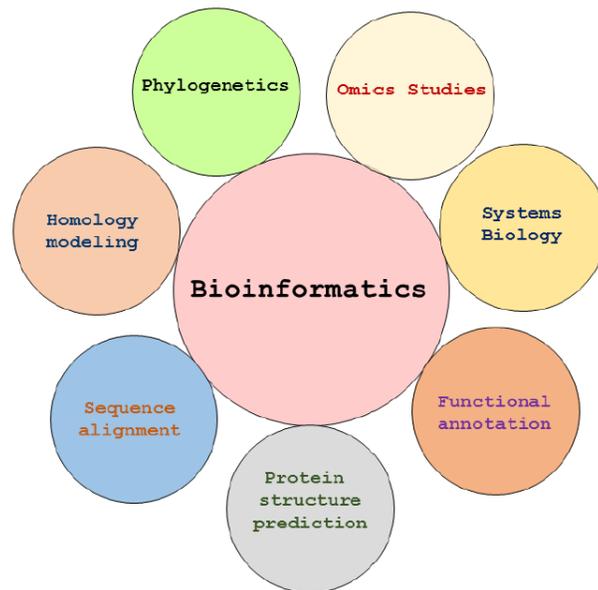


**Figura 5. Representación de los componentes del sistema transportador de maltosa.** La maltosa difunde a través de la maltoporina en membrana externa, se une a MalE/MBP en el periplasma y es transportada a través de la membrana interna hacia el citoplasma por el transportador MalFGK<sub>2</sub>. Tomada de Oldham, 2013.



## 1.5. Herramientas bioinformáticas

El avance de las herramientas tecnológicas con las que se pueden desarrollar experimentos y, a partir de estos, generar una gran cantidad de información, como lo son las técnicas de secuenciación masiva; han permitido obtener una gran cantidad de datos sobre distintos genomas, en una menor cantidad de tiempo. De modo que la bioinformática puede ser dividida en dos clases: la primera relacionada a la secuencia y la segunda relacionada a la estructura biomolecular (Figura 6).



**Figura 6. Algunas de las funciones de la bioinformática.** Tomada de Diniz, 2017

El progreso en esta área ha posibilitado la creación de programas capaces de identificar y clasificar secuencias relacionadas entre bacteriófagos, cuyos genomas poseen mosaicismo, posiblemente ocasionado por recombinación genética, y representan un desafío para su anotación en bases de datos (Cresawn, 2011). Además de, una serie de algoritmos denominados “pipelines” que permiten la anotación funcional automática de nuevos genes de aislados virales, a través de la recopilación de información de bases de datos específicas sobre proteínas de virus y fagos (Ecale, 2019).

Es por todo lo anterior que resulta importante el análisis bioinformático y la caracterización experimental a nivel molecular de la posible interacción entre la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> con las proteínas de membrana LamB, MalF y MalG, para



desempeñar el fenotipo de exclusión a la superinfección en bacterias transformadas con el plásmido pORF81.



## 2. Antecedentes

En relación con el estudio de bacteriófagos, el análisis de aislados virales procedente de materia fecal humana, permitió que se identificaran una serie de fagos, los cuales se clasificaron primeramente como “*lambdoides*”, debido a la dependencia de los factores *Nus* de antiterminación de la transcripción para su desarrollo. Además, el estudio de estos aislados permitió que se identificaran 20 grupos de inmunidad, a través de ensayos de cruza de fagos con bacterias lisógenas que otorgan inmunidad a través de sus represores CI. Interesantemente, se pudieron dividir en dos grupos, los *lambdoides* y un nuevo grupo único no-*lambdoide* (grupo I), con dependencia a los factores *Nus*, pero que a diferencia del fago  $\lambda$  tiene una baja inducción con luz UV, indicando que su represor es resistente al corte inducido por *RecA*; entre otras características, el DNA de los fagos pertenecientes al grupo I no hibridó con sondas de  $\lambda$  o  $\phi 80$ , no formaron fagos recombinantes viables con los fagos  $\lambda$ BLK20 o  $\lambda$  y no pudieron ser detectados con anticuerpos específicos para  $\lambda$  (Kameyama, 1999). Debido al interés en caracterizar estos nuevos fagos, con propiedades únicas, posteriormente se realizó una descripción detallada sobre las condiciones óptimas para su desarrollo, centrándose en la resistencia a la luz UV, proponiendo las probables razones adaptativas de esta cualidad (Kameyama, 2001).

Iniciando el estudio genético de los bacteriófagos pertenecientes al grupo de inmunidad I, el análisis del profago mEp021 permitió observar que bacterias lisogénicas producían un fenotipo de hemólisis en cultivos de agar sangre. Mediante una biblioteca genómica se determinó una secuencia de 294 pb, perteneciente al marco abierto de lectura ORF4, y que codifica para un péptido de 77 aminoácidos, a su producto se le denominó proteína Ipe. Al analizar la sobreexpresión de la proteína se observaron diversos efectos en la bacteria; muerte celular, disminución de viabilidad y crecimiento celular, así como alteraciones morfológicas (bacilos filamentosos o en aparente desecación). Además, se identificó la presencia de vesículas que contenían HlyE (hemolisina celular). Concluyendo así, que Ipe tiene un efecto desregulatorio en la expresión de diversos genes relacionados a membrana, pared celular y división (Martínez-Peñañiel, 2012). Siendo este uno de



los primeros trabajos en estudiar la conversión lisogénica ocasionada por la expresión de genes, no descritos, en mEp021.

Por otra parte, continuando con el estudio de los fagos lambdoides, se caracterizó la relación entre la lipoproteína Cor, que expresa el profago mEp167 en bacterias lisogénicas, y algunas proteínas de membrana externa en la cepa W3110. Se identificó específicamente la interacción entre la proteína Cor del fago y las proteínas OmpA, OmpC, OmpF, OmpW, LamB y Slp de la bacteria, mediante ensayos coprecipitación y de espectrometría de masas. Además, ensayos de exclusión, en cepas mutantes pertenecientes a la colección *Keio*, que contienen deleciones en los genes que codifican para estas proteínas, permitió determinar que su expresión resulta fundamental para que Cor pueda llevar a cabo su función de exclusión a la superinfección. También permitió inferir sobre su mecanismo de acción; sugiriendo que Cor pudiera no interactuar directamente con el receptor principal de mEp167 (FhuA) (Arguijo-Hernández, 2018).

Sin embargo, muchas de las propiedades moleculares, así como la función de múltiples genes y ORF's de este nuevo grupo de fagos permanecen indeterminadas. En un esfuerzo por caracterizar su posible función de exclusión a la superinfección, se realizó el análisis *in silico* de un marco abierto de lectura (ORF81) presente en el bacteriófago mEp021. Esto permitió identificar (a partir de la clonación y su posterior expresión, en un vector de clonación (pORF81)) que su producto confería la capacidad de excluir la infección de partículas virales de la misma especie, debido a que ensayos de infección/exclusión mostraron que bacterias *E. coli* W3110 que expresan la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> excluyen la infección del fago mEp021, al no encontrarse placas de lisis, la presencia de la lipoproteína fue corroborada por ensayos de Western-blot. Además, se identificaron tres mutantes de interés. Estas bacterias contienen deleciones en los genes que codifican para proteínas de membrana; JW3993 (*malG*), JW3992 (*malF*) y W3996 (*lamB*), las cuales a pesar de ser transformadas con el plásmido pORF81, el fago mEp021 tiene la capacidad de infectar a estas bacterias (Martínez-Soto, 2018). Lo que sugiere que el



mecanismo de función de Lpp<sup>mEp021</sup> requiere de la presencia de las proteínas LamB, MalF y MalG, posiblemente a través de una interacción directa.



### 3. Justificación

El bacteriófago mEp021 al ser una entidad viral de reciente descubrimiento, muchas de las características que lo distingue del fago  $\lambda$  permanecen indefinidas o son poco entendidas. Además, posee genes y proteínas que no han sido reportadas previamente. Por lo que la dilucidación y caracterización de funciones que desempeñan la expresión de genes, o conjunto de genes, del profago en la bacteria, resulta medular para el entendimiento del rol que desempeña en su ambiente ecológico. De igual manera, debido al origen de las muestras, es interesante en un futuro poder entender la función que desempeñan estas entidades virales en el microbioma intestinal humano (Kameyama, 2001). El descubrir y descifrar novedosos mecanismos por los cuales un profago puede impedir la lisis de la bacteria lisogénica por diferentes fagos, además de aportar al conocimiento científico, también puede conducir al desarrollo en el campo de la biotecnología.

En este sentido, un mejor entendimiento de las relaciones fago-bacteria-hospedero humano, así como las presiones evolutivas que se ejercen recíprocamente, podrían generar propuestas cada vez más robustas, específicamente en la fagoterapia, cuyos avances cada día resultan más prometedores (Kakasis, 2019).

Aunado a esto, el número de especies y casos reportados sobre infecciones por bacterias multirresistentes a antibióticos, se incrementan día a día de una manera alarmante, por causas muy variables (van der Bij, 2012; Ouyang, 2015; Czekalski, 2012; MacFadden, 2018), representando una amenaza para los pacientes, al sistema de salud y a la sociedad (WHO, 2014; Friedman, 2015). Lo cual ha permitido reorientar su importancia e interés en tratamientos alternativos.

No obstante, con el fin de minimizar los riesgos, es necesario establecer requerimientos de calidad y seguridad, además de una mayor investigación (Pirmary, 2015). Existen múltiples retos biotecnológicos que deben ser considerados, como la caracterización detallada de nuevas entidades (Skurnik, 2007). En acuerdo con Nobrega, *et al* (2015) “se espera que, con la identificación de más fagos, la aplicación de la terapia con fagos tenga éxito”.



Es por todo esto que la comprensión de los mecanismos de exclusión a la superinfección y la investigación sobre las cualidades que confiere la incorporación de un profago, son aportes esenciales en el desarrollo de intelecto y nuevas ideas que permitan, eventualmente, la incorporación de un tratamiento, adecuadamente fundamentado y concreto, para solucionar los desafíos que se presentan actualmente (Furfaro, 2018). Además de contribuir con la resolución de una emergencia sanitaria actual de gran importancia (Pachori, 2019).



#### 4. Hipótesis

La interacción entre la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> con el receptor LamB de membrana externa y las subunidades MalF y MalG del complejo transportador de maltosa (MalFGK<sub>2</sub>), permite que se lleve a cabo la exclusión a la superinfección de fagos OmpA dependientes, probablemente inhibiendo la entrada del DNA en la bacteria.

#### 5. Objetivos

##### 5.1. General

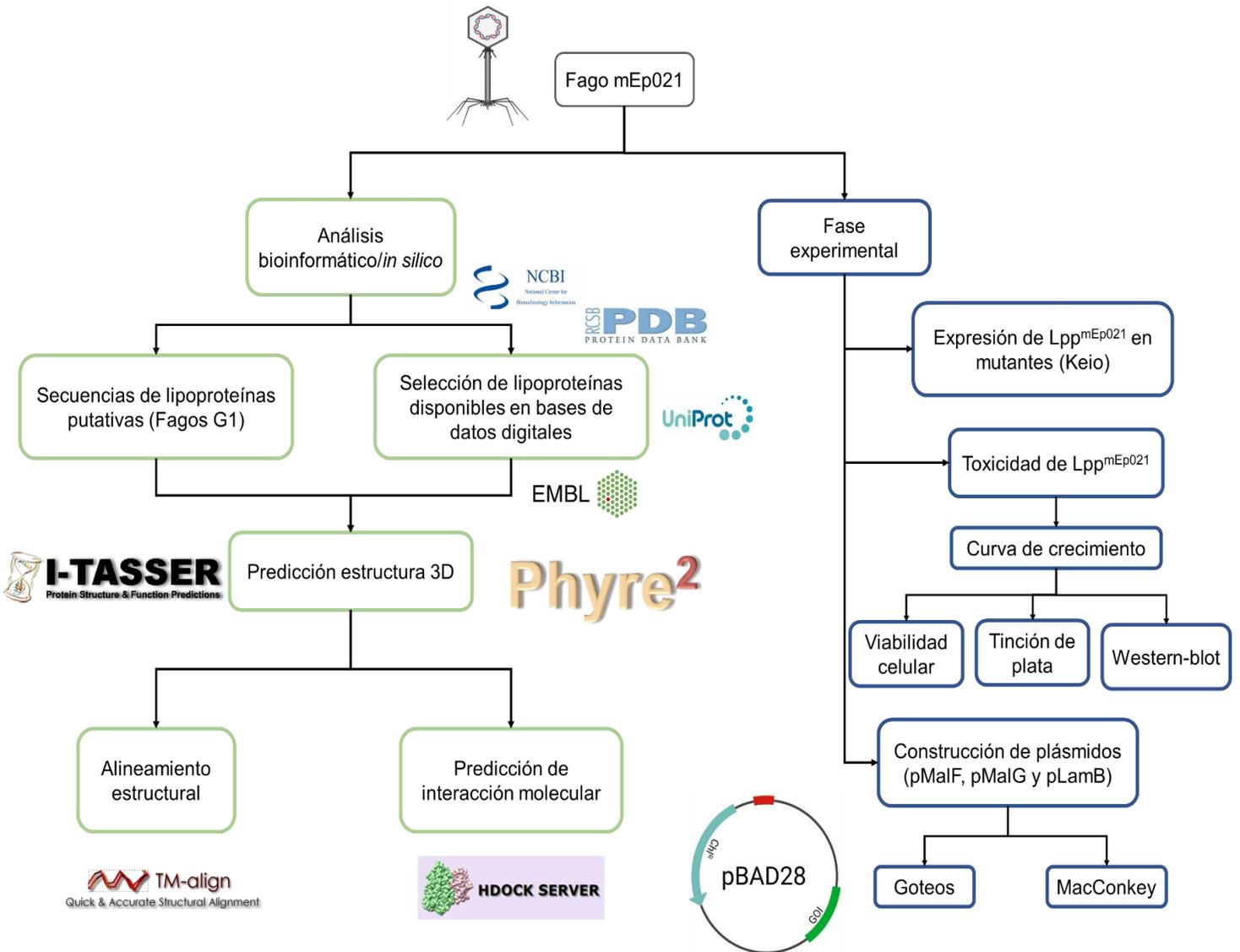
- Obtención de evidencias de la naturaleza de la interacción entre la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> y las proteínas de membrana LamB/MalF-MalG de *E. coli*

##### 5.2. Particulares

- Analizar las características generales de Lpp<sup>mEp021</sup> mediante herramientas bioinformáticas
- Estudiar el fenotipo de exclusión de mEp021 por Lpp<sup>mEp021</sup> en distintas cepas mutantes pertenecientes a la colección Keio
- Identificar la localización física de Lpp<sup>mEp021</sup> en la bacteria, así como la toxicidad de su expresión
- Realizar la construcción de plásmidos complementarios a las cepas mutantes Keio (*malG*, *malF* y *lamB*)
- Comprobar con ensayos de complementación la funcionalidad de cada uno de los genes
- Realizar los ensayos de infección con mEp021 en sus diversas facetas.



## 6. Esquema general de trabajo





## 7. Metodología

### 7.1. Análisis bioinformático de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>

Inicialmente se identificaron las secuencias homólogas correspondientes al ORF81 (lipoproteínas putativas) de las secuencias disponibles otorgadas por el M. en C. Jairo (Hurtado, 2020), con el software computacional Artemis (Carver, 2012) (Sanger institute, disponible en: <https://www.sanger.ac.uk/tool/artemis/>) y se anotaron manualmente de forma digital en formato FASTA en un block de notas. Posteriormente, se realizó un BLAST de la secuencia nucleotídica y BLASTp de la secuencia aminoacídica de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> para identificar proteínas disponibles en las bases de datos, del servidor NCBI, que tuviesen un porcentaje de identidad mayor al 70% y un *E-value* considerado como significativo, además se seleccionaron lipoproteínas virales con estudios de su función en exclusión a la superinfección; Cor de los fagos lambdoides Φ80, HK022 N15, Llp del fago T5, Ltp del fago TP-J34, entre otras.

Una vez seleccionadas las lipoproteínas con mayor similitud a Lpp<sup>mEp021</sup>, se realizaron alineamientos (de aminoácidos y de nucleótidos), utilizando el servidor de Clustal Ω (disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y los softwares computacionales SeaView (v 4.7) y ClustalX (v 2.1) para observar grados de identidad y homología. A partir de los alineamientos se obtuvieron árboles filogenéticos tanto del servidor de Clustal Ω como a partir del software Mega 11 (Tamura, 2021).

Como parte del estudio de las posibles funciones y localización de Lpp<sup>mEp021</sup>, se realizó una búsqueda de dominios conservados a través del servidor InterproScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). Además, se realizó la predicción de los modelos tridimensionales de las lipoproteínas putativas de los fagos: mEp010, mEp013, mEp021, mEp044, mEp167 y mEp554, en su configuración de prelipoproteína y apolipoproteína, asimismo se obtuvieron los modelos de las lipoproteínas de exclusión a la superinfección de los fagos: HK022, N15, Φ80, Rtp, SH6, TP-J34, T1 y T5. Todos los modelos fueron obtenidos a través de los



servidores disponibles en la red; I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) y PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

A partir de los modelos tridimensionales correspondientes a las apolipoproteínas se realizaron alineamientos estructurales por medio del servidor TM-align (<https://zhanggroup.org/TM-align/>) y el software PyMOL2, se obtuvieron valores promedio de RMSD's (raíz media cuadrática) y se generó una matriz de identidad. Además, se realizaron ensayos de interacción proteína-proteína en el servidor digital HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>), esta plataforma utiliza modelos en formato PDB y se ingresaron los archivos correspondientes al "modelo 1" obtenidos a partir del servidor de I-TASSER, previamente mencionado, mientras que las estructuras proteicas del complejo MalFGK<sub>2</sub> y la maltoporina (LamB) fueron obtenidos a partir de la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>). Esto se llevó a cabo como una forma preliminar de identificación de posibles regiones de "docking" molecular y los aminoácidos o estructuras necesarias.

## **7.2. Bacteria, bacteriófagos, plásmidos y medios de cultivo**

Las características relevantes de las cepas bacterianas, plásmidos y del bacteriófago mEp021 se muestran en la Tabla 1. La cepa W3110 se empleó para la propagación de los bacteriófagos. La cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se utilizó para la transformación y selección de plásmidos recombinantes de las construcciones generadas. Mientras que BW25113 y las cepas pertenecientes a la colección de Keio fueron utilizadas para ensayos de exclusión y de incorporación de maltosa. Los bacteriófagos que se utilizaron en este estudio son derivados de mEp y pertenecen a la colección del laboratorio descritos en Kameyama *et al* (1999). Los fagos  $\lambda$  y mEp167 se usaron como controles de infección. Se prepararon los medios Luria-Bertani (LB), T $\Phi$  suave, para el cultivo de las diferentes cepas utilizadas en este estudio, y medio de disolución TMG según lo reportado previamente (Silhavy, 1984). Todos los medios fueron suplementados con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (Amp), 50  $\mu$ g/mL kanamicina (Km), 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol (Chl) o 0.1 mM de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido), en caso de ser requerido y se incubaron a 37°C durante toda la noche (O/N) en agitación (180 rpm).



**Tabla 1**

**Bacteria, bacteriófagos y plásmidos**

Cepas, bacteriófagos y plásmidos	Genotipo/marcadores relevantes	Fuente/referencia
<b>Bacteria</b>		
W3110	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>rph</i>	(Jensen, 1993)
DH5α	<i>supE44 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
BW25113	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> Δ( <i>araD-araB</i> )567 Δ <i>lacZ</i> 4787 (::: <i>rrnB</i> -3) <i>rph-1</i> Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568 <i>hsdR</i> 514	(Baba, 2006)
JW0940 ( <i>ompA</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>ompA</i> 772::kan	Colección Keio
JW0146 ( <i>fhuA</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>fhuA</i> 766::kan	Colección Keio
JW3996 ( <i>lamB</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>lamB</i> 732::kan	Colección Keio
JW3993 ( <i>malF</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>malF</i> 729::kan	Colección Keio
JW3995 ( <i>malK</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>malK</i> 731::kan	Colección Keio
JW3992 ( <i>malG</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>malG</i> 728::kan	Colección Keio
JW2205 ( <i>ompC</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>ompC</i> 768::kan	Colección Keio
JW0912 ( <i>ompF</i> <sup>-</sup> )	BW25113 Δ <i>ompF</i> 746::kan	Colección Keio
W3110 ( <i>OmpA</i> <sup>-</sup> )	F - λ - <i>rph</i> - Δ <i>ompA</i> ::kan	(Martínez, 2018)
<b>Plásmidos</b>		
pKQV4	Vector de bajo número de copias, Amp <sup>R</sup>	(Strauch, 1989)
pORF81	pKQV4 incluyendo Lpp <sup>mEp021</sup>	(Martínez, 2018)
pORF81 <sup>6xHis</sup>	pKQV4 con inserto de Lpp <sup>mEp021</sup> y tag de histidinas (6x) en C-terminal	(Martínez, 2018)
pORF81 W71C	Lpp <sup>mEp021</sup> -6xHis con mutación en el triptófano 71	(Martínez-Soto, 2018)
pORF81-mCherry	Lpp <sup>mEp021</sup> con la inserción correspondiente a la proteína fluorescente mCherry	(Martínez-Soto, 2018)
pBAD28	Vector promotor arabinosa Chl <sup>R</sup> Cat <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	(Chang, 1978)
pMalG	pBAD28 <i>malG</i> ΔAmp <sup>R</sup>	Este trabajo
pLamB	pBAD28 <i>lamB</i> ΔAmp <sup>R</sup>	Este trabajo
pMalF	pBAD28 <i>malF</i> ΔAmp <sup>R</sup>	Este trabajo
<b>Bacteriófagos</b>		
λ	<i>inm</i> <sub>λ</sub>	Colección CHS*
mEp021	<i>Inm</i> <sub>I</sub>	(Kameyama, 1999)
mEp167	<i>Inm</i> <sub>VI</sub>	(Kameyama, 1999)

\*Cold Spring Harbor

### 7.3. Purificación de bacteriófagos

Para la purificación de los bacteriófagos, se pusieron 10 µl de un stock de lisado de mEp021 (1x10<sup>-10</sup>), en una caja de TΦ sólida, se inclinó la caja para deslizar y extender las gotas y se dejó bajo mechero hasta secar la gota. Posteriormente se



adicionaron 400  $\mu$ l, de un cultivo O/N de la cepa W3110, en un tubo y se mezcló por vortex con 4 mL de T $\Phi$  suave, previamente fundido ( $\sim$ 40°C) y se vertió en la caja de T $\Phi$  sólido, se dejó incubar toda la noche a 37°C, y de las placas aisladas se tomó una, repetir el proceso, al menos dos veces más.

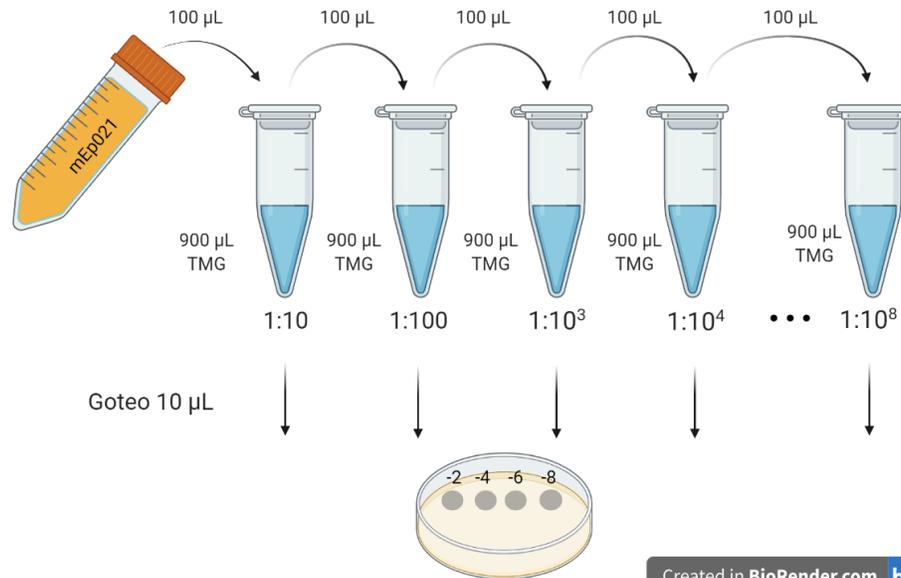
#### 7.4. Obtención de lisados de fagos

Se infectaron 0.3 mL de un cultivo O/N de la cepa W3110 con 1  $\mu$ L de un stock de fagos y se le adicionó MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> a una concentración final de 10 mM. Se permitió la adsorción del fago incubando a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo durante 10-15 minutos, posteriormente se agregaron 15 mL de caldo LB. Los cultivos fueron incubados a 37°C en un mezclador rotatorio a 200 rpm hasta que se observó lisis celular (aproximadamente 7 horas). Posteriormente se adicionó 1 mL de cloroformo y se incubó en agitación 10 minutos, después se centrifugó a 6,000 g durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo Falcón de 15 mL, se procedió a calcular el título viral y los lisados fueron almacenados en refrigeración a 4°C.

#### 7.5. Titulación de bacteriófagos

A partir de los stocks obtenidos previamente, se realizaron diluciones seriadas en medio TMG ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ) con un factor de dilución 1:100. En 900  $\mu$ L de TMG se adicionaron 100  $\mu$ L de lisado del fago de interés, tomando a partir de la dilución inicial las alícuotas para las siguientes. Se tomaron 10  $\mu$ L de cada dilución y se gotearon en un tapiz de W3110, se dejaron secar las gotas bajo mechero y se incubó la caja a 37°C toda la noche. Al siguiente día se calculó el título viral con la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas} \frac{UFP}{ml} = \frac{\# \text{ de placas}}{\text{Dilución de la gota}} \times \frac{1000}{\text{Volumen de la gota en } \mu\text{L}}$$



**Figura 7. Procedimiento de las diluciones de un lisado de bacteriófagos.**

### 7.6. Extracción de DNA viral mediante el protocolo de DEAE-celulosa

Con la finalidad de averiguar que el objeto de estudio (bacteriófago mEp021) no estuviese modificado y descartar que las muestras de trabajo se encontraran contaminadas con la presencia de otros bacteriófagos indeseados, se decidió realizar ensayos de restricción del DNA genómico viral. Para esto se llevó a cabo la extracción de DNA, y se realizó tomando 1 mL de un lisado del bacteriófago, el cual se mezcló con 600 µL de DEAE-celulosa (ver Apéndice). La mezcla se agitó por inversión 15 veces, posteriormente se centrifugó a 12,000 x g durante 15 minutos a 4°C para separar la DEAE-celulosa. Se recuperó el sobrenadante y se repitió este procedimiento para eliminar los residuos de celulosa y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. Se tomaron 800 µL del sobrenadante y se adicionaron 100 µL de NaCl 5 M y 540 µL de isopropanol. Posteriormente la mezcla se incubó durante 20 minutos a -20°C. Pasados los 20 minutos se centrifugó la mezcla a 12,000 x g y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 200 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Se adicionaron 200 µL de fenol y se mezcló brevemente en vortex, la mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos y se recuperó la fase acuosa, en donde se encuentra el DNA del fago. Después se adicionaron 15 µL de NaCl 5 M y dos volúmenes de etanol al 95% para precipitar la muestra, la cual se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a máxima



velocidad por otros 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla bajo mechero hasta que el etanol restante fuese evaporado. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 µL de TE y se almaceno en congelación a -20°C hasta su posterior empleo en los ensayos pertinentes.

### 7.7. Ensayo de restricción del DNA de mEp021

Se tomaron 10 µL (~1 µg) de la extracción de DNA del fago y se adicionaron 10 U de la enzima NdeI (New England Biolabs) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente la reacción total fue cargada en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 80 V durante 1 hora y 20 minutos, se tomó registro fotográfico y el patrón de restricción fue comparado con el patrón obtenido *in silico* en la plata de Molbiotools (<https://molbiotools.com/restrictionanalyzer.php>). Los componentes y volúmenes de la reacción se encuentran listados en la Tabla 2.

Componentes de la reacción de restricción del genoma del bacteriófago mEp021:

Componente	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	14
Buffer	2.5
NdeI (10 U)	0.5
DNA mEp021	8
Volumen final	25

### 7.8. Preparación de bacterias quimiocompetentes

Para este fin se prepararon bacterias quimiocompetentes; a partir de cultivos O/N se tomaron alícuotas de 1 mL y se inocularon 50 mL de medio LB, el cual se dejó en agitación a 37°C hasta alcanzar una O.D.<sub>600nm</sub> 0.5-0.7 (~2 horas). Una vez alcanzada la O.D. deseada se incubó en hielo durante 20 minutos. De aquí en adelante, todo el procedimiento se realizó en frío (4°C). Se obtuvo el pellet por centrifugación a 5,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se homogeneizó con 15 mL de la solución TfbI, se mantuvo en hielo durante 15 minutos. Posterior a este tiempo, se centrifugó nuevamente a 5,000 x g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y, sin retirar el pellet del hielo, se



homogeneizó el nuevo pellet con 1.5 mL de solución TfbII. Se incubó en hielo durante 15 minutos y posteriormente se realizaron alícuotas y en caso de ser requerido se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  o se emplearon en el momento.

### **7.9. Transformación de bacterias quimiocompetentes por choque térmico**

Las bacterias quimiocompetentes obtenidas por el procedimiento desarrollado previamente se utilizaron para transformar los plásmidos de la colección del M. en C. Martínez-Soto, así como para las reacciones de ligación que serán presentadas más adelante.

Se tomaron alícuotas de 80  $\mu\text{L}$  de bacteria las cuales fueron transferidas a un nuevo tubo de centrifuga (capacidad de 1.5 mL) estéril. Se agregaron, según fuesen requeridos, 1.5  $\mu\text{L}$  de los plásmidos a analizar o 10  $\mu\text{L}$  de la muestra de ligación y se agitaron manualmente con suavidad. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y posteriormente se le dio un choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos en el thermoblock a cada suspensión e inmediatamente se incubó en hielo durante 2 min. A cada tubo se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de medio LB y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora en agitación. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a máxima velocidad durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 70  $\mu\text{L}$  de medio LB estéril. Finalmente, los 70  $\mu\text{L}$  fueron goteados y plaqueados sobre medio LB con el antibiótico requerido para su selección y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche. Las candidatas obtenidas se sembraron al menos 2 veces más antes de ser utilizadas en los ensayos.

### **7.10. Diferentes ensayos de infección/exclusión para mEp021**

Para los ensayos de infección/exclusión se requirieron una suspensión de bacteriófagos y bacterias de cultivos recientes de acuerdo con lo descrito por Kameyama *et al.*, 1999. A partir de cultivos O/N de bacterias *E. coli* W3110 y de las cepas Keio (*malF*<sup>-</sup>, *malG*<sup>-</sup>, *malk*<sup>-</sup>, *lamB*<sup>-</sup>, *ompC*<sup>-</sup>, *ompF*<sup>-</sup> y *fhuA*<sup>-</sup>) transformadas con los plásmidos pKQV4, pORF81, pORF81-6xHis y pORF81-6xHisW71C, así como las cepas mutantes complementadas *MalG*<sup>-</sup>/pMalG, *MalF*<sup>-</sup>/pMalF y *LamB*<sup>-</sup>/pLamB, se realizaron tapices sin inductor (IPTG 0 mM) y con inductor (IPTG 0.1 mM). Se



tomaron 400  $\mu\text{L}$  del cultivo O/N y se les adicionó el antibiótico requerido, posteriormente se mezclaron con 4 mL de T $\Phi$  suave, previamente fundido. Se mezcló con vortex y se vertió en cajas de T $\Phi$  sólido (ver apéndice), se dejó a temperatura de mesa de trabajo hasta que solidificaran totalmente. Por otra parte, se realizaron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$ ) de los fagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ , a partir de *stocks* de  $\sim 10^{10}$  UFP/mL, los dos últimos fagos fueron utilizados como controles de infección. Se gotearon 5  $\mu\text{L}$  de cada dilución. Las gotas fueron secadas completamente bajo mechero y las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

#### **7.11. Ensayo de toxicidad por la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en la viabilidad celular**

A partir de cultivos O/N de *E. coli* W3110, W3110/pKQV4, W3110/pORF81 y W3110/pOR81-6xHis, a los cuales se les cuantificó la O.D.<sub>600nm</sub>, se realizaron diluciones para ajustar cada cultivo a una O.D.<sub>600nm</sub> de 0.3 en 8 mL de medio LB. Se tomaron las mismas concentraciones necesarias para cada cultivo y se realizaron duplicados, el primero se tomó como control de crecimiento debido a que no se le adicionó IPTG, mientras que al segundo se le agregaron 0.8  $\mu\text{L}$  de IPTG 1 M, para una concentración final de 0.1 mM. Cada tubo fue incubado en agitación a 37°C durante 4 horas. Se tomaron muestras a los tiempos: 30 min, 1 h, 2 h y 4 h, se registró la O.D.<sub>600nm</sub> de cada tubo, para el desarrollo de la curva de crecimiento, y se tomaron dos alícuotas de cada cepa evaluada. La primer alícuota fue utilizada para realizar diluciones seriadas, las diluciones se realizaron en solución de NaCl 0.18 M y se mantuvieron en hielo hasta ser goteadas en cajas de medio LB o complementado con Ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en los casos requeridos, las cajas se incubaron toda la noche a 37°C y al día siguiente se realizó un conteo y registro del número de colonias, así como las diluciones en las que se pudiese realizar la cuantificación de colonias aisladas. La segunda alícuota fue llevada a una O.D.<sub>600nm</sub> = 0.3 en 1 mL de medio LB y se utilizó para realizar la extracción de proteína, fraccionamiento celular y los geles de proteínas. El ensayo se realizó por triplicado en cada una de las cepas y por concentración de IPTG.



## 7.12. Fraccionamiento celular y detección de lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>

### 7.12.1. Extracción de proteínas y fraccionamiento celular

Para la inducción de Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis, los cultivos fueron incubados en medio LB adicionado con 100 µg/mL de Amp. El cultivo O/N fue diluido 1/100 con caldo LB adicionado con Amp, y se cultivó hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.3 en 1 mL, posteriormente se adicionó 0.1 mM de IPTG para la inducción de la lipoproteína. Las muestras se incubaron en agitación a 37°C y se tomaron muestras a los tiempos: 30 min, 1 h, 2 h y 4 h. Se centrifugaron las alícuotas a 13,500 x g durante 15 minutos a 4°C, se trató el precipitado con 300 µL buffer de lisis (compuesto por Tris-HCl, Glicerol y Lisozima) y se incubó durante 30 minutos en hielo (Aono, 1998), para disolver las envolturas celulares. Se realizó una segunda centrifugación y se tomó el sobrenadante como la fracción soluble y el nuevo precipitado como la fracción insoluble, el pellet fue resuspendido en 50 µL de H<sub>2</sub>O inyectable.

La extracción proteica se realizó adicionando 10 µL de buffer de carga 4x (Laemmli) (Arguijo-Hernández, 2018) a 40 µL de cada fracción celular, cada tubo fue colocado en ebullición por 10 minutos para disgregar las proteínas, después se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se cargaron 20 µL de las muestras en un gel de bis-acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 16% (Apéndice) y se corrió durante 6 horas a 60 V.

### 7.12.2. Preparación de gel de proteínas

El gel se preparó al 16%. El gel separador fue realizado a dos concentraciones; de 16% y 10%, el gel concentrador a 4%. Los volúmenes utilizados para cada gel se muestran a continuación:

	16% (Gel separador)	10%	4% (Gel concentrador)
AB-6 (Bis-acrilamida)	3.33 mL	600 µL	500 µL
Buffer gel 3X	3.33 mL	1 mL	1.5 mL
APS	33.3 µL	15 µL	43 µL
TeMED	3 µL	1.5 µL	5 µL
H <sub>2</sub> O	3.30 mL	1.383 mL	4 mL



Los geles fueron cargados en la base, se dejaron polimerizar y posteriormente se cargaron 20  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 5  $\mu\text{L}$  del marcador (Precision Plus Protein Dual Xtra Standard Bio-Rad), se corrió a 80 V por 6 horas.

### **7.12.3. Tinción de plata**

La tinción de plata se realizó de acuerdo con el protocolo Silver Stain Plus de BioRad. Posterior a que se corrieran las muestras se realizaron tres lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, después se prepararon 100 mL de la solución fijadora (Apéndice) y se colocó junto al gel en un recipiente de vidrio, la mezcla se dejó en agitación durante 20 minutos. Posteriormente, se desechó la solución y se lavó el gel con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada por 10 minutos 3 veces. Se agregaron 15 mL de la solución de tinción (Apéndice) y se agitó manualmente (~20-35 minutos), hasta observar las bandas de proteínas. La tinción se detuvo con una solución de ácido acético al 5%.

### **7.12.4. Western-blot**

Inicialmente se llevó a cabo la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa, esto se realizó mediante la técnica de transferencia en cámara húmeda, para esto se hizo un acomodo específico de los materiales necesarios, similar a la de un sándwich; la esponja, el papel filtro y la membrana fueron humedecidos con buffer de tanque (Tris-Glicina 20% metanol, 0.1% de SDS). La membrana se coloca junto al gel SDS y se dispone en dirección al cátodo de la cámara de transferencia, la reacción se llevó a cabo a 60 V por 1 hora, se adicionó un fragmento de hielo a la cámara de transferencia para evitar sobrecalentamiento.

Transcurrido el tiempo de transferencia, la membrana se colocó en 10 mL de solución de bloqueo (PBS 1x, leche Svelty® 7% y 0.2% Tween (BioRad)) y se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasadas las 2 horas se desechó la solución y se agregaron 10 mL de nueva solución de bloqueo adicionada con anticuerpo primario (Abs 6xHisTag) en una dilución 1:3000 (3.3  $\mu\text{L}$ ). La membrana fue incubada a 4°C en agitación durante toda la noche. Al día siguiente se retiró la solución con el anticuerpo primario y se lavó 3 veces la membrana durante 10 minutos con una solución de PBS-Tween 0.2%. Posteriormente se



agregó una solución PBS, Tween 0.2% y leche Svelty ® 2% que contiene el anticuerpo secundario (Abs anti-ratón) y se incubó a temperatura ambiente y en agitación durante 2 horas. Posteriormente la membrana fue lavada de igual manera al procedimiento mencionado anteriormente, finalmente la membrana fue colocada en 10 mL de PBS y se llevó al cuarto oscuro para su posterior revelado.

#### 7.12.5. Revelado

El revelado de la membrana se realizó colocando 600 µL del reactivo luminiscente (150 µL de Luminol y 150 µL de peroxidasa, Thermo Scientific) y se dejó actuar por un minuto, posteriormente la membrana se expuso a placas fotográficas, por 10, 15 y 30 segundos. Se colocó la placa en solución reveladora hasta que se visualizaran las bandas, se enjuagó con agua y posteriormente se situó en solución fijadora, nuevamente se lavó con agua y se dejó secar al ambiente.

### 7.13. Clonación de los genes que codifican para las proteínas de membrana externa (MalG, MalF y LamB)

#### 7.13.1. Amplificación de los genes *malG*, *malF* y *lamB*

Para amplificar los genes que codifican para las proteínas de membrana, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan cada gen, los cuales incluyen el sitio de unión al ribosoma y los primeros codones de inicio de la traducción (entre 2 y 3 codones). Adicionalmente se incluyeron sitios de restricción para las enzimas *XbaI* (5') y *HindIII* (3'), la secuencia de los oligonucleótidos, así como su nomenclatura se puede observar en la Tabla 2.

#### Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia
MalG_Fw	5'-T`CTAGAaggagataacaaaaatg-3'
MalG_Rv	5'-A`AGCTTttaaccttcacaccac-3'
MalF_Fw	5'-T`CTAGAaggaagaaccccatggatgtc-3'
MalF_Rv	5'-A`AGCTTttaatcaaacttcattcgctg-3'
LamB_Fw	5'-T`CTAGAaggagatagaatgatgattactctg-3'
LamB_Rv	5'-A`AGCTTtaccaccagattccatctg-3'

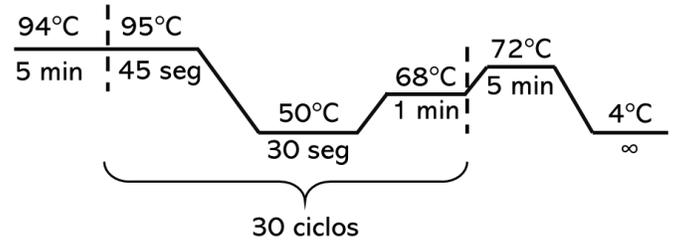
**Tabla 2. Lista de oligonucleótidos utilizados.** Oligonucleótidos utilizados para realizar la amplificación de los genes y su posterior clonación de los genes correspondientes para las



proteínas de membrana complementarias a las cepas Keio. Sitio XbaI T`CTAGA y sitio HindIII A`AGCTT (símbolo “`” indica sitio de corte).

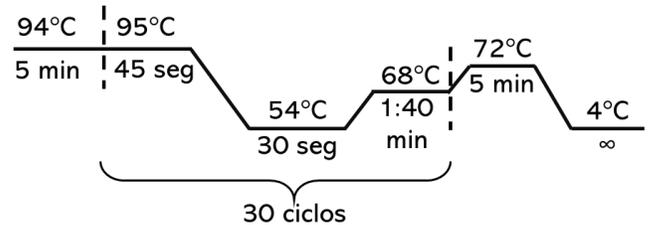
Los componentes de la reacción y las condiciones de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al gen *malG* (891 pb) fueron las siguientes:

Reacción de PCR	Volumen (µL)
Buffer Taq 10X	1
dNTP's 10 µM	0.5
Oligo Fw	2
Oligo Rv	1
Dream Taq polimerasa	0.1
DNA (W3110/DH5α)	1
H <sub>2</sub> O	4.4
Volumen final	10



Los componentes de la reacción y las condiciones de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al gen *malF* (1545 pb) fueron las siguientes:

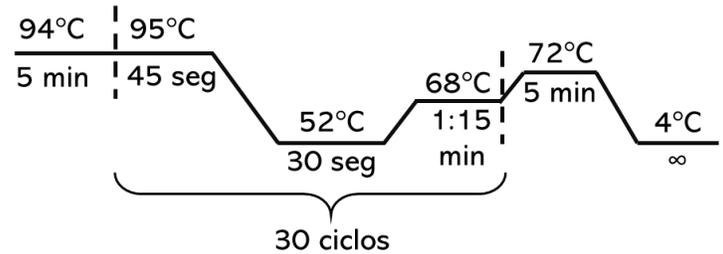
Reacción de PCR	Volumen (µL)
Buffer Taq 10X	1
dNTP's 10 µM	0.5
Oligo Fw	2
Oligo Rv	1
Dream Taq polimerasa	0.1
DNA (W3110/DH5α)	1
H <sub>2</sub> O	4.4
Volumen final	10





Los componentes de la reacción y las condiciones de PCR para amplificar el fragmento correspondiente al gen *lamB* (1341 pb) fueron las siguientes:

Reacción de PCR	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer Taq 10X	1
dNTP's 10 $\mu\text{M}$	0.5
Oligo Fw	1
Oligo Rv	1
Dream Taq polimerasa	0.1
DNA (W3110/DH5 $\alpha$ )	1
H <sub>2</sub> O	5.4
Volumen final	10



Las reacciones se realizaron utilizando el termociclador BioRad T100

Los productos finales de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa a 1% a 80 V durante 1 hora y se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

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

Se realizaron las reacciones de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Thermo Scientific). Se tomaron 30 ng de los productos de PCR, 5  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción 2X, 1  $\mu\text{L}$  de la enzima blunting y 2.5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O, para un volumen final de 9  $\mu\text{L}$ , la reacción se incubó a 70° C por 5 minutos en el termociclador BioRad T100 y pasado el tiempo señalado se colocaron las muestras inmediatamente en hielo. Posteriormente se agregaron 0.5  $\mu\text{L}$  del vector pJET1.2/blunt y 0.5  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa, para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , la reacción se incubó a 22°C por 5 minutos. Posteriormente se tomaron 5  $\mu\text{L}$  de cada reacción de ligación (pJET-*malG*, pJET-*malF* y pJET-*lamB*) y se transformaron en 80  $\mu\text{L}$  de bacteria DH5 $\alpha$  quimiocompetente, respectivamente. Al día siguiente se seleccionaron candidatas, para cada inserto de interés, y se sembraron en cajas de LB con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para posteriormente realizar la PCR de colonia.

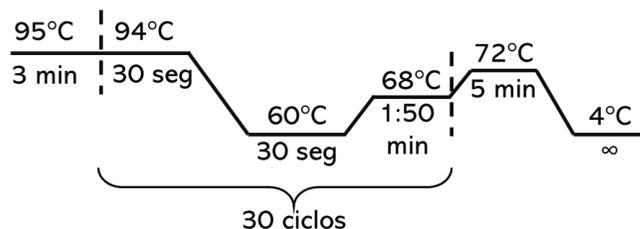


### 7.13.3. Análisis de candidatas por PCR de colonia

Se seleccionaron 10 colonias candidatas de cada inserto de interés y se extrajo el DNA de cada una de ellas, brevemente; se tomó una asada de la colonia y se mezcló en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O inyectable, se le adicionaron perlas de vidrio y se mezcló por vortex durante 2 minutos, divididos en 4 eventos de 30 segundos, posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos.

La reacción y las condiciones de PCR para la obtención de los fragmentos esperados fueron las siguientes:

Reacción de PCR	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer Taq 10X	1
dNTP's 10 $\mu$ M	0.5
Oligo Fw (pJET)	0.5
Oligo Rv (pJET)	0.5
Dream Taq polimerasa	0.1
DNA (W3110/DH5 $\alpha$ )	1
H <sub>2</sub> O	6.5
Volumen final	10



A partir de las colonias donde se obtuvieron amplificaciones del tamaño correspondiente a los genes deseados (*malG*, *malF* y *lamB*) se tomaron alícuotas para inocular medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para extraer el DNA plasmídico y realizar ensayos de restricción.

### 7.13.4. Extracción de plásmido

Para la extracción de plásmido; se prepararon tubos de medio LB suplementados con ampicilina (100  $\mu$ g/mL), cada uno fue inoculado con una asada de las colonias candidatas y se incubaron O/N a 37°C en agitación. Al día siguiente se tomaron alícuotas de 1.5 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 12,000 x g por 1 minuto a 4°C, este procedimiento se realizó repetidamente hasta haber incluido los 5 mL del cultivo O/N. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ L de solución I, a 4°C (Apéndice) y se mezcló varias veces haciendo uso de una



micropipeta. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de solución II (Apéndice) y se mezcló por inversión (~5 veces). Por último, se adicionaron 150  $\mu$ L de solución III (Apéndice) a 4°C, se mezcló invirtiendo el tubo por inversión (~5 veces) y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se tomó la fase acuosa de las muestras, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo estéril, se le adicionaron 500  $\mu$ L (~1 volumen) de Fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex durante 10 segundos y se centrifugó a 12,000 x g durante 2 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo de centrifuga (1.5 mL) estéril. Se repitió el paso anterior, adicionando solamente cloroformo, se recuperó el sobrenadante a un nuevo tubo y se adicionó 1 mL (~2 volúmenes) de etanol absoluto grado biología molecular y se mezcló por inversión. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos y posterior al tiempo de incubación se centrifugó nuevamente a 12,000 x g por 5 minutos a 4°C.

Se descartó el sobrenadante, y se realizaron 3 lavados con 1 mL de etanol al 70% frío (incubado previamente en hielo), en cada lavado se despegó la pastilla por vortex y se centrifugó. En el tercer lavado se descartó el sobrenadante, retirando cuidadosamente con pipeta los restos de etanol y se dejó secar la pastilla bajo mechero. La pastilla se resuspendió en 40  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O inyectable y se adicionó RNAsa (2 mg/mL), se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y posterior al plazo de tiempo, se utilizó para cargar un gel de agarosa al 1%, ensayos de restricción y el restante se almacenó en congelación a -20°C hasta su posterior uso.

#### **7.13.5. Selección de candidatas con inserto de interés por restricción**

Con la finalidad de confirmar la presencia del inserto de ligación deseado en las colonias que amplificaron las bandas correspondientes por PCR, se realizó una doble restricción de los plásmidos de pJET1.2\_ *malG/malF/lamB* y pBAD28 con las enzimas *XbaI* y *HindIII* (New England Biolabs®) con las especificaciones siguientes:



Reacción	Volumen (μL)
Buffer 2	2.5
BSA	0.25
<i>Xba</i> I	0.5
<i>Hind</i> III	1
DNA	8
H <sub>2</sub> O	12.75
Volumen final	25

La reacción de restricción se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se analizaron las reacciones, cargando los 25 μL de la reacción en un gel de agarosa y seleccionaron aquellos plásmidos que liberaron bandas correspondientes al tamaño del fragmento de interés (*malG*-891 pb, *lamB*-1341 pb y *malF*-1545 pb), así como las bandas correspondientes al vector pBAD28 linealizado, para su posterior purificación y clonación.

#### 7.13.6. Corte y purificación de las bandas

Las bandas correspondientes al tamaño del inserto de interés fueron cortadas del gel de agarosa y purificadas con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN®) siguiendo las indicaciones del fabricante. El gel de agarosa fue analizado en un transiluminador de luz UV para cortar las bandas deseadas y se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril, se adicionaron 500 μL del buffer FADF, se mezclaron en vortex y se incubaron por 10 minutos a 60°C en el thermoblock, se utilizó vortex cada 3 minutos para homogeneizar adecuadamente la reacción. Concluidos los 10 minutos se dejó enfriar a temperatura ambiente para posteriormente transferir el contenido del tubo de microcentrífuga (~800 μL) a la columna FADF y centrifugar en refrigeración (4°C) a 11,000 x g por 30 segundos, se descartó el eluyente y se adicionaron 750 μL de Buffer de lavado (incluye Etanol) a la columna. Se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones y tiempo, se deshecho el nuevo eluyente y se centrifugó la columna a máxima velocidad por 3 minutos en refrigeración (4°C), este paso resulta esencial para eliminar cualquier



residuo líquido en la columna. Seguidamente se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga, se adicionaron 18  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  inyectable, previamente calentada a  $60^\circ\text{C}$  en thermoblock, a la columna, y se centrifugó a  $18,000 \times g$  por un minuto a  $4^\circ\text{C}$  para eluir el DNA. Se tomaron 2  $\mu\text{L}$  de las purificaciones para cargar un gel de agarosa al 1% y corroborar su viabilidad y se emplearon para realizar ligaciones en el vector deseado (pBAD28), el restante fue almacenado en congelación a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### 7.13.7. Clonación de los genes de proteínas de membrana en el vector pBAD28

A partir de la doble restricción del vector pBAD28 y las construcciones en pJET1.2 con las enzimas *XbaI* y *HindIII* se realizó una reacción de ligación de la siguiente manera:

Reacción	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
pBAD28 (~150 ng)	6
Inserto (~50 ng)	1.5
Ligasa	0.2
Buffer	2
$\text{H}_2\text{O}$	10.3
Volumen final	20

Se adicionó un control de ligación, siendo una reacción de ligación del vector lineal sin inserto. La reacción de ligación se incubó a  $16^\circ\text{C}$  durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron las ligaciones para transformar DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, se plaquearon en cajas de LB suplementadas con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y cloranfenicol (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), se cultivó toda la noche a  $37^\circ\text{C}$  y se cuantificaron todas las colonias en cada caja, el número de candidatas seleccionadas fue considerado con respecto al número de colonias en el control, a todas las colonias candidatas se les extrajo el DNA plasmídico, siguiendo el mismo procedimiento que se describió previamente.

#### 7.13.8. Comprobación de colonias candidatas en pBAD28

A partir de la extracción de los plásmidos de cada una de las colonias candidatas se utilizaron para ser analizados en un gel de agarosa al 1% que se corrió durante



1 hora a 80 V. Se realizó un análisis de los tamaños de banda y se discernió entre posibles plásmidos con el inserto de interés. A estos plásmidos se les realizó ensayos de doble restricción con las enzimas *XbaI* y *HindIII*. Se seleccionaron los plásmidos que liberaron el fragmento de interés y se volvieron a someter a un ensayo de restricción y ligación para suprimir el gen responsable de la resistencia a ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*).

#### 7.13.9. Delección de la resistencia a ampicilina (*Amp<sup>R</sup>*)

Debido a que el plásmido pBAD28 cuenta con una doble resistencia a antibióticos (ampicilina y cloranfenicol) y el plásmido pORF81 (construcción de Lpp<sup>mEp021</sup> en pKQV4) tiene resistencia a ampicilina, la transformación de ambos plásmidos en una misma bacteria podía ocasionar resultados erróneos. Es debido a esto que los plásmidos extraídos de las colonias candidatas con los insertos pBAD28\_ *malG*, pBAD28\_ *malF* o pBAD28\_ *lamB* se trataron con las enzimas de restricción *PstI* y *BglI*, las concentraciones de la reacción se muestran a continuación:

Reacción	Volumen (μL)
Buffer 3.1	2.5
<i>PstI</i>	2
<i>BglI</i>	1
DNA	8
H <sub>2</sub> O	11.5
Volumen final	25

La reacción se incubó durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se corrió la muestra en un gel de agarosa al 1% durante una hora a 80 V, las bandas correspondientes al plásmido pBAD28 con la construcción y sin el gen *Amp<sup>R</sup>* fueron purificados de la misma manera que se describió previamente, con el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN®), se analizó su integridad en un gel de agarosa y se procedió a realizar una reacción de ligación. Debido a que los sitios de reconocimiento de las enzimas utilizadas generan extremos cohesivos se llevó a cabo el mismo procedimiento que la ligación descrita previamente para la clonación en pJET1.2/blunt. Brevemente, se adicionaron 5 μL



de buffer de reacción 2X, 0.5  $\mu$ L de la enzima blunt y 4  $\mu$ L de cada plásmido, e incubó a 70°C durante 5 minutos, seguido de adicionar 0.5  $\mu$ L de T4 ligasa, se incubó a 22°C durante 5 minutos y se tomaron 5  $\mu$ L del resultado de la reacción de ligación y se transformaron 80  $\mu$ L de bacteria DH5 $\alpha$  quimiocompetente, se adicionaron como controles de ligación las bandas purificadas sin ligar. La transformación de las bacterias se realizó de igual forma a lo descrito previamente y se plaquearon en cajas de medio LB sólido complementado con cloranfenicol (30  $\mu$ g/mL), las cajas fueron incubadas toda la noche a 37°C, al día siguiente se sembraron las colonias en nuevas cajas de LB cloranfenicol (30  $\mu$ g/mL). Tras el primer pase se tomaron colonias aisladas, las cuales fueron sembradas nuevamente en cloranfenicol y se sembraron, además, en cajas de LB ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y LB ampicilina-cloranfenicol como controles de delección del gen *Amp<sup>R</sup>*.

#### 7.14. Ensayos de MacConkey

A partir de cultivos O/N frescos de bacterias mutantes de la cepa Keio (*malG*<sup>-</sup>, *malF*<sup>-</sup>, *malk*<sup>-</sup>, *lamB*<sup>-</sup>, *ompA*<sup>-</sup>, *ompC*<sup>-</sup>, *ompF*<sup>-</sup> y *fhuA*<sup>-</sup>), cepas silvestres *E. coli* W3110, BW25113 y DH5 $\alpha$ , *E. coli* W3110 transformada con los plásmidos pKQV4, pORF81, pORF81-6xHis, pORF81-6xHisW71C y pORF81-mCherry, así como las mutantes complementadas (*malG*/pMalG, *malF*/pMalF y *lamB*/pLamB), se sembraron en cajas solidas de medio selectivo MacConkey base suplementado con dos concentraciones de maltosa: 1) maltosa 1% (29.23 mM), 2) maltosa 0.2% (5.84 mM). Todos los medios fueron suplementados con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (Amp), 50  $\mu$ g/mL kanamicina (Km), 30  $\mu$ g/mL de cloranfenicol (Chl), o arabinosa 0.2% en caso de ser requeridos y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Posterior a la observación de la capacidad de que las construcciones pudiesen complementar a las cepas mutantes, se procedió a hacer bacterias *malG*/pMalG, *malF*/pMalF y *lamB*/pLamB quimiocompetentes para transformarlas con un segundo plásmido; pKQV4, pORF81, pORF81-6xHis, pORF81-6xHisW71C y pORF81-mCherry, respectivamente y se probaron en medio selectivo de MacConkey siguiendo los mismos procedimientos a lo descrito previamente.



## 8. Resultados

### 8.1. Análisis bioinformático relacionado a la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>

#### 8.1.1. Identificación de lipoproteínas putativas de fagos provenientes del grupo I

Al comparar los genomas de los bacteriófagos del grupo de inmunidad I (mEp010, mEp013, mEp044, y mEp554) se pudieron localizar los genes para las lipoproteínas putativas en los cuatro fagos. Se observó que todos los genes se encuentran ubicados en el sitio equivalente al ORF81 de mEp021 (Anexo 1). La anotación de la secuencia aminoacídica de las Lpps permitió identificar inicialmente un alto grado de homología entre cuatro de los fagos, exceptuando a mEp021 (Anexo 2). Además, la búsqueda de lipoproteínas de distintos fagos, en las bases de datos nos permitió adicionar (a los ensayos de alineamiento) las lipoproteínas putativas de los fagos: mEp237 y mEp167.

#### 8.1.2. Alineamientos de distintas lipoproteínas obtenidas de las bases de datos

En las alineaciones de aminoácidos se puede observar que existe una homología de >90% entre las secuencias de los fagos mEp010, mEp044, mEp013 y mEp554, donde las secuencias casi idénticas son las de mEp010 y mEp013, que cuentan con el cambio de un solo aminoácido. Por otra parte, de los fagos lambdoides mEp167 y mEp237 se tiene una homología, entre sus secuencias ~50%, y se distancian del grupo de las lipoproteínas anteriores. Mientras que la de mEp021 tiene el menor grado de homología con todas las lipoproteínas analizadas del grupo de inmunidad I, como se puede observar en la Figura 8.



**Figura 8.** Alineamiento de lipoproteínas de fagos del grupo de inmunidad I y de dos fagos lambdoides (mEp167 y mEp237). El recuadro rojo indica la secuencia lipobox de cada una de las proteínas, las flechas negras indican el sitio de corte de la proteasa LSP.

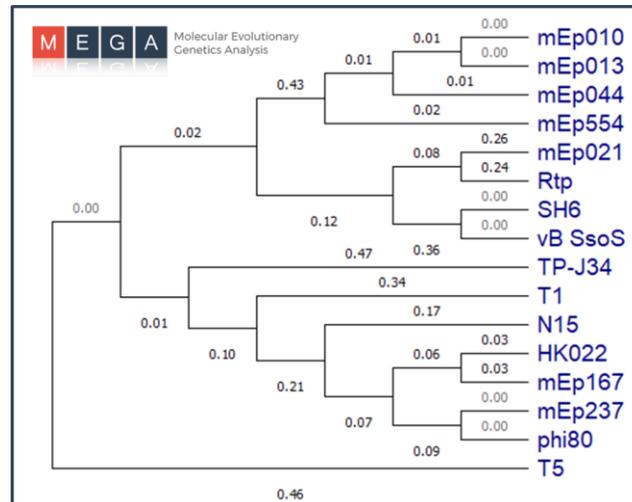


Al realizar una búsqueda de proteínas similares en bases de datos por medio de la herramienta BLASTp se identificaron 4 posibles lipoproteínas de fagos. Lpp<sup>mEp021</sup> tiene un alto índice de identidad (>70%) con diversas proteínas hipotéticas de *Escherichia coli*. De manera contraria, la similitud con lipoproteínas de bacteriófagos del grupo I es baja, y teniendo el porcentaje de identidad más alto, de 49% con el bacteriófago SH6 de *Shigella* y con el fago Rtp de *Escherichia coli* (Tabla 2). Esto resalta la singularidad que representa el fago mEp021, que incluso dentro del grupo de inmunidad I sobresale con características únicas.

**Tabla 3. Proteínas homólogas a Lpp<sup>mEp021</sup> a nivel de aminoácidos disponibles en bases de datos.**

BLASTp	Query cover (%)	E-value	Identidad (%)
Proteína hipotética de <i>E. coli</i> WCHEC025970	100	1e-44	98
Proteína hipotética de <i>E. coli</i> FSIS11918109	100	4e-42	90
Proteína hipotética de <i>E. coli</i> O157:H7	100	3-e34	73
Lipoproteína putativa del fago Rtp de <i>E. coli</i>	98	9e-15	49
Proteína hipotética gp24 del fago HK578 de <i>E. coli</i>	98	5e-13	46
Lipoproteína putativa del fago vB_SsoS de <i>Shigella</i>	95	9e-11	48

A partir de los resultados de BLASTp, así como de la búsqueda literaria sobre lipoproteínas de exclusión a la superinfección, se adicionaron las proteínas Cor, entre otras. En la nueva alineación de 16 distintas proteínas (Anexo 2), se puede observar que la lipoproteína de mEp021 cuenta con un grado de identidad menor con las proteínas de los fagos del grupo de inmunidad I. Sin embargo, también tiene cierto grado de identidad con lipoproteínas del fago Rtp (*E. coli*) y SH6 (*Shigella*). Esto se puede apreciar de mejor manera en los árboles filogenéticos, donde la Lpp de mEp021 se agrupa mejor con las lipoproteínas de estos fagos, indicando una relación evolutiva más cercana, que con los mEp's del grupo de inmunidad I (ver Figura 9).



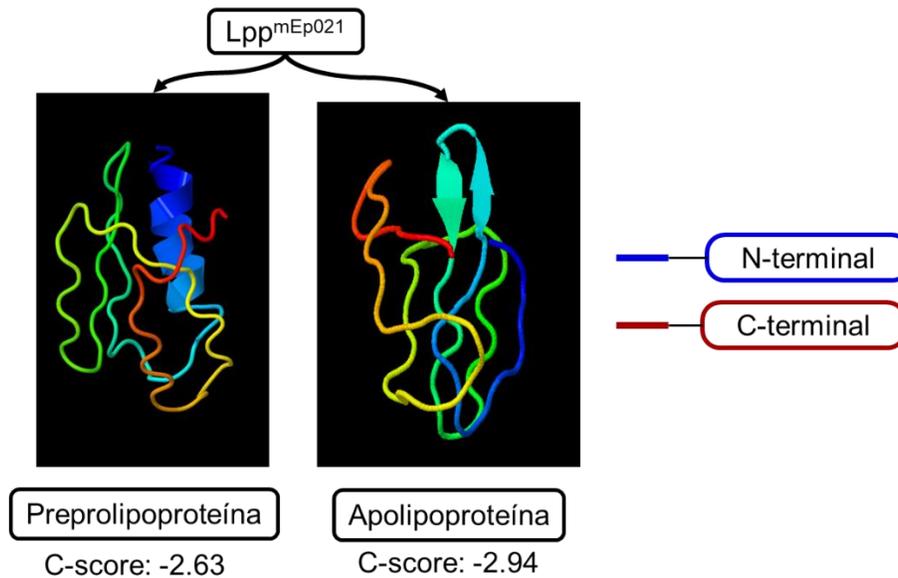
**Figura 9. Árbol filogenético de distintas lipoproteínas de exclusión a la infección.** Obtenido por el software MEGA X. Los valores numericos en las ramas indican el tiempo evolutivo entre dos nodos, valores mas altos representan la existencia de una mayor divergencia genética.

### 8.1.3. Estructuras tridimensionales y alineación de proteínas

En cuanto a las estructuras tridimensionales, se obtuvieron las predicciones de las proteínas de los 16 fagos descritos previamente (lipoproteínas putativas y Cor) mediante el servidor de I-TASSER. Se predijo la estructura tridimensional de las proteínas: 1) Previo al corte por la proteasa (prelipoproteína) y 2) De la proteína procesada (apolipoproteína). Al comparar ambas estructuras tridimensionales se puede destacar la pérdida de la estructura de alfa hélice ubicada en el extremo amino terminal (N-terminal) de la apolipoproteína (C-score: -2.94), que comprende a los primeros 15 aminoácidos de la secuencia (Figura 10). En cuanto a la estructura de la apolipoproteína de Lpp<sup>mEp021</sup> se observa que la mayor parte de la lipoproteína procesada no cuenta con algún tipo de estructura secundaria, solamente en la región media del péptido se puede plegar y estructurar en una lámina  $\beta$  corta (~6 aminoácidos). Esta observación de la pérdida de una región de alfa hélice se repite en todos los modelos obtenidos de las distintas modificaciones de la lipoproteína (Anexo 4). Sin embargo, de manera contraria, en los modelos de las lipoproteínas putativas de los fagos mEp010, mEp013, mEp044 y mEp554 se conserva la estructura terciaria en los primeros aminoácidos, aún posterior al procesamiento, y se observa una nueva estructura de alfa hélice en una posición cercana con



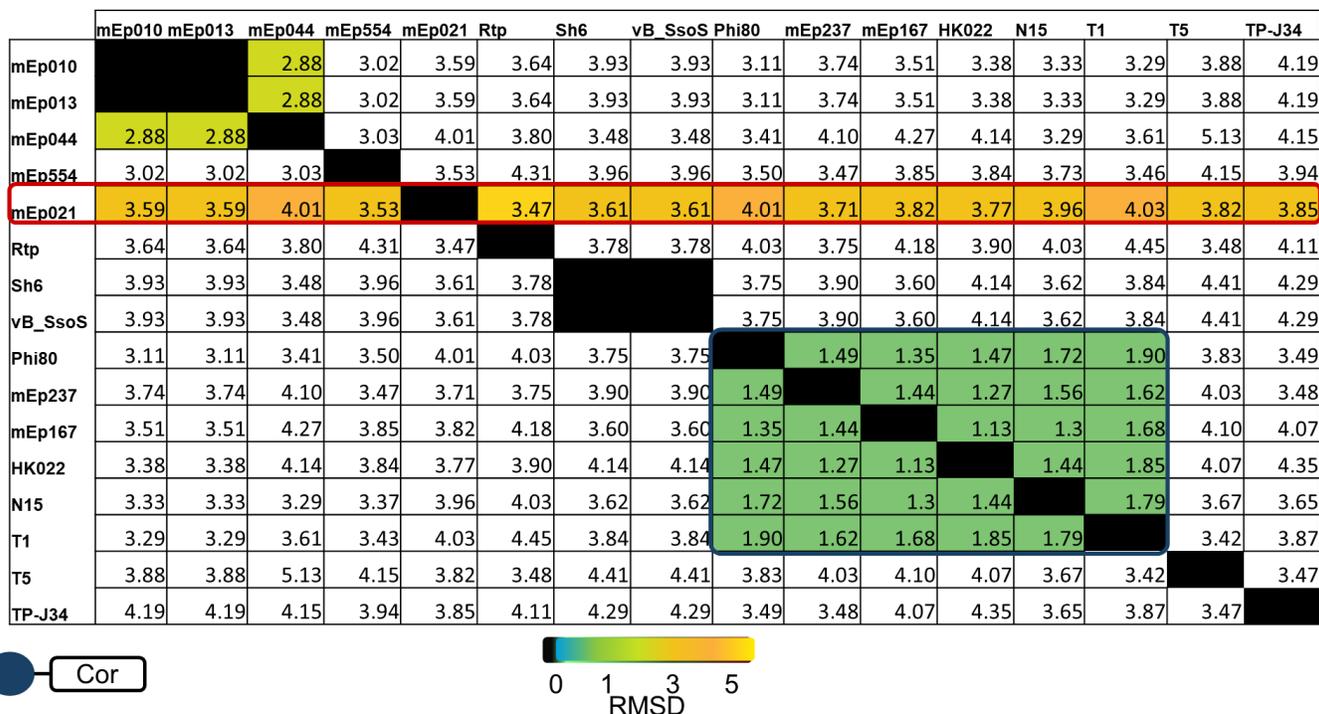
respecto a donde se encontrarían las  $\beta$  plegadas de la lipoproteína de mEp021 (Anexo 5).



**Figura 10. Modelos de la estructura tridimensional de Lpp<sup>mEp021</sup>.** realizados en I-TASSER. N-terminal: extremo amino terminal, C-terminal: extremo carboxilo terminal.

#### 8.1.4. Alineamiento de estructuras tridimensionales y matriz

A partir del alineamiento de estructuras tridimensionales se obtuvo el valor de la raíz de desviación cuadrática media (RMSD), la cual indica la distancia que separan sus moléculas al superponer las estructuras, específicamente para proteínas, y está relacionado con la homología que existen entre las estructuras proteicas con respecto a la disposición de sus aminoácidos. Como se puede observar, todas las proteínas Cor de los fagos T1, N15, HK022, mEp167, mEp237 y  $\Phi$ 80, a pesar de no tener una secuencia idéntica, los modelos predichos por I-TASSER cuentan con un valor de RMSD bajo ( $\text{RMSD} < 2$ ), indicando que su estructura es muy similar (Figura 11). Por otra parte, Lpp<sup>mEp021</sup> no presenta ningún valor bajo que represente un grado de similitud en estructura proteica con ninguna de las proteínas utilizadas. El valor más bajo (3.47) se encuentra con la proteína putativa del fago Rtp, mientras que con respecto a los fagos mEp's, solamente el fago mEp044 cuenta con un valor considerablemente bajo (2.88) con respecto a los fagos mEp010 y mEp013 (Figura 11).



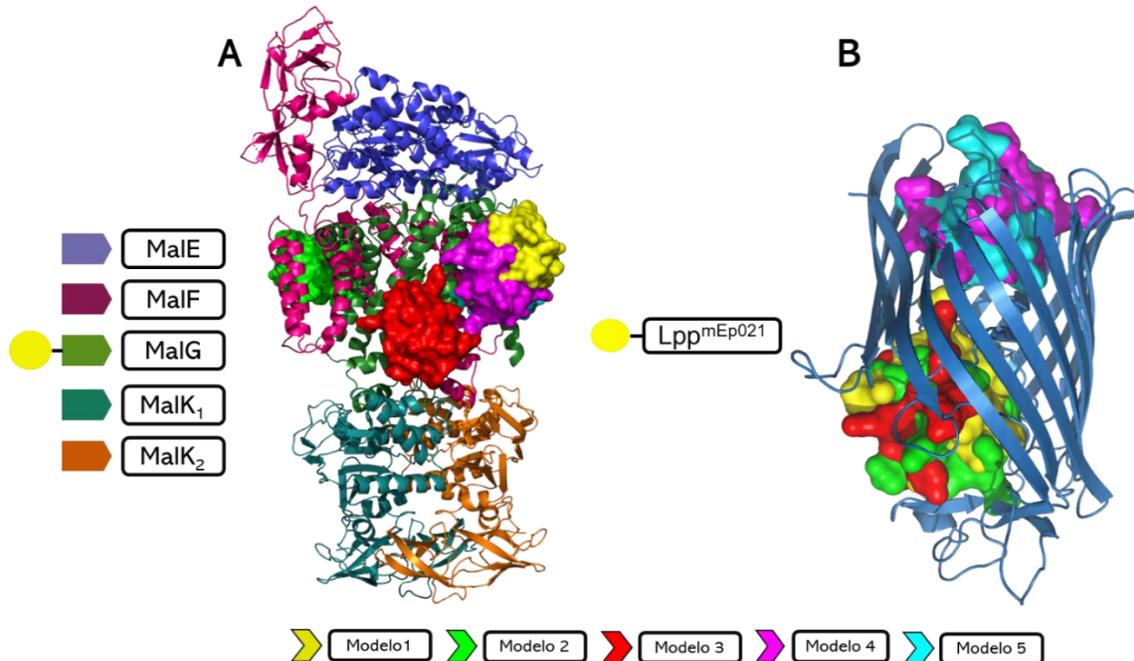
**Figura 11. Matriz de identidad en alineamientos de proteínas.** Recabadas de la literatura y bases de datos. Se presenta el valor de RMSD, resultado del promedio de dos valores obtenidos por separado (TM-Align y PyMOL2). El alineamiento estructural se realizó considerando los modelos obtenidos para las proteínas en su conformación procesada. Se resaltan los resultados de mayor relevancia, el recuadro rojo resalta los valores de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>.

### 8.1.5. “Docking” molecular *in silico* de Lpp<sup>mEp021</sup> con proteínas de membrana

Con el fin de identificar algunos posibles sitios de interacción entre la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> y las proteínas de membrana LamB, MalF y MalG, se realizaron ensayos de interacción *in silico*. El servidor proporciona distintos modelos predictivos de interacción, dependiendo del modelo tridimensional ingresado. Además, permite visualizar distintos posibles sitios de interacción entre el ligando ingresado y la proteína receptora, dividiéndolos en diez modelos, ordenados en una escala ascendente, donde el número mayor es un sitio de interacción menos factible. Se puede observar que Lpp<sup>mEp021</sup> pudiera tener una mayor posibilidad de interactuar con el domino de MalG, al presentar 4 de 5 diferentes modelos de interacción con esta proteína, mientras que solo un modelo se presenta que estaría interactuando con MalF (Figura 12A). Estas observaciones se conservan, por lo menos en el complejo MalFGK<sub>2</sub>, al utilizar el modelo para Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis (Anexo 7).



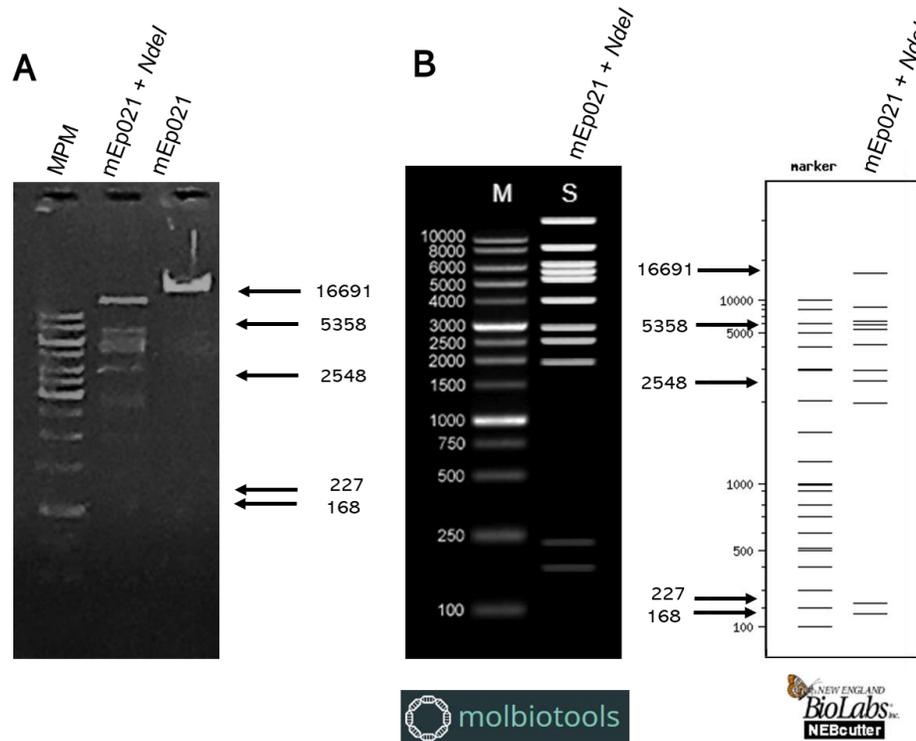
Interesantemente, para la interacción entre  $Lpp^{mEp021}$  y una unidad del trímero de LamB, los modelos 2, 3 y 5 tienen interacción dentro del poro de maltosa, pero en los modelos 1 y 4,  $Lpp^{mEp021}$  se presentan interactuando alrededor del poro (Figura 12B).



**Figura 12. Ensayo *in silico* de “docking” molecular entre la lipoproteína  $Lpp^{mEp021}$  y proteínas de membrana.** A) Posibles sitios de interacción entre  $Lpp^{mEp021}$  y el complejo transportador de maltosa de membrana interna MalFGK<sub>2</sub>, cada subunidad se representa con un color diferente. B) Posibles sitios de interacción entre  $Lpp^{mEp021}$  y una subunidad de la maltoporina; proteína de membrana externa LamB.

## 8.2. Caracterización del fago mEp021 por restricción de genoma

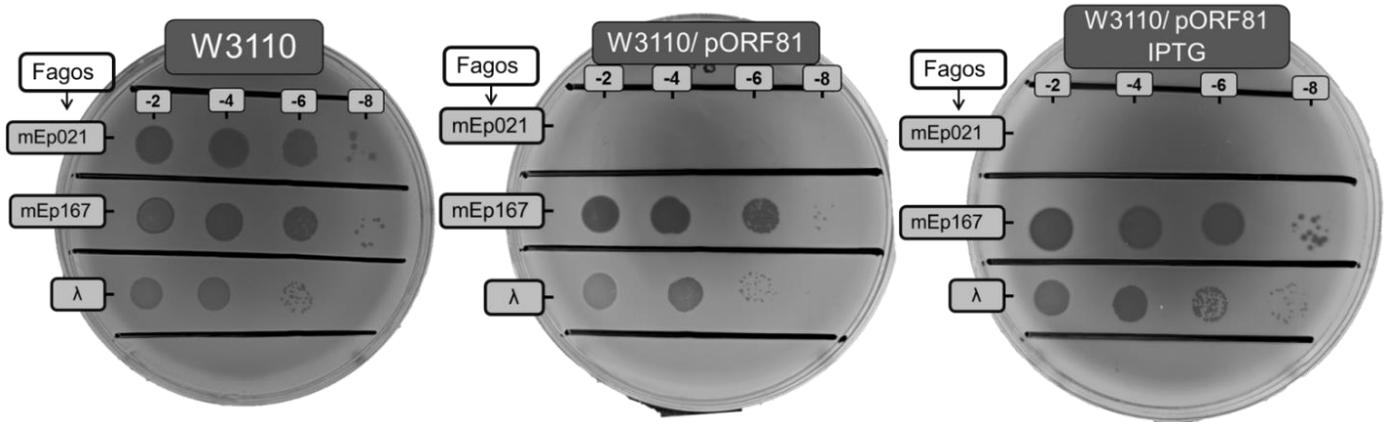
El bacteriófago mEp021 se propagó en la cepa W3110 y se obtuvo un título viral de  $\sim 1.13 \times 10^{11}$  UFP/mL. La integridad del genoma de mEp021 se comprobó mediante el patrón de bandeo que se presenta por el corrimiento en el gel, al tratar el DNA con la enzima de restricción *NdeI*. Al realizar una electroforesis se verificaron que las bandas son las correspondientes al genoma. Como control se comparó con el patrón de restricción obtenido *in silico*. Se observa que las bandas correspondientes al tamaño coinciden, indicando así que el genoma del bacteriófago corresponde a mEp021.



**Figura 13. Integridad del genoma de mEp021 por patrón de restricción de DNA.** A) Electroforesis en gel de agarosa 1% y patrón de restricción con la enzima *NdeI*. B) Predicción *in silico* del patrón de restricción del genoma de mEp021 al ser tratado con la enzima *NdeI* a través de dos servidores en línea.

### 8.3. Ensayos de infección/exclusión para el bacteriófago mEp021 en distintas cepas

Con la finalidad de poder corroborar y confirmar los datos experimentales obtenidos previamente por nuestro grupo de trabajo, se analizó la infección de mEp021 en bacterias *E. coli* W3110 con los plásmidos pKQV4, pORF81, pORF81-6xHis y pORF81-6xHisW71C, en dos condiciones; sin inductor (IPTG 0 mM) y con inductor (IPTG 0.1 mM). En los tapices bacterianos se gotearon diluciones de 3 fagos; 1) mEp021, como objeto de estudio, 2) mEp167 y 3)  $\lambda$ , como controles de infección. Se puede observar que en la cepa W3110 los tres fagos pueden infectar y formar placa de lisis bacteriana pero no cuando la bacteria expresa Lpp<sup>mEp021</sup> a partir del plásmido (pORF81) por lo que existe una exclusión de la infección específica del fago mEp021 (Figura 14).



**Figura 14. Ensayo de infección/exclusión en W3110 y W3110/pORF81.** Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución de los fagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$  (en buffer TMG). N=3. (comprobación de resultados de Martínez-Soto, 2018)

Posteriormente se evaluó el efecto que tienen las modificaciones en  $Lpp^{mEp021}$  sobre su funcionamiento: 1) El efecto de la adición de 6 aminoácidos de Histidina en la región carboxilo, 2) Una mutación W71C que además contiene el TAG de Histidinas (cambio de un nucleótido que modifica el aminoácido de Triptófano a Cisteína en la posición 71) y 3) La incorporación de la proteína fluorescente mCherry en el extremo carboxilo. Inesperadamente, se observó una disminución de dos logaritmos en el título viral correspondiente a la infección de mEp021 en la cepa que contiene una delección para la proteína de membrana externa OmpC (sin plásmido y al contener el vector vacío (pKQV4) pero no así en los fagos mEp167 y  $\lambda$  (Tabla 4); sin embargo, aún es necesario comprobar la cepa *ompC*), de ser correcta, estos resultados sugieren que, esta proteína pudiera tener un grado de importancia en el proceso de infección de mEp021. En cuanto a las bacterias que expresan el plásmido pORF81, se puede observar que la expresión de  $Lpp^{mEp021}$  está relacionada con el fenotipo de resistencia a la infección del fago mEp021, incluso en condiciones sin inductor (IPTG 0 mM, muy posiblemente debido a una fuga transcripcional). Se presenta un fenotipo de exclusión en la mayoría de las cepas (5 de 8), excepto en aquellas que contienen las delecciones en los genes que codifican para las proteínas de membrana MalG (JW3993), MalF (JW3992) y LamB (JW3995) (Tabla 5), esto sugiere que la expresión de estas proteínas resulta esencial para el funcionamiento adecuado de  $Lpp^{mEp021}$  en el proceso de exclusión a la infección. Ya que la ausencia



de las proteínas permite la exclusión aun en presencia de Lpp, sin embargo es necesario comprobar la delección de los respectivos genes.

Por otra parte, la construcción del ORF81 que contiene seis codones para Histidinas o la adición del péptido mCherry en el extremo 3', conserva la capacidad de excluir al fago mEp021, mientras que, de manera contraria, la mutante Lpp<sup>mEp021-6xHisW71C</sup> no excluye en ninguna cepa. Estos ensayos indican que la adición de 6 aminoácidos de Histidinas o el péptido mCherry, conservan el comportamiento a la exclusión, y que el cambio de una Cisteína en la posición 71, aun teniendo las 6 Histidinas, elimina completamente la actividad de exclusión de Lpp<sup>mEp021</sup>, como se puede observar en las Tablas 6, 7 y 8.

**Tabla 4. Ensayos de infección/exclusión.** Se muestran los ensayos realizados distintas cepas silvestres de *E. coli* y cepas mutantes pertenecientes a la colección Keio, y transformadas con el vector vacío (pKQV4), como controles de infección. (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago, (+/-) Disminución del título viral (infección solo en dilución  $1 \times 10^{-4}$ ). N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. IPTG utilizado como inductor del vector.

Cepas	Plásmido IPTG (0.1 mM)	Bacteriófagos (mEp y $\lambda$ )								
		-			pKQV4					
		-			-			+		
		021	167	$\lambda$	021	167	$\lambda$	021	167	$\lambda$
W3110		+	+	+	+	+	+	+	+	+
BW25113		+	+	+	+	+	+	+	+	+
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	+	+	-	+	+	-	+	+	-
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	+	-	+	+	-	+	+	-	+

En cuanto a lo observado con el bacteriófago mEp167, este fago no puede infectar bacterias mutantes JW0146(FhuA<sup>-</sup>), indicando que son dependientes de este receptor para que puedan llevar a cabo la adsorción en las bacterias, esto se encuentra acorde a previas observaciones (Hérendez-Sánchez, 2008).



**Tabla 5. Ensayos de infección/exclusión con pORF81.** Se muestran ensayos en distintas cepas silvestres de *E. coli* y cepas mutantes pertenecientes a la colección Keio, y transformadas con el vector que contiene el inserto del ORF81 (pORF81). (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. IPTG utilizado como inductor del vector.

Cepas	Plásmido IPTG (0.1 mM)	pORF81					
		-			+		
		Bacteriófagos (mEp y $\lambda$ )					
		021	167	$\lambda$	021	167	$\lambda$
W3110		-	+	+	-	+	+
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	+	+	+	+	+	+
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	+	+	+	+	+	+
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	-	+	+	-	+	+
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	+	+	-	+	+	-
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	-	+	+	-	+	+
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	-	+	+	-	+	+
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	-	-	+	-	-	+



**Tabla 6. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-6xHis.** Se muestran ensayos en distintas cepas silvestres de *E. coli* y cepas mutantes pertenecientes a la colección Keio, y transformadas con el vector que contiene el inserto del ORF81 (pORF81) y la adición de seis aminoácidos de Histidina en el extremo carboxilo terminal. (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. IPTG utilizado como inductor del vector.

Cepas	Plásmido IPTG (0.1 mM)	pORF81-6xHis					
		-			+		
		Bacteriófagos (mEp y $\lambda$ )					
		021	167	$\lambda$	021	167	$\lambda$
W3110		-	+	+	-	+	+
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	-	+	+	-	+	+
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	-	+	+	-	+	+
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	-	+	+	-	+	+
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	-	+	-	-	+	-
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	-	+	+	-	+	+
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	-	+	+	-	+	+
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	-	-	+	-	-	+



**Tabla 7. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-6xHisW71C.** Se muestran ensayos en distintas cepas silvestres de *E. coli* y cepas mutantes pertenecientes a la colección Keio, y transformadas con el vector que contiene el inserto del ORF81 (pORF81), la adición de seis aminoácidos de Histidina en el extremo carboxilo terminal y una mutación W71C (cambio de aminoácido de triptófano a cisteína). (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. IPTG utilizado como inductor del vector.

Cepas	Plásmido IPTG (0.1 mM)	pORF81-6xHisW71C					
		-			+		
		Bacteriófagos (mEp y λ)					
		021	167	λ	021	167	λ
W3110		+	+	+	+	+	+
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	+	+	+	+	+	+
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	+	+	+	+	+	+
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	+	+	+	+	+	+
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	+	+	-	+	+	-
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	+/-	+	+	+/-	+	+
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	+	+	+	+	+	+
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	+	-	+	+	-	+



**Tabla 8. Ensayos de infección/exclusión con pORF81-mCherry.** Se muestran ensayos en cepas mutantes con deleciones en genes que codifican para proteínas de membrana, transformadas con el vector que contiene el inserto correspondiente al ORF81 (Lpp<sup>mEp021</sup>) y el inserto de la proteína mCherry. (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. IPTG utilizado como inductor del vector.

Cepas	Plásmido IPTG (0.1 mM)	pORF81-mCherry					
		-			+		
		Bacteriófagos (mEp y λ)					
		021	167	λ	021	167	λ
W3110		-	+	+	-	+	+
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	-	+	+	-	+	+
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	-	+	+	-	+	+
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	-	+	+	-	+	+
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	-	+	-	-	+	-
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	-	+	+	-	+	+
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	-	+	+	-	+	+
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	-	-	+	-	-	+

Cabe resaltar que al transformar las cepas mutantes (*malG*<sup>-</sup>, *malF*<sup>-</sup> y *lamB*<sup>-</sup>), con pORF81 (Lpp<sup>mEp021</sup>) esta lipoproteína no fue capaz de excluir la infección del fago mEp021 (Tabla 5). Sin embargo, con la construcción que contiene la lipoproteína y las 6 Histidinas (Tabla 6 y Anexo 8), al igual que con la construcción que contiene el inserto de la proteína mCherry (Tabla 8 y Anexo 9), recuperan en su totalidad la capacidad de excluir al fago mEp021, indicando que la ausencia de las proteínas MalG, MalF o LamB, ahora ya no son esenciales para que estas lipoproteínas (con las modificaciones en su extremo carboxilo terminal) puedan llevar a cabo su función.

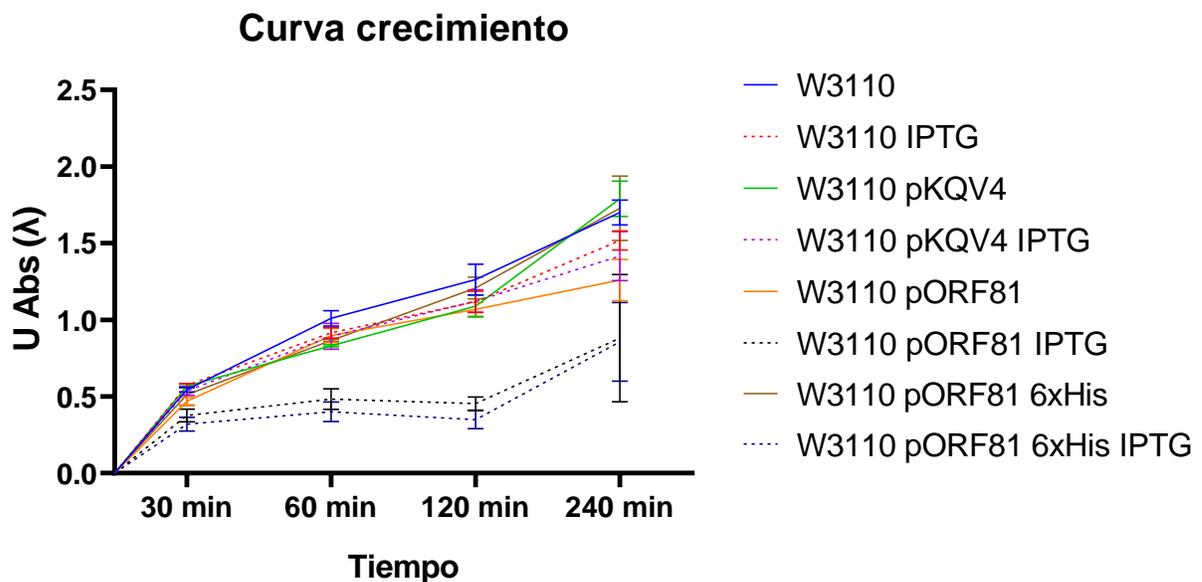
#### 8.4. Ensayos de toxicidad por la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en la viabilidad celular

Debido a que algunos ensayos de infección/exclusión presentaban tapices bacterianos con poco crecimiento bacteriano al inducir Lpp<sup>mEp021</sup> en



concentraciones mayores a 0.1 mM de IPTG, se decidió analizar este fenómeno mediante viabilidad celular. Para esto se tomaron alícuotas del crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica (O.D.<sub>600nm</sub>) a los tiempos: 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas, utilizando las cepas W3110 y W3110/pKQV4 como controles de crecimiento (Figura 15).

Se puede observar que la inducción de pORF81 y pORF81-6xHis con 0.1 mM de IPTG, tienen un retraso en el crecimiento con respecto a los controles, el cual se recupera ligeramente, sin alcanzar el crecimiento final de las cepas control, posterior a las dos horas. Mientras que todas las demás bacterias presentan un crecimiento similar, ya sea en la presencia o ausencia del inductor IPTG. Esto indica que la expresión inducida de Lpp<sup>mEp021</sup>/Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis a partir de una concentración de 0.1 mM inhibe el crecimiento al menos durante 2 horas.



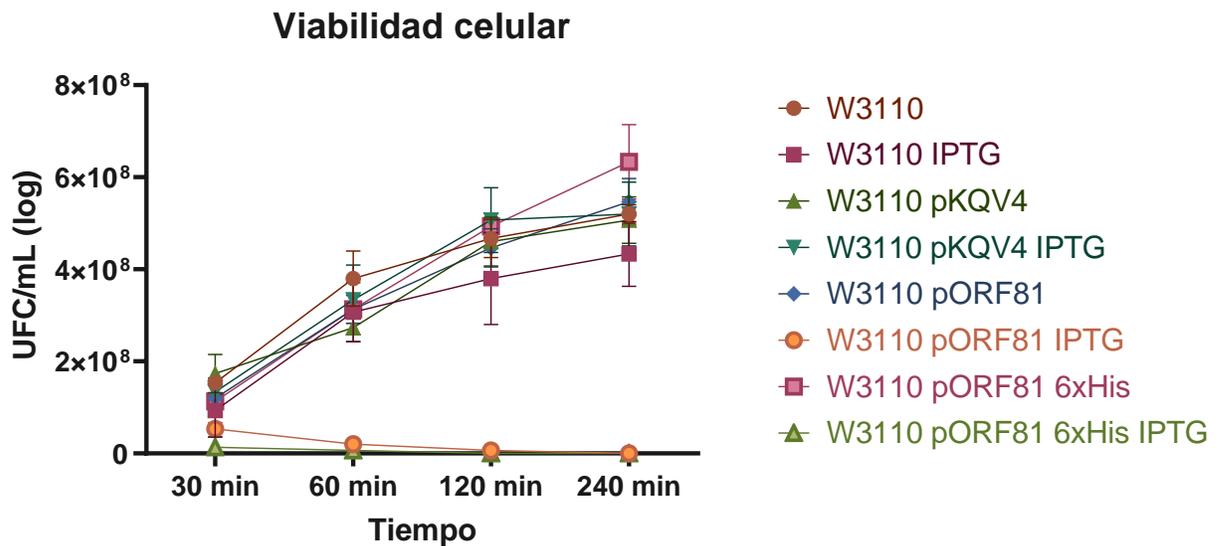
**Figura 15. Curvas de crecimiento.** Se representan las unidades de absorbancia en la cepa W3110 y al ser transformadas con los plásmidos: pKQV4, pORF81 y pORF81-6xHis, sin inductor e inducidas con IPTG 0.1 mM. N=3.

En cuanto a la viabilidad celular se decidió realizar diluciones seriadas a partir de los ensayos de crecimiento celular, con el objetivo de discernir sobre el aumento en la absorbancia observada al final en la curva de crecimiento (240 min), debido a que esto podía ser ocasionado por las siguientes razones: Las bacterias recuperan su crecimiento promedio aun cuando se induce la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> por cualquier



medio posible (modificación del plásmido, eliminación del gen, mutación del gen, inactivación por tiempo del antibiótico, regulación de la expresión de la lipoproteína).

Al graficar el número de colonias observadas se puede observar una evidente disminución en la viabilidad celular, debido a que las cepas W3110/pORF81 y W3110/pORF81-6xHis que fueron inducidas con IPTG a 0.1 mM presentan un valor de UFC/mL muy bajo ( $\approx 40$  millones de células) al inicio, comparado con los controles de crecimiento, llegando a presentar un valor de cero a partir de las 2 horas (Figura 16). Por otra parte, los controles de viabilidad presentan un crecimiento exponencial conforme al paso del tiempo con valores promedio de  $5 \times 10^8$  UFC/mL ( $\approx 500$  millones de células). Al comparar los resultados existe una evidente prueba del efecto tóxico que puede representar la inducción de la proteína Lpp<sup>mEp021</sup>, pudiendo ser incluso letal para el crecimiento bacteriano, de manera contraria a lo observado con la fuga transcripcional, inherente al plásmido pORF81.



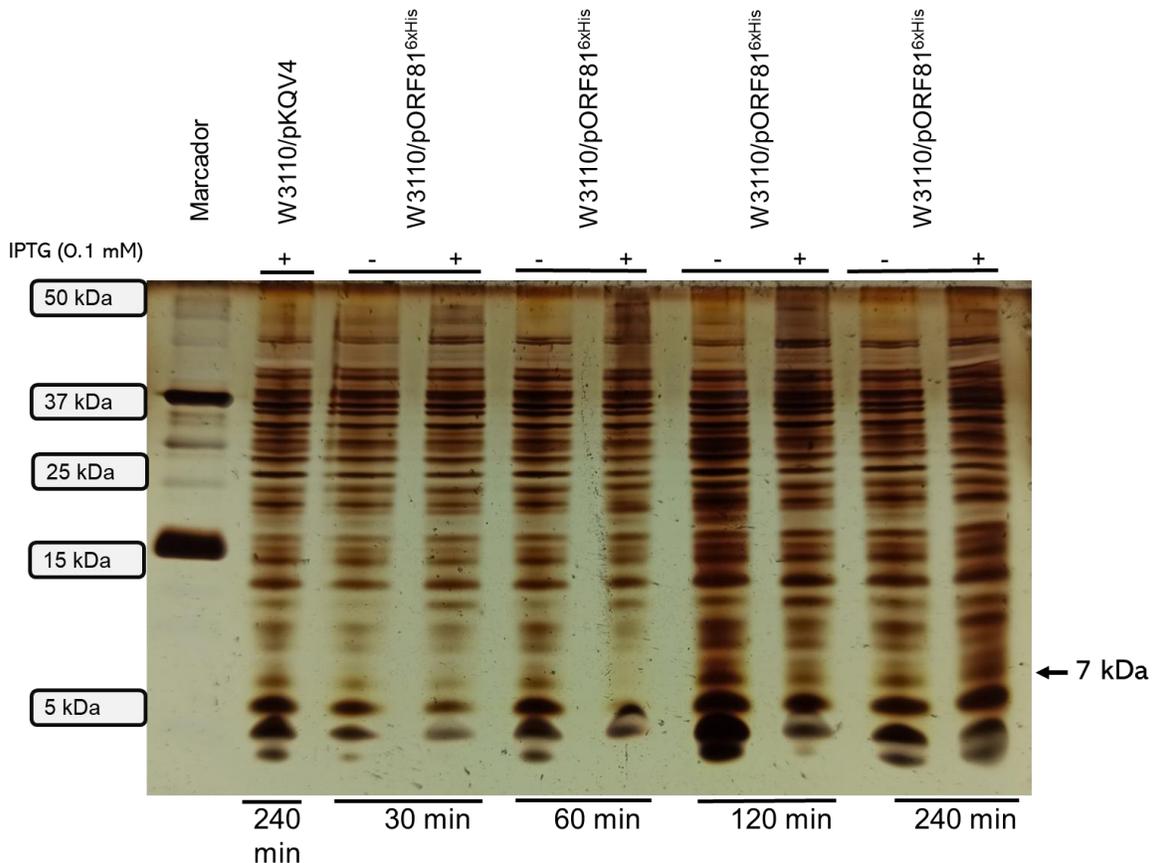
**Figura 16. Viabilidad celular de la cepa *E. coli* W3110.** Se presentan los valores graficados correspondientes a las UFC/mL, cuantificado por diluciones seriadas en la cepa W3110 y al ser transformadas con los plásmidos: pKQV4, pORF81 y pORF81-6xHis. Los goteos se realizaron en cajas de ampicilina (100 g/mL) en caso de ser requerido. N=3



## 8.5. Fraccionamiento celular y detección de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>

### 8.5.1. Expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en la cepa W3110

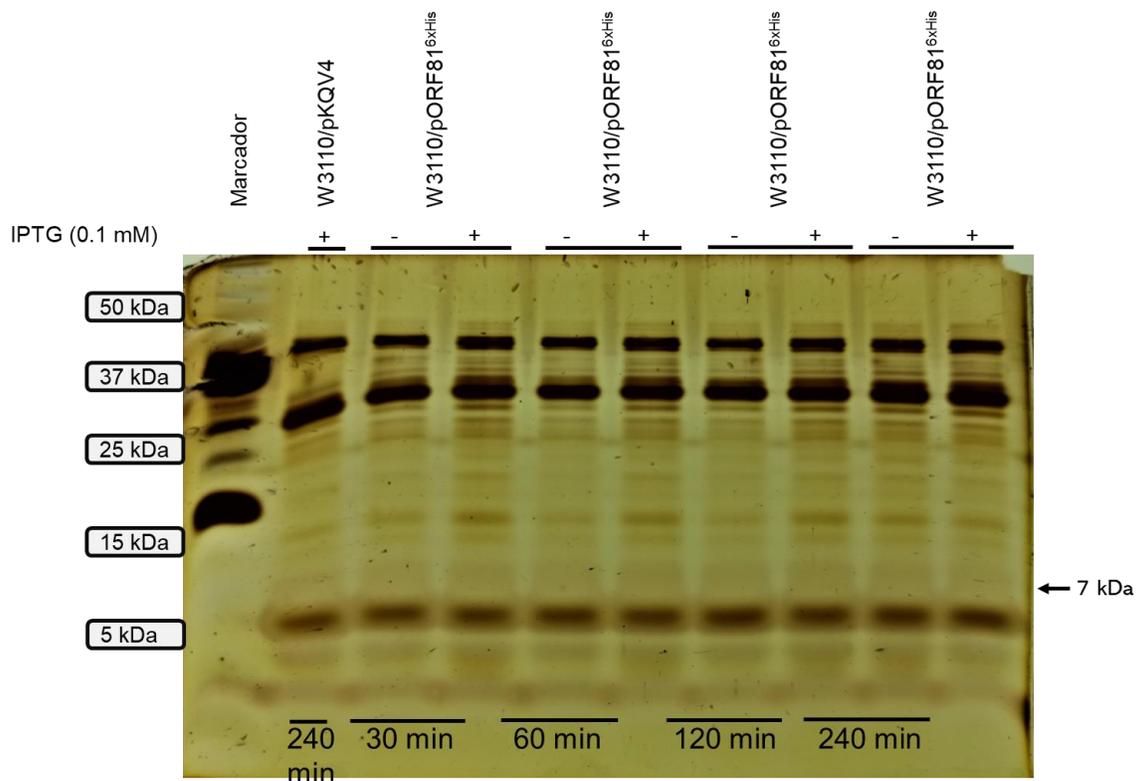
Con la finalidad de poder observar la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en cepas *E. coli* W3110/pORF81-6xHis se realizaron ensayos de tinción de plata en geles de proteínas SDS-PAGE, en los cuales se incorporaron muestras de extracciones de proteína total y proteínas de un fraccionamiento celular (soluble e insoluble). Al observar el gel correspondiente a la extracción de proteína total no se observan diferencias en cuanto a la banda esperada (~7.2 kDa) correspondiente a la proteína Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis, sin embargo, algunas otras proteínas, de distintos tamaños, si presentan una mayor concentración en presencia de IPTG (0.1 mM), en comparación con las que no contienen inductor, o el control con el vector vacío (pKQV4), conforme aumenta el tiempo (Figura 17).



**Figura 17. Tinción con plata de gel de proteínas.** Correspondiente a un lisado y extracción de proteína total. Efecto de la inducción de IPTG 0.1 mM en bacterias W3110/pORF81<sup>6xHis</sup> a distintos tiempos (30, 60, 120 y 240 minutos). Flecha negra indica el peso esperado de Lpp<sup>mEp021</sup> en kDa.



Por otra parte, el gel correspondiente a la extracción de proteína de la fracción soluble no presentó ningún cambio en la banda esperada para la lipoproteína, así como la mayoría de las bandas no cuentan con una diferencia de expresión ni con el paso del tiempo, ni con la inducción de IPTG. Algunas bandas como las correspondientes a los tamaños de: 5 kDa, 15 kDa, 20 kDa y 30 kDa, cuentan con una mayor expresión entre muestras sin inducir y al ser inducidas con IPTG, sin embargo, se encuentran de igual manera en el control del vector pKQV4, por lo que se descarta la posibilidad de que sea la proteína de interés (Figura 18).

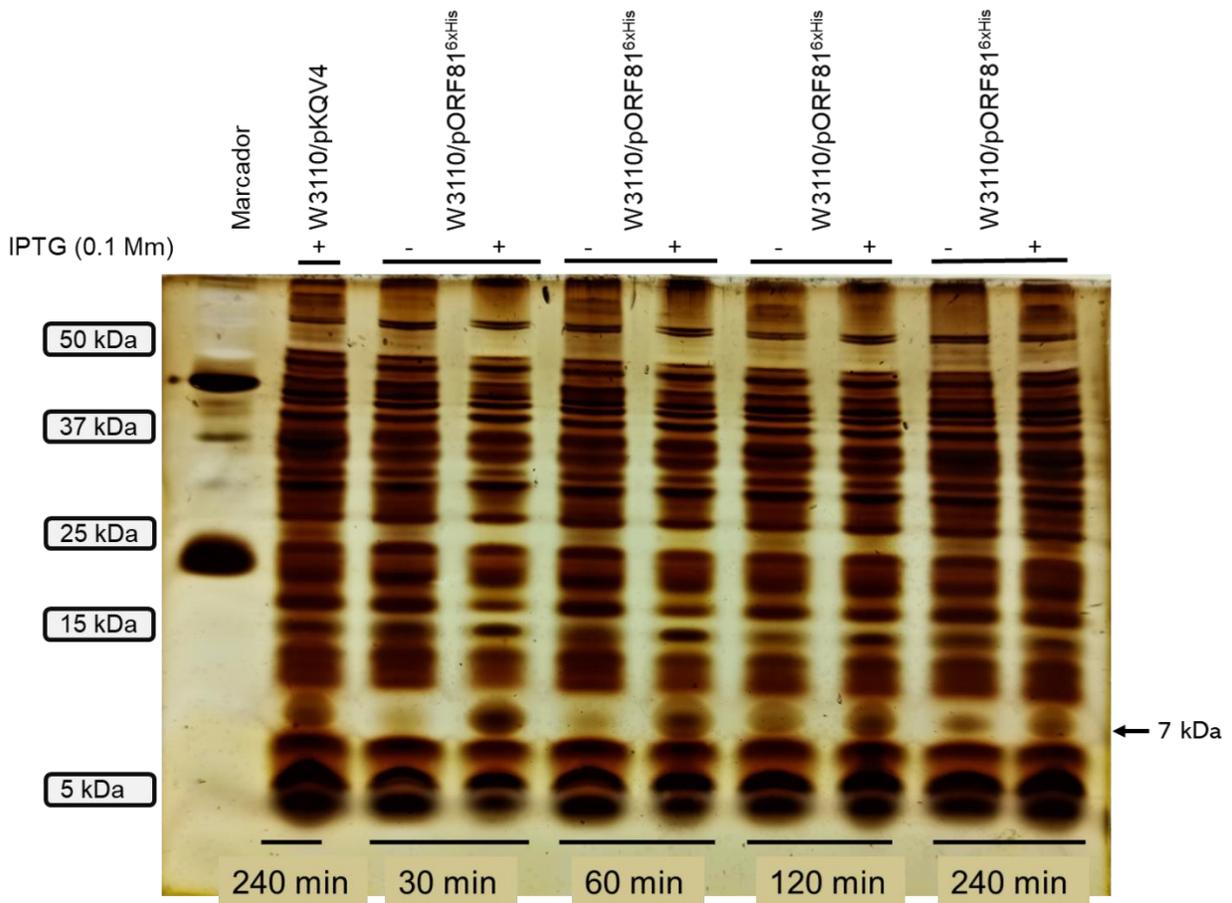


**Figura 18. Tinción con plata de gel de proteínas de la fracción celular soluble.** Efecto de la inducción de IPTG 0.1 mM en bacterias W3110/pORF81<sup>6xHis</sup> a distintos tiempos (30, 60, 120 y 240 minutos). Flecha negra indica el peso esperado en kDa de Lpp<sup>mEp021</sup>.

Por último, en el gel correspondiente a la extracción proteica de la fracción celular insoluble se observa una banda con el tamaño esperado y que representa una mayor concentración al inducir las muestras con IPTG y su mayor concentración se encuentra posterior a 30 minutos de cultivo. Sin embargo, nuevamente se encuentra la misma banda en el carril correspondiente al control de expresión (pKQV4), por lo que se concluye que se trata de una proteína celular. No obstante, existe la



posibilidad de que la técnica no cuente con la sensibilidad adecuada para detectar la proteína  $Lpp^{mEp021}$ , o que algunas de las proteínas bacterianas cuenten con un tamaño similar al esperado ( $\sim 7.2$  kDa) y se encuentren modificando el fondo, por lo que no se puede observar la expresión diferencial, o incluso, la presencia de la lipoproteína (Figura 19).



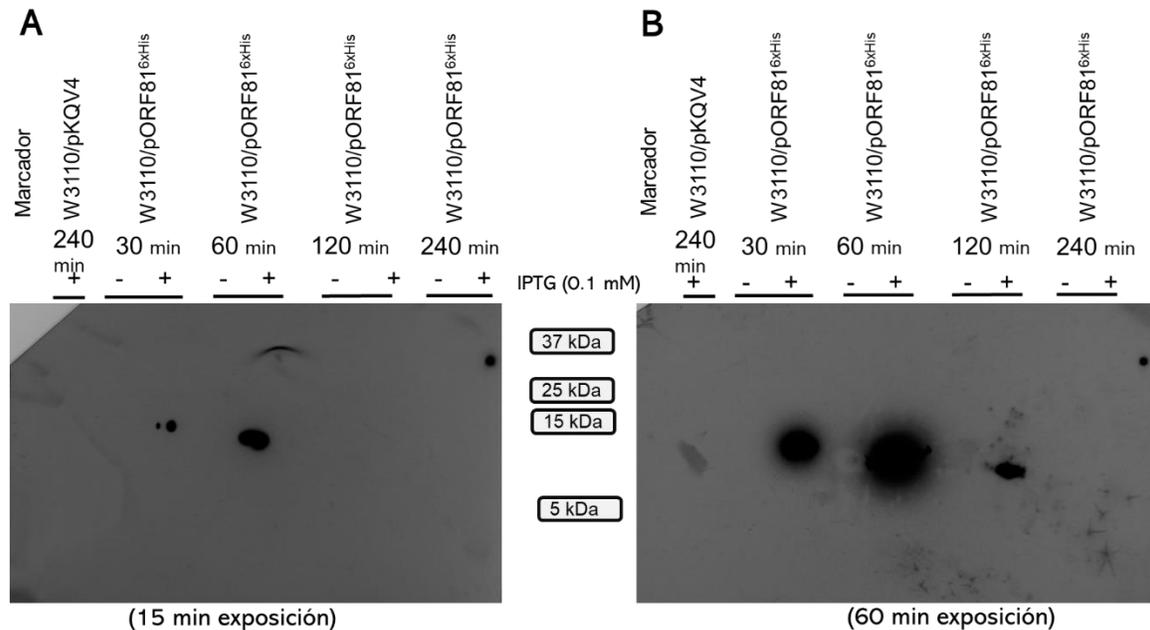
**Figura 19. Tinción con plata de gel de proteínas de la fracción celular insoluble.** Efecto de la inducción de IPTG 0.1 mM en bacterias W3110/pORF81<sup>6xHis</sup> a distintos tiempos (30, 60, 120 y 240 minutos). Flecha negra indica el peso esperado en kDa de  $Lpp^{mEp021}$ .

### 8.5.2. Inmunodetección de $Lpp^{mEp021}$ por Western-blot

Como primer resultado de la detección de la lipoproteína por Western-blot a partir de la extracción total de proteína celular, se puede observar que a partir de los 30 minutos es posible observar la presencia de la proteína, solamente cuando esta es inducida con IPTG 0.1 mM, alcanzando la mayor concentración tras una hora de inducción, de manera contrastante, a las 4 horas no es posible observar ninguna



banda correspondiente al tamaño esperado, por lo que puede existir algún mecanismo celular que este inhibiendo su expresión (Figura 20).

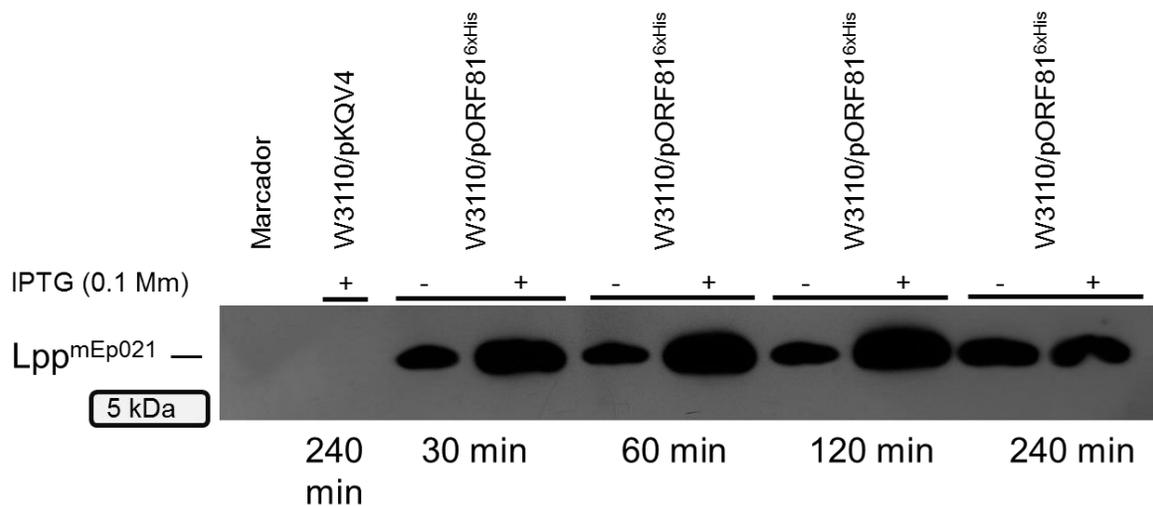


**Figura 20. Expresión e inmunodetección de la lipoproteína  $Lpp^{mEp021}$ .** En W3110 utilizando el anticuerpo 6xHis-tag (1:3000), resultado correspondiente a la extracción total de proteína celular. A) 15 minutos de exposición de la membrana. B) 60 minutos de exposición de la membrana. Peso aproximado de la proteína esperada de 7.2 kDa

Respecto a la inmunodetección de la fracción celular soluble, no se pudo observar ninguna banda en ningún tiempo, ni al tratar la muestra con IPTG, aun posterior a 60 minutos de exposición, lo que permite deducir que la lipoproteína no se encuentra en el citoplasma bacteriano desde los 30 minutos y hasta al menos 4 horas de cultivo (resultado no mostrado). Por el contrario, y de manera contrastante, en la fracción insoluble con 15 segundos de exposición se pudieron observar las bandas en todos los tiempos (de 30 minutos en adelante), incluso en las muestras que no fueron inducidas con IPTG (Figura 21), indicando que la fuga transcripcional del mRNA que expresa la lipoproteína es suficiente para poder ser detectada por Western-blot. Estos resultados se encuentran acordes con lo observado en los ensayos de infección/exclusión, donde cultivos no inducidos pueden excluir la infección de fago mEp021 (Tabla 5). Estos resultados sugieren la existencia de una fuga transcripcional de  $Lpp^{mEp021}$  en el vector de clonación pKQV4. Al comparar las bandas correspondientes a las muestras que no fueron inducidas, se puede



observar un claro efecto del IPTG con respecto a la expresión de la lipoproteína, las muestras inducidas cuentan con las bandas de mayor tamaño, alcanzando la concentración máxima a las dos horas. Interesantemente, contrario a lo esperado de que la mayor concentración fuese a las 4 horas de inducción, se observa una disminución en el tamaño de la banda, coincidiendo con lo observado en la extracción total de proteínas. Estos resultados sugieren que las proteínas de Lpp se encuentran en los restos membranales de la célula y al solubilizar la proteína que contiene el TAG de Histidinas se encuentra accesible a los anticuerpos.

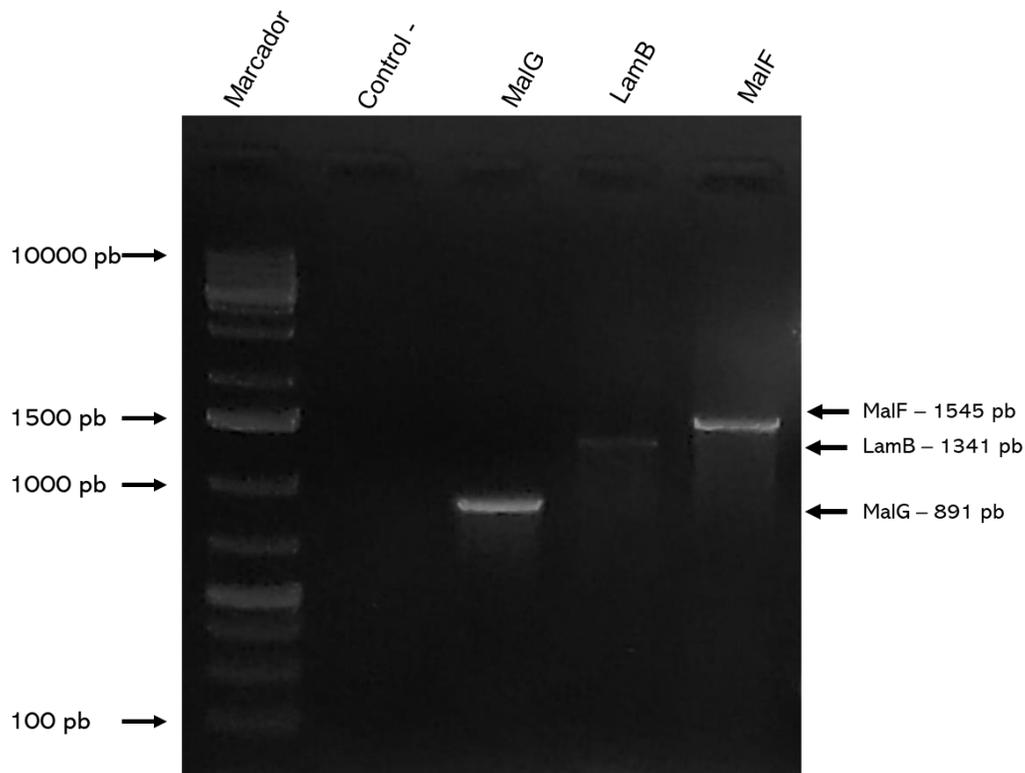


**Figura 21. Western blot de Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis en la fracción insoluble.** Expresión de la lipoproteína en W3110, detectada con 1:3000 del anticuerpo primario (6xHis), 1:3000 anticuerpo secundario (anti-ratón). Tiempo de exposición 15 segundos.

## 8.6. Construcción de plásmidos complementarios a las cepas Keio (*malG*, *malF* y *lamB*)

### 8.6.1. Amplificación de los genes de proteínas de membrana

Con los oligonucleótidos diseñados (presentados en la Tabla 4) se amplificó por PCR las secuencias correspondientes a los genes de las proteínas, a partir de la extracción de los genomas de las cepas W3110 y DH5 $\alpha$ . Como se observa en la Figura 22, las bandas obtenidas corresponden a los genes (*malF*: 1545 pb, *malG*: 891 pb y *lamB*: 1341 pb). A partir de estos resultados se realizó la ligación en el vector de transición pJET1.2/blunt para su posterior clonación en pBAD28 (resistencia a Cloranfenicol<sup>R</sup>) y transformarlas en las bacterias mutantes.



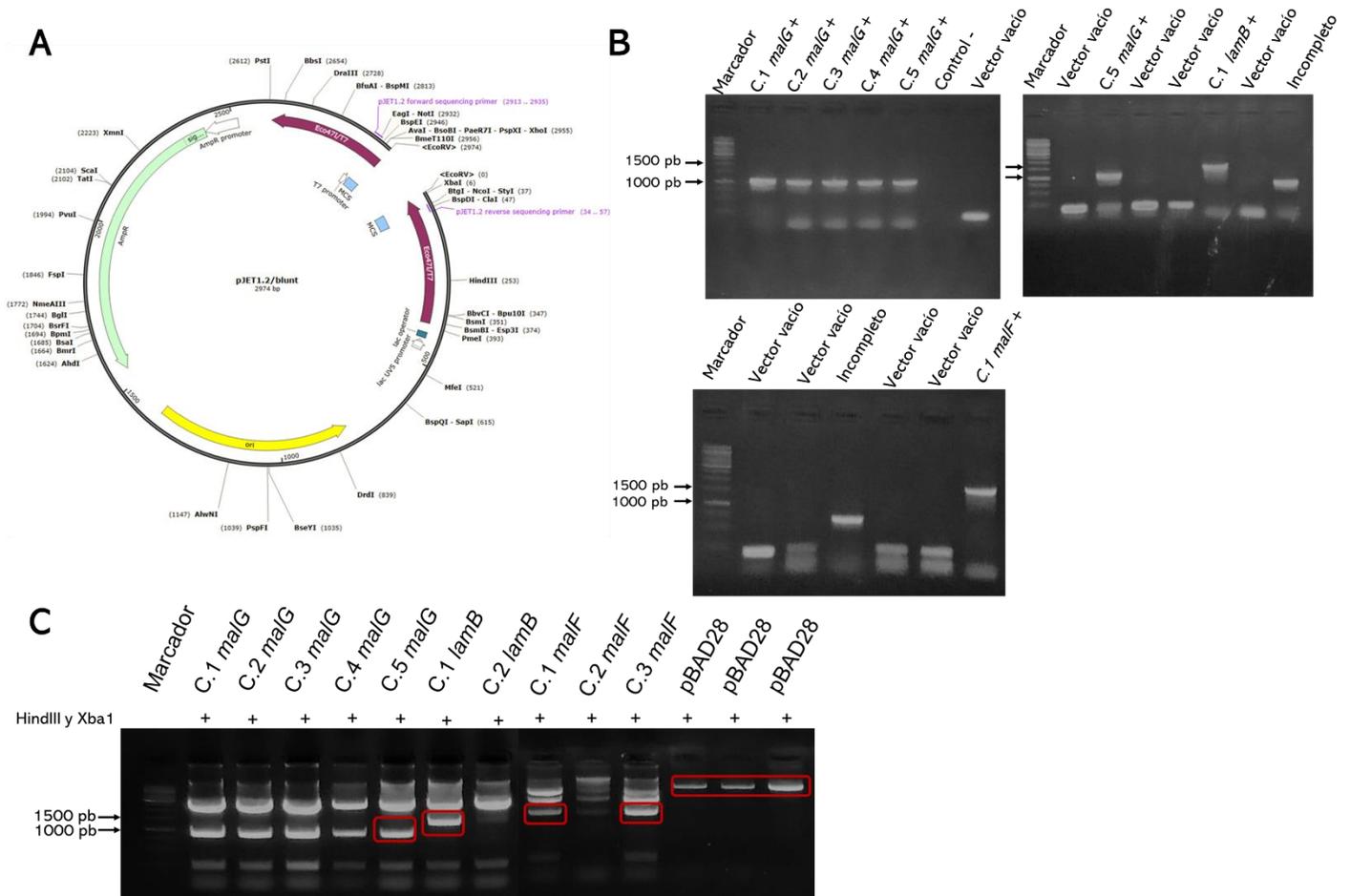
**Figura 22. Amplificación de los genes *malG*, *malF* y *lamB*.** Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de PCR de los genes *malG*, *malF* y *lamB* de la extracción de genoma de W3110. Marcador de peso molecular 1 kb.

#### **8.6.2. Clonación de los genes de proteínas de membrana en el vector pJET1.2/blunt**

Los fragmentos correspondientes a los genes de las proteínas de membrana se clonaron en el vector de transición pJET1.2/blunt, para esto se ligaron y se transformaron bacterias DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, se obtuvieron más de 40 candidatas por cada gen, de las cuales se purificaron 35 de cada una de las clonaciones, de estas se seleccionaron 5 de cada construcción y se les extrajo el DNA plasmídico. Este fue utilizado para realizar ensayos de PCR. Se obtuvieron los amplicones correspondientes a cada gen (*malF* 1545 pb, *malG* 891 pb y *lamB* 1341 pb, más aproximadamente 100 nucleótidos correspondientes a los fragmentos amplificados del plásmido pJET1.2/blunt). Finalmente, para comprobar que los sitios de restricción *HindIII* y *XbaI* se encontraran íntegros, se comprobó la liberación de los insertos correspondientes mediante una doble restricción. Las 5 candidatas para



*malG* liberaron el fragmento esperado, mientras que solo se obtuvo una candidata positiva correspondiente a *lamB* y *malF* (Figura 23B).



**Figura 23. Analisis de candidatas pJET1.2/*malG*, pJET1.2/*lamB* y pJET1.2/*malF*.** A) Mapa *in silico* del vector pJET1.2/blunt, se muestran los posibles sitios de corte por enzimas de restricción, así como los sitios de hibridación de los plásmidos correspondientes. B) Gel de electroforesis al 1% de los productos de PCR de las proteínas de membrana, fragmentos esperados de 1545 pb para *malF*, 1341 pb para *lamB* y 891 pb para *malG*. C) Electroforesis de doble restricción del vector pJET1.2/blunt, de las colonias candidatas, y del plásmido pBAD28, con las enzimas *HindIII* y *XbaI*. Los recuadros rojos indican las bandas que fueron seleccionadas para su posterior purificación y ligación.

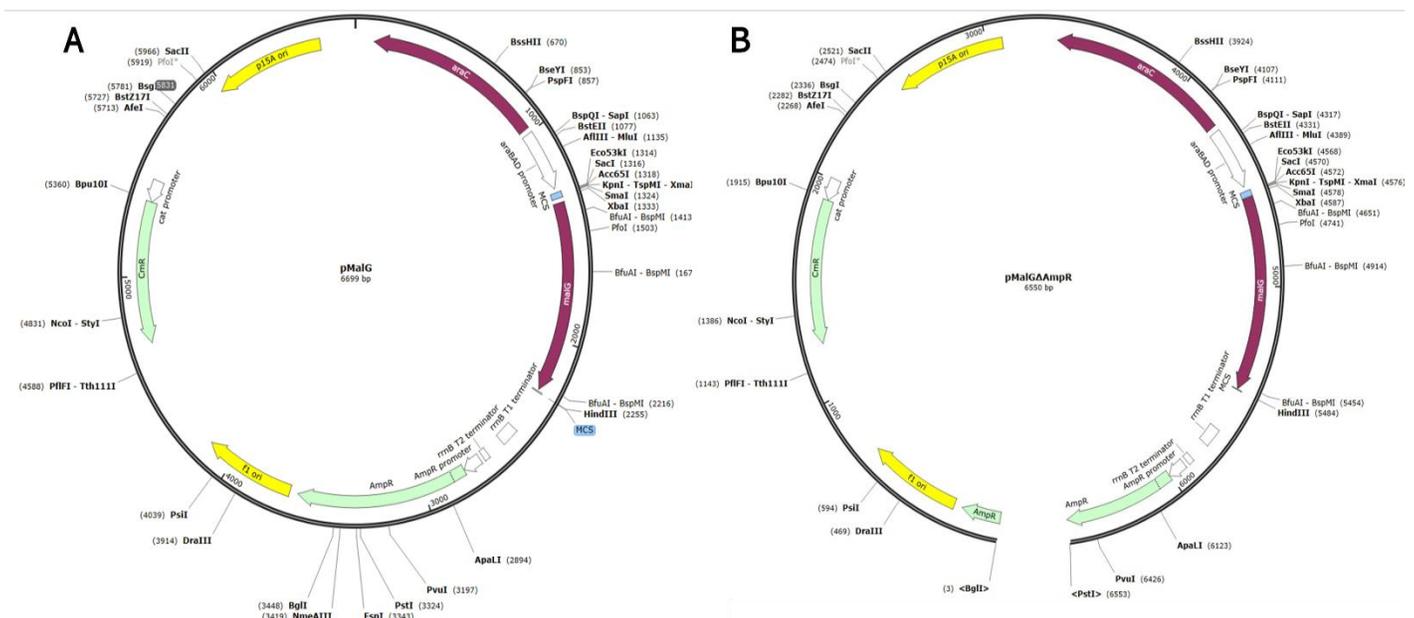
### 8.6.3. Clonación en el vector pBAD28

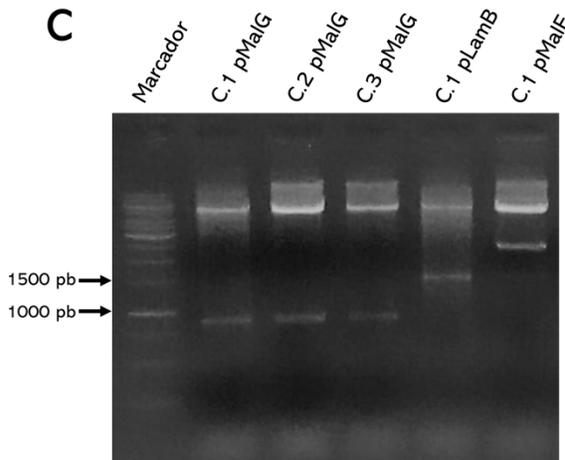
Para la clonación en el vector de expresión pBAD28 se procedió a llevar a cabo la linealización del plásmido con las enzimas *HindIII* y *XbaI* y se ligaron los fragmentos correspondientes a los genes *malG*, *lamB* y *malF*. Estas reacciones se transformaron en bacterias DH5 $\alpha$  en una relación 1:6. Se obtuvieron 3 candidatas



para *malG* y *lamB*, y 2 candidatas para *malF*. De estas se seleccionaron todas las candidatas para *malG* y solo una para *malF* y *lamB*, a las cuales se les extrajo el DNA plasmídico y se comprobó que contuvieran el gen de interés por medio de una doble restricción con *HindIII* y *XbaI*. Todas las colonias candidatas liberaron el fragmento esperado para cada gen (Figura 23C). Además, a partir de estas construcciones se realizó un nuevo ensayo de doble restricción con las enzimas *PstI* y *BglII*, se utilizó la enzima Klenow para rellenar y dejar extremos romos de DNA y se llevó a cabo la ligación, esto con la finalidad de eliminar el gen de resistencia a ampicilina, debido a que la construcción de estos vectores tiene el propósito de ser utilizadas en futuros ensayos junto al plásmido de pORF81 ( $Amp^R$ ). Se muestra un diagrama *in silico* correspondiente a la delección del gen de ampicilina producido por los cortes de las enzimas en el plásmido pBAD28 en la Figura 24B.

Una vez obtenidos los plásmidos de pBAD28/*malG*, pBAD28/*malF* y pBAD28/*lamB* y posterior a comprobar de que se trataban de cepas  $Amp^S$  (creciéndolas en cajas LB sin Ampicilina y complementadas con Ampicilina 100 mg/mL, Cloranfenicol 50 mg/mL y Ampicilina 100 mg/mL-Cloranfenicol 50 mg/mL), se utilizaron para transformar y complementar las cepas mutantes de la colección Keio, las construcciones serán referidas en adelante como pMalG, pMalF y pLamB (Figura 24).





**Figura 24. Características del plásmido pBAD28 y restricción de candidatas pBAD28/malG, malF o lamB.** A) Mapa del vector pBAD28 con el inserto de interés, se muestra la clonación con el gen *malG* como ejemplificación de la posición de los tres genes clonados. B) Mapa predicho del vector pBAD28 tras la delección del gen de resistencia a ampicilina, obtenido *in silico* con el software SnapGene. C) Gel de agarosa 1% de la doble restricción con las enzimas *HindIII* y *XbaI*, de las construcciones de genes de proteínas de membrana en pBAD28.

### 8.7. Ensayos de incorporación de maltosa en células que expresan Lpp<sup>mEp021</sup>

Tras las observaciones de los análisis *in silico* de posibles sitios de “docking” molecular entre Lpp<sup>mEp021</sup> y el complejo MalFGK<sub>2</sub>, y la maltoporina LamB, y teniendo como antecedente los resultados de Martínez-Soto (2018) donde bacterias *malK*, *malF* y *lamB*, en presencia de Lpp<sup>mEp021</sup>, permiten la infección de mEp021, se planteó que la posible interacción pudiese interferir con la función de la translocación de la maltosa (mediada por MalFGK<sub>2</sub> y por LamB). Para esto, se estrilaron diferentes cepas bacterianas, sin vector (-), con vector vacío (pKQV4) y conteniendo la lipoproteína, de sus variantes (pORF81, pORF81-6xHis y pORF81-mCherry), en medio selectivo MacConkey adicionado con maltosa a una concentración de 29.2 mM. Como se puede apreciar en la Tabla 9 y Anexo 11. A esta concentración de maltosa la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> al parecer no interfiere con la asimilación de maltosa en las cepas silvestres para los genes *mal*.

Es necesario señalar que se esperaba que las colonias de la cepa W3996 (*lamB*) fuesen incoloras, sin embargo, estas presentaron un fenotipo rosa (Anexo 12), lo que indica que pueden incorporar la maltosa. Esto podría ser explicado por los trabajos de Dargen *et al.* (1987), en donde otros canales de membrana externa, como OmpF y OmpC, pueden facilitar la difusión pasiva de maltosa, por otras porinas en un gradiente más bajo y con menor especificidad molecular en comparación con LamB; además Martonosi *et al.* (2012) describen que solo a partir de concentraciones menores a 10  $\mu$ M de maltosa se presentan fenotipos que



destaquen la ausencia de LamB. Sin embargo, los ensayos de infección por goteo del fago  $\lambda$ , en un tapiz bacteriano con esta cepa JW3996,  $\lambda$  fue incapaz de infectar, lo que sugiere que la cepa se trata de una *lamB<sup>-</sup>* como se muestra en la imagen 12 del anexo.

**Tabla 9. Ensayos de incorporación de maltosa en distintas cepas.** Coloración de las colonias presentes de distintas cepas en un medio sólido de MacConkey adicionado con maltosa a 29.2 mM. La coloración roja indica la incorporación y metabolización de la maltosa disponible en el medio, mientras que una colonia blanca indica que no se metabolizó maltosa en la célula. (**R**) colonia roja, (**B**) colonia blanca. N=3. Los recuadros rojos resaltan los datos de mayor relevancia.

Cepas	Plasmido	Coloración									
		WT		pKQV4		pORF81		pORF81-6xHis		pORF81-mCherry	
		IPTG (0.1 mM)		IPTG (0.1 mM)		IPTG (0.1 mM)		IPTG (0.1 mM)		IPTG (0.1 mM)	
W3110		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
DH5 $\alpha$		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BW25113		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MalG <sup>-</sup>	(JW3993)	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
MalF <sup>-</sup>	(JW3992)	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
MalK <sup>-</sup>	(JW3995)	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
LamB <sup>-</sup>	(JW3996)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
FhuA <sup>-</sup>	(JW0146)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OmpA <sup>-</sup>	(JW0146)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OmpC <sup>-</sup>	(JW2203)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
OmpF <sup>-</sup>	(JW0912)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

### 8.8. Ensayos de incorporación de maltosa en cepas Keio complementadas

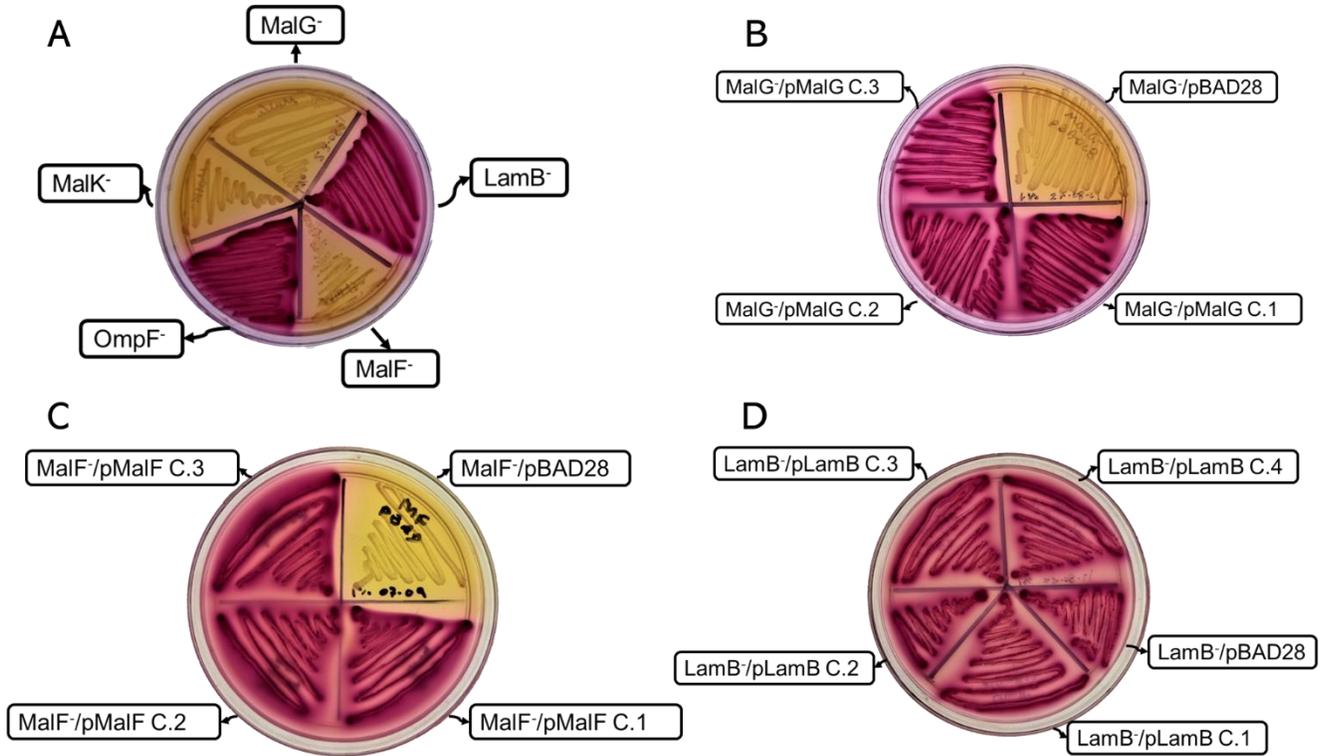
Una forma de constatar la integridad y funcionalidad fisiológica de las construcciones realizadas, que contienen los genes que expresan las proteínas de membrana, y que se encuentran deletadas en las bacterias de las cepas Keio, es a través de ensayos de incorporación de maltosa. Como se presentó en los resultados anteriores, las cepas JW3993 (*malG<sup>-</sup>*), JW3992 (*malF<sup>-</sup>*) y W3995 (*malK<sup>-</sup>*) presentan una coloración blanca, esta incapacidad de incorporar la maltosa fue revertida cuando las bacterias fueron transformadas con las construcciones plasmídicas que contienen el gen silvestre. Se transformó como control el vector vacío, el cual no presentó ningún efecto sobre la coloración de la bacteria, lo cual nos permite inferir que las construcciones de pMalG y pMalF son funcionales fisiológicamente, por la



incorporación de maltosa. De igual forma y acorde a los resultados observados con la cepa W3996 (*lamB*), la bacteria presentó una coloración roja al crecer en el medio selectivo de MacConkey-maltosa, por lo que no es posible determinar por este medio la integridad y funcionalidad de la construcción pLamB a través de este ensayo (Tabla 10 y Figura 25).

**Tabla 10. Coloración de las bacterias de la cepa Keio complementadas.** Se muestran resultados al ser transformadas con su plásmido complementario en un medio sólido de MacConkey adicionado con maltosa a 29.2 mM. La coloración roja indica la incorporación y metabolización de la maltosa disponible en el medio, mientras que una colonia blanca indica que no se incorporó maltosa en la célula. (R) colonia roja, (B) colonia blanca. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. (ND) indica no determinado.

		Coloración									
Cepas	Plásmido	-		pBAD28		pMalG		pMalF		pLamB	
	Arabinosa 0.2%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
W3110		R	R	R	R	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
MalG <sup>-</sup>		B	B	B	B	B	R	N/D	N/D	N/D	N/D
MalF <sup>-</sup>		B	B	B	B	N/D	N/D	B	R	N/D	N/D
LamB <sup>-</sup>		R	R	R	R	N/D	N/D	N/D	N/D	R	R



**Figura 25. Ensayos de incorporación de maltosa en bacterias mutantes complementadas.** Placas correspondientes a los ensayos de incorporación de maltosa en medio selectivo MacConkey complementado con maltosa a una concentración de 29.2 mM. A) Caja correspondiente al estriado distintas cepas pertenecientes a la colección Keio. B) Cepa *malG* transformada con la construcción complementaria y el vector vacío (pBAD28). C) Cepa *malF* transformada con la construcción complementaria y el vector vacío (pBAD28). D) Cepa *LamB* transformada con la construcción complementaria y el vector vacío (pBAD28). La coloración blanca se debe a la incapacidad de asimilar el carbohidrato adicionado (maltosa), mientras que la coloración roja indica que se fermenta el carbohidrato adicionado lo que ocasiona una disminución del pH y la coloración de las colonias rosadas o rojas.

Como parte del estudio sobre la posible interacción entre la lipoproteína  $Lpp^{mEp021}$  y las proteínas de membrana interna, MalG y MalF, y externa LamB, un ensayo importante requería de una doble transformación en las cepas mutantes. Una vez observado que los plásmidos podían revertir la incapacidad de incorporar maltosa, se utilizaron los plásmidos que confieren la capacidad de excluir al fago mEp021 (pORF81, pORF81-6xHis y pORF81-mCherry). Se adicionaron los plásmidos pKQV4 y pORF81-6xHisW71C como controles negativos. Interesantemente, se puede observar que, al expresar simultáneamente la proteína de membrana y la lipoproteína  $Lpp^{mEp021}$  (pORF81) se pierde la capacidad de incorporar maltosa y se obtiene una coloración de colonia blanca, en ambos casos; *malG*/pMalG/pORF81

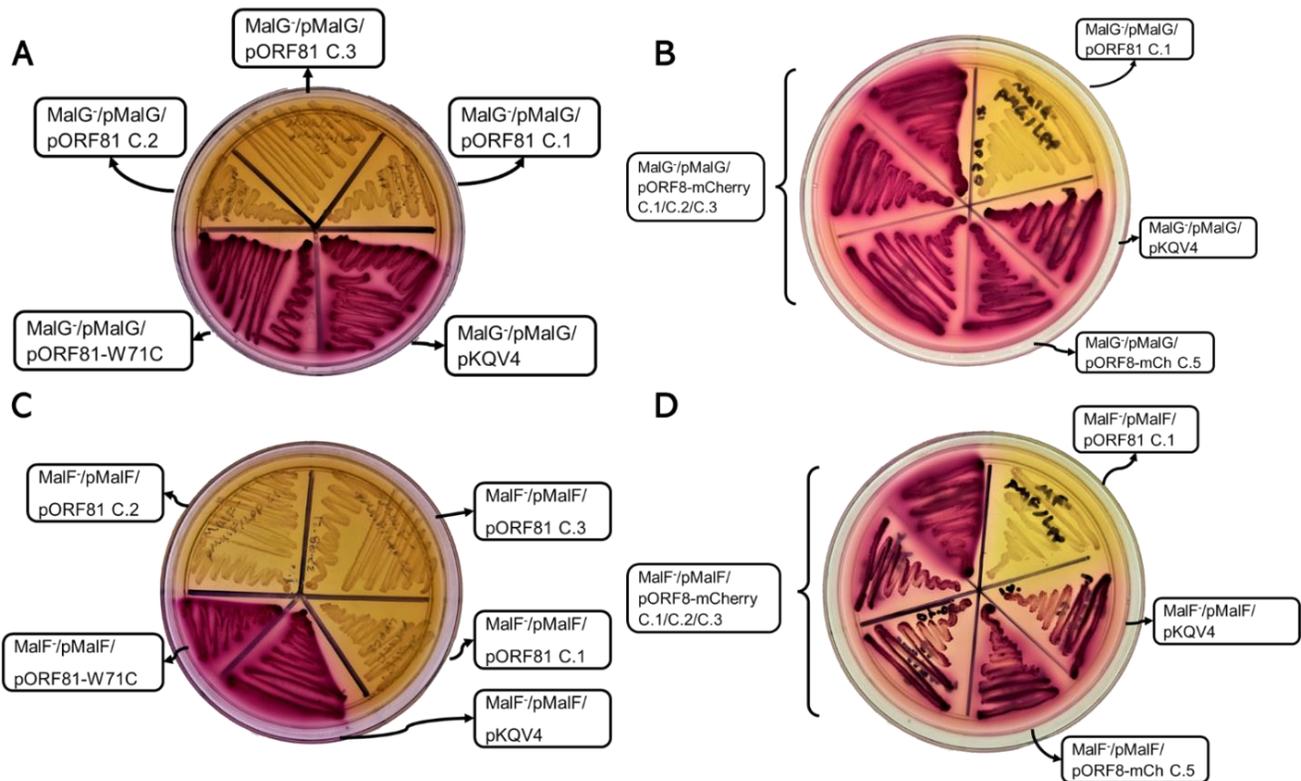


y *malF*/pMalF/pORF81. Sin embargo, esto no es así para las lipoproteínas con alguna modificación en el extremo carboxilo terminal, donde no se observa una modificación en la coloración de la colonia, en ninguno de los casos (Tabla 11 y Figura 26).

Estos resultados sugieren que, de alguna forma, el extremo carboxilo de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> puede estar interfiriendo con la función adecuada de las proteínas de membrana interna, esto al expresarse simultáneamente (ambos por vectores de clonación).

**Tabla 11. Coloración de las bacterias de la cepa Keio complementada y con Lpp<sup>mEp021</sup>.** Se muestran los resultados al ser transformadas con el plásmido de expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> (pORF81) y el plásmido complementario, en un medio sólido de MacConkey adicionado con maltosa a 29.2 mM. La coloración roja indica la incorporación y metabolización de la maltosa disponible en el medio, mientras que una colonia blanca indica que no se incorporó maltosa en la célula. (**R**) colonia roja, (**B**) colonia blanca. N=3. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. (Ver anexo 15).

Maltosa 1% Arabinosa 0.2% Cepas	Plásmido	Coloración				
		pKQV4	pORF81	pORF81 -6xHis	pORF81 -6xHisW71C	pORF81 -mCherry
W3110		R	R	R	R	R
MalG <sup>-</sup> (JW3993)		B	B	B	B	B
MalG <sup>-</sup> /pMalG		R	B	R	R	R
MalF <sup>-</sup> (JW3992)		B	B	B	B	B
MalF <sup>-</sup> /pMalF		R	B	R	R	R



**Figura 26. Ensayos de incorporación de maltosa al expresar dos vectores de clonación.** Placas correspondientes a los ensayos de incorporación de maltosa en medio selectivo MacConkey complementado con maltosa a una concentración de 29.2 mM. A) Caja correspondiente a la cepa *malG* al expresar dos vectores de clonación, por una parte, la construcción complementaria y construcciones de  $Lpp^{mEp021}$ , se adicionaron los vectores vacíos; pKQV4 y pORF81-W71C, como controles negativos. B) Caja correspondiente a la cepa *malG* al expresar dos vectores de clonación, la construcción complementaria y el vector de pORF81-mCherry, se adicionó el vector vacío pKQV4 como control negativo y pORF81 como control positivo. C) Caja correspondiente a la cepa *malF* al expresar dos vectores de clonación, por una parte, la construcción complementaria y construcciones de  $Lpp^{mEp021}$ , se adicionaron los vectores vacíos; pKQV4 y pORF81-W71C, como controles negativos D) Caja correspondiente a la cepa *malF* al expresar dos vectores de clonación, la construcción complementaria y el vector de pORF81-mCherry, se adicionó el vector vacío pKQV4 como control negativo, y pORF81 como control positivo.

### 8.9. Ensayos de infección/exclusión en cepas Keio complementadas

Finalmente, se había planteado la hipótesis de que una vez teniendo las construcciones que contienen los genes que codifican para las proteínas de membrana de las cepas Keio de interés (por complementación), y al expresarse junto a  $Lpp^{mEp021}$ , se recuperaría la exclusión a la infección, pues las cepas estarían comportándose como la cepa silvestre *E. coli* W3110. Sin embargo y de manera contraria a lo esperado, cuando se expresan en las cepas mutantes ambos



plásmidos (pORF81 y pMalG) o (pORF81 y pMalF), ¡mEp021 fue capaz de infectar en ambas bacterias!, similar a lo observado inicialmente cuando se transforman las cepas mutantes (*malG* y *malF*) solamente con el plásmido pORF81 que expresa la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> (Tabla 5).

De modo similar se observa que al utilizar la lipoproteína con seis Histidinas en el extremo carboxilo (pORF81-6xHis) esta pierde su actividad de exclusión (el fago mEp021 es capaz de infectar) (Tabla 12), contrario a lo observado previamente (Tabla 6), cuando las cepas mutantes están transformadas con el vector pORF81-6xHis (exclusión). Resulta interesante esta observación debido a que, en relación con los resultados de incorporación de maltosa, la proteína Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis no altera la función de asimilación de la proteína de membrana, pero si se ve modificada la función de la lipoproteína para llevar a cabo la exclusión del fago mEp021 (Anexo 13 y 16). No obstante, el comportamiento de la lipoproteína que contiene el inserto correspondiente a la proteína mCherry conservó la capacidad en su totalidad de excluir al fago (Tabla 12) y a su vez no afectó en su totalidad la asimilación de la maltosa en las cepas complementadas (Tabla 11), estos resultados sugieren que la posible interacción se pudiera ir perdiendo debido a la adición de péptidos de gran tamaño (para mCherry de 26.7 kDa), lo que daría lugar así a una cepa capaz de incorporar maltosa, y a su vez, excluir al fago mEp021 (Tabla 12 y Anexo 14 y 15).



**Tabla 12. Ensayos de infección/exclusión en cepas mutantes Keio (MalG- y MalF-) al ser complementadas.** Se muestran los resultados al expresar plásmidos con las distintas construcciones disponibles para Lpp<sup>mEp021</sup>. (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=2. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. Solo se utilizó arabinosa a una concentración de 0.2% para la inducción del promotor de pBAD28, mientras que los plásmidos correspondientes a la lipoproteína se utilizaron sin inducción de IPTG.

Cepas	Arabinosa 0.2 %		Plásmido				Bacteriófago
	-	pKQV4	pORF81	pORF81-6xHis	pORF81-mCherry	pORF81-W71C	
	mEp021	mEp021	mEp021	mEp021	mEp021	mEp021	
W3110	+	+	-	-	-	+	
MalF (JW3992)	+	+	+	-	-	+	
MalF/pBAD28	+	+	+	-	-	+	
MalF/pMalF	+	+	+	+	-	+	←
MalG (JW3993)	+	+	+	-	-	+	
MalG/pBAD28	+	+	+	-	-	+	
MalG/pMalG	+	+	+	+	-	+	←

Debido a que en los ensayos de incorporación de maltosa no fue posible determinar si la construcción correspondiente a pLamB era correcta, se decidió comprobar su funcionalidad por medio de ensayos de infección/exclusión, con la hipótesis de que al inducir la expresión de la proteína de membrana externa (maltoporina) por medio del vector de clonación pBAD28/*lamB*, se podría recuperar la capacidad de infección del fago  $\lambda$ , y cuyo receptor primario es la proteína LamB. Brevemente, se puede observar que solamente cuando la cepa mutante (*lamB*) es complementada con el plásmido correspondiente (pLamB) y este es inducido con una concentración de arabinosa al 0.2%, el fago  $\lambda$  adquiere la capacidad de infectar a la bacteria (Tabla 13). Lo que demuestra que la construcción pLamB es correcta y funcional.

Más imágenes correspondientes a las cajas y placas de infección se pueden consultar en la figura del anexo 15.



**Tabla 13. Ensayos de infección/exclusión en la cepa mutante LamB- complementada.**

Se muestran resultados al ser transformada con el vector vacío (pBAD28) y con la construcción complementaria. (+) Infección del fago, (-) Sin infección del fago. N=2. Las flechas negras y recuadros rojos resaltan los datos de mayor importancia. Se utilizó arabinosa a una concentración de 0.2% para la inducción del promotor ubicado en pBAD28.

Cepas	Plásmido		pBAD28						pLamB						
	-		-		+		-		+						
	Arabinosa (0.2%)		-		+		-		+						
	Bacteriófagos														
	021	167	λ	021	167	λ	021	167	λ	021	167	λ	021	167	λ
W3110	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
LamB <sup>-</sup> (JW3996)	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+



## 9. Discusión

La identificación de un marco abierto de lectura (ORF81), en el genoma del bacteriófago mEp021, con características de una lipoproteína y con una posible función de exclusión a la superinfección, permitió desarrollar una línea de investigación sobre el mecanismo y la función que esta proteína podía causar en la bacteria lisogénica. En este trabajo, se planteó como objetivo recabar información adicional sobre la existencia de una posible interacción entre Lpp<sup>mEp021</sup> y las proteínas de membrana MalG, MalF y LamB, y como parte de este estudio, el análisis bioinformático inicial nos permitió extender la información sobre algunas características de este péptido.

En esta dirección, una de las observaciones importantes se encuentra en el grado de identidad presente entre las lipoproteínas de los bacteriófagos mEp010, mEp013, mEp044 y mEp554, lo cual nos mostró que están relacionados evolutivamente, indicando un tiempo de divergencia relativamente corto entre estos bacteriófagos, pero con adaptaciones que se han ido estableciendo durante un grado de diversificación lo suficientemente amplio como para poder ser identificados como fagos distintos. Aun cuando existe una alta variación a nivel de nucleótidos y aminoácidos, muchas de las proteínas pueden contar con la convergencia evolutiva, cuyas estructuras proteicas pueden ser compartidas entre fagos de distintas clases (Dion, 2020). Por otra parte, se puede establecer, por la homología estructural obtenida con las herramientas *in silico*, que la posible función es similar entre estos fagos, tal como sería el caso de la clonación de un gen que codifica para una lipoproteína putativa, con la predicción de que la función fuera para la exclusión a la superinfección de todos los demás bacteriófagos. Un ejemplo de esta semejanza es la homología entre la proteína bacteriana Pst con la lisozima del bacteriófago T4, que permite la identificación de un dominio funcional que tiene la lisozima, lo que indica que probablemente se trate de un precursor evolutivo (Patzner, 2012). Si se presentan relaciones con funcionalidad compartida entre proteínas de bacterias y bacteriófagos, es más factible hallarlas en bacteriófagos.



Debido a los ensayos de exclusión por Lpp<sup>mEp021</sup> y con los insertos en el extremo carboxilo terminal (pORF81-6xHis, pORF81-mCherry) se observó que no solamente tuvieron la capacidad de excluir la infección de mEp021 en cepas *E. coli* W3110, sino que fueron capaces de revertir el fenotipo de exclusión a la superinfección en las cepas mutantes Keio (*malG*, *malF* y *lamB*), por lo que resulta de gran interés extender y entender el mecanismo por el cual se pueden originar estas exclusiones. Una de las ideas que se pueden desarrollar a partir de estos hallazgos, y considerando las características electrostáticas que pueden conferir, por una parte, los seis aminoácidos de carga positiva, o una proteína fluorescente con estructura de barril beta en el extremo C-terminal, es la modificación o alteración de la posición en la cual la proteína ocupara una mayor área y una alteración en la estructura que ahora no le permitiera interactuar con las proteínas originales. Existe evidencia de una lipoproteína de exclusión a la superinfección (Ltp<sub>TP-J34</sub>) que, al contar con una deleción en su sitio de anclaje lipídico, aumenta su rango de hospedero-exclusión a fagos que pertenecen a otras especies de bacterias de *Lactococcus*, pudiendo excluir ahora a los fagos P335 y P001, indicando que el dominio activo de la proteína puede contar con un amplio espectro de resistencia a bacteriófagos (Bebeacua, 2013). Estas observaciones podrían explicar porque algunas modificaciones en extensión que son realizadas directamente sobre Lpp<sup>mEp021</sup> están modificando su fenotipo de exclusión, asimismo, resulta tentadora la idea de que las modificaciones en el rango de exclusión pudiesen ser aditivas en estas lipoproteínas de Lpp<sup>mEp021</sup>, no obstante, es necesario una mayor investigación al respecto.

De manera contraria, se cuenta con el ejemplo de la lipoproteína, expresada a partir del vector de clonación pORF81-6xHisW71C, cuya modificación del cambio de aminoácido de un Triptófano por una Cisteína en la posición 71, suprime su actividad de exclusión. Esto puede ser explicado al menos por dos posibilidades: 1) El aminoácido de Triptófano es esencial en la lipoproteína para poder llevar a cabo su función, ya sea que su pérdida impidiera la interacción proteína-proteína con algún factor implicado en la exclusión o con alguna de las posibles proteínas Tol (Cascales, 2002), o 2) Debido a que el cambio del aminoácido de la Cisteína en la posición 71 de Lpp<sup>mEp021</sup> promovería la formación de un posible puente de disulfuro



entre la otra cisteína de Lpp. Este puente de disulfuro causaría un plegamiento aberrante y por lo tanto no funcional, inclusive podría alterar la posible interacción con las proteínas MalG y MalF, en membrana interna y con LamB, en membrana externa. Sin embargo, se requerirá de una mayor investigación para poder entender adecuadamente el proceso de infección de mEp021, así como el mecanismo por el cual la lipoproteína puede excluir la infección del fago.

La importancia de entender el procedimiento y mecanismo de acción de la lipoproteína es medular, debido a que la posible interacción con las proteínas de membrana interna MalG y MalF, pudiera ser entendido directamente con el proceso de maduración en membrana interna; solamente las proteínas que cuentan con una señal de anulación de Lol permanecen ancladas en membrana interna, esta señal consiste en una Asparagina ubicada en la posición +2 posterior a la Cisteína (+1), conservada tras el corte por la proteasa LspA. Contrario a esto, para que las lipoproteínas puedan migrar hacia membrana externa deben ser reconocidas por el complejo IM, LolCDE, y transportadas hacia membrana externa en forma de un complejo soluble por la chaperona LolA (Yakushi, 2000).

Al considerar las interacciones que existen entre la maltoporina LamB y el complejo MalFGK<sub>2</sub> (Anexo 14 y 15), se puede observar que la proteína MalE/MBP es un punto de conexión entre la proteína LamB y el complejo de membrana interna, MalFGK<sub>2</sub>, sin embargo, se desconoce si esta proteína tiene un rol tanto en el proceso infeccioso de mEp021, como en el proceso de exclusión, pero se presenta como una posibilidad prometedora debido a su función en el transporte de maltosa, pudiendo representar un principio de parsimonia mayor, comparado con el de la exploración de un sistema novedoso por el cual Lpp<sup>mEp021</sup> pudiera ser transportada a membrana externa. Por lo que identificar la participación de la proteína MalE en este fenómeno podría aclarar algunos aspectos que por ahora permanecen inciertos o son poco entendidos.

En referencia a las proteínas de membrana, resulta conveniente indagar sobre los resultados obtenidos en los ensayos de infección/exclusión con la cepa mutante Keio (*ompC*) (requiriendo ser comprobada). Hasta el momento es de nuestro



conocimiento que el receptor principal de mEp021 es la proteína OmpA (datos no publicados), pero al identificar una disminución en el título viral en cepas *ompC* nos permite hipotetizar y se puede sugerir que esta proteína tiene algún rol de significancia en el proceso infeccioso del bacteriófago, específicamente pudiendo desempeñarse como un receptor secundario. Los receptores secundarios suelen estar relacionados con la adsorción del fago, permitiendo una unión a la superficie de la membrana celular por medio de receptores específicos, lo cual fue observado con mutantes del bacteriófago T4 (Tétart, 1996). En este sentido se ha observado que en la infección del bacteriófago T4 existe una correlación entre la proteína OmpC en conjunto con estructuras de lipopolisacáridos, indicando que el fago T4 puede unirse tanto a cadenas de azúcar como proteínas, aparentemente estas estructuras de polisacáridos facilitan el reconocimiento de la proteína de membrana OmpC como un receptor (Washizaki, 2016). Por otra parte, estudios recientes utilizando inserciones con transposones (para el descubrimiento de receptores nuevos) identificaron que 3 de 5 bacteriófagos (seleccionados aleatoriamente), reconocieron de alguna forma la proteína OmpC como receptor ¿Dónde fue desarrollándose esta selección? Probablemente se debió a la abundante cantidad y disponibilidad de esta proteína en la superficie de membrana externa (Kortright, 2020), la proteína OmpC al ser una de las proteínas con mayor expresión (207 mil moléculas por célula), junto con OmpA (163 mil moléculas por célula), además de ser proteínas que se encuentran relativamente conservadas entre especies bacterianas (Li, 2014). Tomando esto en consideración hace sentido que el bacteriófago mEp021 pueda hacer uso de las proteínas OmpA y OmpC el proceso de infección, aunque en otro sentido esto indicaría la gran competencia selectiva en utilizar estos receptores. Sin embargo, se requiere de mayor investigación sobre el tema y no corresponde a los objetivos de este trabajo.

Al realizar las extracciones de proteínas de la bacteria *E. coli* W3110/pORF81-6xHis (indistintamente si este vector se encontraba inducido con IPTG) aparentemente la concentración de Lpp<sup>mEp021</sup> en la bacteria fue muy baja en los ensayos de Western-blot, debido a que el tiempo de exposición de la placa fue muy prolongado (>50 minutos) para poder observar las bandas correspondientes o en su defecto, utilizar



soluciones capaces de detectar concentraciones femtomolares (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate), se supuso primeramente que la lipoproteína estaba formando cuerpos de inclusión por lo que no podía ser detectada. Al realizar el fraccionamiento celular se pudo observar la expresión diferencial de Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis considerando la posibilidad de que la proteína se encontrara en forma de agregados proteicos, o, que se pudiese encontrar en los restos membranales, lo cual coincidió con lo esperado; debido a su naturaleza proteica, de lipoproteína (Labrie, 2010).

Aunado a esto, la expresión inducida del vector que contiene a Lpp<sup>mEp021</sup> produce una disminución en el crecimiento exponencial bacteriano, además de la pérdida de viabilidad celular. En este sentido, se tienen reportes que indican que los cuerpos de inclusión son estructuras dinámicas y reversibles, pudiéndose recuperar la función de las proteínas que formaron los agregados, por medio de chaperonas, o ser eliminadas por un proceso de proteólisis (Villaverde, 2003), e incluso se ha observado que muchos de los cuerpos de inclusión son activos y las proteínas agregadas cuentan con su función específica (García-Fruitós, 2010). Aun cuando estos procesos pudiesen requerir de mecanismos moleculares que controlen y promuevan la formación de estas estructuras, no existe evidencia de que su formación en exceso pudiese estar afectando en gran medida el *fitness* celular. Por otra parte, y especulando, la inducción de la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> podría estar alterando los recursos celulares encargados en: 1) Transcripción y traducción de proteínas esenciales, 2) Mecanismos y complejos encargados en el reconocimiento y transporte de proteínas y biomoléculas que componen y estructuran las membranas celulares, que ya se pueden encontrar alterados debido a la fuga transcripcional presente en el vector pORF81, pero que al ser inducido puede incitar una mayor desregulación. Existe una mayor probabilidad de que el fenotipo observado sea debido a que Lpp<sup>mEp021</sup> comparte vías de expresión y transporte con proteínas de membrana, cuya función como poros para la difusión, entrada o salida, de nutrientes esenciales y expulsión de partículas o residuos tóxicos, que forman parte del metabolismo celular, y por este motivo este causando indirectamente un desbalance en las cantidades adecuadas de proteínas de superficie de membrana,



cuyas deleciones pueden provocar distintas afectaciones (Lin, 2002; Lucena, 2018) Además la expresión de lipoproteínas en bacterias Gram negativas es vital para el mantenimiento bacteriano, la sobreexpresión de Lpp<sup>mEp021</sup> puede conducir también a una menor presencia de lipoproteínas esenciales en membrana y desestabilizar las membranas.

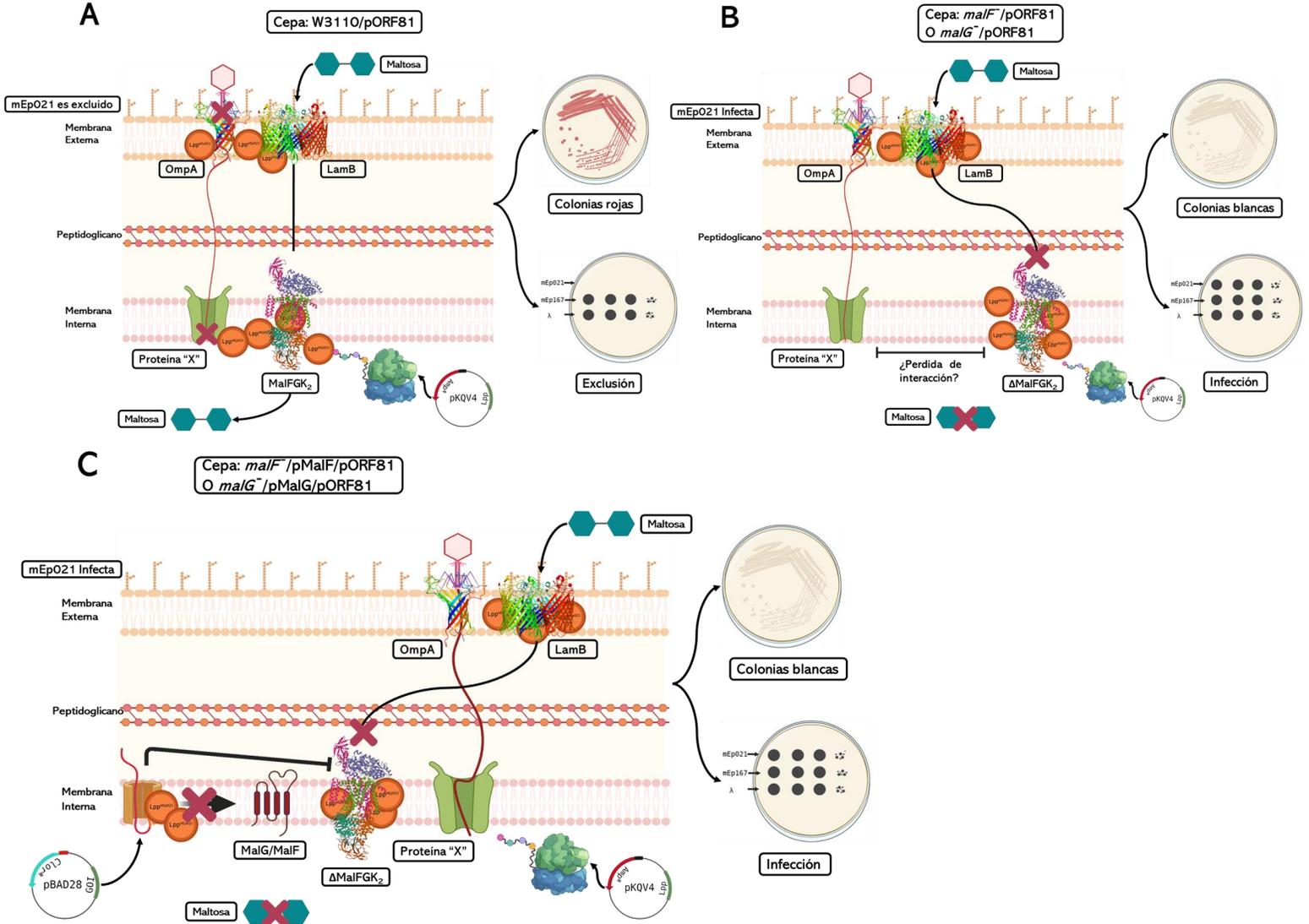
Finalmente, los resultados de mayor importancia en este trabajo están enfocados en la incorporación de maltosa en bacterias mutantes complementadas, que expresan Lpp<sup>mEp021</sup>. Al transformar las cepas mutantes *malG* y *malF* con los plásmidos que expresan las proteínas ausentes, pMalG y pMalF correspondientemente, y al sembrarlas en medio selectivo MacConkey-maltosa se observaron colonias con una coloración rosada o roja, indicando que la formación del complejo MalFGK<sub>2</sub>, en ambos casos, se está conformando adecuadamente y es funcional. Interesantemente, al adicionar el vector pORF81, la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en conjunto con los vectores complementarios (*malG*/pMalG/pORF81 o *malF*/pMalF/pORF81) la coloración de las colonias fue blanca, contrario a lo esperado, aun cuando la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> fue inducido con IPTG, no presentó ningún signo de alteración de la coloración.

Estos datos sugieren que, al expresar ambas proteínas, Lpp<sup>mEp021</sup> y las proteínas de membrana (MalG o MalF) por medio de vectores de clonación, existe un proceso por el cual se está perturbando la estructuración del complejo MalFGK<sub>2</sub>, muy probablemente por la intervención de la lipoproteína. De los primeros experimentos se sabe que pORF81 cuenta con una fuga transcripcional lo suficiente como para que se pueda llevar a cabo la exclusión de la superinfección. La proteína Lpp puede contar con una expresión constitutiva. De manera contraria, las proteínas del complejo MalFGK<sub>2</sub>, requieren de la inducción por arabinosa para que se lleve a cabo su expresión, lo cual, al menos en concentración, representaría una ventaja para la lipoproteína, puesto que ya se encontraría anclada en membrana interna desde antes de que se llevara a cabo el ensayo con las bacterias.

Existen evidencias de que el arreglo espacial del DNA en la bacteria, así como su transcripción, traducción y translocación puede variar dependiendo de la



localización del gen en el genoma (Woldringh, 2002). En un principio la delección de estos genes pudiera estar alterando su disposición en el cromosoma en la bacteria, aunado a esto se desconoce el efecto que pudiera tener la expresión de estos genes por medio de vectores de clonación; esto sugiere que puede existir una alteración, al menos en el proceso de co-traducción y translocación de estas proteínas. De manera breve; el proceso consiste en la traducción de las proteínas y su posterior translocación a través de la membrana plasmática por medio de la partícula de señal de reconocimiento (SRP), el receptor FtsY y el translocón SecYEG y, dependiendo del tipo de proteína, esta puede adoptar un arreglo topológico con el amino terminal nascente orientado hacia exterior de la célula o hacia el interior de la célula, pudiendo adoptar estructuras secundarias como alfa hélices de hasta 30 aminoácidos de tamaño, como ha sido estudiado recientemente en un sistema bacteriano *in vitro* por medio de FRET en tiempo real (Mercier, 2020). Es probable que Lpp<sup>mEp021</sup> pudiese estar interviniendo en este procedimiento, que al ya encontrarse anclada en la membrana y tener un grado de afinidad y de interacción con la proteína nascente, interrumpir su plegamiento adecuado y por ende la formación del complejo MalFGK<sub>2</sub>, en cualquiera de los casos (MalG o MalF). Por último, se recomienda que se realicen ensayos que comprueben la existencia de una interacción entre la lipoproteína del fago mEp021 con las proteínas de membrana para concretar adecuadamente la información recabada en este trabajo.



**Figura 27. Posibles modelos representativos de los efectos observados de Lpp<sup>mEp021</sup>.**

Se presentan las posibles vías de los fenotipos observados en distintas cepas que expresan la proteína Lpp<sup>mEp021</sup> (pORF81) y al co-exresar junto con el vector complementario de las cepas mutantes Keio (pMalG/pMalF). A) Esquema correspondiente a la transformación de la cepa W3110/pORF81. El bacteriófago mEp021 es excluido por la presencia de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>, la cual tiene una influencia sobre el receptor primario OmpC en membrana externa y en membrana interna con la proteína X, por otro lado, al encontrarse LamB y el complejo MalFGK<sub>2</sub>, la maltosa es transportada hasta el citoplasma bacteriano. B) Esquema del fenotipo observado al expresar la lipoproteína Lpp en cepas mutantes Keio, colonias blancas en medio MacConkey-maltosa y no exclusión. Esto puede ser debido a que la ausencia de la proteína MalG o MalF no permite que se lleve a cabo la inhibición de la infección en membrana interna, por una posible pérdida de interacción con la proteína X, por lo que mEp021 es capaz de infectar, sin embargo, el complejo MalFGK<sub>2</sub> no se puede conformar en membrana interna y la maltosa no es transportada hacia el citoplasma de la bacteria. C) Se representa el posible efecto que puede tener la expresión de Lpp<sup>mEp021</sup> en la cepa mutante, al expresarse en conjunto con la construcción complementaria. En este modelo se plantea que Lpp<sup>mEp021</sup> pudiera estar interfiriendo con la translocación de las proteínas MalG/MalF que su expresión es inducida con Arabinosa, al inhibir su



translocación en membrana interna no se puede conformar el complejo  $\text{MalFGK}_2$  adecuadamente, perdiendo la capacidad de incorporar la maltosa y además la interacción con la proteína X. “Proteína X” indica una proteína hipotética que tiene importancia en el proceso de infección de mEp021 en membrana interna.



## 10. Conclusiones

- Lpp<sup>mEp021</sup> tiene características únicas en cuanto a secuencia proteica y estructura tridimensional al ser comparada con otras lipoproteínas de exclusión a la superinfección (Figura 8 y 11)
- Lpp<sup>mEp021</sup> puede excluir la infección de mEp021, sin alterar el metabolismo de maltosa en cepas de la colección Keio y en *E. coli* W3110 (Tabla 5 y 9)
- El TAG de histidinas (6xHis), así como la adición de la proteína mCherry, le confieren a Lpp<sup>mEp021</sup> la capacidad de excluir a mEp021 en cepas mutantes LamB<sup>-</sup>, MalF<sup>-</sup> y MalG<sup>-</sup> (Tabla 6 y 8)
- La expresión inducida de Lpp<sup>mEp021</sup> con IPTG a una concentración de 0.1 mM resulta tóxica para el crecimiento bacteriano, así como la viabilidad de las células a partir de 30 minutos (Figura 15 y 16)
- La mayor concentración proteica de Lpp<sup>mEp021</sup> se encuentra en la fracción celular insoluble, posterior a las 2 horas de inducción con IPTG (Figura 21)
- Lpp<sup>mEp021</sup> puede interferir con la incorporación de maltosa en cepas *malG* y *malF* al expresarse simultáneamente, a través de vectores de clonación, con los genes que codifican para las proteínas de membrana MalG y MalF (Tabla 11 y Figura 26)
- La construcción pLamB, al ser inducida con arabinosa en una cepa *lamB*, revierte la capacidad de infección del bacteriófago  $\lambda$ , indicando que LamB está siendo transportada a la superficie de membrana externa de manera adecuada (Tabla 13)
- La infección por mEp021 no es excluida en las cepas:  
*malG*/pMalG + pORF81  
*malF*/pMalF + pORF81 o  
*malG*/pMalG + pORF81-6xHis  
*malF*/pMalF + pORF81-6xHis  
(Contrario a lo que se esperaba) (Tabla 12)
- La infección de mEp021 es inhibida en las cepas:  
*malG*/pMalG + pORF81-mCherry  
*malF*/pMalF + pORF81-mCherry (Tabla 12)



## 11. Perspectivas

- Llevar a cabo análisis *in silico* que permitan un mejor entendimiento de la posible interacción proteína-proteína entre Lpp<sup>mEp021</sup> y que ofrezcan una mayor información
- Realizar ensayos con mayor grado de sensibilidad para pruebas de absorción, incorporación y metabolismo de maltosa en cepas que expresan Lpp<sup>mEp021</sup> y en cepas mutantes
- Aumentar el tiempo de crecimiento bacteriano al expresar Lpp<sup>mEp021</sup> y dilucidar el mecanismo por el cual las bacterias recuperan viabilidad
- Transformar la cepa mutante *lamB*<sup>-</sup> con el vector de clonación pORF81 y/o pLamB y determinar por ensayos de infección/exclusión el fenotipo resultante
- Diseñar otro tipo de ensayos que permitan probar la interacción proteína-proteína entre la lipoproteína y MalF, MalG y LamB (ensayos que a su vez sean eficientes, altamente sensibles, que no interfieran con la posible interacción ni modifiquen el ambiente hidrofóbico en el que se encuentran las proteínas de membrana y Lpp<sup>mEp021</sup>)
- Clonar el gen de la lipoproteína putativa de uno de los fagos: mEp010, mEp013, mEp044 o mEp554, y discernir si se lleva a cabo la exclusión a la superinfección
- Identificar y comprobar la relación de la proteína de membrana externa OmpC con el proceso de infección del bacteriófago mEp021
- Desarrollar experimentos que comprueben la exclusión de mEp021 en cepas *lamB*<sup>-</sup>, *malF*<sup>-</sup> y *malG*<sup>-</sup> con los plásmidos pORF81-6xHis y pORF81-mCherry
- Determinar si existe alguna modificación en el rango de exclusión a la infección de bacteriófagos mEp por modificaciones/adciones en Lpp<sup>mEp021</sup>
- Comprobar la exclusión de fagos que pertenezcan a familias diferentes a la de mEp021



## 12. Literatura consultada

1. Abedon, S. T. (2012). 1 Phages. *Bacteriophages in health and disease*, 24, 1. Cabi.
2. Arguijo-Hernández, E. S., Hernandez-Sanchez, J., Briones-Peña, S. J., Oviedo, N., Mendoza-Hernández, G., Guarneros, G., & Kameyama, L. (2018). Cor interacts with outer membrane proteins to exclude FhuA-dependent phages. *Archives of virology*, 163(11), 2959-2969.
3. Aono, R., Tsukagoshi, N., & Yamamoto, M. (1998). Involvement of outer membrane protein TolC, a possible member of the mar-sox regulon, in maintenance and improvement of organic solvent tolerance of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 180(4), 938-944.
4. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1), 2006-0008.
5. Bebeacua, C., Lorenzo Fajardo, J. C., Blangy, S., Spinelli, S., Bollmann, S., Neve, H., ... & Heller, K. J. (2013). X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J 34 and identification of the tape measure protein as its target. *Molecular microbiology*, 89(1), 152-165.
6. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*, 363(4).
7. Braun, V., & Hantke, K. (2019). Lipoproteins: structure, function, biosynthesis. *Bacterial Cell Walls and Membranes*, 39-77.
8. Bohannan, B. J., Kerr, B., Jessup, C. M., Hughes, J. B., & Sandvik, G. (2002). Trade-offs and coexistence in microbial microcosms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81(1-4), 107-115.
9. Bukhari, A. I. (1976). Bacteriophage Mu as a transposition element. *Annual review of genetics*, 10(1), 389-412.
10. Carballo-Ontiveros, M. A., Cazares, A., Vinuesa, P., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2020). The concerted action of two B3-like prophage genes excludes superinfecting bacteriophages by blocking DNA entry into *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of virology*, 94(15), e00953-20.
11. Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics*, 28(4), 464-469.
12. Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J. C., & Lloubes, R. (2002). Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *Journal of bacteriology*, 184(3), 754-759.
13. Chatterjee, S., & Rothenberg, E. (2012). Interaction of bacteriophage I with its *E. coli* receptor, LamB. *Viruses*, 4(11), 3162-3178.



14. Clark, J. R., & March, J. B. (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology*, 24(5), 212-218.
15. Chang, A. C., & Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of bacteriology*, 134(3), 1141-1156.
16. Cresawn, S. G., Bogel, M., Day, N., Jacobs-Sera, D., Hendrix, R. W., & Hatfull, G. F. (2011). Phamerator: a bioinformatic tool for comparative bacteriophage genomics. *BMC bioinformatics*, 12(1), 1-15.
17. Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., & Bürgmann, H. (2012). Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in microbiology*, 3, 106.
18. Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125-138.
19. Ecale Zhou, C. L., Malfatti, S., Kimbrel, J., Philipson, C., McNair, K., Hamilton, T., ... & Souza, B. (2019). multiPhATE: bioinformatics pipeline for functional annotation of phage isolates. *Bioinformatics*, 35(21), 4402-4404.
20. Emrich, J. (1968). Lysis of T4-infected bacteria in the absence of lysozyme. *Virology*, 35(1), 158-165.
21. Friedman, N. D., Temkin, E., & Carmeli, Y. (2016). The negative impact of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 416-422.
22. Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 376.
23. García-Fruitós, E. (2010). Inclusion bodies: a new concept. *Microbial cell factories*, 9(1), 1-3.
24. Gardner, J. F., & Nash, H. A. (1986). Role of Escherichia coli IHF protein in lambda site-specific recombination: a mutational analysis of binding sites. *Journal of molecular biology*, 191(2), 181-189.
25. Garen, A., & Puck, T. T. (1951). The first two steps of the invasion of host cells by bacterial viruses. II. *Journal of Experimental Medicine*, 94(3), 177-189.
26. Gingery, R., & Echols, H. (1967). Mutants of bacteriophage lambda unable to integrate into the host chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(4), 1507.
27. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
28. Hernández-Sánchez, J., Bautista-Santos, A., Fernández, L., Bermúdez-Cruz, R. M., Uc-Mass, A., Martínez-Peñafiel, E., ... & Kameyama, L. (2008). Analysis of some phenotypic traits of feces-borne temperate lambdoid bacteriophages from different immunity groups: a high incidence of cor+, FhuA-dependent phages. *Archives of virology*, 153(7), 1271.



29. Hurtado Cortés, J. R. (2020). *Genómica comparativa de los bacteriófagos mEp010, mEp012, mEp044, mEp554 y mEp021-c del grupo de inmunidad I* (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Genética y Biología Molecular).
30. Ikeda, H., & Tomizawa, J. I. (1968, January). Prophage P1, an extrachromosomal replication unit. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 33, pp. 791-798). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
31. Jensen, K. F. (1993). The Escherichia coli K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of bacteriology*, 175(11), 3401-3407.
32. Kameyama, L., Fernández, L., Calderón, J., Ortiz-Rojas, A., & Patterson, T. A. (1999). Characterization of wild lambdoid bacteriophages: detection of a wide distribution of phage immunity groups and identification of a Nus-dependent, nonlambdoid phage group. *Virology*, 263(1), 100-111.
33. Kameyama, L., Fernández, L., Bermúdez, R. M., García-Mena, J., & Ishida, C. (2001). Properties of a new coliphage group from human intestinal flora. *Recent research developments in virology*, 297-303.
34. Kakasis, A., & Panitsa, G. (2019). Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International journal of antimicrobial agents*, 53(1), 16-21.
35. Kellerman, O., & Szmelcman, S. (1974). Active transport of maltose in Escherichia coli K12: Involvement of a "periplasmic" maltose binding protein. *European journal of biochemistry*, 47(1), 139-149.
36. Killmann, H., Videnov, G., Jung, G., Schwarz, H., & Braun, V. (1995). Identification of receptor binding sites by competitive peptide mapping: phages T1, T5, and phi 80 and colicin M bind to the gating loop of FhuA. *Journal of bacteriology*, 177(3), 694-698.
37. Konovalova, A., & Silhavy, T. J. (2015). Outer membrane lipoprotein biogenesis: Lol is not the end. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1679), 20150030.
38. Kortright, K. E., Chan, B. K., & Turner, P. E. (2020). High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(31), 18670-18679.
39. Letellier, L., Boulanger, P., Plançon, L., Jacquot, P., & Santamaria, M. (2004). Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake. *Front Biosci*, 9(1), 1228-1339.
40. Li, G. W., Burkhardt, D., Gross, C., & Weissman, J. S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, 157(3), 624-635.



41. Licht, A., Bommer, M., Werther, T., Neumann, K., Hobe, C., & Schneider, E. (2019). Structural and functional characterization of a maltose/maltodextrin ABC transporter comprising a single solute binding domain (MalE) fused to the transmembrane subunit MalF. *Research in microbiology*, 170(1), 1-12.
42. Lin, J., Huang, S., & Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and infection*, 4(3), 325-331.
43. Lin, J., Huang, S., & Zhang, Q. (2002). Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and infection*, 4(3), 325-331.
44. Lu, M. J., & Henning, U. (1994). Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in microbiology*, 2(4), 137-139.
45. Lucena, D., Mauri, M., Schmidt, F., Eckhardt, B., & Graumann, P. L. (2018). Microdomain formation is a general property of bacterial membrane proteins and induces heterogeneity of diffusion patterns. *BMC biology*, 16(1), 1-17.
46. Lu, M. J., & Henning, U. (1994). Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends in microbiology*, 2(4), 137-139.
47. Mullins, N. C. (1972). The development of a scientific specialty: The phage group and the origins of molecular biology. *Minerva*, 51-82.
48. McGrath, S., Fitzgerald, G. F., & Sinderen, D. V. (2002). Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular microbiology*, 43(2), 509-520.
49. Morona, R., Klose, M., & Henning, U. (1984). Escherichia coli K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *Journal of bacteriology*, 159(2), 570-578.
50. Martonosi, A. (Ed.). (2012). *The Enzymes of Biological Membranes: Volume 3: Membrane Transport*. Springer Science & Business Media.
51. MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, 8(6), 510-514.
52. Martínez-Peñafiel, E., Fernández-Ramírez, F., Ishida, C., Reyes-Cortés, R., Sepúlveda-Robles, O., Guarneros-Peña, G., ... & Kameyama, L. (2012). Overexpression of Ipe protein from the coliphage mEp021 induces pleiotropic effects involving haemolysis by HlyE-containing vesicles and cell death. *Biochimie*, 94(6), 1262-1273.
53. Martínez-Soto, C. E. (2018). *Caracterización parcial de una lipoproteína del colifago mEp021 involucrada en la exclusión a la superinfección* (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Genética y Biología Molecular).
54. Mercier, E., Wintermeyer, W., & Rodnina, M. V. (2020). Co-translational insertion and topogenesis of bacterial membrane proteins monitored in real time. *The EMBO journal*, 39(15), e104054.
55. Nakayama, H., Kurokawa, K., & Lee, B. L. (2012). Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways. *The FEBS journal*, 279(23), 4247-4268.



56. Nash, H. A. (1981). Integration and excision of bacteriophage  $\lambda$ : the mechanism of conservative site-specific recombination. *Annual review of genetics*, 15(1), 143-167.
57. Nguyen, M. T., & Götz, F. (2016). Lipoproteins of Gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 891-903.
58. Nobrega, F. L., Costa, A. R., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2015). Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in microbiology*, 23(4), 185-191.
59. Okuda, S., & Tokuda, H. (2011). Lipoprotein sorting in bacteria. *Annual review of microbiology*, 65, 239-259.
60. Oldham, M. L., Chen, S., & Chen, J. (2013). Structural basis for substrate specificity in the Escherichia coli maltose transport system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(45), 18132-18137.
61. Orlova, E. (2012). 1 Bacteriophages and Their Structural Organisation. *Bacteriophages*, 1st ed (pp.5-9). InTech
62. Ouyang, W. Y., Huang, F. Y., Zhao, Y., Li, H., & Su, J. Q. (2015). Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(13), 5697-5707.
63. Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P. (2019). Emergence of antibiotic resistance Pseudomonas aeruginosa in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*, 6(2), 109-119.
64. Patzer, S. I., Albrecht, R., Braun, V., & Zeth, K. (2012). Structural and mechanistic studies of pesticin, a bacterial homolog of phage lysozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23381-23396.
65. Pieter-Jan, C., & Rob, L. (2010). 2 Introduction to bacteriophage biology and diversity. *Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens* (pp. 11-29). American Society of Microbiology.
66. Pirnay, J. P., Blasdel, B. G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J. R., ... & Gabard, J. (2015). Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharmaceutical research*, 32(7), 2173-2179.
67. Puck, T. T., Garen, A., & Cline, J. (1951). The mechanism of virus attachment to host cells: I. The role of ions in the primary reaction. *The Journal of experimental medicine*, 93(1), 65-88.
68. Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol*, 59(3), 145-55.
69. Rohwer, F. (2003). Global phage diversity. *Cell*, 113(2), 141.
70. Schneider, E. (2001). ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Research in microbiology*, 152(3-4), 303-310.
71. Silhavy, T. J., Berman, M. L., & Enquist, L. W. (1984). Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory. *Press, Cold Spring Harbor, NY*.



72. Skurnik, M., Pajunen, M., & Kiljunen, S. (2007). Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnology letters*, 29(7), 995-1003.
73. Smith, S. G., Mahon, V., Lambert, M. A., & Fagan, R. P. (2007). A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 1-11.
74. Strauch, M. A., Spiegelman, G. B., Perego, M., Johnson, W. C., Burbulys, D., & Hoch, J. A. (1989). The transition state transcription regulator abrB of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *The EMBO journal*, 8(5), 1615-1621.
75. Summers, W. C. (1999). *Felix dHerelle and the origins of molecular biology*. Yale University Press.
76. Suttle, C. A. (2005). Viruses in the sea. *Nature*, 437(7057), 356-361.
77. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027.
78. Taylor, N. M., van Raaij, M. J., & Leiman, P. G. (2018). Contractile injection systems of bacteriophages and related systems. *Molecular Microbiology*, 108(1), 6-15.
79. Tétart, F., Repoila, F., Monod, C., & Krisch, H. M. (1996). Bacteriophage T4 host range is expanded by duplications of a small domain of the tail fiber adhesin.
80. Thompson, J. F., Waechter-Brulla, D. A. R. Y. L. E., Gumport, R. I., Gardner, J. F., de Vargas, L. M., & Landy, A. (1986). Mutations in an integration host factor-binding site: effect on lambda site-specific recombination and regulatory implications. *Journal of bacteriology*, 168(3), 1343-1351.
81. Vallée, M., & Cornett, J. B. (1972). A new gene of bacteriophage T4 determining immunity against superinfecting ghosts and phage in T4-infected *Escherichia coli*. *Virology*, 48(3), 777-784.
82. van der Bij, A. K., & Pitout, J. D. (2012). The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2090-2100.
83. Villaverde, A., & Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*, 25(17), 1385-1395.
84. von Heijne, G. (1989). The structure of signal peptides from bacterial lipoproteins. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2(7), 531-534.
85. Wang, Y. (2002). The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), 396-401.
86. Washizaki, A., Yonesaki, T., & Otsuka, Y. (2016). Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen*, 5(6), 1003-1015.
87. Wen, P. C., & Tajkhorshid, E. (2011). Conformational coupling of the nucleotide-binding and the transmembrane domains in ABC transporters. *Biophysical journal*, 101(3), 680-690.



88. World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Disponible en: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. [Consultado el 20 de junio 2020].
89. Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S. I., Matsuyama, S. I., & Tokuda, H. (2000). A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nature cell biology*, 2(4), 212-218.
90. Yamaguchi, K., Yu, F., & Inouye, M. (1988). A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell*, 53(3), 423-432.



### 13. Apéndices

- **Medios y soluciones**

#### **Medio Luria-Bertani**

Se pesan 10 g de Bactotripton, 10 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, el pH se ajusta con NaOH 10 N (200 µl aproximadamente) a un valor de 7, para la preparación de medio sólido (cajas Petri) se adicionan 15 g de agar bacteriológico, se afora a 1 L con agua bidestilada. Se calienta el medio brevemente para se disuelvan los componentes y se esteriliza con autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

#### **Medio TΦ suave**

Se pesan 10 g de Bactotripton, 10 g agar bacteriológico, 2.5 g NaCl y 2 mL de NaOH 2 M para ajustar el pH=7. Se agrega 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M para la preparación de medio sólido (tapiz bacteriano), aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O bidestilada. Esterilizar con autoclave 15 minutos.

#### **Agar suave (STABS)**

Se pesan 10 g de bacto-nutrient broth, 6 g de agar bacteriológico y 8 g de NaCl. Aforar a 1 Litro con H<sub>2</sub>O bidestilada. Esterilizar con autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

#### **TMG**

Se pesan 11.7 g de NaCl, 1 g de gelatina, se adiciona 1 mL de Tris-HCl 1 M (pH 8.0) y 0.5 mL de MgSO<sub>4</sub> 1 M. Se ajusta el pH a 7.4 con KOH. Esterilizar con autoclave 15 minutos.

#### **DAE Celulosa equilibrada**

Se pesan 20 g de DEAE celulosa y se adicionan a 100 mL de HCl 0.05 N, se ajusta el pH con NaOH (aproximadamente 6.8, cercano al pH del medio LB). Se deja sedimentar la resina y se descarta el sobrenadante, posteriormente se realizan 3 lavados con medio LB. Del restante volumen final de resina se le adiciona un 25%



de medio LB. Una vez obtenida la DEAE celulosa equilibrada se esteriliza en autoclave. Almacenar en refrigeración a 4°C.

- **Soluciones para extracción de plásmido**

### **Solución I**

50 mM glucosa

25 mM Tris-HCl (pH=8)

10 mM EDTA (pH=8)

La solución se prepara a partir de las soluciones *stock* (dependiendo del volumen final deseado), las cuales deben de ser estériles por autoclave a 121°C a 15 lb de presión, exceptuando la glucosa, la cual debe ser esterilizada mediante filtración. Almacenar en refrigeración a 4°C.

### **Solución II**

0.2 N NaOH (Diluir a partir de un stock 10 N)

1% (p/v) SDS

Se prepara la solución previamente a su utilización a temperatura ambiente.

### **Solución III**

60 mL de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K (Acetato de potasio)

11.5 mL de CH<sub>3</sub>COOH (Ácido acético glacial)

28.5 mL de H<sub>2</sub>O

---

100 mL

Almacenar solución en refrigeración a 4°C.



- **Soluciones para células quimiocompetentes**

Tfb I: 500 mL

30 mM KOAc	3 mL de un stock 5 M
100 mM RbCl <sub>2</sub>	6 g
10 mM CaCl <sub>2</sub>	5 mL de un stock 1 M
50 mM MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	12.5 mL de un stock 2 M
Glicerol 15% v/v	75 mL de recipiente 100%
Ajustar pH 5.8 con ácido acético diluido	
Autoclave o filtración	

Tfb II: 500 mL

10 mM MOPS (o PIPES)	1 g
75 mM CaCl <sub>2</sub>	37.5 mL de un stock 1 M
10 mM RbCl <sub>2</sub>	10 mL de un stock 0.5 M
15% Glicerol	75 mL de recipiente 100%
Ajustar pH 6.5 - 6.8 con KOH/NaOH	
Autoclave o filtración	

- **Soluciones para electroforesis**

### **Buffer stock TAE 50X**

Se pesan 245 g de Tris y se adicionan 57.1 mL de CH<sub>3</sub>COOH (Ácido acético) y 100 mL EDTA 0.5 M (pH 8.0). Se afora a un litro con agua bidestilada.

### **Buffer de carga**

0.25% (p/v) azul de bromofenol

0.25% (p/v) xileno cianol

30% glicerol (H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, inyectable o Milli-Q)



## Gel agarosa

Gel 1%	50 mL	0.5 g Agarosa	2.5 µL Bromuro de etidio
	150 mL	1.5 g Agarosa	7.5 µL Bromuro de etidio

## Soluciones para gel de proteínas

### Gel de proteínas

Acrilamida 30%, 2.7% bis

Acrilamida 29.2 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Aforar a 100 mL y almacenar en refrigeración a 4°C.

### Composición de geles de proteínas

	16% (Gel separador)	10%	4% (Gel concentrador)
AB-6 (Bis-acrilamida)	3.33 mL	600 µL	500 µL
Buffer gel 3X	3.33 mL	1 mL	1.5 mL
APS	33.3 µL	15 µL	43 µL
TeMED	3 µL	1.5 µL	5 µL
H <sub>2</sub> O	3.30 mL	1.383 mL	4 mL

### Tris-glicina

Tris 0.25 M (pH=8.3), Glicina 1.92 M

7.5 g -Trisma base

37.5 g - Glicina

Aforar a 250 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada.

### Buffer gel 3X

36.3 g – Tris 3 M

3.13 mL - HCl 1 M

0.3 g – SDS 0.3%

Ajustar pH 8.45 y aforar con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

### SDS 10% (p/v)

Se disuelven 5 g de SDS en 50 mL de H<sub>2</sub>O inyectable, bidestilada o Milli-Q.



### **Persulfato de amonio 10% (APS)**

Disolver 0.05 g de APS en 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril, inyectable o Milli-Q. Almacenar en refrigeración a -20°C. Para su uso debe ser recientemente preparado.

### **Buffer Tanque**

50 mL Tris-glicina

5 mL SDS 10%

Aforar a 500 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, inyectable o Milli-Q

### **Buffer de tratamiento**

Se mezclan 2.5 mL de Tris-HCl (pH=6.8), 4 mL de SDS 10%, 2 mL de glicerol, 1 mL de 2-mercaptoetanol, aforar a 10 mL con H<sub>2</sub>O bidestilada. Disolver una pizca de bromofenol.

- **Soluciones para tinción de plata**

#### **Solución fijadora**

Metanol	50 mL
Ácido acético	10 mL
Fijador (Enhancer Bio Rad Kit)	10 mL
H <sub>2</sub> O bidestilada	30 mL
Para 100 mL	

#### **Solución de tinción**

H <sub>2</sub> O Milli-Q, bidestilada estéril o inyectable	7 mL
Solución de plata (Sol. 1)	1 mL
Solución reductora (Sol. 2)	1 mL
Desarrollador de imagen (Sol. 3)	1 mL
Solución aceleradora	5 mL (se disuelven 0.25 g)
Para 15 mL	

#### **Solución STOP (Ácido acético 5%)**

H <sub>2</sub> O Milli-Q, bidestilada estéril o inyectable	47.5 mL
Ácido acético	2.5 mL
Para 50 mL	



- **Soluciones Western Blot**

**Buffer de transferencia**

SDS – 0.1%

Tris-Glicina – 1X

Metanol – 20%

Se mezclan 10 mL de un stock SDS 10%, 100 mL stock de Tris-Glicina 10X y 200 mL de metanol. Se afora a un litro con H<sub>2</sub>O bidestilada estéril

**Tris-Glicina 10X (Tris 0.25 M, pH 8.3; Glicina 1.92 M)**

Tris – 30 g

Glicina – 144 mL

Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O bidestilada

**Buffer PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X**

Se pesan 8.06 g de NaCl, 0.22 g KCl, 1.15 de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Ajustar pH a 7.4 y aforar volumen a 1 L con H<sub>2</sub>O Milli-Q o bidestilada. Almacenar a temperatura ambiente.

**Buffer de lisis**

50 mM Tris-HCl

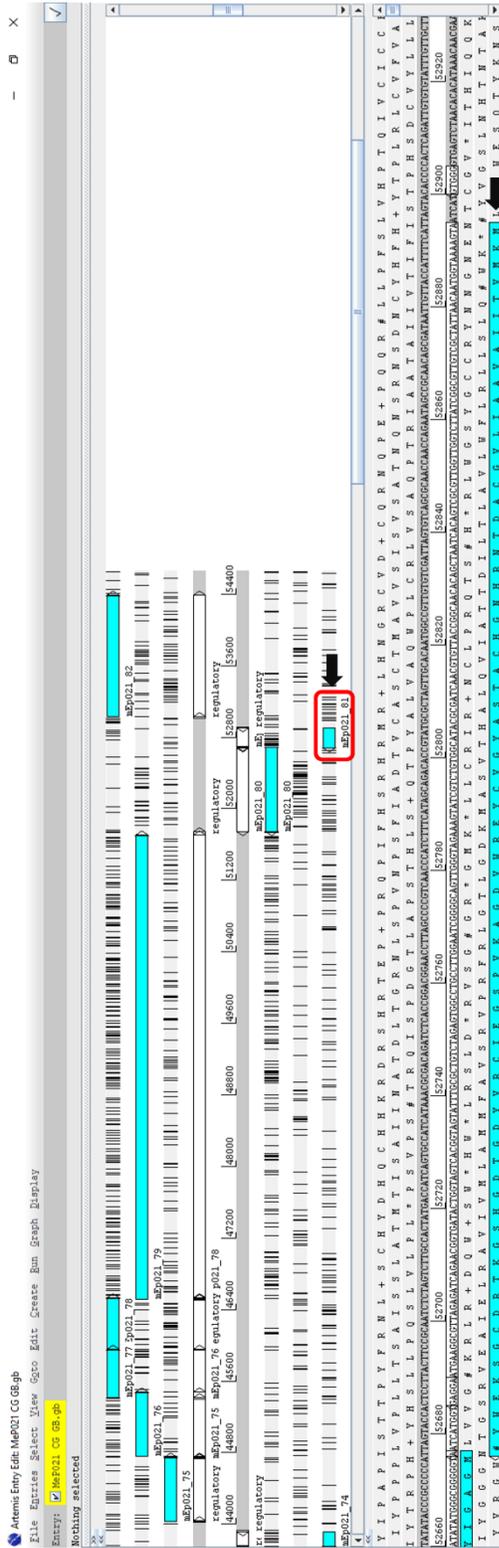
100 mM NaCl

**Buffer fraccionamiento celular**

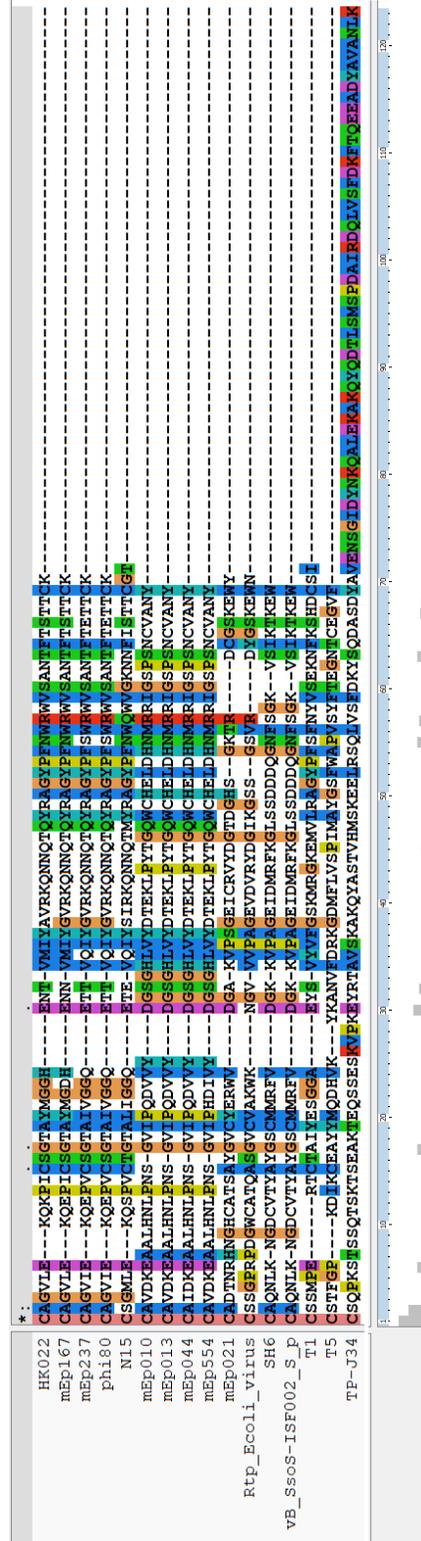
Tris 50 mM	500 µL
Glicerol 10%	1 mL
Tritón 0.1%	10 µL
Lisozima 100 mg/mL	50 µL
Para 10 mL	



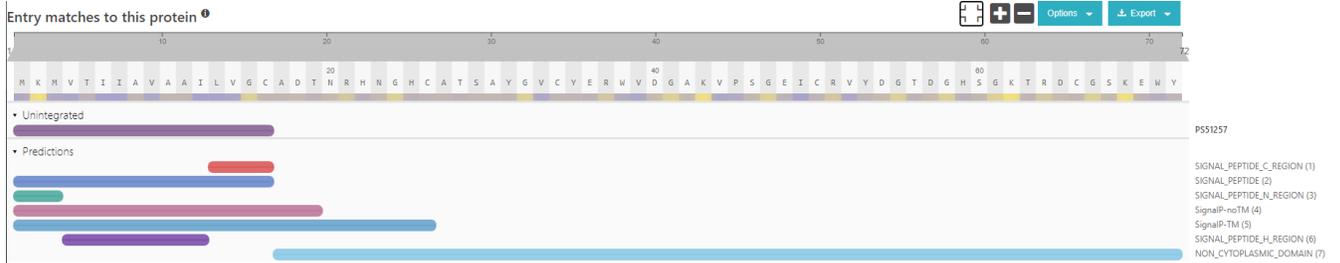
# 14. Anexo



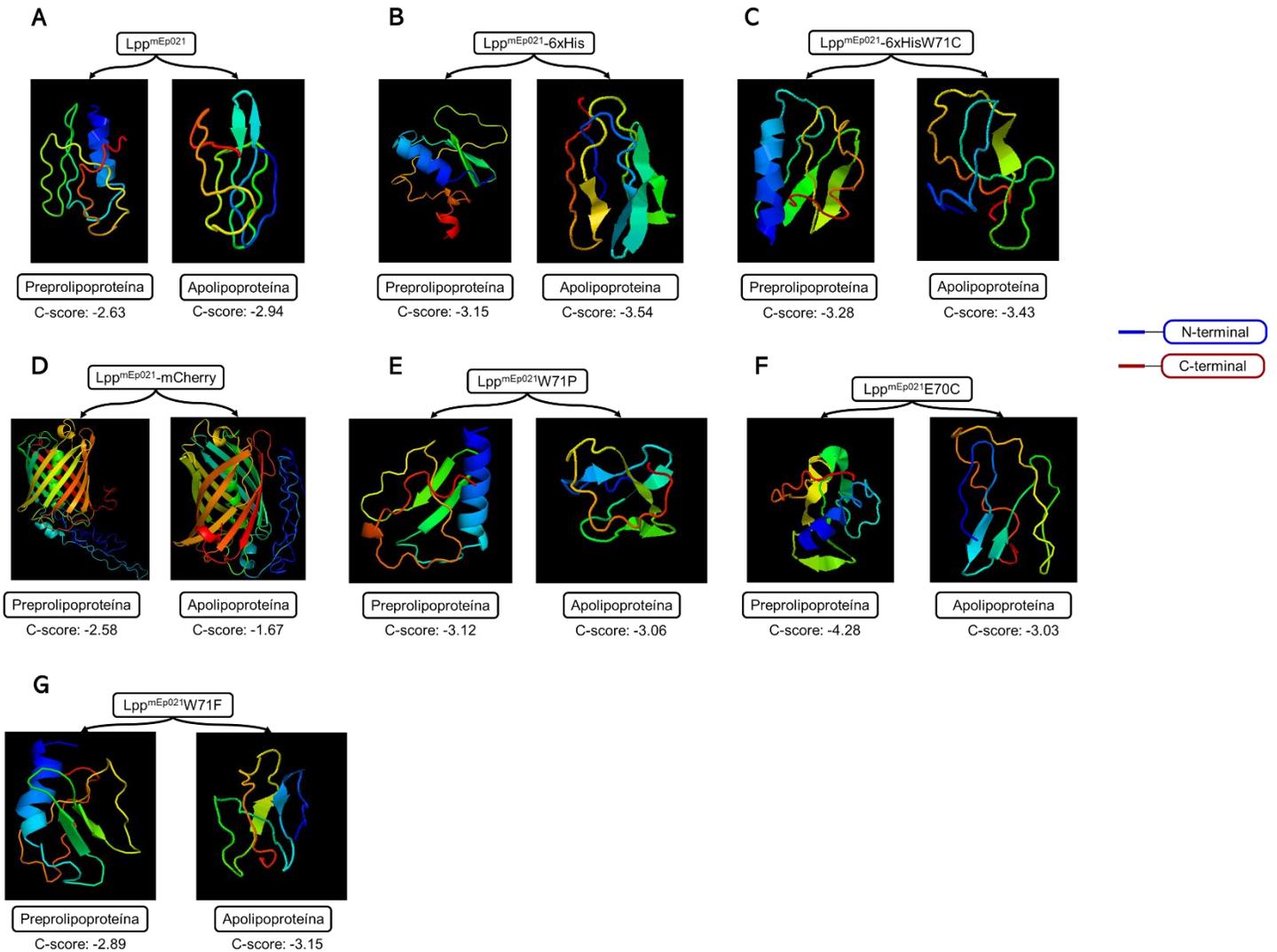
Anexo 1. Localización y secuencia de la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup> del bacteriófago mEp021. Visualizado en el software Artemis.



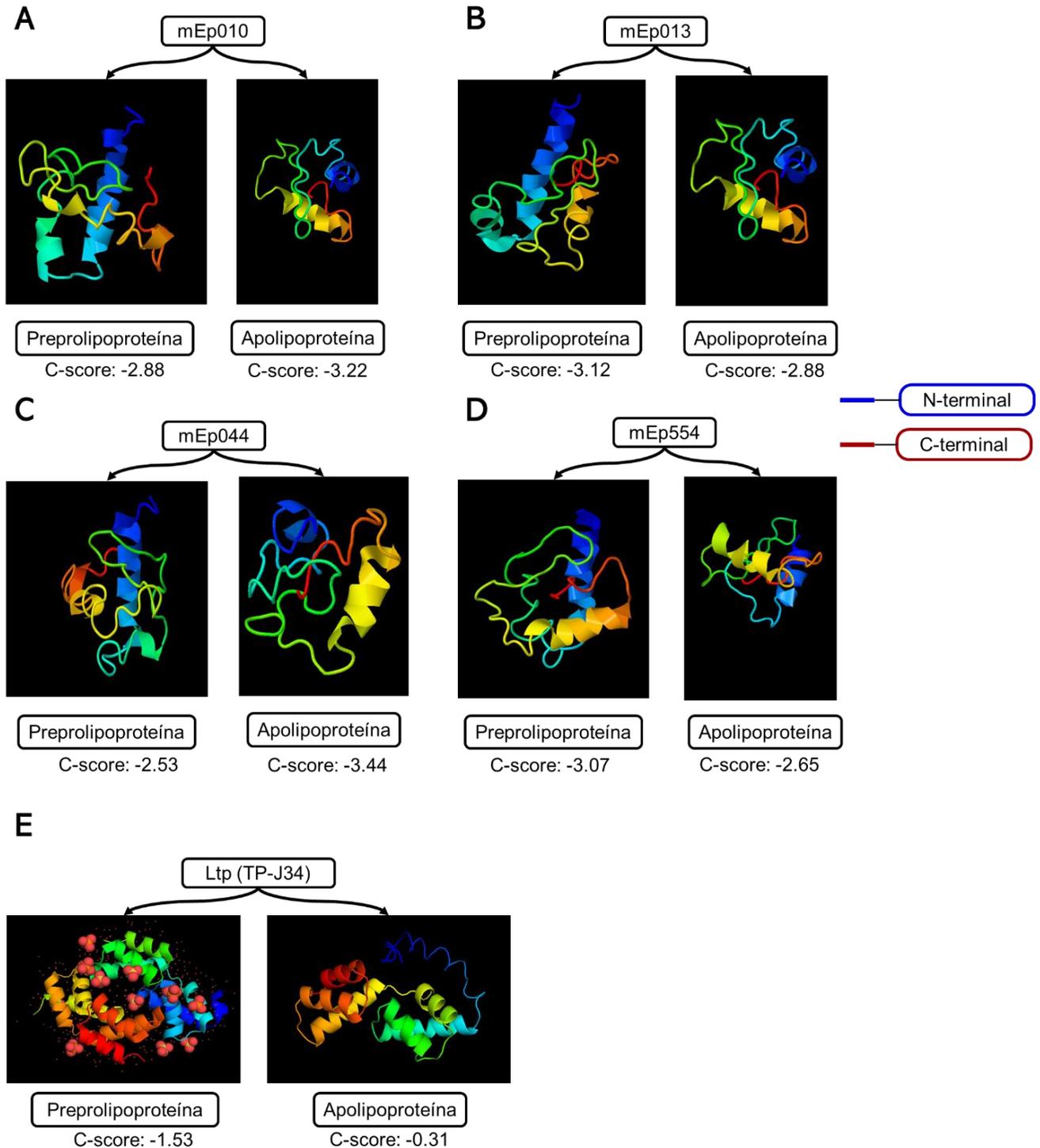
Anexo 2. Alineamientos de distintas lipoproteínas de exclusión a la infección. Proteínas putativas, homologas a Lpp<sup>mEp021</sup> y lipoproteínas con función reportada. El alineamiento se representa a partir del sitio de corte de la proteasa. Representación de apolipoproteínas.



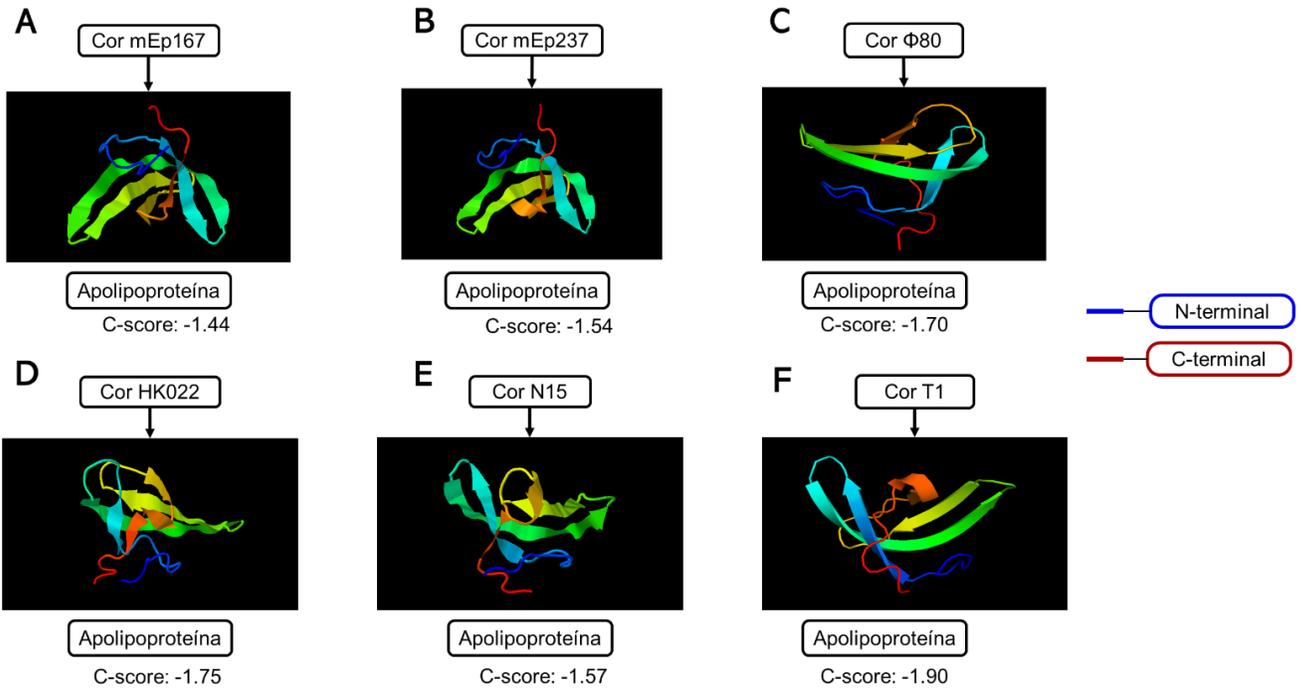
**Anexo 3.** Resultados de la búsqueda *in silico* de los dominios conservados en el péptido de la proteína Lpp<sup>mEp021</sup>. Resultados obtenidos de la página web InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>).



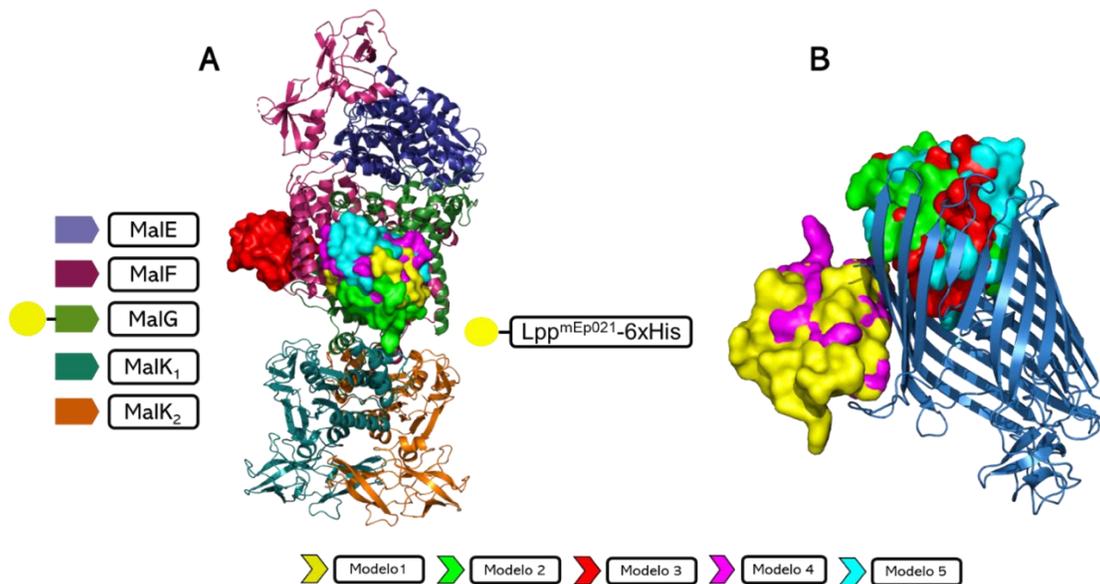
**Anexo 4.** Modelos tridimensionales correspondientes a las diversas proteínas disponibles en el laboratorio de Lpp<sup>mEp021</sup>, así como algunas modificaciones *in silico*, se muestran los modelos correspondientes a la proteína sin procesar (Prelipoproteína) así como la proteína tras el proceso de maduración (Apolipoproteína). Modelos predichos obtenidos a través de la página web I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>).



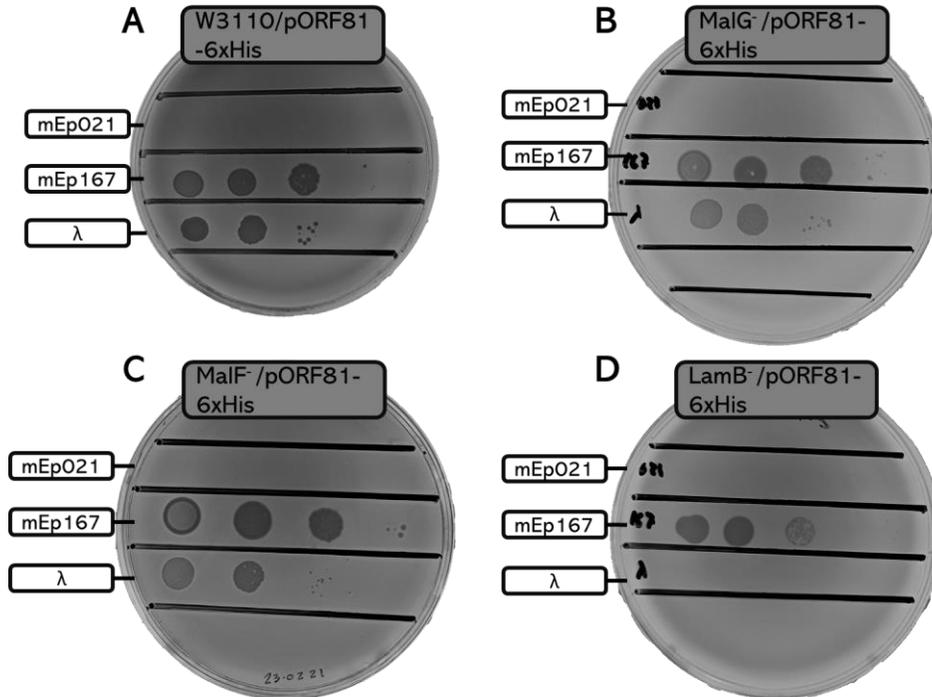
**Anexo 5.** Modelos tridimensionales correspondientes a las lipoproteínas putativas de los fagos del grupo de inmunidad I, secuenciados por el M. en C. Hurtado, así como la lipoproteína Ltp del fago TP-J34 identificada a través de búsqueda literaria, se muestran los modelos correspondientes a la proteína sin procesar (Prelipoproteína) así como la proteína tras el proceso de maduración (Apolipoproteína). Modelos predichos obtenidos a través de la página web I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>).



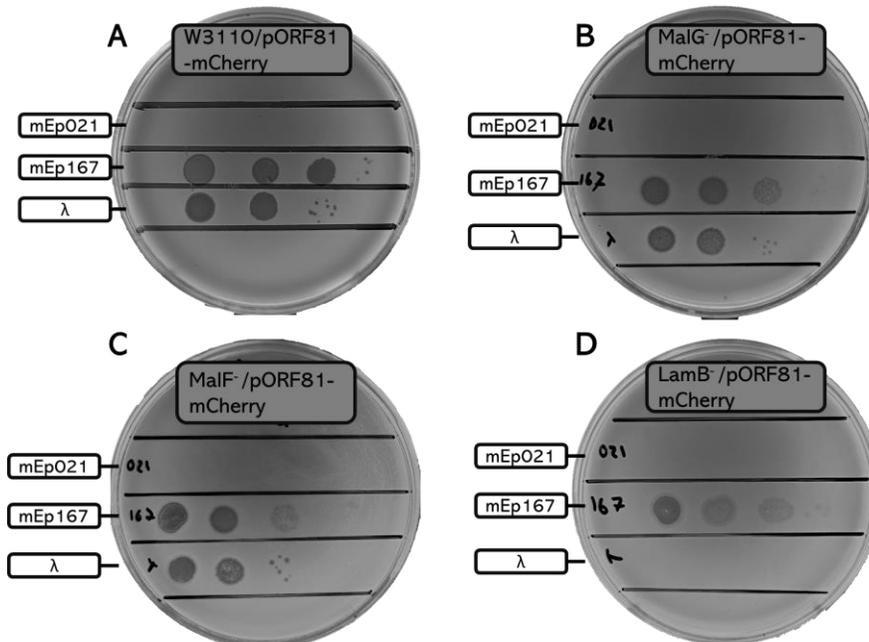
**Anexo 6.** Modelos tridimensionales correspondientes a las proteínas Cor, de diversos bacteriófagos, identificados a través de búsqueda literaria o en bases de datos por BLASTp. Se muestran los modelos correspondientes a la proteína sin procesar (Prelipoproteína) así como la proteína tras el proceso de maduración (Apolipoproteína). Modelos predichos obtenidos a través de la página web I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>).



**Anexo 7.** Ensayo *in silico* de docking molecular entre la lipoproteína Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis y las proteínas de membrana LamB y el complejo MalFGK<sub>2</sub>. A) Posibles sitios de interacción entre Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis y el complejo transportador de maltosa de membrana interna MalFGK<sub>2</sub>, cada subunidad se representa con un color diferente. B) Posibles sitios de interacción entre Lpp<sup>mEp021</sup>-6xHis y una subunidad de la maltoporina; proteína de membrana externa LamB.



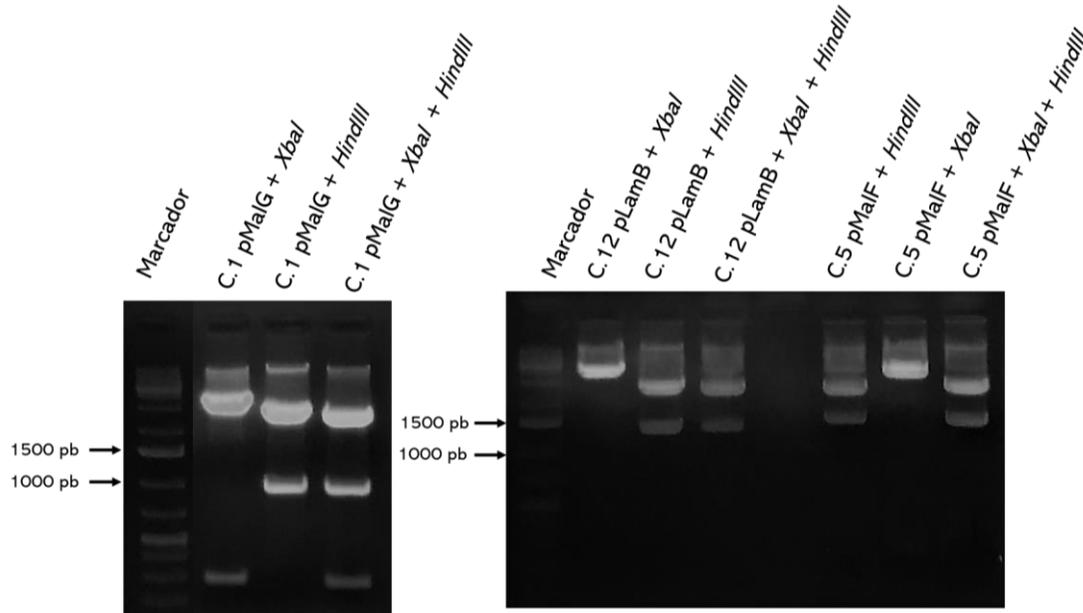
**Anexo 8.** Placas correspondientes a los ensayos de infección/exclusión en la cepa W3110 y en mutantes de la cepa Keio (*malG*, *malF* y *lamB*). A) Cepa W3110/pORF81-6xHis. B) Cepa JW3993 *malG*/pORF81-6xHis. C) Cepa JW3992 *malF*/pORF81-6xHis. D) Cepa J3995 *lamB*/pORF81-6xHis. Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución de los bacteriófagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ . N=3. La ausencia de placas denota incapacidad de infección del bacteriófago.



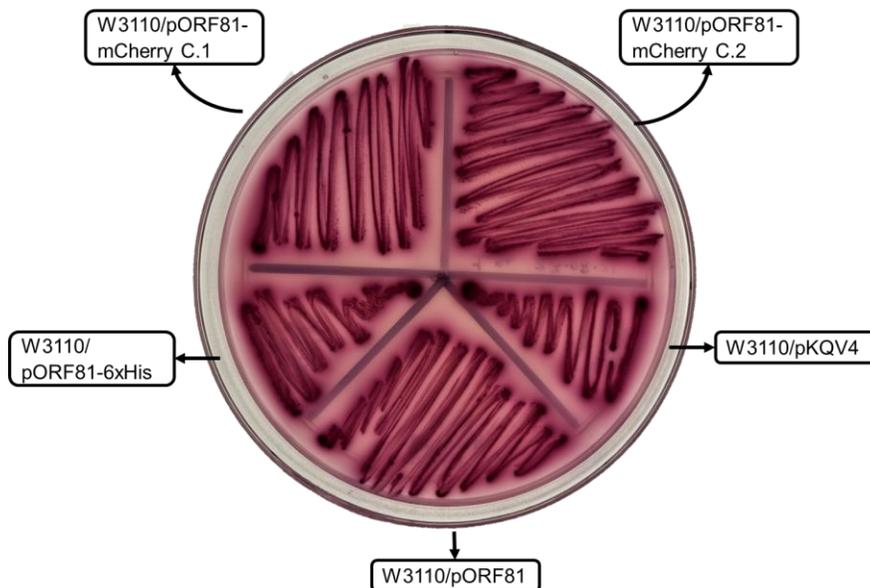
**Anexo 9.** Placas correspondientes a los ensayos de infección/exclusión en la cepa W3110 y en mutantes de la cepa Keio (*malG*, *malF* y *lamB*). A) Cepa W3110/pORF81-mCherry.



B) Cepa JW3993 *malG*/pORF81-mCherry. C) Cepa JW3992 *malF*/pORF81-mCherry. D) Cepa J3995 *lamB*/pORF81-mCherry. Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución de los bacteriófagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ . N=3. La ausencia de placas denota incapacidad de infección del bacteriófago.



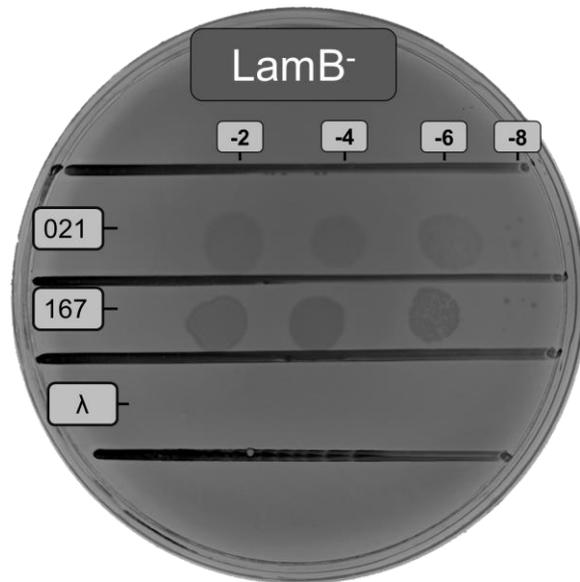
**Anexo 10.** Electroforesis en gel de agarosa 1% de los ensayos de doble restricción de las candidatas con los insertos de interés de las proteínas de membrana en el vector de clonación pJET1.2/blunt. Se observa la liberación de una banda de un tamaño aproximado de 200 kb correspondiente a un segundo sitio de reconocimiento en pJET1.2/blunt.



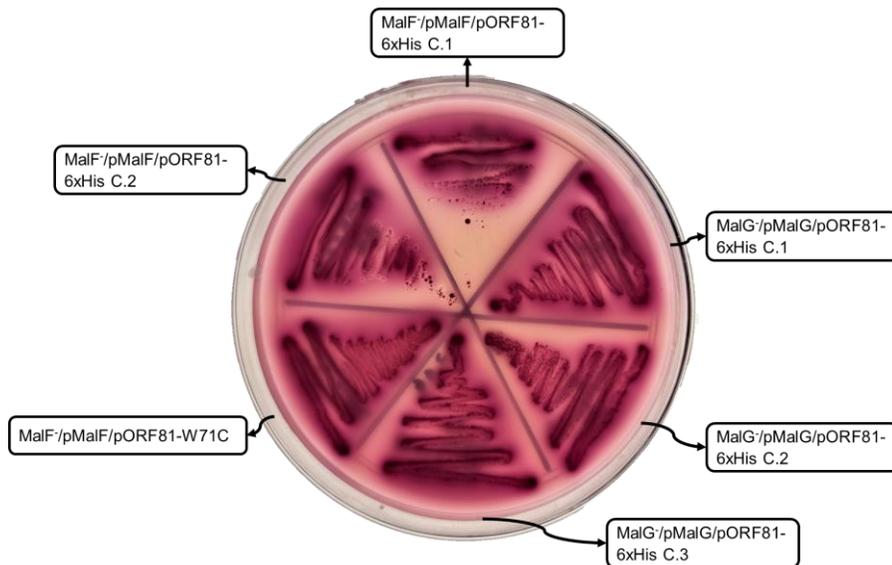
**Anexo 11.** Placas correspondientes a los ensayos de incorporación de maltosa en medio selectivo MacConkey complementado con maltosa a una concentración de 29.2 mM. Se muestran estriados de cepas W3110 transformada con los plásmidos pKQV4, pORF81, pORF81-6xHis y pORF81-mCherry. La coloración roja indica que se fermenta el



carbohidrato adicionado lo que ocasiona una disminución del pH y la coloración de las colonias rosadas o rojas.



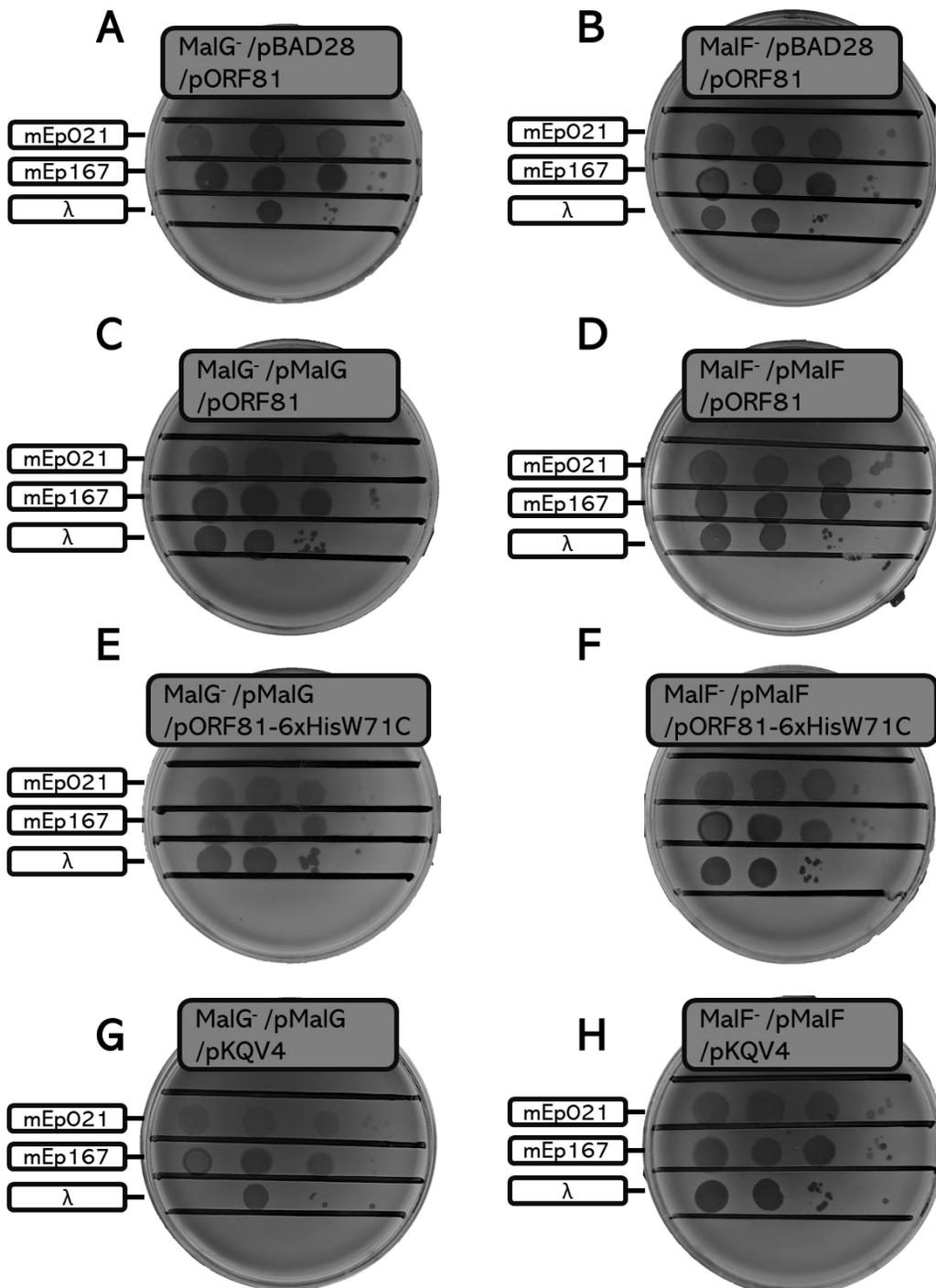
**Anexo 12.** Ensayo de infección en mutantes derivadas de JW3996 (*lamB*<sup>-</sup>) con los bacteriofagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ . Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución. N=3. La ausencia de placas denota incapacidad de infección del bacteriófago.



**Anexo 13.** Placas correspondientes a los ensayos de incorporación de maltosa en medio selectivo MacConkey complementado con maltosa a una concentración de 29.2 mM. Se presentan los estriados correspondientes a las cepas *malF* y *malG* al expresar dos plásmidos, la construcción complementaria (pMalF/pMalG, respectivamente) y el plásmido pORF81-6xHis. La coloración blanca se debe a la incapacidad de asimilar el carbohidrato adicionado (maltosa), mientras que la coloración roja indica que se fermenta el carbohidrato



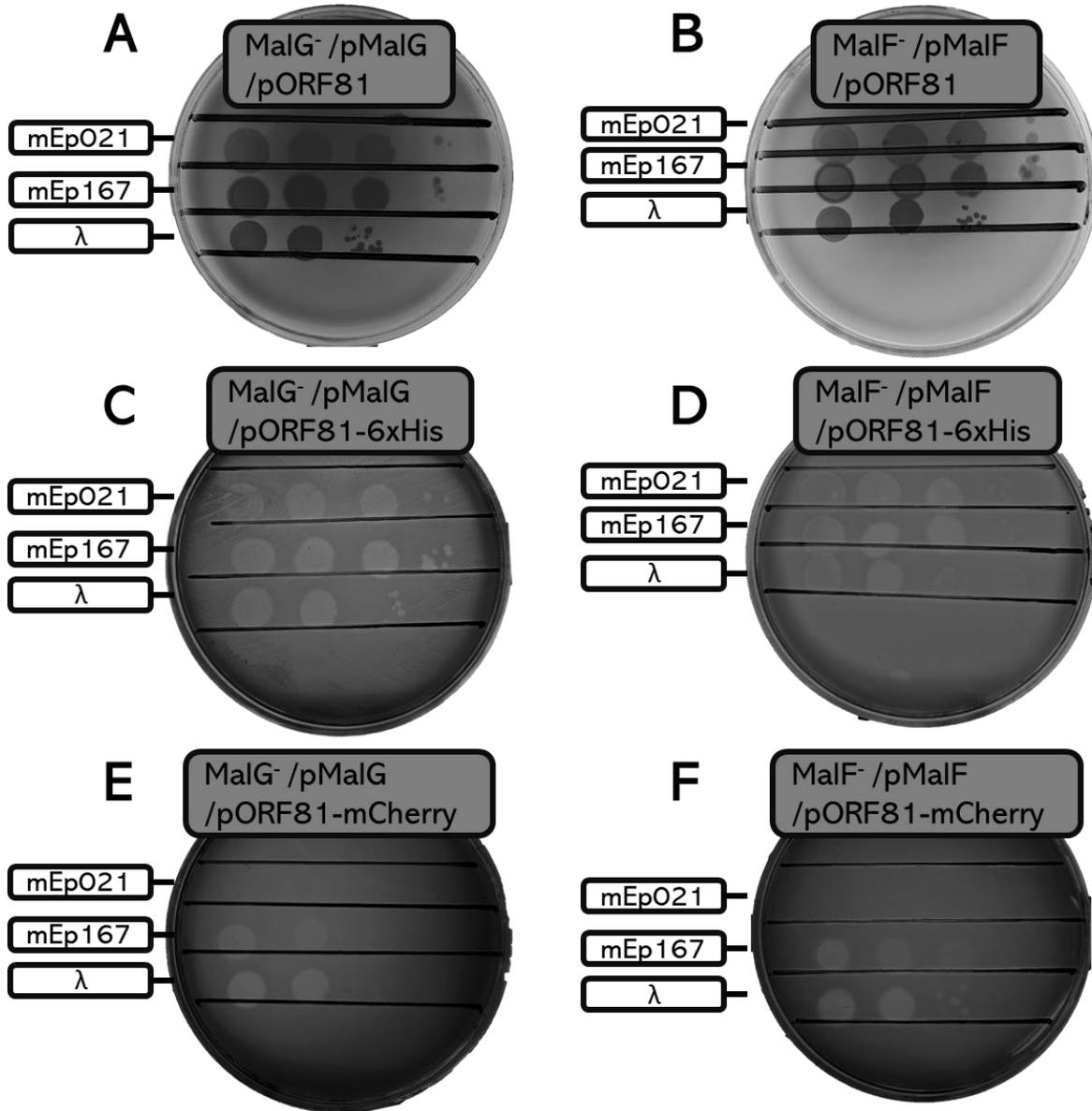
adicionado lo que ocasiona una disminución del pH y la coloración de las colonias rosadas o rojas.



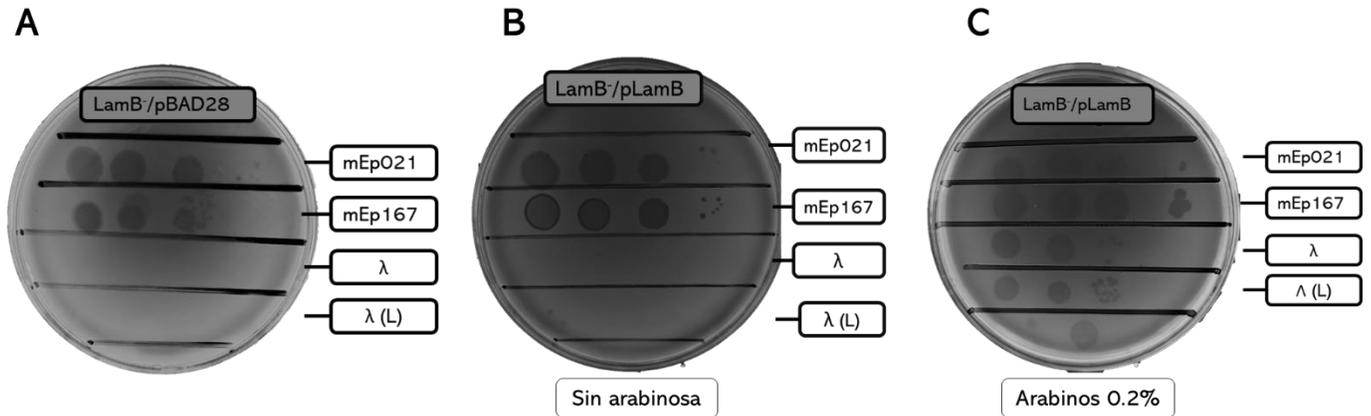
**Anexo 14.** Placas correspondientes a los ensayos de infección/exclusión en mutantes de la cepa Keio (*malG* y *malF*). A) Cepa JW3993 *malG*/pBAD28/pORF81. B) Cepa JW3992 *malF*/pBAD28/pORF81. C) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pORF81. D) Cepa JW3992 *malF*/pMalF/pORF81. E) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pORF81-6xHisW71C. F) Cepa JW3992 *malF*/pMalF/pORF81-6xHisW71C. G) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pKQV4. H) Cepa



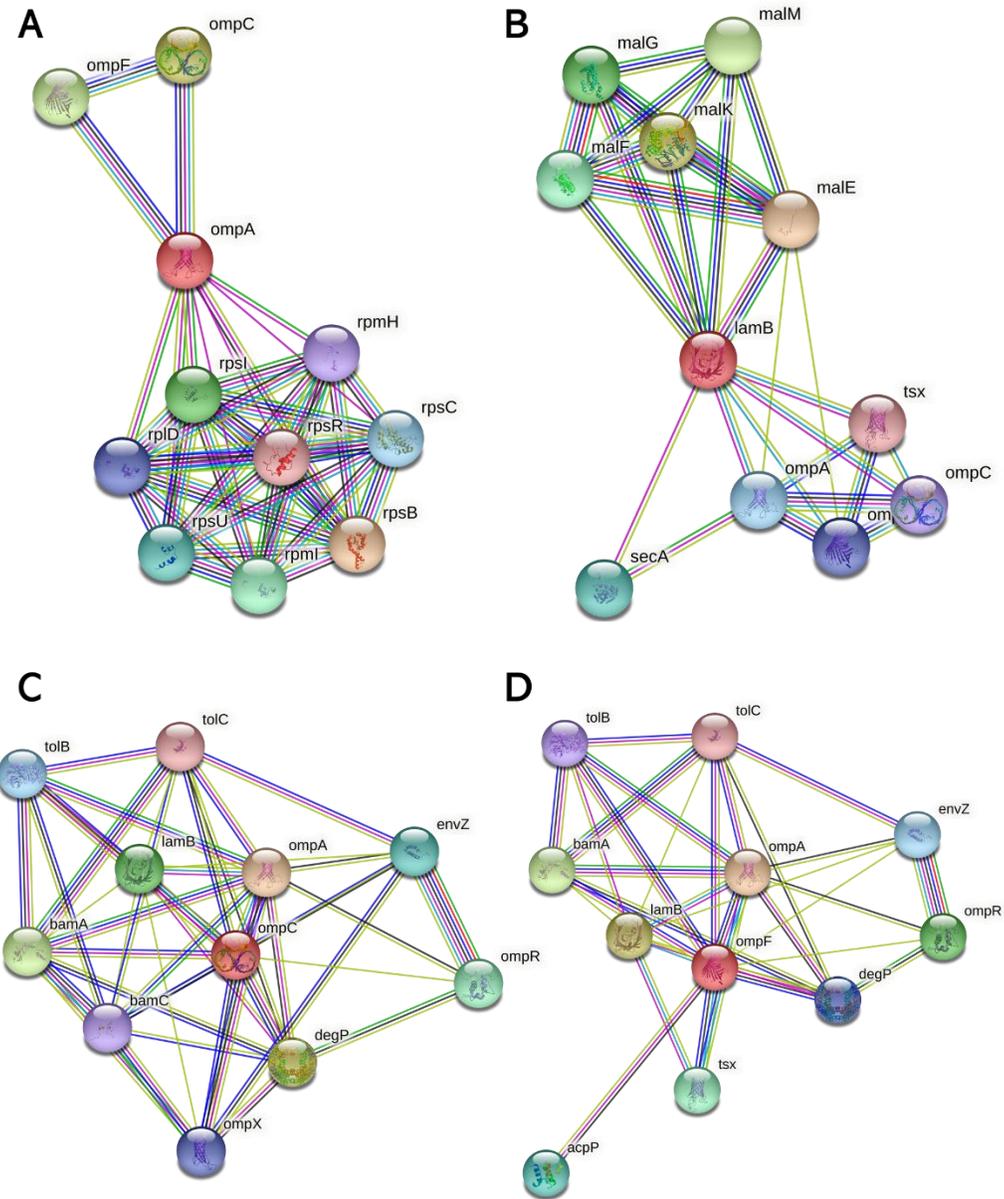
JW3992 *malF*/pMalF/pKQV4. Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución de los bacteriófagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ . N=2. La presencia de placas denota la capacidad de infección del bacteriófago.



**Anexo 15.** Placas correspondientes a los ensayos de infección/exclusión en mutantes de la cepa Keio (*malG* y *malF*) complementadas. A) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pORF81. B) Cepa JW3992 *malF*/pMalF/pORF81. C) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pORF81-6xHis. D) Cepa JW3992 *malF*/pMalF/pORF81-6xHis. E) Cepa JW3993 *malG*/pMalG/pORF81-mCherry. F) Cepa JW3992 *malF*/pMalF/pORF81-mCherry. Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución de los bacteriófagos mEp021, mEp167 y  $\lambda$ . N=2. La ausencia de placas denota la incapacidad de infección del bacteriófago.



**Anexo 16.** Placas correspondientes a los ensayos de infección/exclusión en la cepa mutante LamB<sup>-</sup> al ser transformada con el vector vacío (pBAD28) y la construcción complementaria. A) Cepa LamB<sup>-</sup> transformada con el vector vacío. B) Cepa LamB<sup>-</sup> transformada con la construcción complementaria sin arabinosa adicionado. C) Cepa LamB<sup>-</sup> transformada con la construcción complementaria e inducido con arabinosa a una concentración de 0.2%. Las placas corresponden a sitio de infección y lisis bacteriana de los bacteriofagos mEp021, mEp167,  $\lambda$  y  $\lambda$  (L), “L” corresponde a un stock previamente almacenado por nuestro grupo de trabajo. Se gotearon 5  $\mu$ L de cada dilución. N=3. La ausencia de placas denota incapacidad de infección.



**Nodes:**

Network nodes represent proteins  
*splice isoforms or post-translational modifications are collapsed, i.e. each node represents all the proteins produced by a single, protein-coding gene locus.*

**Node Color**

- colored nodes: query proteins and first shell of interactors
- white nodes: second shell of interactors

**Node Content**

- empty nodes: proteins of unknown 3D structure
- filled nodes: some 3D structure is known or predicted

**Edges:**

Edges represent protein-protein associations  
*associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.*

**Known Interactions**

- from curated databases
- experimentally determined

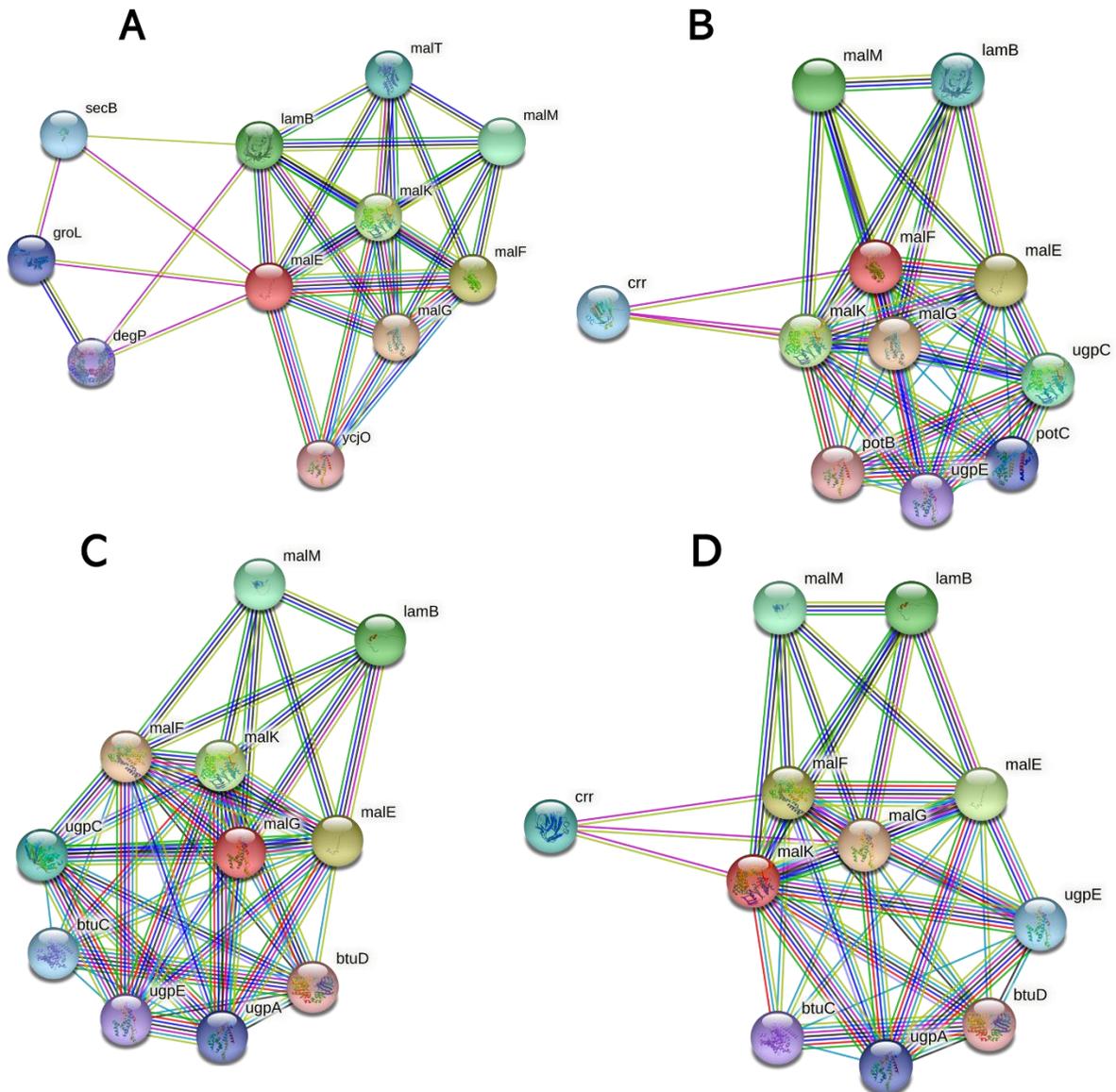
**Predicted Interactions**

- gene neighborhood
- gene fusions
- gene co-occurrence

**Others**

- textmining
- co-expression
- protein homology

**Anexo 17.** Interacciones entre proteínas de membrana externa. Las líneas magentas indican interacciones observadas por experimentación, imagen obtenida del servidor de STRING. A) OmpA B) LamB C) OmpC D) OmpF.



**Anexo 18.** Interacciones entre las proteínas que componen el complejo transportador de maltosa MalFGK<sub>2</sub> en membrana interna. Las líneas magentas indican interacciones observadas por experimentación, imagen obtenida del servicio de STRING. A) MalE B) MalF C) MalG D) MalK



**Anexo 19.** Lista de oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen MalE, así como oligonucleótidos para deletar los genes correspondientes a MalE, en la bacteria, y Lpp<sup>mEp021</sup>, en el bacteriófago, e incorporar resistencia a Kanamicina. Sitio XbaI T`CTAGA y sitio HindIII A`AGCTT (símbolo “`” indica sitio de corte). Los oligonucleótidos de delección cuentan con homología correspondiente a las secuencias en el genoma de los organismos.

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia</b>
MalE_Fw	5'-T`CTAGAaggacatagattatgaaaataaaaac-3'
MalE_Rv	5'-A`AGCTTttacttggtgatacgagtctg-3'
MalE_Reckan_Fw	5'gtaggccggacaaggcggtcacgccgcatccggcatttcacagcatgtgtag gctggagctgcttcg-3'
MalE_Reckan_Rv	5'-gtttaggtgttttcacgagcacttcaccaacaaggacatagattaattccggg gatccgctcgacc-3'
Lpp_Reckan_Fw	5'-ttgcagggcgctccgctcattcagcccaatatatatacccgccccatgtgtag gctggagctgcttcg-3'
Lpp_Reckan_Rv	5'-aataaacaagcaacaatacacacaatctgagtggggtgactaaattcc gggatccgctcgacc-3'