



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Identificación de la proteína 10 del fago Φ Ps56 como responsable de la exclusión durante la infección lítica en *Pseudomonas aeruginosa*”

TESIS

QUE PRESENTA

M. en C. Ricardo Israel Amador Zafra

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la Tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Asesores de la Tesis:

Dra. Rosa María Bermúdez Cruz

Dr. Javier Hernández Sánchez

Dra. Norma Angélica Oviedo de Anda

Dr. Luis Servín González

Ciudad de México

AGOSTO, 2022

Contenido

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCIÓN	6
II. ANTECEDENTES	13
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	20
VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	21
Cepas y bacteriófagos.	22
Propagación de los fagos.	22
Gradientes de CsCl.	23
Extracción de ADN.	23
Preparación de bacterias electrocompetentes de la cepa Ps33.	23
Electroporación.	24
Tapices de la cepa Ps33.	24
Ensayos de infección y exclusión.	24
Extracción de DNA de fago por gradientes de CsCl.	24
Patrones de Restricción	26
Diseño de oligos	26
PCR	27
Western Blot	27
VIII. RESULTADOS	31
8.1 Comprobación de los fenotipos de exclusión e infección	31
8.2 Resección del gen 9 al 16%.	35
8.3 Etiquetamiento, purificación y análisis por espectrometría de masas de la proteína 10. 39	
8.4 Papel de la proteína 10 en el fenotipo de exclusión a la superinfección.	42
8.5 Electroporación de genomas de fagos que infectan a la cepa Ps33	48
8.6 Electroporación de genomas de fagos que no infectan a la cepa Ps33	53
8.7 Electroporación de genomas de fagos que no infectan a la cepa Ps33	55

IX. DISCUSIÓN	56
X. CONCLUSIONES.....	60
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	61
XII. APÉNDICE.....	64
XIII. EQUIPO	64
XIV. PERSPECTIVAS	65

RESUMEN

En comunidades microbianas los bacteriófagos compiten con otros para ser los más exitosos en infectar a las bacterias. Como consecuencia de esta lucha por hospederos los fagos han desarrollado mecanismos de inhibición para anular a sus competidores. Uno de estos mecanismos es la exclusión a la superinfección, en donde la infección de un primer fago impide infecciones secundarias por otros fagos. En cepas Gram negativas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que en años recientes ha tenido gran relevancia por su resistencia a los antibióticos, se han descrito varios estudios de la exclusión a la superinfección. Uno de ellos, realizado en este laboratorio, demostró que el profago Ps56 de la cepa clínica Ps33 de *Pseudomonas aeruginosa* era el responsable de ejercer la exclusión a la superinfección de 16 fagos líticos a nivel de la envoltura celular, como se ha descrito en varios ejemplos. Dicho estudio sirvió como punto de partida para experimentos posteriores que permitieron profundizar más acerca de este fenómeno. En este trabajo se desarrolló un método de electroporación para transfectar el ADN de fagos que infectan y que no infectan a la cepa Ps33, en condiciones normales. Principalmente se usó para confirmar que la exclusión a la superinfección derivada del profago Ps56 ocurre a nivel de la envoltura celular, como se reportó previamente. Esto se logró mediante la observación de UFPs en un tapiz de la cepa Ps33 cuando, a través de esta técnica de transfección, el ADN electroporado de los fagos líticos PaMx47 y PaMx53 originalmente excluidos dio lugar a partículas virales con la capacidad de infectar a otras bacterias. Estos resultados con la cepa Ps33 confirmaron que la técnica puede ser extrapolada para cepas clínicas, facilitando el estudio de los fenómenos de exclusión a la superinfección en la investigación básica de bacteriófagos.

Como ya se mencionó, el fenotipo de exclusión a la superinfección se asignó al profago Ps56, pero de manera específica, se demostró que el mecanismo era provocado por la acción concertada de dos genes (9 y 10) de este profago clonados en dos plásmidos con diferente origen de replicación en una misma cepa Ps33. Sin embargo, en este trabajo se realizaron experimentos que descartaron el papel del gen 9 y muy probablemente posicionan al gen 10 como el único responsable del fenómeno de exclusión a la superinfección que ocurre en esta cepa lisógena. Experimentos adicionales son necesarios para confirmar esta observación.

ABSTRACT

In microbial communities, bacteriophages compete with others to be the most successful in infecting bacteria. As a result of this host war, phages have evolved inhibition mechanisms to eliminate their competitors. One of these mechanisms is the exclusion of superinfection, where infection of a first phage prevents secondary infections by other phages. Several studies to rule out superinfection in gram-negative strains of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, which has become increasingly important in recent years due to its resistance to antibiotics, have been described.

One of them, carried out in this laboratory, showed that the Ps56 prophage of the Ps33 clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* was responsible for exerting the exclusion of the superinfection of 16 lytic phages at the cell envelope level, as described in several examples.

This study served as a starting point for subsequent experiments that allowed us to delve deeper into this phenomenon. In this work, an electroporation method was developed to transfect the DNA of phages that infect and do not infect the Ps33 strain under normal conditions.

It was mainly used to confirm that exclusion of Ps56 prophage-derived superinfection occurs at the cell envelope level as previously reported. This was achieved by observing PFUs in a mat of the Ps33 strain when, by this transfection technique, the electroporated DNA of the originally excluded lytic phages PaMx47 and PaMx53 resulted in virus particles with the ability to infect other bacteria.

These results with the Ps33 strain confirmed that the technique can be extrapolated to clinical strains, facilitating the study of superinfection exclusion phenomena in basic bacteriophage research. As already mentioned, the superinfection exclusion phenotype has been assigned to the Ps56 prophage, but in particular it has been shown that the mechanism was caused by the concerted action of two genes (9 and 10) of this prophage cloned into two plasmids with different origins of replication in same Ps33 strain. However, in this work, experiments were performed that ruled out the role of gene 9 and very likely cite gene 10 as the only one responsible for the superinfection exclusion phenomenon that occurs in this lysogenic strain. Additional experiments are needed to confirm this observation.

I. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo que pertenece a las bacterias Gram negativas y es uno de los principales patógenos oportunistas, y tienen un papel principal en las infecciones nosocomiales, agudas y crónicas. La infección por este patógeno conduce a enfermedades con una alta tasa de mortalidad en pacientes con diagnóstico de fibrosis quística, cáncer, quemaduras graves e inmunosuprimidos. Esta bacteria puede vivir en el agua, en superficies y dispositivos médicos, mediante sus factores de unión, como flagelos, pili y biopelículas. Por lo tanto, *P. aeruginosa* es abundante en ambientes naturales y artificiales, lagos, hospitales y desagües de fregaderos domésticos.

Pseudomonas aeruginosa puede unirse a diversas superficies y formar biopelículas, provocan infecciones crónicas al aumentar la resistencia a los antibióticos, desinfectantes, a diversos tratamientos de irradiación, condiciones ambientales y el sistema inmunitario. La biopelícula bacteriana se introdujo por primera vez en 1987 como una comunidad de microorganismos capaces de unirse a las superficies y formar un exo-polisacárido y una matriz extracelular. Las bacterias formadoras de biopelículas son aproximadamente de 10 a 1000 veces más resistentes a los antibióticos que las células planctónicas, debido a la difícil penetración de los antibióticos en la compleja matriz de polisacáridos (glicocálix) de las biopelículas. Por lo tanto, las biopelículas y el mecanismo de resistencia a los antibióticos inherente y adquirido de *P. aeruginosa* han aumentado la prevalencia de las cepas MDR en los últimos años. Por lo tanto, los investigadores están buscando nuevas formas de inhibir las biopelículas de *P. aeruginosa*. La terapia con fagos es uno de los métodos más importantes para inhibir las biopelículas de *P. aeruginosa*. Los bacteriófagos son virus que invaden bacterias; fueron descubiertas hace más de un siglo y se dividen en dos categorías: líticos o temperados según su ciclo de vida (Fig. 1). Hay que destacar que los bacteriófagos líticos son a menudo un tema de interés para fines terapéuticos porque conducen a la muerte de su célula huésped bacteriana.

Por otro lado, los fagos temperados generalmente integran su genoma en el cromosoma del huésped o se mantienen como plásmido, lo que les permite transmitirse a las células hijas en la división celular. Los bacteriófagos que se dirigen específicamente al género *Pseudomonas* se descubrieron por primera vez a mediados del siglo XX, y debido al gran papel de este

microorganismo en las infecciones nosocomiales y la alta resistencia a los antibióticos, el uso de bacteriófagos para inhibir las infecciones por *P. aeruginosa* ha sido muy estudiado. Al infectar células bacterianas, los fagos se enfrentan a una gama de mecanismos antivirales, por lo que han desarrollado múltiples tácticas para evitar, eludir o subvertir estos mecanismos para prosperar en la mayoría de los entornos.

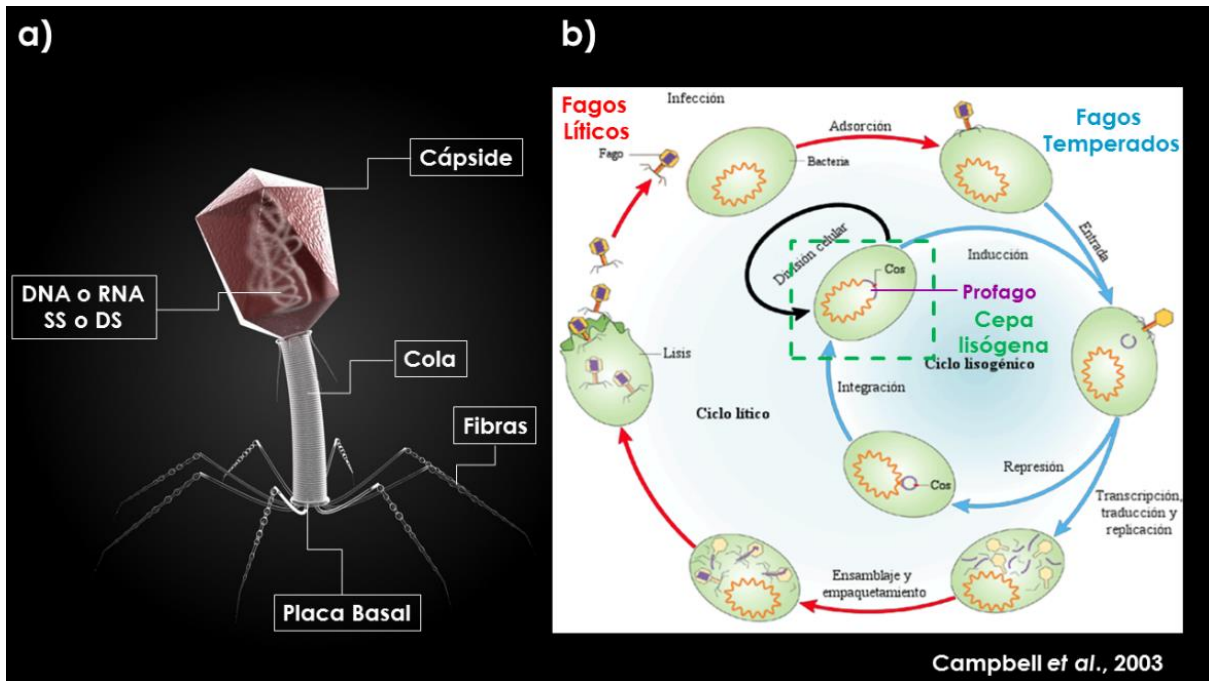


Figura 1. Los fagos y su ciclo de replicación. a) Estructura general de los bacteriófagos; b) Ciclo de replicación de bacteriófagos: el fago se ancla a la superficie celular, mediante el receptor de su cola e inyecta su ADN. Después ese ADN adopta una forma circular, cuyo punto de clausura es llamado sitio cohesivo (cos). En algunas células infectadas el ADN es transcrito, traducido y replicado. Existen 2 vías de replicación: de la forma θ y círculo rodante. La replicación de círculo rodante genera multi genomas de ADN lineal de doble cadena, que después es introducido en envolturas proteicas preformadas; las caudas son añadidas y la célula se lisa para liberar a la progenie del fago. En otras células infectadas, el desarrollo del fago es reprimido y su ADN se integra en el cromosoma bacteriano. La célula lisogénica resultante puede replicarse indefinidamente, pero puede ser inducida al ciclo lítico con la escisión del ADN del fago del cromosoma. (Tomada y modificada de Campbell *et al.*, 2003)

Los sistemas de exclusión a la superinfección (Sie) son llevados a cabo generalmente por proteínas que bloquean la entrada del ADN del fago en las células huésped, por lo que confieren inmunidad contra fagos específicos. Comúnmente, estas proteínas están ancladas

a la membrana o asociadas con componentes de membrana (Fig. 2). Los genes que codifican estas proteínas se encuentran generalmente en profagos, lo que sugiere que en muchos casos, los sistemas Sie son importantes para conocer las interacciones de los componentes fago-fago en lugar de interacciones fago-huésped. Se han identificado muchos sistemas Sie diferentes, aunque sólo unos pocos han sido caracterizados.

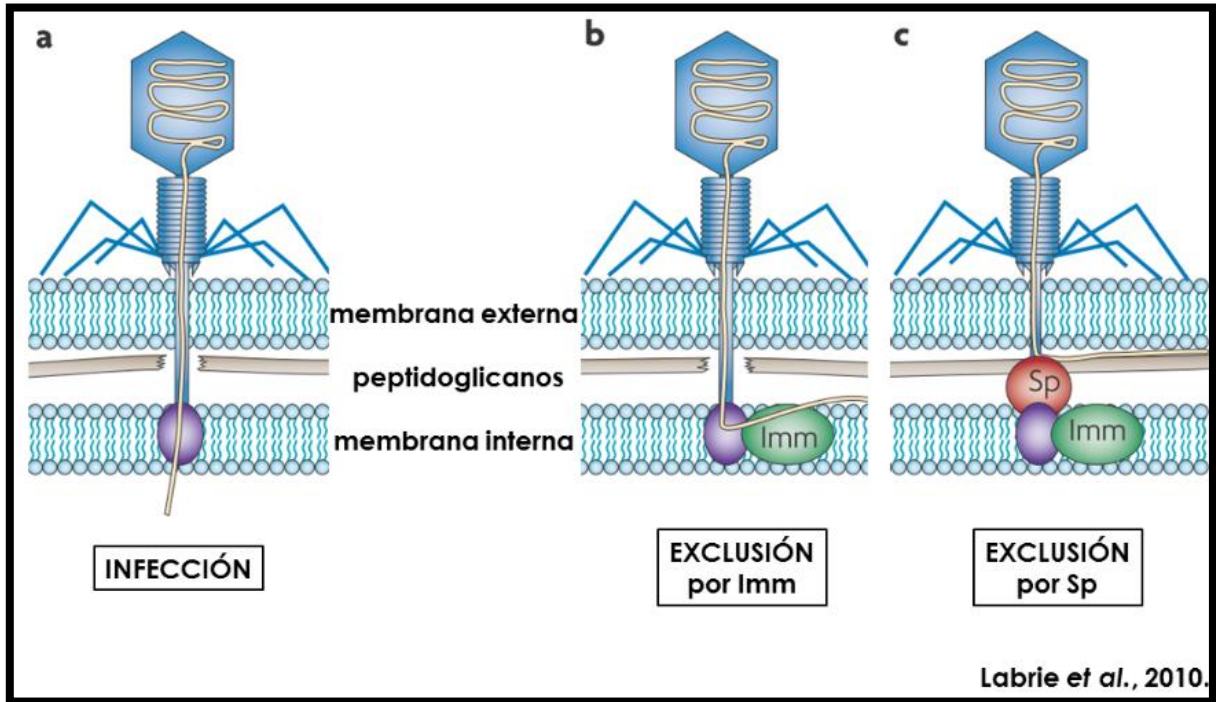


Figura 2. Sistema de exclusión a la superinfección del fago T4 a nivel de membrana. a) El ADN del fago T4 atraviesa ambas membranas y los peptidoglicanos para lograr la translocación hacia el citoplasma; b) El fago T4 produce la proteína Imm que retiene el ADN de otros fagos T-like entre los peptidoglicanos y la membrana interna, evitando su translocación; c) Del mismo modo la proteína Sp del fago T4 puede evitar la infección impidiendo que el ADN de otros fagos degrade la barrera de peptidoglicanos. (Tomada y modificada de Labrie *et al.*, 2010)

En la Figura 2 se observa que el ADN de los fagos es bloqueado por las proteínas producidas por el fago T4 una vez que alcanza la membrana interna o los peptidoglicanos. Es decir, el mecanismo de exclusión a la superinfección se pone en marcha hasta que el ADN es inyectado y comienza el proceso de translocación por la envoltura celular (membranas y

peptidoglicanos) sin brindar protección en la etapa previa de adsorción. Este hecho posiciona a la envoltura celular como el objeto principal de estudio que se debe analizar si se quieren entender los fenómenos de exclusión a la superinfección. Una de las técnicas más utilizadas en la investigación y que involucra la introducción de ácidos nucleicos a través de la envoltura celular de bacterias es la electroporación. Una breve descripción de su fundamento y aplicaciones se describe a continuación.

En la técnica de electroporación se usa la descarga eléctrica de un capacitor para formar un campo eléctrico de alta intensidad que genera poros en las membranas de las células, lo cual permite la entrada de moléculas de ADN exógeno.

La electroporación se lleva a cabo en una cámara de electroporación, que es simplemente una celda de plástico (parecida a las usadas en equipos de espectrofotometría) con dos electrodos en cada lado. Para dar el pulso eléctrico la celda se coloca en la cámara de pulsos y una vez activada la descarga, el pulso eléctrico es transmitido a través de la suspensión de bacterias-ADN durante algunos milisegundos.

Los dos principales tipos de pulsos que pueden emplearse en la electroporación son el de tipo decaimiento exponencial y el de tipo onda cuadrada (*square wave*) como se explican en la **Figura 3**.

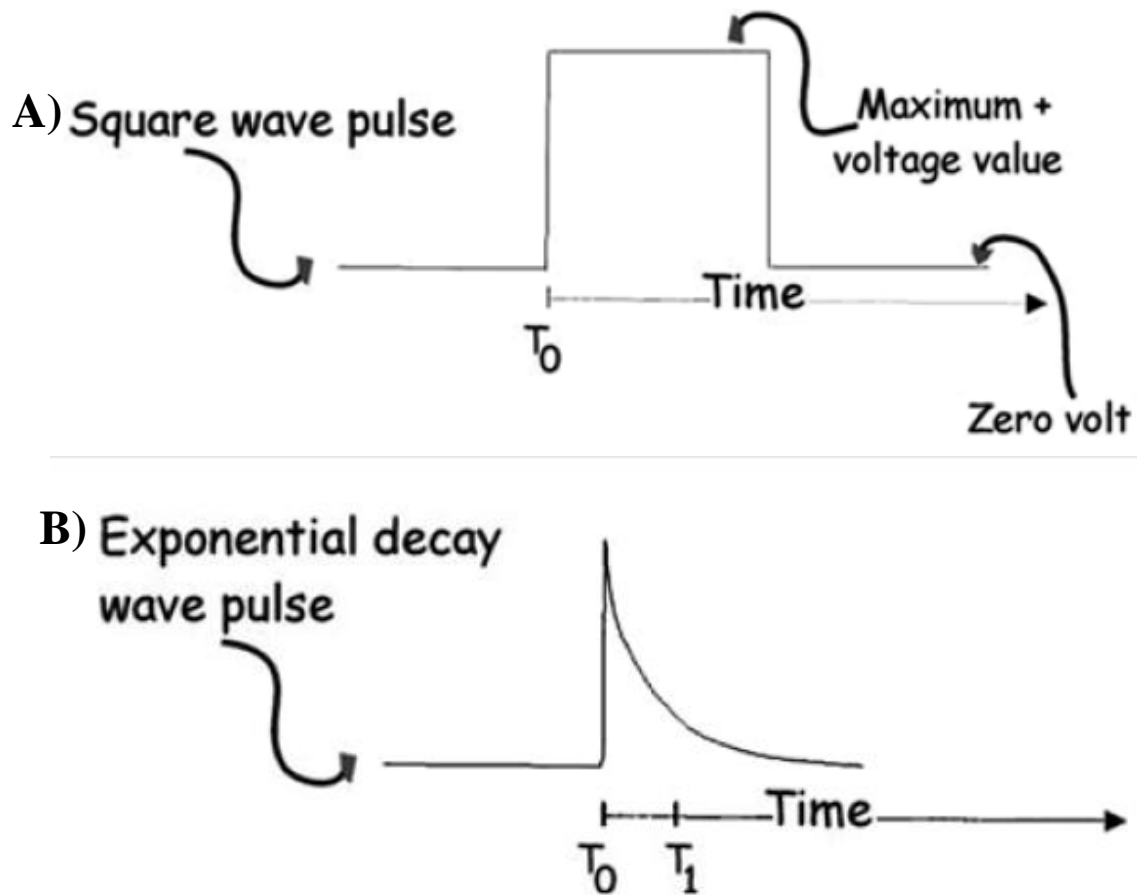


Figura 3. Tipos de pulsos en la electroporación. Principalmente existen dos formas comunes en que el voltaje puede ser aplicado para crear un campo eléctrico. A) Un pulso de onda cuadrada, por ejemplo, puede alcanzar muy rápido los 1000 V, permanecer a 1000 V y luego regresar a 0 V. Todo este proceso puede durar unos cuantos milisegundos. Durante casi todo el pulso, la señal se mantiene en los 1000 V. B) Por otro lado, un pulso de tipo decaimiento exponencial puede alcanzar igual de rápido el mismo voltaje, pero comienza a decaer inmediatamente. En la figura, T_0 indica el instante cuando se alcanza el voltaje máximo y T_1 el tiempo requerido para que el voltaje inicial disminuya 1/3 de su valor original. (Kee, S., Gehl, J., Lee, E. (2011). *Clinical Aspects of Electroporation*. Springer. (pp.47-48). DOI 10.1007/978-1-4419-8363-3)

Aparentemente, las bacterias pueden ser transformadas con plásmidos más eficientemente por pulsos de tipo decaimiento exponencial, mientras que algunos tipos de células de mamífero y protoplastos de plantas muestran por lo general transformaciones superiores con pulsos de tipo onda cuadrada (Hofmann, G. (1995). *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Humana Press. (pp. 31-32). doi.org/10.1385/0896033104).

Aunque una gran proporción de las células mueren durante el pulso eléctrico, muchas de las células experimentan una permeabilidad reversible, siempre que la fuerza del campo eléctrico no exceda un nivel crítico (Hofmann, G. (1995). *Electroporation Protocols for Microorganisms*. Humana Press. (pp. 125-126). doi.org/10.1385/0896033104). La técnica de electroporación surgió como una alternativa para algunas bacterias como las especies de *Pseudomonas* que no son naturalmente competentes (transferencia horizontal de ADN) y que deben usar estrategias más complejas como la conjugación para adquirir ADN exógeno. Esta técnica permite la transferencia eficiente de ADN en solución directamente dentro de las bacterias. Este método puede ser usado para transferir cualquier tipo ADN circular o lineal y replicativo o no replicativo para muchas aplicaciones como la expresión, reemplazamiento e integración sitio-específica de genes, recombinación homóloga y uso de transposones (Cadoret *et al.*, 2014). A continuación, un poco de su historia.

Hace 34 años se demostró que las cepas de *E. coli* LE392 y DH5 α lavadas previamente con HEPES o agua desionizada y mezcladas con plásmidos como pUC18 y pBR329 podían ser expuestas a un breve pero intenso pulso eléctrico de tipo decaimiento exponencial para producir hasta 10¹⁰ transformantes/ μ g de plásmido (Dower *et al.*, 1988). Al año siguiente se analizó que la eficiencia de transformación del vector de fago M13mp19 era mil veces mejor por electroporación que a través del método tradicional con CaCl₂ (Heery *et al.*, 1989). Este fue uno de los primeros experimentos en evidenciar la producción de fagos en bacterias a partir de ADN introducido mediante un pulso eléctrico. En esa misma época también se demostró que la electroporación era muy útil para la transfección de ARN (Taketo *et al.*, 1989) y ADN (Lyra *et al.*, 1991) de dos bacteriófagos Q β y PRD1 que infectaban a la *E. coli*. Con su auge en ascenso, esta técnica comenzó a usarse para electroporar cromosomas artificiales de bacteria (BACs) de hasta 240 kb (Sheng *et al.*, 1995) y como una alternativa rápida y de bajo costo para resguardar librerías de expresión clonadas en vectores de fagos como el λ EMBL3 de *E. coli* (Planelles *et al.*, 1998). Por otro lado, los métodos de electroporación para *P. aeruginosa* surgieron poco después de los trabajos sobre electroporación en *E. coli*. La primera modificación al método fue en el medio de lavado con sacarosa 300 mM con eficiencias mil veces más altas que con HEPES o agua, obteniéndose eficiencias de 10⁷ transformantes/ μ g de plásmido con las condiciones de 8kV/cm con la cepa PA103 de *P. aeruginosa* (Smith *et al.*, 1989).

Al año siguiente surgieron dos métodos más, el primero definió las condiciones óptimas para la cepa PAO1 con el plásmido pLAFR1 que dio como resultado una eficiencia de transformación 1500 veces mayor a la transformación química convencional con MgCl₂ (Diver *et al.*, 1990), el segundo utilizó la cepa PAO1 para demostrar una alta eficiencia de transformación a través de las suspensiones de bacterias congeladas las cuales fueron sometidas a voltajes de 2.5 kV y un buffer compuesto por 15% de glicerol y MOPS 1 mM, que dio como resultado 10⁸ transformantes/μg de plásmido (Farinha *et al.*, 1990).

Cuatro años más tarde se desarrollaron otros dos métodos, en el primero se encontraron las condiciones óptimas de electroporación para *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. flavida* con el plásmido pN1105 mediante los lavados con un buffer compuesto de sacarosa 300 mM y fosfato de potasio 5 mM que dio como resultado eficiencias de transformación 100-10000 veces mayores a la transformación química convencional con MgCl₂ (Itoh *et al.*, 1994), el segundo logró resultados similares, pero sólo con la cepa PpY101 de *P. putida* (Iwasaki *et al.*, 1994).

Como se pudo apreciar, la técnica de electroporación ha sido de utilidad desde hace mucho tiempo en la investigación y puede ser una herramienta importante para el estudio de los fenómenos de exclusión a la superinfección.

II. ANTECEDENTES

Los pili tipo 4 son necesarios para la motilidad espasmódica en bacterias y para la infección por fagos como MP22 en *P. aeruginosa*. En un estudio se describió que una proteína codificada por el profago D3112 llamada TIP es suficiente para provocar la inhibición de la motilidad espasmódica de la cepa PAO1. Se demostró que TIP interactúa y bloquea la actividad de la ATPasa PilB que se encarga de la extensión y ensamble del pilus tipo 4. Esta inhibición provocó que fagos como MP22, DMS3, MPK7 y PP7 no pudieran infectar cepas lisógenas de PAO1(D3112). Además, descubrieron que el ORF 5 del fago D3112 era el único responsable de este fenómeno de exclusión al clonarlo en el plásmido pUCP18. En la **Fig. 4** se describe de manera general el mecanismo de exclusión a la superinfección en PAO1 causado por el profago D3112 (Chung *et al.*, 2014).

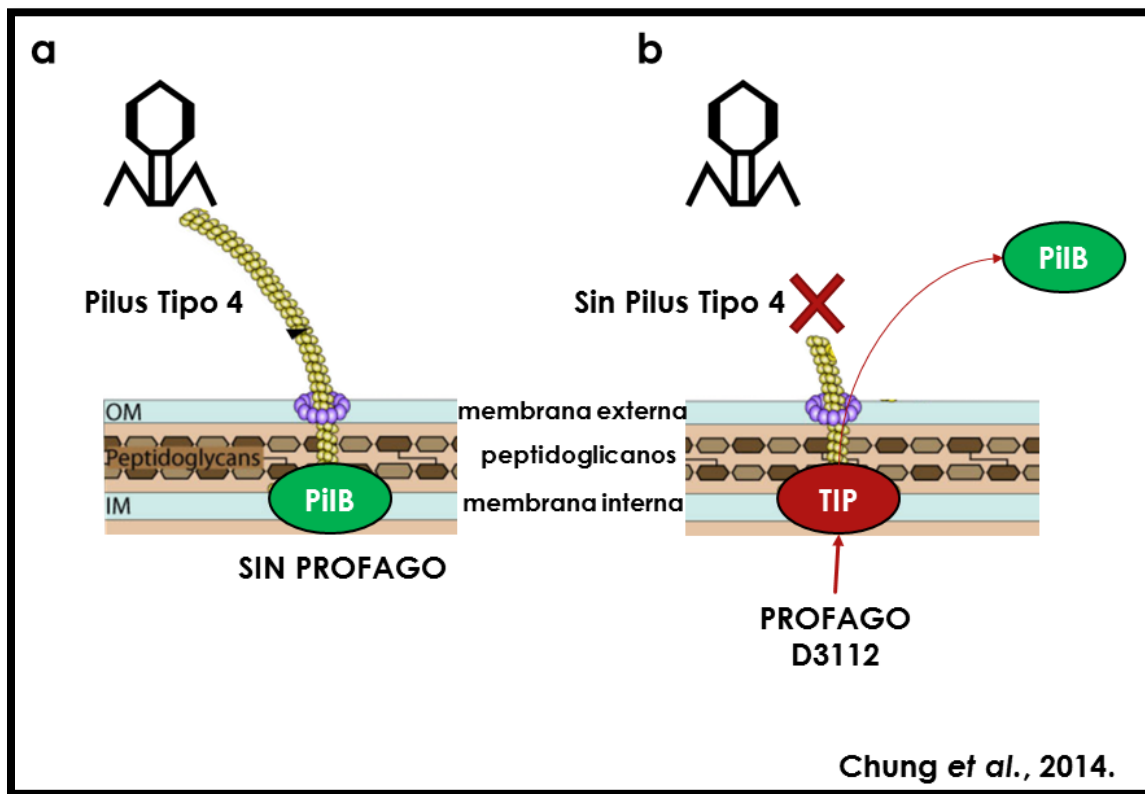


Figura 4. Sistema de exclusión a la superinfección del fago D3112 a nivel de membrana.
a) El pilus tipo 4 formado por la ATPasa PilB de la cepa PA14 permite la infección de los virus Pf; b) El profago D3112 en la cepa PA14 produce la proteína TIP que desplaza a la proteína PilB e impide la formación del pilus tipo 4, que evita la infección por parte de los virus Pf. (Tomada y modificada de Chung *et al.*, 2014)

En este año se publicó un trabajo similar al de 2014, donde se describió que las proteínas estructurales codificadas por profagos filamentosos en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* permitieron la exclusión de fagos Pf superinfectivos al interferir con la función del pilus tipo 4. Específicamente se evidenció que la proteína de la cápside menor del fago pVII inhibe la adsorción del fago Pf al interactuar con PilC y PilJ de T4P, además de que la sobreproducción de pVII anula por completo la motilidad espasmódica. También se demostró que la proteína pIII de la cápside menor proporciona exclusión parcial a la superinfección e interactúa con PilJ y las proteínas TolR/TolA. Finalmente, también observaron que pVII proporciona protección total contra la infección por fagos líticos dependientes de pilus y pIII confiere protección parcial contra fagos líticos independientes de pilus (Wang *et al.*, 2022).

En cuanto a antecedentes más locales, el trabajo publicado por Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 en este laboratorio estableció que el fenotipo de exclusión a la superinfección contra 16 fagos líticos descubierto en la cepa lisógena Ps33(Ps56) es provocado por la acción concertada de los ORFs 9 y 10 del fago Ps56 cuando están clonados juntos en el vector de expresión pHERD30T en la cepa Ps33 de *P. aeruginosa*. Un experimento realizado en este trabajo fue el ensayo de eflujo de potasio (K^+), que se basa en el hecho de que la traslocación del ADN de las partículas virales al infectar una bacteria siempre viene acompañada de una liberación de K^+ al medio que puede medirse. En el experimento el fago PaMx53 (uno de los 16 fagos líticos sensibles al fenotipo de exclusión) se puso en contacto con la cepa Ps33 portadora de los ORFs 9 y 10 en el vector pHERD30T y también con la cepa Ps33 que solo poseía el vector vacío. Los resultados demostraron que la cepa Ps33 con ambos ORFs clonados no liberó K^+ al medio (excluyó a PaMx53) mientras que aquella con el plásmido vacío liberó (fue infectada por PaMx53) un 35% de K^+ en el mismo lapso (30 min). Estos resultados indicaron que el fenotipo de exclusión provocado por los ORFs 9 y 10 estaba ocurriendo a nivel de envoltura en la cepa Ps33. Otro aspecto importante de este trabajo fueron los plásmidos que involucraron la clonación de los ORFs 9 y 10. Una construcción interesante fue la del plásmido pHERD30T con el 100% de la secuencia del ORF 10 y sólo el 64% de la secuencia del ORF 9 que seguía presentando el fenotipo de exclusión a pesar de no tener las secuencias completas como en la construcción pHERD30T original con ambas secuencias de los ORFs al 100% (Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020).

Estos antecedentes permitieron vislumbrar que era necesario el desarrollo de una técnica rápida y confiable que permitiera determinar si el mecanismo de exclusión a la superinfección

recién descubierto está ocurriendo a nivel de la envoltura celular o de citoplasma. Como ya se mencionó, la electroporación involucra la introducción de ácidos nucleicos a través de la envoltura celular de bacterias, lo cual se asemeja al proceso llevado a cabo por los fagos para translocar su material genético hacia el citoplasma. Esta comparación permitió colocar a la técnica de electroporación como el método idóneo para determinar rápidamente el nivel donde está ocurriendo un fenómeno de exclusión a la superinfección. En la literatura se encontraron algunos antecedentes donde la técnica de electroporación fue usada para transferir plásmidos, grandes moléculas de ADN y genomas de fagos completos en cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Se describen a continuación.

Hace 22 años se estableció un método para la transformación con plásmidos (pUCP20, pUCP24 y pUCP26) y fragmentos cromosomales (20-30 kb) en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* a partir de lavados con sacarosa 300 mM y pulsos eléctricos de tipo decaimiento exponencial que dieron como resultado eficiencias de transformación de 10^{11} y 10^3 transformantes/ μ g respectivamente (Choi *et al.*, 2006). La versatilidad de este método lo convirtió rápidamente en la técnica predilecta para la transformación de cepas de *P. aeruginosa* con plásmidos, como en el caso de nuestro laboratorio, donde se ha usado ampliamente con plásmidos pHERD (Qui *et al.*, 2008) y algunos plásmidos de la colección pSEVA (Silva-Rocha *et al.*, 2013) en cepas PAO1, PA14 y Ps33.

En cuanto a electroporación de genomas de fagos se pueden describir dos trabajos, el primero publicado hace 3 años describió un método para introducir el genoma del fago lambda en la cepa de *E. coli* DSM4230 a través de lavados con agua destilada fría y la aplicación de un pulso de tipo onda cuadrada de 3000 V (Janez *et al.*, 2019). Aunque los autores no reportaron la eficiencia del método, sí demostraron la presencia de placas aisladas provenientes de la electroporación en un tapiz de la cepa sensible y una fotografía por microscopía electrónica que permite apreciar la morfología de los fagos lambda (Fig. 5). Los autores también evaluaron que la electroporación de un plásmido de 4 kb siguiendo el mismo método requirió un pulso de tipo onda cuadrada de menor voltaje, sólo 2000 V.

Este trabajo concluyó que su método de electroporación era de baja eficiencia para la transfección de genomas del fago lambda y de alta eficiencia para la transformación con plásmidos pequeños en la cepa de *E. coli* DSM4230.

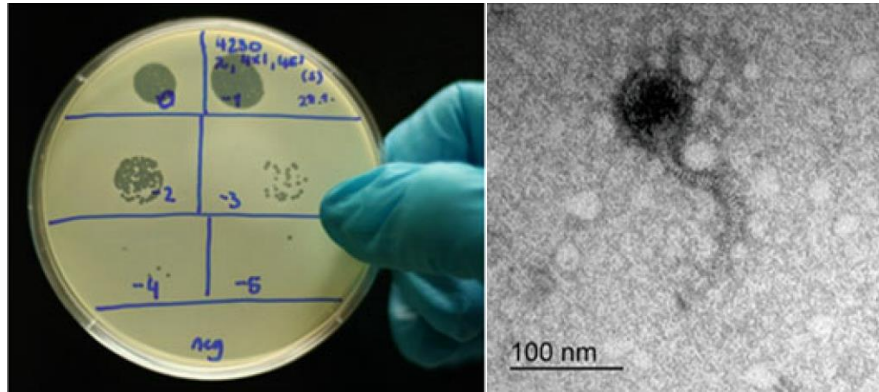


Figura 5. Electroporación del genoma del fago lambda en la cepa de *E. coli* DSM4230. Izquierda, diluciones de las placas provenientes de la electroporación del genoma del fago lambda en un tapiz de la cepa *E. coli* DSM4230. Derecha, fotografía por microscopía electrónica del fago lambda producido por el método de electroporación. (Tomada y modificada de Janez *et al.*, 2019)

Los trabajos sobre electroporación de bacterias mediante pulsos de tipo onda cuadrada son escasos, sin embargo, en uno de los pocos estudios que se pueden encontrar, explican los resultados obtenidos de un análisis sobre la orientación, permeabilización y transformación con plásmidos en la cepa de *E. coli* CB 0129 derivada de la cepa K12 bajo la influencia de pulsos de tipo onda cuadrada. En este trabajo, los autores concluyeron que después de aplicar el pulso a la bacteria, el cambio en su orientación es seguida de una alteración en su envoltura y que la duración del pulso parece ser un parámetro crítico para la transferencia de ADN mediante este tipo de electroporación (Eynard *et al.*, 1998).

Finalmente, en el segundo trabajo se describió el diseño de fagos sintéticos a partir de reacciones de PCR y su posterior ensamble en levadura (*YAC: yeast artificial chromosom*), que dio como resultado genomas artificiales de fagos que fueron electroporados en la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* mediante el método de electroporación ya citado de Choi y colaboradores (Pires *et al* 2021).

Es importante hacer notar que, aunque en ese último trabajo si pudieron transfectar genomas de fagos en la cepa PAO1 con el mismo método (Choi *et al.*, 2006) que nosotros hemos usado en este laboratorio para transformar cepas de *P. aeruginosa* como PAO1, PA14 y Ps33, nosotros no fuimos capaces de reproducirlo para transfectar genomas de fagos en la cepa Ps33.

Todas estas observaciones nos permitieron establecer objetivos en este proyecto, para continuar con la investigación sobre el fenómeno de exclusión a la superinfección derivado del fago Ps56 en la cepa clínica Ps33 de *P. aeruginosa*.

III. JUSTIFICACIÓN

A pesar del auge en el estudio de los fagos con fenotipo de exclusión a la superinfección, aún hay pocos reportes de fagos que provocan este fenómeno en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Por ello, es importante desarrollar técnicas confiables y accesibles que permitan

identificar cómo funciona la exclusión en estas cepas y así, acrecentar el conocimiento sobre este mecanismo en la investigación básica de fagos.

IV. HIPÓTESIS

Es posible confirmar que el fenotipo de exclusión a la superinfección por Ps33(Ps56) ocurre a nivel de envoltura celular y que el gen 10 es el único responsable del fenómeno.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

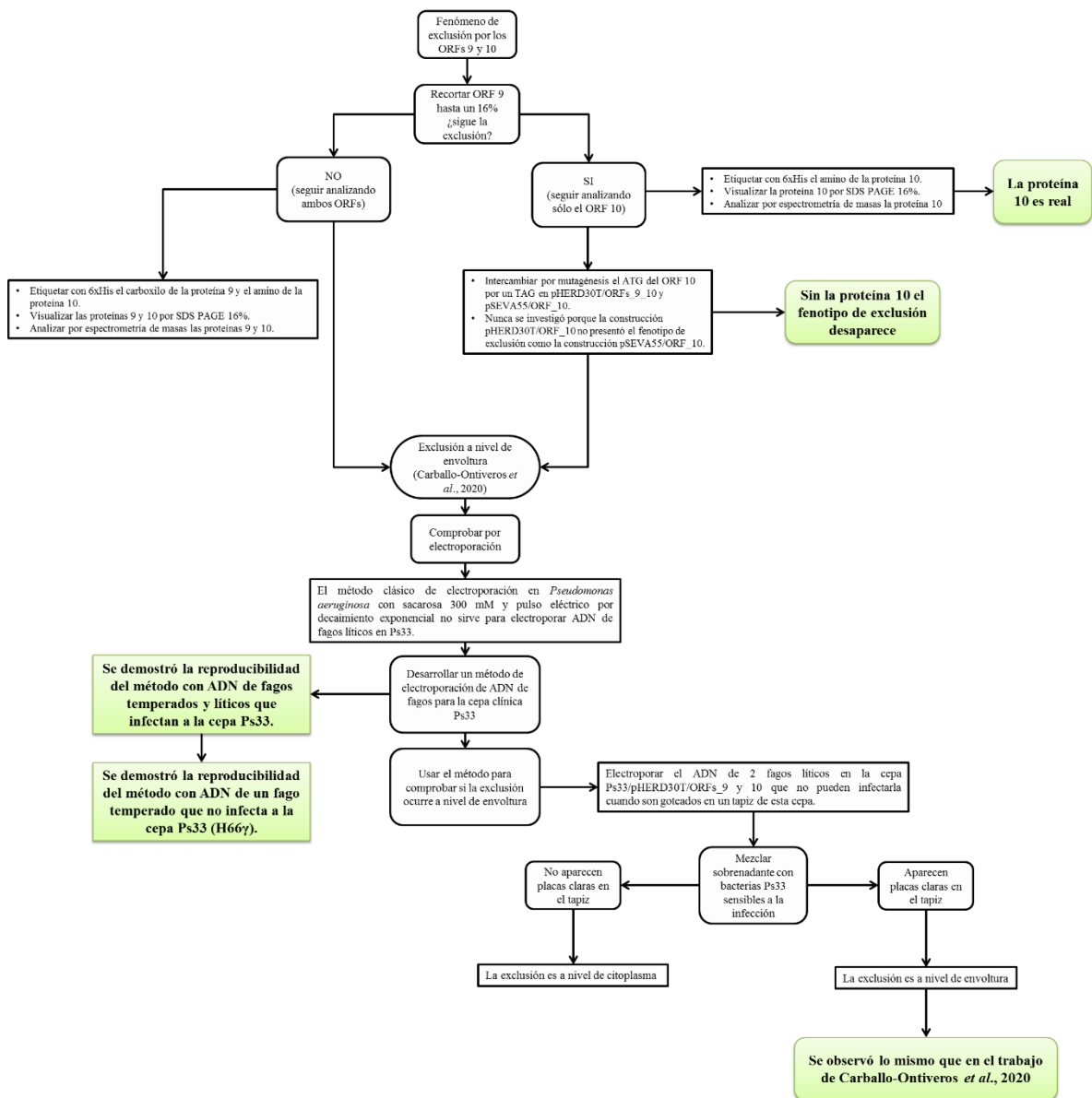
Confirmar que el fenotipo de exclusión a la superinfección ocurre a nivel de envoltura celular mediante una técnica de electroporación por onda cuadrada y que el gen 10 es el único

responsable del fenómeno a través de la eliminación gradual de su secuencia clonada en el vector pHERD30T.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Transfectar ADN genómico de fagos que infectan a Ps33.
 - 1.1. Transfectar ADN genómico de fagos que no infectan a Ps33 por un bloqueo en la envoltura celular.
2. Transfectar ADN genómico de fagos que no infectan a Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9 por un bloqueo en la envoltura celular.
3. Eliminar la secuencia del gen 9 hasta un 16%.
4. Demostrar que el gen 10 solo ejerce el fenómeno de exclusión a la superinfección.
5. Etiquetar y purificar la proteína codificada por el gen 10.
6. Obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína 10 por espectrometría de masas.

VI. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y bacteriófagos.

Las cepas Ps33 y PAO1 utilizadas en este estudio pertenecen a la colección de 142 cepas clínicas del Laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV, México. Dicha colección proviene del muestreo de tres hospitales de la Ciudad de México y de muestras solicitadas tanto a la ATCC como a la Universidad Nacional Autónoma de México. Los fagos usados que infectan a Ps33 fueron PaMx47, PaMx48, PaMx49 y PaMx53 (líticos) y Ps56 (temperado). El único fago usado que no infecta a la cepa Ps33, pero sí a la cepa PAO1 fue el fago temperado H66 γ . Este profago se obtuvo de la cepa lisógena PAO1(H66) mediante recombinación homóloga que derivó en la sustitución de uno de sus genes por el gen de resistencia a gentamicina. Esto permitió que la cepa lisógena resultante PAO1(H66 γ) pueda crecer en medios adicionados con 50 $\mu\text{g/mL}$ de este antibiótico (Ortega-Oliva *et al.*, en proceso). Todos fueron usados para los ensayos de infección mediante el goteo de diluciones en aumento provenientes de cada stock de fago en tapices de su cepa hospedera hasta que las placas aisladas fueran visibles (placas claras para fagos líticos y placas turbias para fagos temperados). Ninguno de los fagos líticos ha sido secuenciado, pero son de la misma especie (familia Siphoviridae y morfotipo B1) que el fago lítico PaMx10 cuya secuencia está depositada en GenBank bajo el número de acceso JQ067086 (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012). Al igual, las secuencias de los fagos Ps56 y H66 están depositadas en GenBank con los números de acceso MH719192 (Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020) y KC262634.1 respectivamente. El genoma del profago H66 γ no ha sido secuenciado. Las construcciones de la cepa Ps33 con los plásmidos pHERD30T y pSEVA55, así como la cepa lisógena Ps33(Ps56) con pHERD30T vacío se obtuvieron de criotubos almacenados a -70°C ya existentes (Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020).

Propagación de los fagos.

Cultivos overnight de las cepas Ps33 y PAO1 de *P. aeruginosa* fueron crecidos en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C de los cuales se tomaron 300 μL para elaborar tapices con 100 μL de los stocks de cada uno de los fagos que infectan a la cepa Ps33 (Ps56, PaMx47, PaMx48, PaMx49 y PaMx53) y con el único fago que infecta a la cepa PAO1 (H66 γ). En todos los casos, las placas fueron aisladas y propagadas para generar una colección de fagos que fue usada para este estudio. Los fagos fueron individualmente propagados en tapices de su

correspondiente cepa sensible. Las placas fueron depositadas en tubos de 1.5 mL con 1 mL de buffer SM (200 mM NaCl, 0.5 mM MgSO₄, 1 mM Tris-HCl, y 0.1% de gelatina; el pH fue ajustado a 7.4 con HCl) y centrifugadas a 9000 X g por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron depositados en tubos nuevos estériles y tratados con cloroformo. Una segunda ronda de centrifugación se hizo para recolectar cada sobrenadante como un stock de fago individual (con un título de 10⁸ UFP/mL). Todos los stocks fueron almacenados a 4°C.

Gradientes de CsCl.

Las preparaciones de fagos fueron purificadas como se ha descrito previamente (Sambrook et al., 2001). Las partículas de los fagos fueron recolectadas de lisados de tapices bacterianos en cajas Petri concentrados con PEG 8000 y lavados con cloroformo. Cada preparación de fago fue concentrada por centrifugación en tubos Ultra-Clear para centrifuga (no. de catálogo 344060; Beckman Coulter) con gradientes de CsCl. Los tubos fueron centrifugados a 61,000 X g por 2.5 h a 4°C y los fagos fueron recuperados a través de un pinchazo lateral con la aguja de una jeringa. Los fagos obtenidos fueron dializados con 3 rondas de buffer (10 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM MgCl₂) por 1 hora a 4°C. Los fagos purificados fueron almacenados a 4°C.

Extracción de ADN.

El ADN de los fagos fue extraído con fenol-cloroformo (1:1) de los fagos purificados por gradientes de CsCl (Sambrook et al., 2001).

Preparación de bacterias electrocompetentes de la cepa Ps33.

Se inocularon 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) con una colonia de una caja Petri con crecimiento de la cepa Ps33. El cultivo se dejó en incubación a 37°C con agitación toda la noche. El cultivo se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 mL y se centrifugó a 9000 X g por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante. La pastilla de bacterias se resuspendió con 50 mL de agua MilliQ estéril fría en hielo y se volvió a centrifugar a 9000 X g por 10 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces más. La pastilla de bacterias se resuspendió en 1 mL de agua MilliQ estéril fría, la suspensión se dividió en alícuotas de 200 µL c/u y se almacenaron a -70°C inmediatamente durante 1 o 2 horas antes de usarlas.

Electroporación.

Las bacterias electrocompetentes de la cepa Ps33 se descongelaron en hielo y se mezclaron con el ADN del fago en cuestión en un tubo de 1.5 mL que se dejó en hielo por 20 minutos. La mezcla fue transferida a una celda de electroporación nueva (no. de catálogo EPC102-50; BECAST) previamente enfriada a la cual se le aplicó un voltaje de 3000 V durante 5 ms mediante el programa predeterminado SQUARE WAVE del equipo de electroporación BIORAD Gene Pulser Xcell Electroporation System.

Tapices de la cepa Ps33.

Después de mezclar cuidadosamente con 1 mL de LB se tomó todo el líquido de la celda y se transfirió a un tubo de vidrio con 4 mL de medio TΦ-MgSO₄ previamente derretido que se usó para realizar los tapices bacterianos en cajas Petri que fueron incubados a 37°C toda la noche para evidenciar la aparición de spots de lisis al día siguiente.

Ensayos de infección y exclusión.

Se tomaron 10 µL de los stocks de los fagos Ps56, PaMx47, PaMx48, PaMx49 y PaMx53 con un título de 10⁸ UFP/mL para hacer diluciones seriadas y ser goteadas en tapices de la cepa Ps33. De igual forma 10 µL del stock del fago H66γ fue diluido y goteado en tapices de la cepa PAO1. Después de la incubación a 37°C toda la noche, la presencia o ausencia de las placas aisladas fue registrada para clasificar cada evento de infección en dos categorías: infección o exclusión. Todos los ensayos de infección se hicieron por triplicado.

Extracción de DNA de fago por gradientes de CsCl.

Para cada muestra del fago, se preparó un cultivo overnight con 5 mL de medio LB líquido que se inoculó con la cepa bacteriana correspondiente y se dejó en incubación por 15 horas a 37°C con agitación de 200 RPM. Después de ese tiempo, se tomó 1 mL del cultivo y se adicionó a un matraz que contenía 100 µL del stock del fago en cuestión y 1 mL de la solución CaCl₂/MgCl₂ (0.4M/0.1M), se dejó reposar la mezcla por aproximadamente 10 min. Mas tarde, a la mezcla se le adicionaron 50 mL de medio LB líquido y se incubó por 6 horas a 37°C con agitación de 200 RPM. Posteriormente, al matraz se le agregaron 5 mL de Cloroformo y se dejó en agitación a 37°C por 10 minutos a 200 RPM. Al terminar este

proceso la mezcla se transfirió a un tubo cónico de 50 mL que fue centrifugado a 6,000 RPM por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo cónico de 50 mL, y se le adicionaron 4g de PEG 8000, 2g de NaCl, 2.5 µL de DNAsa y 2.5µL de RNAsa, toda la mezcla se incubó a 37°C por 30 min. Luego la mezcla se agitó hasta que el PEG y el NaCl se disolvieron totalmente, lo que permitió dejar el tubo a 4°C durante 15 horas. Pasado ese tiempo el tubo cónico fue centrifugado a 10,000 RPM por 20 min a 4°C, el sobrenadante fue eliminado porque ya no iba a usarse para otros fines. La pastilla resultante fue resuspendida con 1 mL de medio TMG-SM y transferida a dos tubos de 1.5 mL que contenían 500 µL de Cloroformo, los tubos se mezclaron y se centrifugaron a 10,000 RPM por 10 min a 4°C, el sobrenadante fue recuperado. Este paso se repitió dos veces más, lo que dio un total de 3 lavados con Cloroformo. Al final se recuperaron 500 µL de muestra de cada tubo de 1.5 mL, que se mezclaron con 1 mL de medio TMG-SM. Los 2 mL resultantes de la mezcla se transfirieron a un tubo Beckman Ultra Clear® en el que previamente se vaciaron 4 soluciones de CsCl a diferente molaridad y densidad (Fig. 6). Después, el tubo fue centrifugado a 22 000 RPM por 2.5 horas a 4°C en condiciones de vacío y sin freno, ya que esto podría dañar el gradiente y por consiguiente las muestras. Después de esto, se usó una jeringa de 10 mL para recuperar 1 mL de la muestra de los fagos purificados que pudieron apreciarse en la “Región de fagos verdaderos” (Fig. 6). Las muestras recolectadas se transfirieron a una membrana Spectra/Por® de 6-8 kD que se dejó en 1 litro de solución de diálisis durante 15 horas a 4°C bajo condiciones de agitación con una agitador magnético o mejor conocido como “mosca”. Posteriormente, dicha muestra dializada se recuperó en dos tubos de 1.5 mL (cada una de las muestras con 500 µL de muestra). Mas tarde, las muestras fueron tratadas con el método de extracción de DNA por fenol/cloroformo 1:1, el cual se describe a continuación.

A los tubos de 1.5 mL se les añadió un volumen equivalente de fenol/cloroformo y se centrifugaron a 10,000 RPM por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue guardado y usado para otros 2 lavados de fenol/cloroformo. Después, al sobrenadante del 3er lavado se le agregó 1 mL de etanol absoluto (EtOH) frío, esta mezcla se agitó por 1 min y se centrifugo a 10,000 RPM durante 3 min a 4°C. Se tiró el sobrenadante de los tubos de 1.5 mL y se invirtieron sobre papel durante 5 min para dejar secar la pastilla formada en el fondo de los tubos. El siguiente paso en el procedimiento fue añadirle a cada tubo de 1.5 mL 1mL de etanol al 70% (EtOH 70%), esta mezcla se agitó durante 1 min y se centrifugó a 10,000 RPM por 3 min a

4°C. El sobrenadante se tiró porque ya no iba a ser necesario para otros fines y la pastilla se lavó con etanol al 70% otras 2 veces. Al final, después del tercer lavado, se eliminaron los remanentes del etanol al 70% en la pastilla por medio del equipo de vacío SpeedVac® a una temperatura media por aproximadamente 20 min y después de ese tiempo la pastilla se resuspendió aproximadamente 50 a 100 µL de agua estéril dependiendo del tamaño de la pastilla. Las muestras de ADN del fago purificado se cuantificaron en el NanoDrop® y se almacenaron a una temperatura de -20°C en el congelador del Laboratorio 3.

Patrones de Restricción

Cada reacción de restricción se hizo en un volumen de 20 µL y con los siguientes reactivos:

- 1 µg de ADN del fago en cuestión purificado mediante gradientes de CsCl.
- 10 U (unidades) de la enzima de restricción en cuestión.
- 2 µL del buffer de la enzima de restricción que estaba a 10X.
- Agua estéril para llevar la reacción a un volumen final de 20 µL.

Se adicionó cada reactivo a un tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 14,000 RPM durante 1 min a temperatura ambiente para mejorar el contacto entre los reactivos. La mezcla en el tubo de 1.5 mL se incubó a 37°C toda la noche y después de ese tiempo se colocó en un gel de agarosa al 0.8 % y se corrió en una cámara de electroforesis a 80V por 1.5 horas. Pasado ese tiempo el gel se dejó en una solución de buffer TAE 1X con 10 µL de bromuro de etidio durante 40 min aproximadamente. Finalmente, el gel se procesó en el equipo TransIlluminator UVP® bajo luz UV de donde se obtuvo una fotografía nítida del gel en cuestión.

Diseño de oligos

Para el diseño de oligos se usó el programa PerlPrimer v1.1.21 o la página web Tm Calculator de Thermo Fisher Scientific – MX (Allawi & Santa Lucia 1997). En estas aplicaciones se introdujeron las secuencias que se deseaban amplificar y se consideraron los siguientes parámetros en el diseño:

- Temperatura de fusión de los oligos (T_m).
- Diferencia de T_m entre el oligo forward y el oligo reverse.
- La longitud total de los oligos considerando los sitios de restricción.
- El posicionamiento teórico de los oligos en la secuencia problema.
- El porcentaje de las bases de guaninas y citosina (porcentaje de GC).

Una vez que la aplicación o las aplicaciones encontraban los oligos óptimos para amplificar la secuencia de interés, éstos se comprobaban con el programa jPCR v.3.16. En este programa, se introdujeron los oligos diseñados y la secuencia en cuestión para realizar PCR de manera *in silico*, y así comprobar que se obtenían las secuencias diseñadas a través del tamaño de estas, es decir, el amplicón resultante que daba el programa en cuestión.

PCR

- Para clonación de genes de fago: High Fidelity Polymerase de Jena Bioscience. Primers [0.2 μ M], Buffer 10X [1X], dNTPs [0.2 mM], Pol [0.25 U/10 μ L de reacción], ADN [10-50 ng] y Agua MilliQ estéril.
- Para PCR de colonia: DreamTaq DNA Polymerase de Thermo Scientific. Las colonias se resuspendían en 50 μ L de Agua MilliQ estéril y se hervían a 96°C (10 min para *E. coli* y 15 min para *P. aeruginosa*). De ahí se tomaban 6 μ L. Primers [0.2 μ M], Buffer 10X [1X], dNTPs [0.2 mM], Pol [0.25 U/10 μ L de reacción], y Agua MilliQ estéril.
- Programa en el termociclador: 95°C-3 min, 95°C-30 seg, T_m -30 seg, 72 °C-1 min, 72°C-5 min, 4°C- infinito.

Western Blot

1. Transferencia húmeda (duración 12 a 16 horas)

Para la transferencia en húmedo se requiere de la cámara para transferencia en húmedo (Lab. Dr. L. K.) y Buffer de Transferencia (Tank buffer: trizma base 303 g y glicina 1442 g para una solución stock de 10 litros 10X; para 2 litros de una solución 1X, se disuelven 6.06 g de trizma base y 28.84 g de glicina. La solución 1X de buffer de transferencia se lleva al 20 %

de metanol. Se pesa la glicina, el trizma base y se disuelven en H₂O destilada o doble destilada (DDW o milli Q), se adiciona el metanol para una concentración final del 20 % según el volumen a preparar. Para 2 litros se adicionan 400 mL de metanol y se afora a 2 litros).

Una vez que terminó la electroforesis en gel de poliacrilamida se sacan los geles y con uno de ellos se forma un sándwich en el siguiente orden (del polo negativo hacia el polo positivo): dos papeles filtro (9 x 6 cm), gel de poliacrilamida (proteína de interés), membrana de NITROCELULOSA y dos papeles filtro. El sándwich se coloca entre las esponjas del sujetador (sándwich acrílico con tapas de color negro (gel-negativo) y rojo o transparente (membrana-positivo) que sirven para orientarlo en la cámara de acuerdo con la polaridad de la corriente eléctrica).

Una vez que se colocó el sándwich (papeles filtro, gel, membrana y papeles filtro) en el sujetador acrílico con las esponjas, éste se introduce a la cámara de transferencia orientándolo de acuerdo con la polaridad de negativa a positiva (uno o más geles a transferir). La cámara se llena (verificar límite de llenado) con buffer de transferencia (previamente enfriado a 4°C y concentración 1X) y se realiza la transferencia a 20 V o 25 V toda la noche (12 a 16 horas). El otro gel se fija, tiñe y destiñe normalmente.

2. Bloqueo de membranas e incubación con anticuerpos (duración 7 horas)

Se prepara una solución de TBS-T 1X (TBS-Tween) al 0.05 % a partir de una solución stock 10X (para 1 L: NaCl 8g y Trizma Base 2.4g. Ajustar pH a 7.6 con HCl y filtrar). Tween 20, 1 mL.

Para 500 mL de TBS 1X se toman 50 mL de la solución stock y se aforan a 500 mL (450 mL de H₂O de tu preferencia; sugerencia agua bidestilada o milli Q).

Posteriormente se adicionan 250 µL de Tween 20 (como el detergente presenta alta densidad, se sugiere cortar la punta (no mucho) con la que se tomará el volumen deseado (para agilizar el proceso) y una vez que se vertió en la solución TBS dejar la punta dentro de la solución para favorecer la disolución total del detergente (TBS-T 0.05 %).

Para evitar inespecificidad de los anticuerpos, es necesario bloquear la membrana (toda la membrana en donde no se presentan proteínas de interés). Cubrir el resto de la membrana se puede realizar con caseína (proteína de la leche) si se cuenta con la proteína como reactivo.

De no ser así se puede utilizar cualquier marca comercial de leche semidescremada o descremada en polvo y preparar una solución que puede ir del 5 %, 10 %, 15 % o 20 %, dependiendo de la especificidad de los anticuerpos a utilizar y la cantidad de proteína presente a identificar.

Dependiendo de la cantidad que se requiera para cubrir la membrana durante el bloqueo la solución debe de quedar a una concentración final TBS-T-0.05%-leche-5% (de acuerdo con las condiciones que se requieran):

Para 50 mL se disuelven 2.5g de leche.

Para 25 mL se disuelven 1.25g de leche.

Para 15 mL se disuelven 0.75g de leche.

Para 10 mL se disuelven 0.5g de leche.

Para 05 mL se disuelven 0.25g de leche.

La membrana en cuestión puede bloquearse en agitación suave (Velocidad: 40) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Una vez concluido el tiempo de bloqueo se realizan 4 lavados con TBS-T 0.05% de 10 mL c/u por 10 minutos (40 minutos) a temperatura ambiente con agitación fuerte (Velocidad: 100).

Una vez terminada la primera serie de lavados se procede a incubar con el anticuerpo primario (que reconoce a la proteína de interés).

Se usa 1/10 000, es decir 1 μ L de Ab 1° (el Anti His 6, lo guarda José Bueno) en 10 mL de TBS-T-leche-2%, se vierte sobre la membrana y se incuba con agitación suave durante 2 h a TA.

Posterior al tiempo de incubación con el Ab 1° (se puede recuperar la solución del Ab 1° en tubos cónicos para almacenar a 4°C; para aumentar el tiempo de vida de la solución se pueden adicionar 5 μ L de azida de sodio al 20%).

Una vez concluido el tiempo de incubación de la membrana con el Ab 1° se realizan 4 lavados con TBS-T 0.05% de 10 mL c/u por 10 minutos (40 minutos) a temperatura ambiente con agitación fuerte.

Una vez terminada la segunda serie de lavados se procede a incubar con el anticuerpo secundario (Ab que reconoce la fracción cristalizable o constante “Fc” del Ab 1° (p. ej. Goat anti Rabbit); el Ab 2° se encuentra acoplado a peroxidasa).

Al igual que con el Ab 1° el Ab 2° se resuspende en TBS-T-leche-2% a una proporción de 1/10 000. Se vierte sobre la membrana y se incuba con agitación suave durante 1 hora.

Posterior al tiempo de incubación con el Ab 2° (se puede recuperar la solución del Ab 2° en tubos cónicos para almacenar a 4°C; para aumentar el tiempo de vida de la solución se pueden adicionar 5 µL de azida de sodio al 20%).

Una vez concluido el tiempo de incubación de la membrana con el Ab 2° se realizan 4 lavados con TBS-T 0.05% de 10 mL c/u por 10 minutos (40 minutos) a temperatura ambiente con agitación fuerte.

Una vez terminada la tercera serie de lavados, la membrana está lista para revelarse.

3. Revelado (50 minutos)

Verificar si el cuarto oscuro se encuentra disponible

Para revelar con placas autorradiográficas es necesario trabajar en cuarto oscuro, asegurarse de que las luces en cuestión no velan las placas (foco rojo) y llevar todo el material correspondiente.

La membrana se coloca encima de un acetato y se le añade la mezcla de 200 µL de Luminol y 200 µL de Peroxide. Después otro acetato se pone encima de la membrana para esparcir la solución de manera uniforme. La membrana queda entre los dos acetatos.

Se apagan las luces, se vacían las soluciones Reveladora y Fijadora en los contenedores correspondientes y se coloca (con guantes) una placa autorradiográfica (del tamaño de la membrana y con un corte en diagonal en alguna de las esquinas superiores que indique el lado en el que se encuentra el marcador de peso molecular) por encima del acetato que cubre la membrana el tiempo que se considere dependiendo de la reacción. 20, 15, 10 y 5 minutos.

Posteriormente la placa se revela sumergiéndola en un recipiente con Solución Reveladora (1 min), enseguida se enjuaga en un contenedor con agua corriente y se sumerge en otro contenedor con Solución Fijadora (1 min) y finalmente se enjuaga bajo el flujo de agua de la

llave (sostener firmemente para evitar que se caigan) se elimina el exceso de agua y se dejan secar a temperatura ambiente colgadas o recargadas sobre algo.

VIII. RESULTADOS

8.1 Comprobación de los fenotipos de exclusión e infección

Con el objetivo de verificar los fenotipos de exclusión e infección de las cepas que fueron usadas en el trabajo de Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 se llevaron a cabo ensayos de infección en todas las construcciones resguardadas a -70°C en este laboratorio por el autor del trabajo citado. El ensayo consistió en gotear las diluciones de dos fagos sensibles (PaMx47 y PaMx53) y dos fagos inmunes (PaMx48 y PaMx49) al fenotipo de exclusión en un tapiz de la cepa en cuestión. La Fig. 7 muestra que la cepa Ps33 con el plásmido pHERD30T vacío fue susceptible a la infección de los cuatro fagos líticos, como se esperaba. La Fig. 8 muestra el fenómeno de exclusión proveniente de la cepa lisógena con el plásmido vacío, al igual que la Fig. 9 donde también se observó la exclusión causada por los genes 10 y 9 clonados en el plásmido pHERD30T. Ambos resultados coincidieron con lo reportado.

En el trabajo de Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 no se evaluó la construcción de la cepa Ps33/pSEVA55/ORF_10 de manera individual, por lo que se decidió ponerla a prueba. Al

realizar el ensayo de infección se descubrió el mismo patrón de exclusión (Fig. 10) que con la construcción pHERD30T que tiene clonados los genes 10 y 9 (Fig. 9). Ante esta sorpresa, el fenotipo de la construcción Ps33/pHERD30T/ORF_10 también fue evaluado, pero se encontró que no se presentaba el fenotipo de exclusión, como ya se había reportado (Fig. 11).

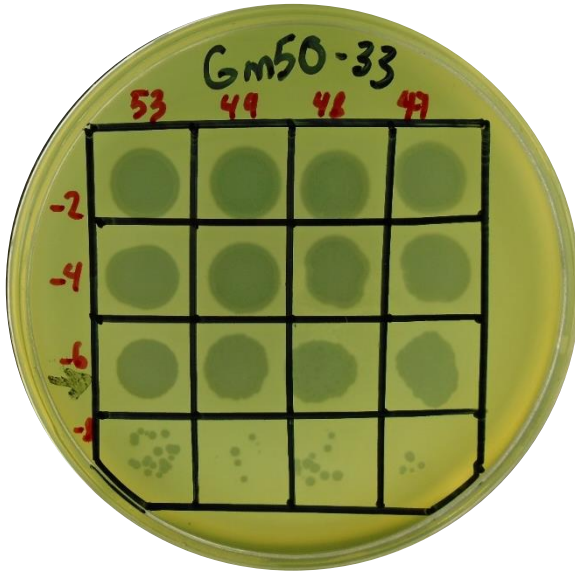


Figura 7. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pHERD30T. Tapiz bacteriano con 300 μ L de un cultivo overnight y 4 mL de medio T Φ -MgSO₄ en una caja de LB con 50 μ g/mL de gentamicina. **53:** PaMx53; **49:** PaMx49; **48:** PaMx48 y **47:** PaMx47. Se observó infección en todos los casos.

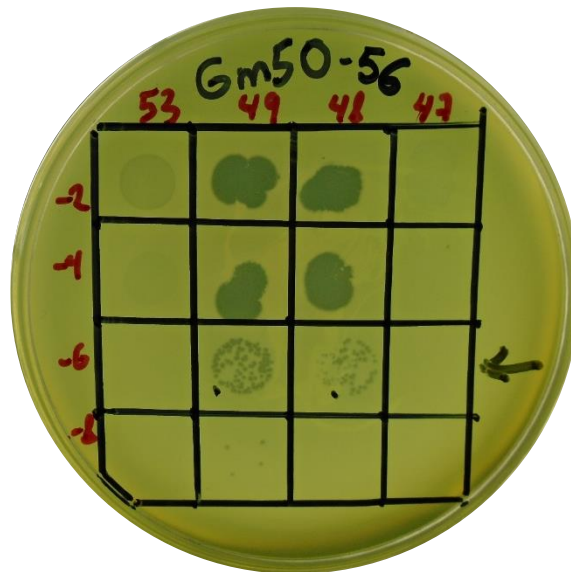


Figura 8. Ensayo de infección sobre la cepa lisógena Ps33(Φ Ps56)/pHERD30T. Ver pie de Figura 7. Se observó infección en el caso de los fagos PaMx48 y PaMx49. Y exclusión en el caso de los fagos PaMx47 y PaMx53.

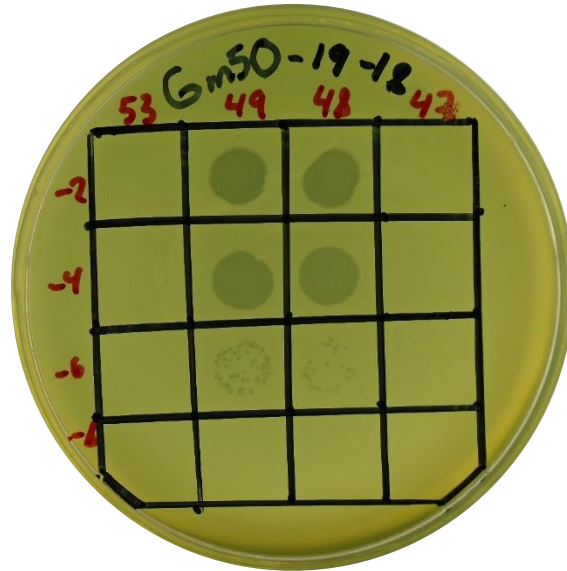


Figura 9. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9.
Ver pie de Figura 7. Se observó infección en el caso de los fagos PaMx48 y PaMx49. Y exclusión en el caso de los fagos PaMx47 y PaMx53.
Nota: 19: gen 10; 18: gen 9.

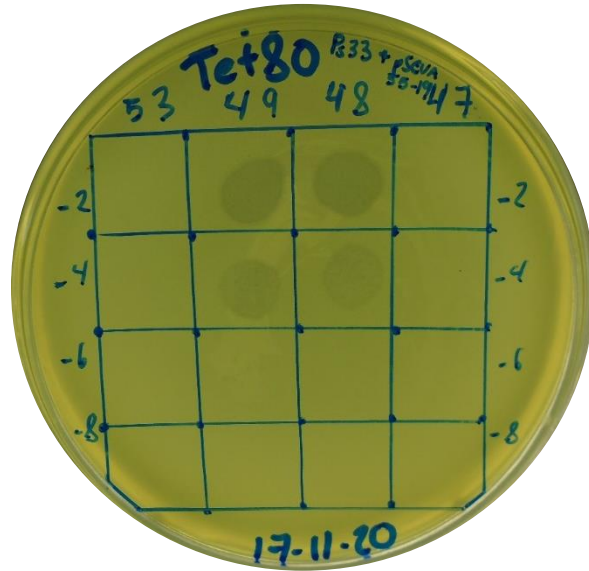


Figura 10. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pSEVA55/ORF_10.
 Ver pie de Figura 7. Se observó infección en el caso de los fagos PaMx48 y PaMx49. Y exclusión en el caso de los fagos PaMx47 y PaMx53.
 Nota: 19: gen 10. Caja de LB con 80 µg/mL de tetraciclina.

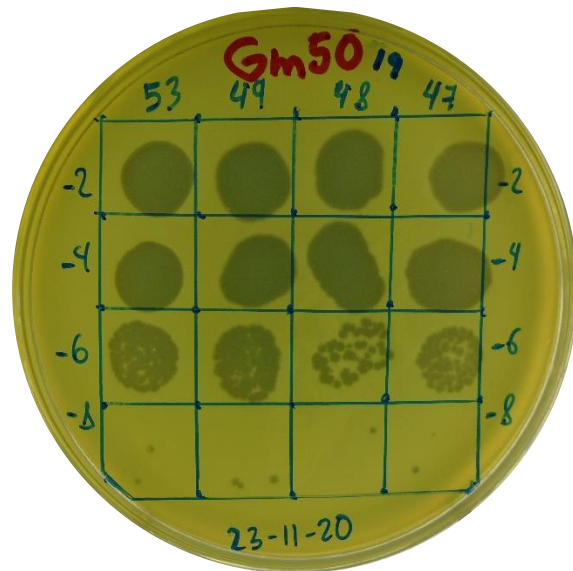


Figura 11. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pHERD30T/ORF_10.
 Ver pie de Figura 7. Se observó infección en todos los casos.
 Nota: 19: gen 10.

8.2 Resección del gen 9 al 16%

Para empezar el estudio del gen 9 primero se determinó su localización en el genoma del fago Ps56. Para lograr esto se secuenció la región intergénica entre el final del gen 10 y el principio del gen 9 de los fagos Fc02 y Ps56. En la **Figura 12** se muestra el alineamiento y el porcentaje de identidad entre las secuencias, que al ser de casi un 90%, permitió considerar que los genes 9 de ambos comienzan y terminan igual. Con el objetivo de verificar si el gen 9 era necesario para el fenotipo de exclusión, se decidió recortar gradualmente su secuencia mediante tres amplificaciones por PCR. La primera abarcó toda la secuencia del gen 10 y un 64% de la secuencia del gen 9, la segunda toda la secuencia del gen 10 y un 35% de la secuencia del gen 9 y la tercera toda la secuencia del gen 10 y un 16% de la secuencia del gen 9. Se encontró que un 16% de la secuencia del gen 9 clonada junto con el 100% de la secuencia del gen 10 seguían presentando el fenotipo de exclusión a la superinfección como se muestra en las **Figuras 13 y 14**. El resultado se comprobó por secuenciación para evidenciar que efectivamente solo estaba el 16% de la secuencia del gen 9, lo cual quedó plasmado en la **Figura 15**.

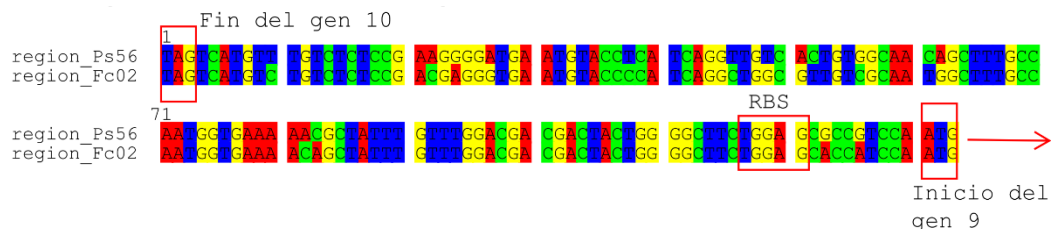


Figura 12. Alineamiento de la región intergénica entre el gen 10 y el gen 9 en los fagos Ps56 y Fc02. Se realizó un alineamiento proveniente de la secuenciación de la región entre el final del gen 10 y el inicio del gen 9. La identidad entre las secuencias fue de un 87%, es decir, 111 de 127 bp resultaron idénticas.

ORF 10 al 100%
ORF 9 al 100%

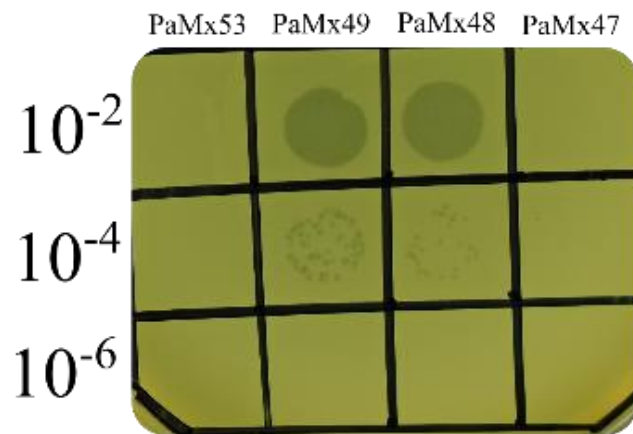
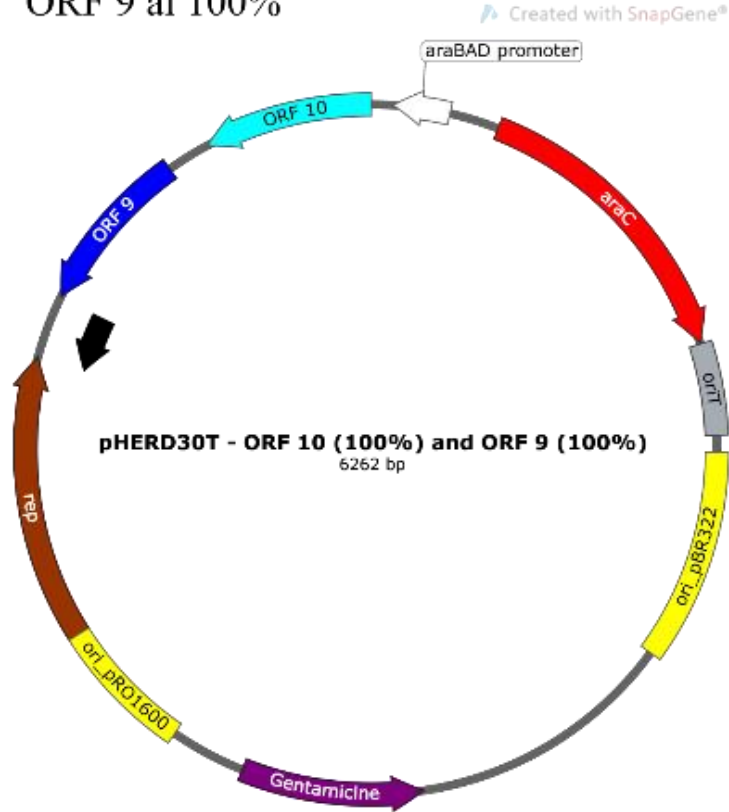


Figura 13. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9. Ver pie de Figura 7. Se observó infección en el caso de los fagos PaMx48 y PaMx49. Y exclusión en el caso de los fagos PaMx47 y PaMx53. *Ensayo control.*

ORF 10 al 100%
ORF 9 al 16%

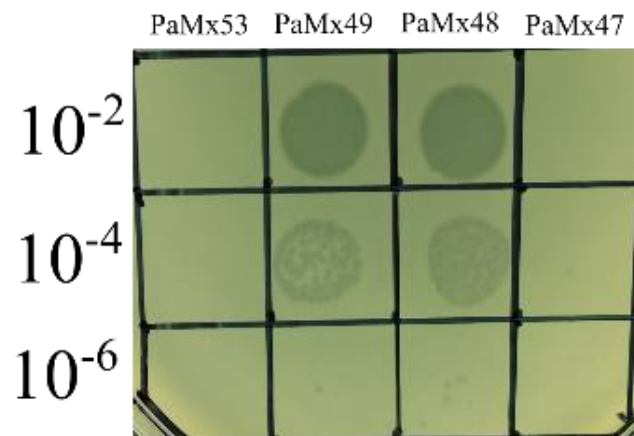
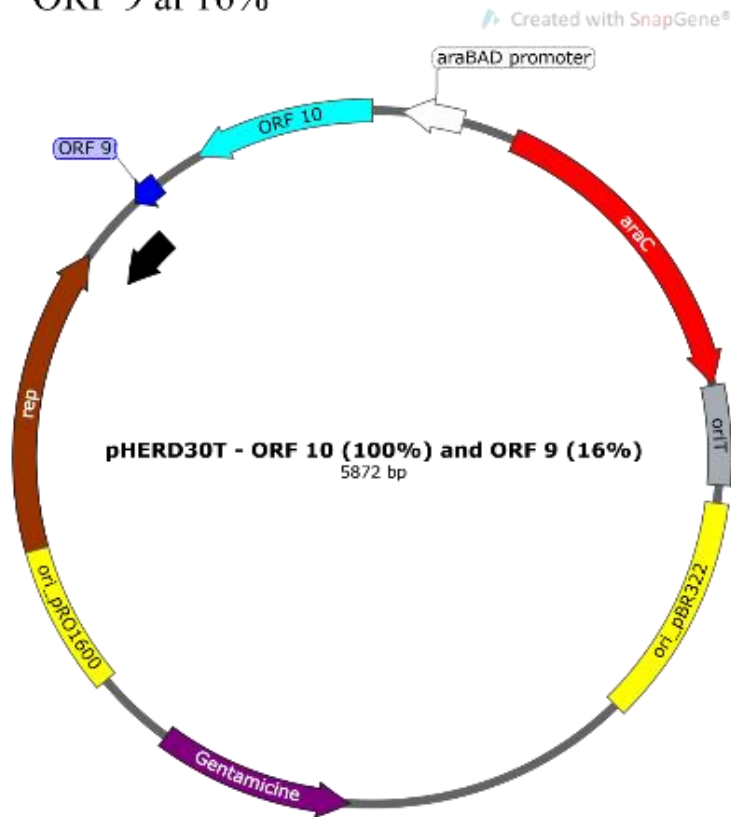


Figura 14. Ensayo de infección sobre la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9(16%). Ver pie de Figura 7. Se observó infección en el caso de los fagos PaMx48 y PaMx49. Y exclusión en el caso de los fagos PaMx47 y PaMx53.

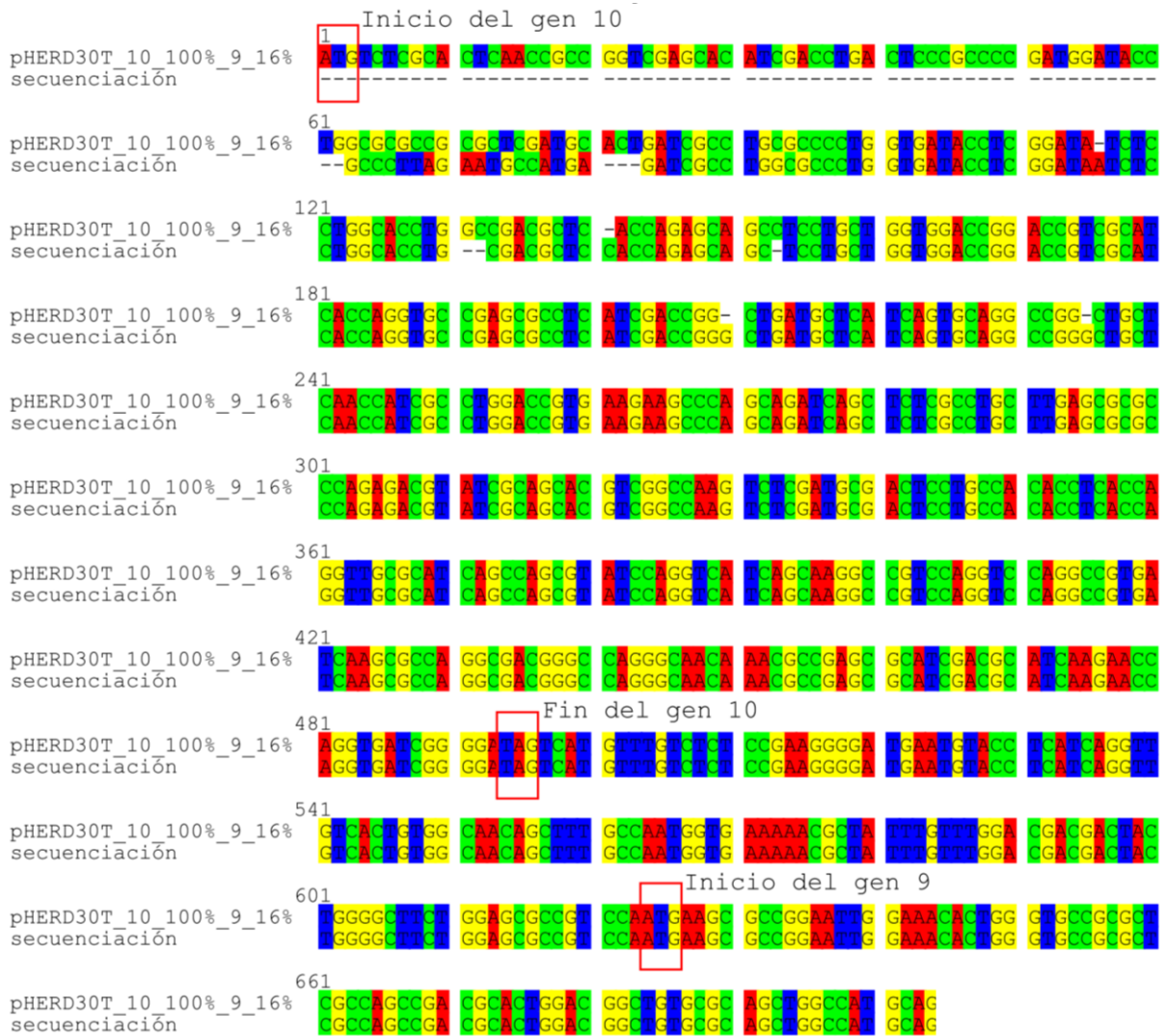


Figura 15. Alineamiento de la secuenciación del plásmido pHERD30T/ORFs_10_9(16%). Se muestra la secuenciación parcial del gen 10 y la secuenciación total del gen 9 al 16% lograda con el *primer reverse*.

En este punto el gen 9 fue descartado para más estudios y el trabajo se centró en dos experimentos: evidenciar la existencia de una proteína proveniente del gen 10 y demostrar que su traducción es necesaria para el fenómeno de exclusión a la superinfección.

8.3 Etiquetamiento, purificación y análisis por espectrometría de masas de la proteína 10.

Para el primer experimento, se colocó mediante oligos y PCR una etiqueta de 6 histidinas al principio del gen 10 (2 codones después del ATG) en la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9. El resultado de dicha clonación se verificó por secuenciación (Fig. 16) y por ensayo de infección (Fig. 17). Las pruebas demostraron que la etiqueta de histidinas fue clonada correctamente y que no afecta al fenotipo de exclusión a la superinfección llevado a cabo por el gen 10.

Una vez verificada la etiqueta, se procedió a la purificación de la proteína 10 mediante resina de níquel y lavados con imidazol cuyas fracciones se corrieron en un SDS-PAGE al 16%. Este proceso puede observarse a detalle en la Figura 18. La banda observada tuvo un tamaño aproximado de 20 kDa, que difiere un poco del tamaño teórico de la proteína 10 que se calculó en 18 kDa. Finalmente se recortó una de las bandas y se mandó a analizar por espectrometría de masas al Laboratorio Nacional PlanTECC del CINVESTAV Irapuato. Los resultados de este análisis identificaron 123 de 163 aminoácidos totales que resultó en una cobertura de 76% (Fig. 19). En análisis por espectrometría de masas un 70% de cobertura es considerado como lo mínimo necesario para validar un resultado, mientras que un 80% de cobertura es visto como suficiente (School of Medicine. University of Virginia. 2022). De lo anterior se puede concluir que la proteína purificada fue realmente el producto del gen 10, es decir, la proteína 10 del mecanismo de exclusión producida por el fago Ps56 en la cepa Ps33.

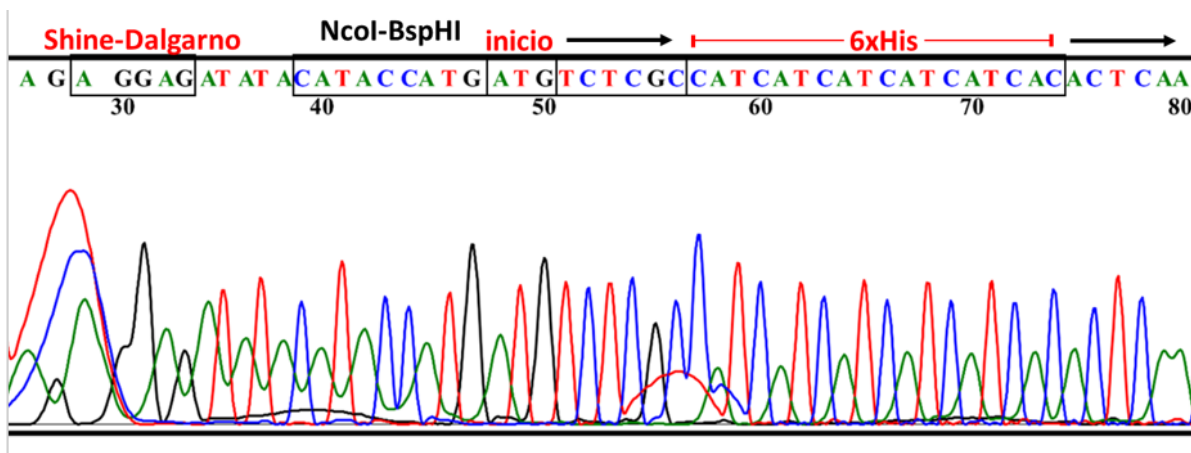


Figura 16. Electroferograma de la etiqueta de 6xHisTag en el inicio del gen 10. Se muestra la etiqueta de 6 histidinas dos aminoácidos después del inicio del gen 10. El RBS no se modificó.

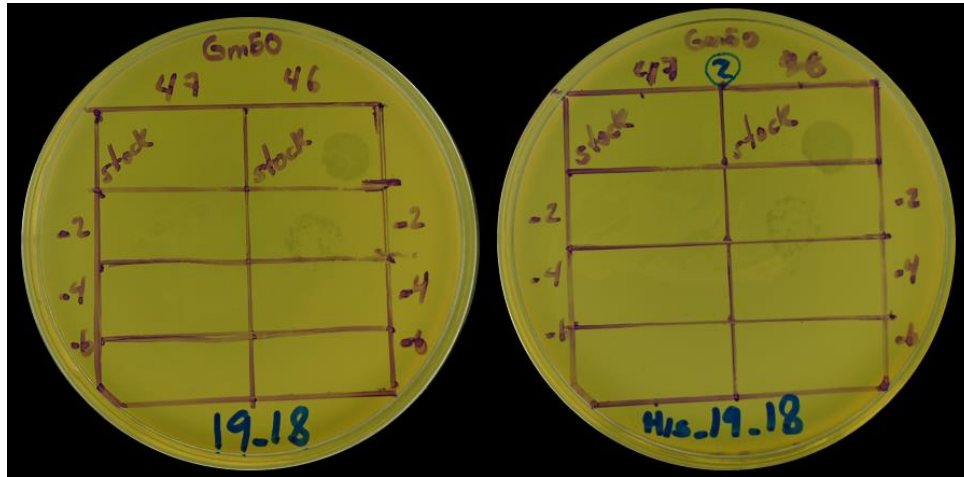


Figura 17. Ensayo de infección en la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_His-10_9. Ver pie de Figura 7. En este caso en particular sólo se usaron 2 fagos, uno sensible (PaMx47) y otro inmune (PaMx46) al fenotipo de exclusión. Se observó exclusión en el caso del fago PaMx47 e infección en el caso del fago PaMx46.
Nota: 19: gen 10; 18: gen 9.

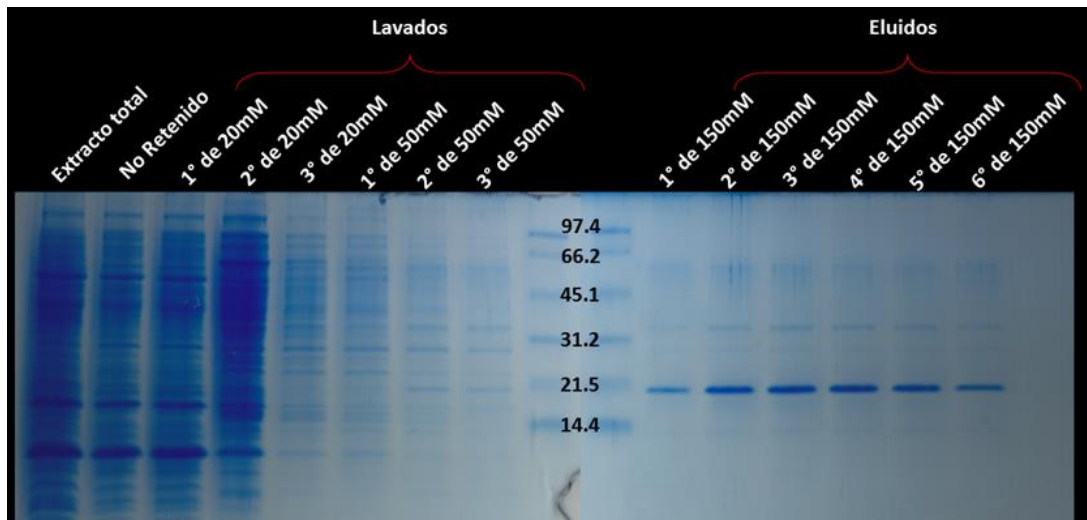


Figura 18. Purificación de la proteína 10 en la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_His-10_9. Para obtener la proteína de exclusión purificada primero se hizo un cultivo de 0.5 L de la cepa Ps33 con el plásmido Ps33/pHERD30T/ORFs_His-10_9, se indujo por 4 horas con arabinosa al 0.5%, se obtuvo el botón celular, se lisó, se sonicó y el sobrenadante se pasó por una resina de níquel. Finalmente, la proteína de interés se eluyó con soluciones de imidazol (20, 50 y 150 mM) a 4°C y las fracciones se corrieron en un SDS PAGE al 16%.

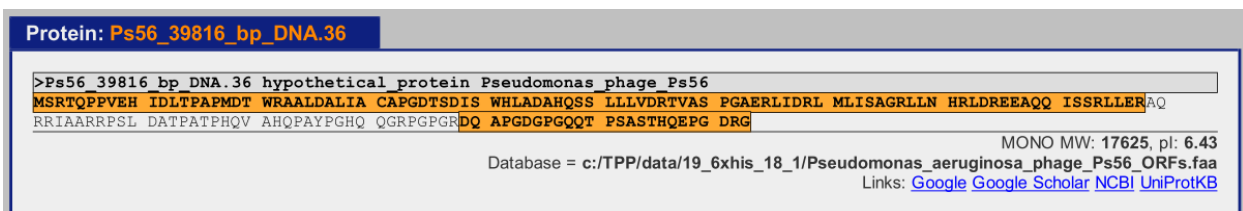


Figura 19. Análisis por espectrometría de masas de la proteína 10 purificada de la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_His-10_9. El análisis comenzó con una serie de lavados para eliminar el colorante de la banda seguido de una reducción y metilación de los grupos SH. Después de varios lavados para eliminar el exceso de reactivos se procedió a la digestión de la proteína contenida en la banda con una proteasa que rompe las proteínas donde exista un enlace de Arginina o Lisina. Se recuperaron los péptidos generados y se analizaron por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas. Por cada péptido generado se obtuvo un espectro de fragmentación, es decir, una colección de espectros correspondiente a todos los péptidos encontrados durante el análisis que generó el *raw data*.

8.4 Papel de la proteína 10 en el fenotipo de exclusión a la superinfección.

Para el segundo experimento se realizó la técnica de mutagénesis dirigida en la construcción Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9. En la **Figura 20** se muestra que el ATG al inicio del gen 10 cambió por TAG y que el RBS no sufrió cambios. De esta manera se logró la construcción de pHERD30T_ORFs_STOP_10_9.

Para construir el plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10 se decidió partir del plásmido pHERD30T_ORFs_STOP_10_9 que ya tenía la mutación en el ORF 10. En la **Figura 21** se puede observar la amplificación de la región promotora araBAD junto con el ORF 10 mutado en el ATG (izquierda) y el plásmido pSEVA55 vacío y linealizado con las enzimas de restricción FseI y PshAI.

Posteriormente, la región promotora araBAD junto con el ORF 10 mutado en el ATG se clonó en el plásmido de transición pJET para después propagarlo y clonarlo finalmente en el vector pSEVA55. Por medio de PCR se demostró la presencia de la región promotora araBAD junto con el ORF 10 mutado en los 3 plásmidos, pHERD30T_ORFs_STOP_10_9, pJET(araBAD-STOP-10) y pSEVA55/ORF_STOP_10 (**Fig. 22**).

Para demostrar que el plásmido estaba clonado correctamente se hizo una restricción al plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10 con las enzimas antes mencionadas, lo que dio como resultado el plásmido pSEVA55 por un lado y el fragmento araBAD-STOP-10 por otro en un gel de agarosa (**Fig. 23**).

El cambio fue verificado por secuenciación (**Fig. 24**). Ambas construcciones mutagenizadas fueron evaluadas mediante ensayos de infección. Los resultados en ambos casos, con las cepas originales como controles, permitieron observar una pérdida total del fenotipo de exclusión (**Figuras 25 y 26**).



Figura 20. Mutagénesis para inhibir la traducción del gen 10 en la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9. Se muestra la secuenciación total del gen 10 mutado en el ATG y la secuenciación parcial del gen 9 lograda con el *primer forward*.

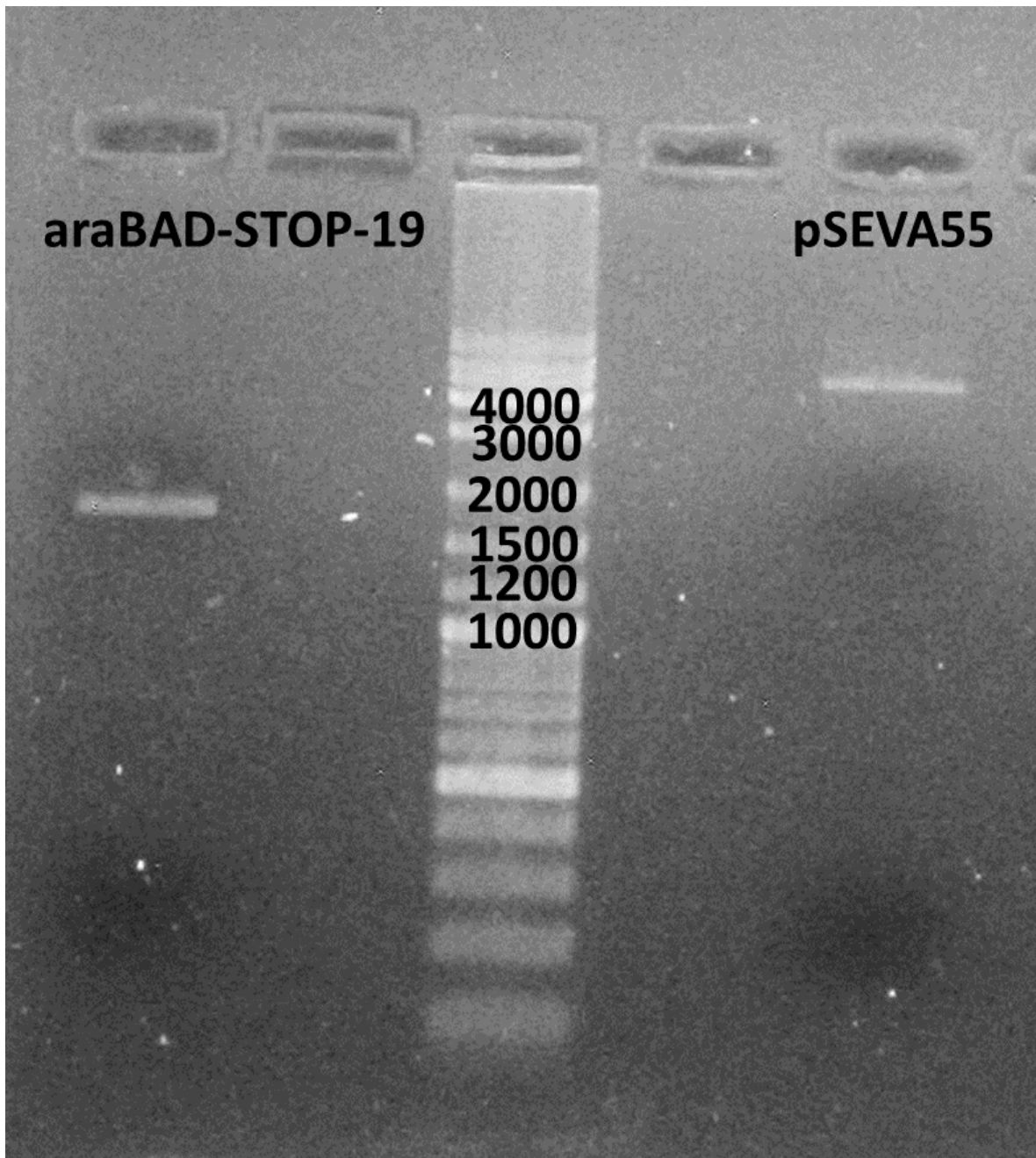


Figura 21. Elementos para la construcción del plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10. Se muestra un gel de agarosa al 0.8%. La amplificación por PCR del fragmento que contiene la región promotora araBAD y el ORF 10 mutado en el ATG proveniente del plásmido pHERD30T/ORFs_STOP_10_9 se corrió del lado izquierdo (1784 bp). El plásmido pSEVA55 vacío y digerido con las enzimas FseI y PshAI se corrió del lado derecho (4 983 bp). *Nota: 19: gen 10.*

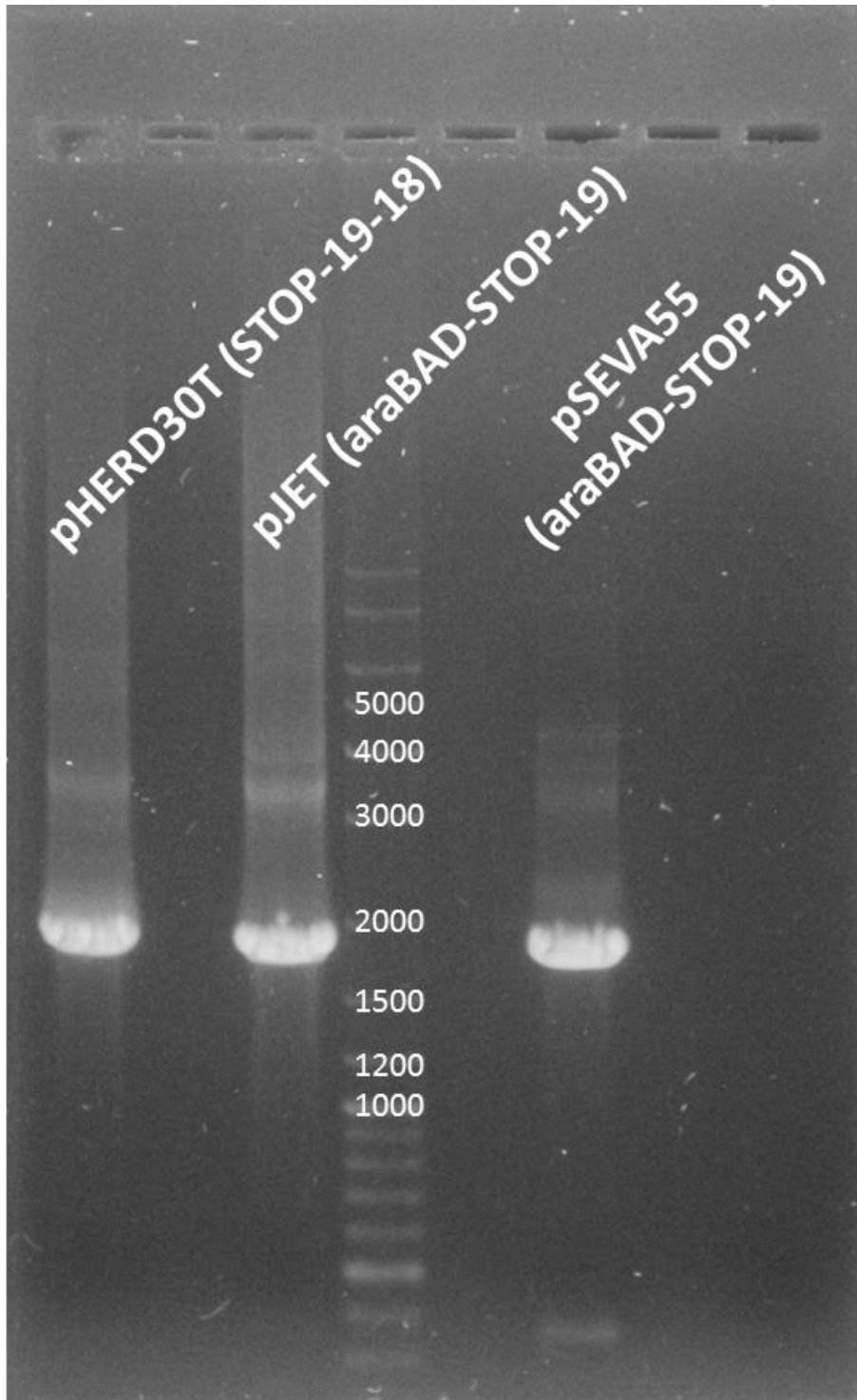


Figura 22. Confirmación del fragmento araBAD-STOP-10 en el plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10. Se muestra un gel de agarosa al 0.8%. La amplificación por PCR del fragmento que contiene la región promotora araBAD y el ORF 10 mutado en el ATG proveniente del plásmido pHERD30T/ORFs_STOP_10_9 de 1784 bp dio positivo para ese plásmido, para el plásmido de transición pJET donde se ligó temporalmente y para el plásmido pSEVA55 donde se ligó para realizar el experimento. *Nota: 19: gen 10; 18: gen 9.*

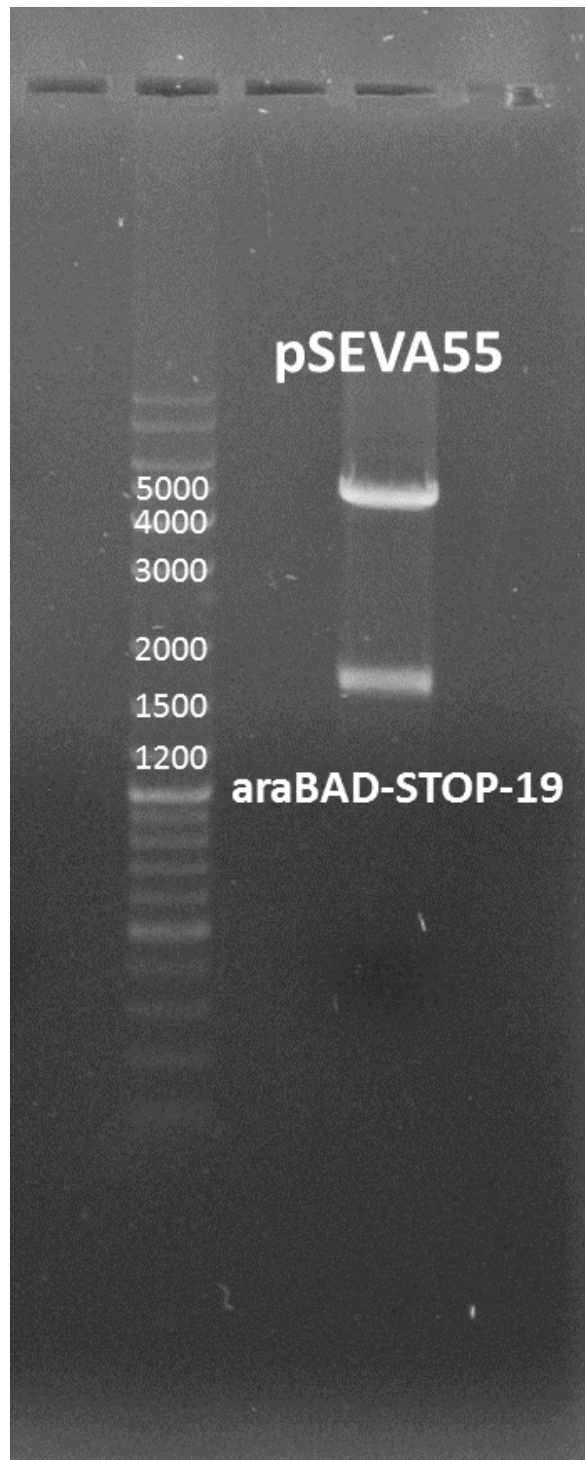


Figura 23. Restricción del plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10. Se muestra un gel de agarosa al 0.8%. La digestión del plásmido pSEVA55/ORF_STOP_10 con las enzimas de restricción FseI y PshAI permitieron apreciar dos bandas. Una correspondiente al fragmento de la región promotora araBAD-STOP-10 de 1784 bp y el plásmido pSEVA55 vacío. *Nota: 19: gen 10.*

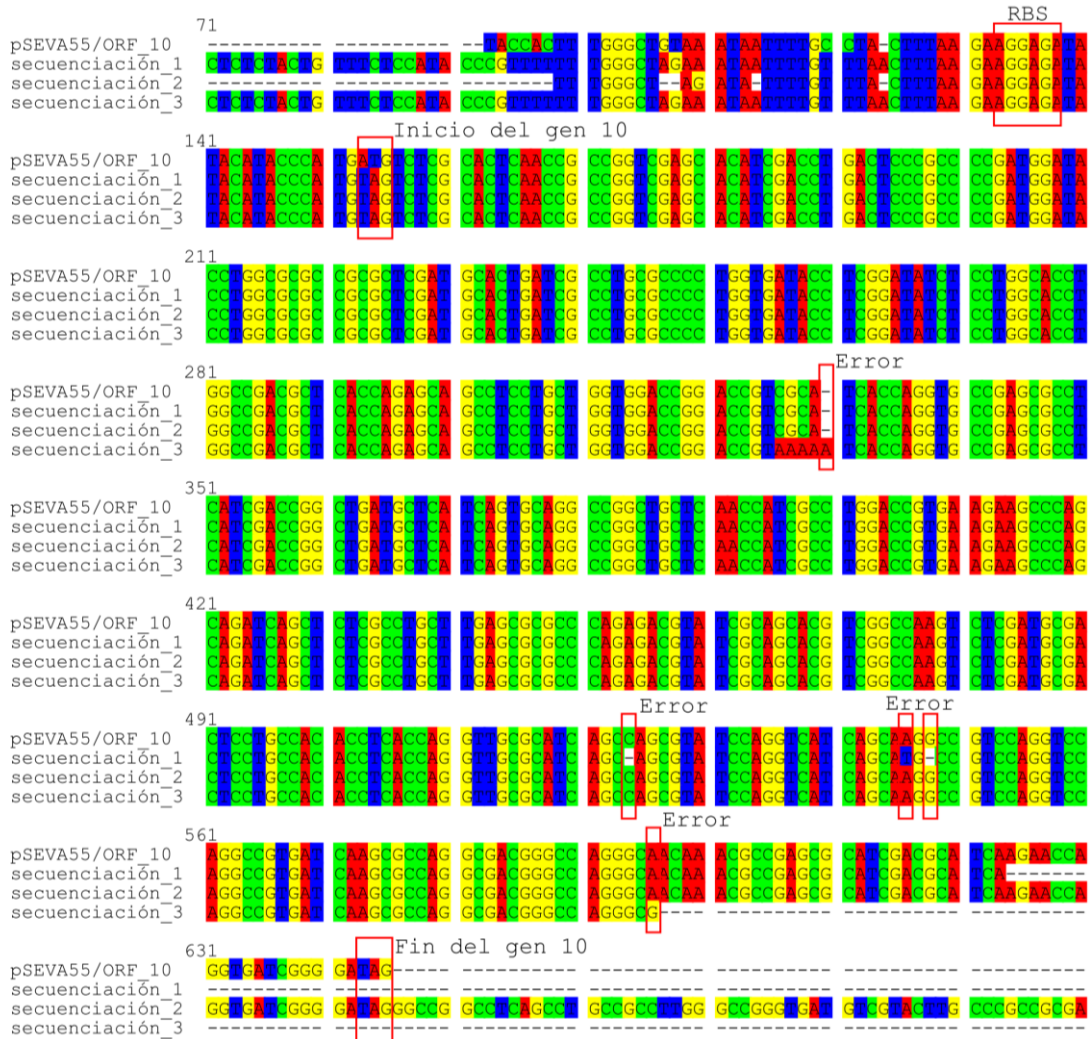


Figura 24. Mutagénesis para inhibir la traducción del gen 10 en la cepa Ps33/pSEVA55/ORF_10. Se muestra la secuenciación total del gen 10 mutado en el ATG lograda con el *primer forward*. Nota: 19: gen 10.

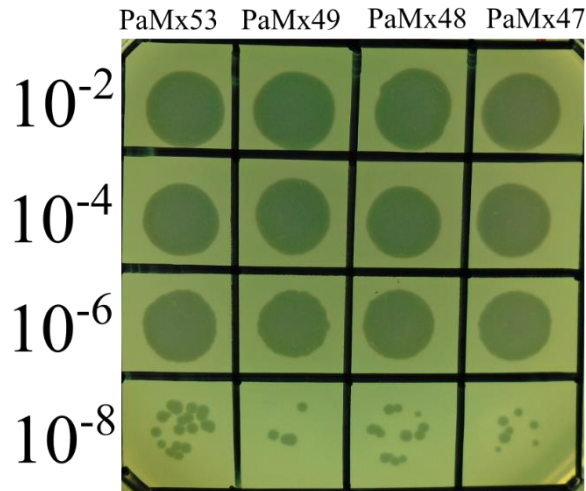


Figura 25. Ensayo de infección sobre la cepa pHERD30T/ORFs_STOP_10_9.
Ver pie de Figura 7. Se observó infección en todos los casos.

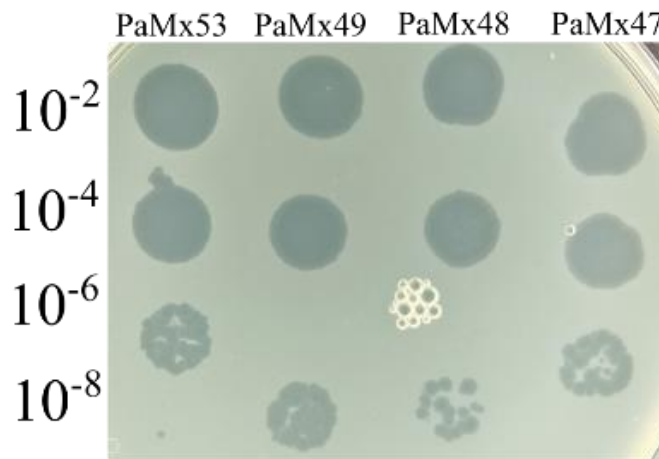


Figura 26. Ensayo de infección sobre la cepa pSEVA55/ORF_STOP_10.
Ver pie de Figura 7. Se observó infección en todos los casos. Caja de LB con 80 µg/mL de tetraciclina.

En este punto el gen 9 fue descartado y se consideró al gen 10 como único responsable. Los siguientes experimentos se realizaron para desarrollar la técnica de electroporación de genomas de fagos en la cepa Ps33.

8.5 Electroporación de genomas de fagos que infectan a la cepa Ps33

En cuanto a la electroporación como una herramienta para estudiar los fenómenos de exclusión a la superinfección, se tuvo que adaptar una técnica de electroporación de genomas para *E. coli* (Janez *et al.*, 2019), debido a que el método usado en el laboratorio para la transformación con plásmidos (Choi *et al.*, 2006) no funcionó para la transfección de genomas de fagos en la cepa Ps33.

Los primeros intentos de transfección se hicieron con el ADN del fago Ps56 con algunas variables como el gap de las celdas. Se concluyó que celdas de 1 y 2 mm de gap eran adecuadas. También se establecieron algunos controles, como el goteo de los medios de cultivo (LB) y dilución (TMG), que en ningún caso presentaron UFPs (Fig. 27).

La confiabilidad del método quedó demostrada con la electroporación (al mismo tiempo, pero en celdas diferentes) de ADN de un fago temperado (Ps56) y un fago lítico (PaMx53), que dio como resultado placas turbias y placas claras respectivamente (Fig. 28).

Finalmente se estandarizó el método para la transfección de genomas de fagos en la cepa Ps33 (Fig. 29). Su reproducibilidad quedó demostrada en una cinética de transfección con el ADN del fago Ps56 que permitió observar una correlación directamente proporcional entre el ADN transfectado y la producción de UFPs en tapices de la cepa Ps33 (Fig. 30).

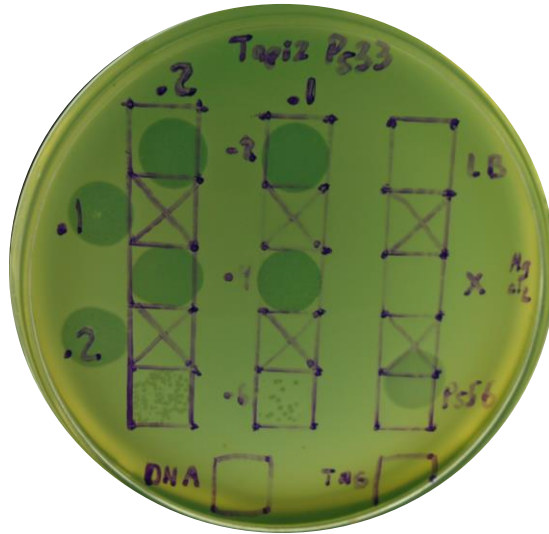


Figura 27. Electroporación de ADN del fago Ps56 en células de 1 y 2 mm de gap. Se muestra el goteo de diluciones del fago Ps56 producido por electroporación en un tapiz de Ps33. Los medios de cultivo y de dilución (LB y TMG), así como el stock de ADN también fueron goteados (30 μ L).

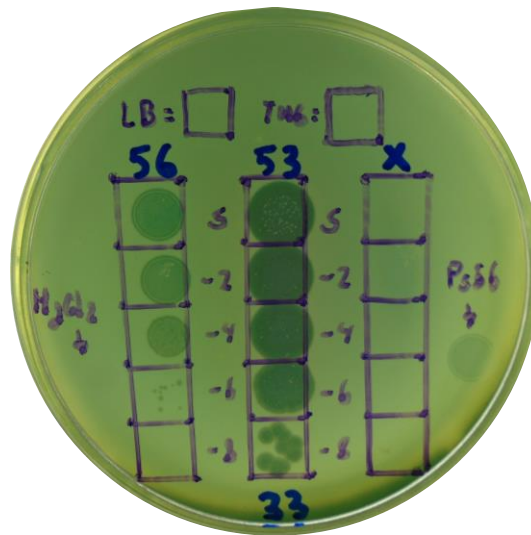


Figura 28. Electroporación de ADN de los fagos Ps56 y PaMx53. Se muestra el goteo de diluciones del fago Ps56 y del fago PaMx53 producidos por electroporación en un tapiz de Ps33. X representa una cepa de Ps33 que nunca entró en contacto con muestras de ADN de fago. Los medios de cultivo LB y de dilución TMG, así como el $MgCl_2$ también fueron goteados (30 μ L).

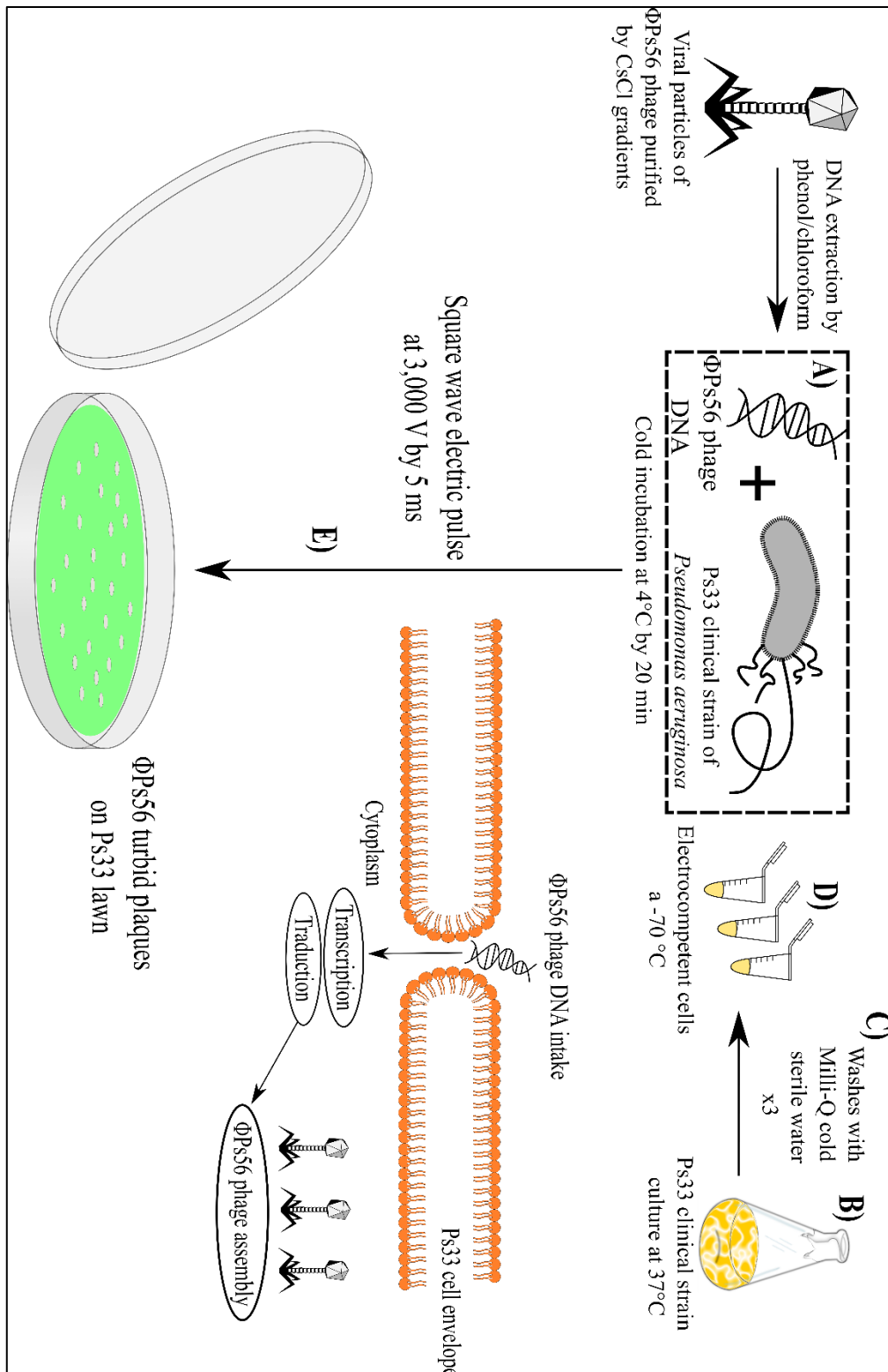


Figura 29. Esquema general de la técnica de electroporación. A) Los stocks de ADN de fago siempre fueron derretidos en hielo. B) Los cultivos overnight siempre fueron de la cepa Ps33 wt o de sus construcciones con plásmidos, en cuyo caso se adicionó el antibiótico correspondiente. C) El agua MilliQ para los lavados siempre se usó fría. D) Las bacterias electrocompetentes se almacenaban a -70°C máximo 7 días antes de su uso. E) Después del pulso eléctrico el medio T Φ -MgSO₄ previamente calentado se usaba inmediatamente.

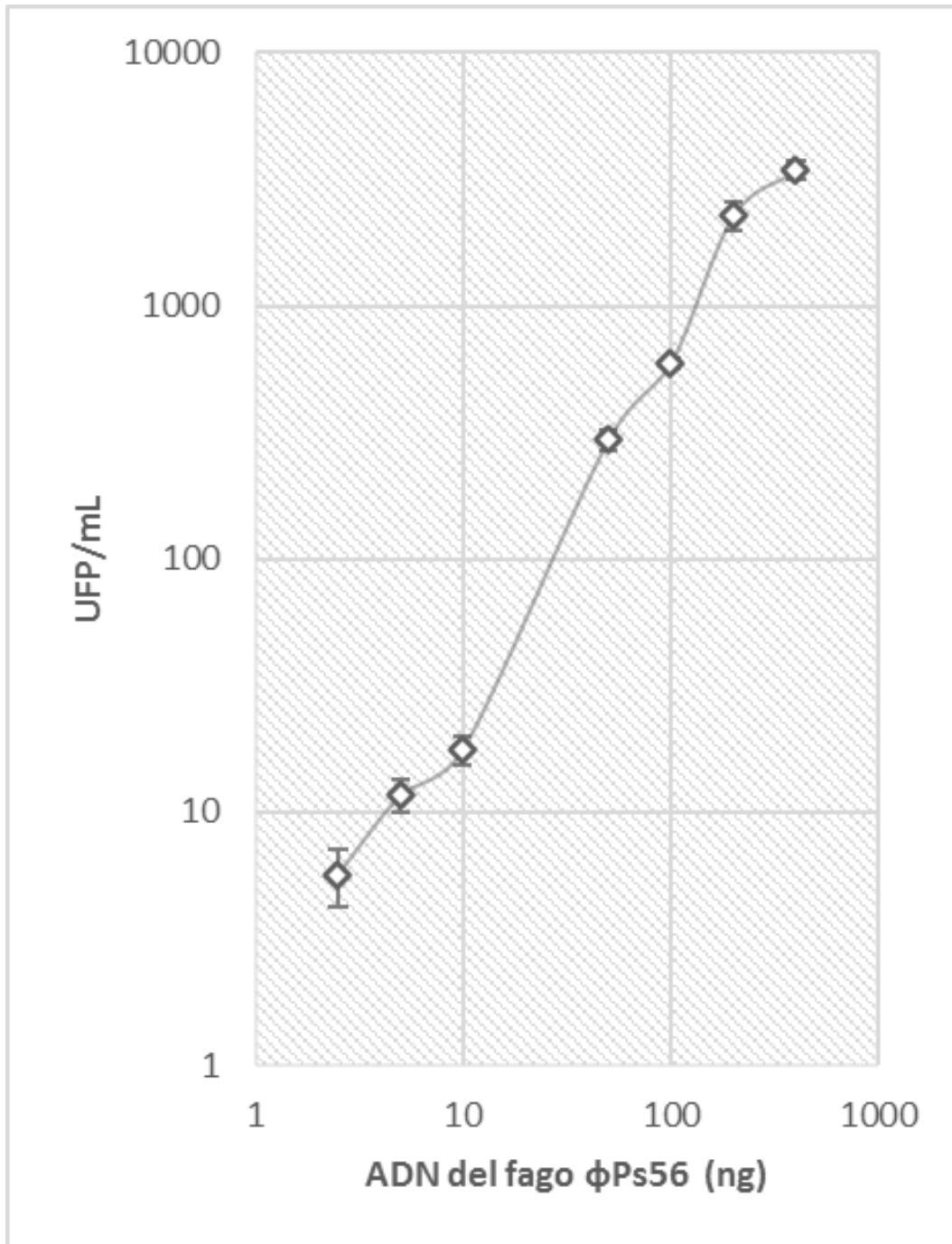


Figura 30. Cinética de transfección del ADN del fago Ps56 en la cepa Ps33. La correlación entre el ADN electroporado y las UFPs observadas fue directamente proporcional. Estos datos fueron graficados en una escala logarítmica para una mejor visualización. Los valores para el eje X fueron 2.5, 5, 10, 50, 100, 200 y 400 ng de ADN del fago Ps56. Los valores para el eje Y fueron 6, 12, 18, 297, 595, 2283 y 3440 UFPs del fago Ps56. Los valores estándar para cada punto fueron 1.45, 1.76, 2.33, 29.06, 29.30, 289.16 y 291.43 respectivamente.

8.6 Electroporación de genomas de fagos que no infectan a la cepa Ps33

Una de las aplicaciones más importantes del método fue la transfección del genoma del fago H66 γ que no es capaz de infectar a la cepa Ps33 en condiciones normales (Fig. 31A).

Mediante el método desarrollado en este trabajo, se demostró que los fagos producidos mediante la electroporación del genoma de H66 γ en Ps33 seguían siendo capaces de infectar a su cepa hospedera original, la cepa PAO1 (Fig. 31B).

Una característica muy interesante en este fago es su capacidad para conferir la resistencia a gentamicina a su cepa hospedera. Esto también sirvió para demostrar que la técnica de electroporación era real, al observar UFC de la nueva cepa Ps33(H66 γ) en una caja de LB adicionada con gentamicina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 31C). Este fenotipo de resistencia fue verificado por la presencia del ORF 70 de aproximadamente 500 bp en 5 UFC que se logró evidenciar mediante PCRs de colonia (Fig. 31D).

Este hallazgo indicó que el acoplamiento del virus y/o la traslocación del genoma son las mayores barreras que limitan el rango de infección de H66 γ entre estas dos cepas de *P. aeruginosa*. Este podría ser el caso para otros fagos que tienen un rango de infección limitado. Los datos muestran que Ps33 representa un sistema altamente versátil para la introducción y transfección cruzado de fagos a partir de ADN genómico.

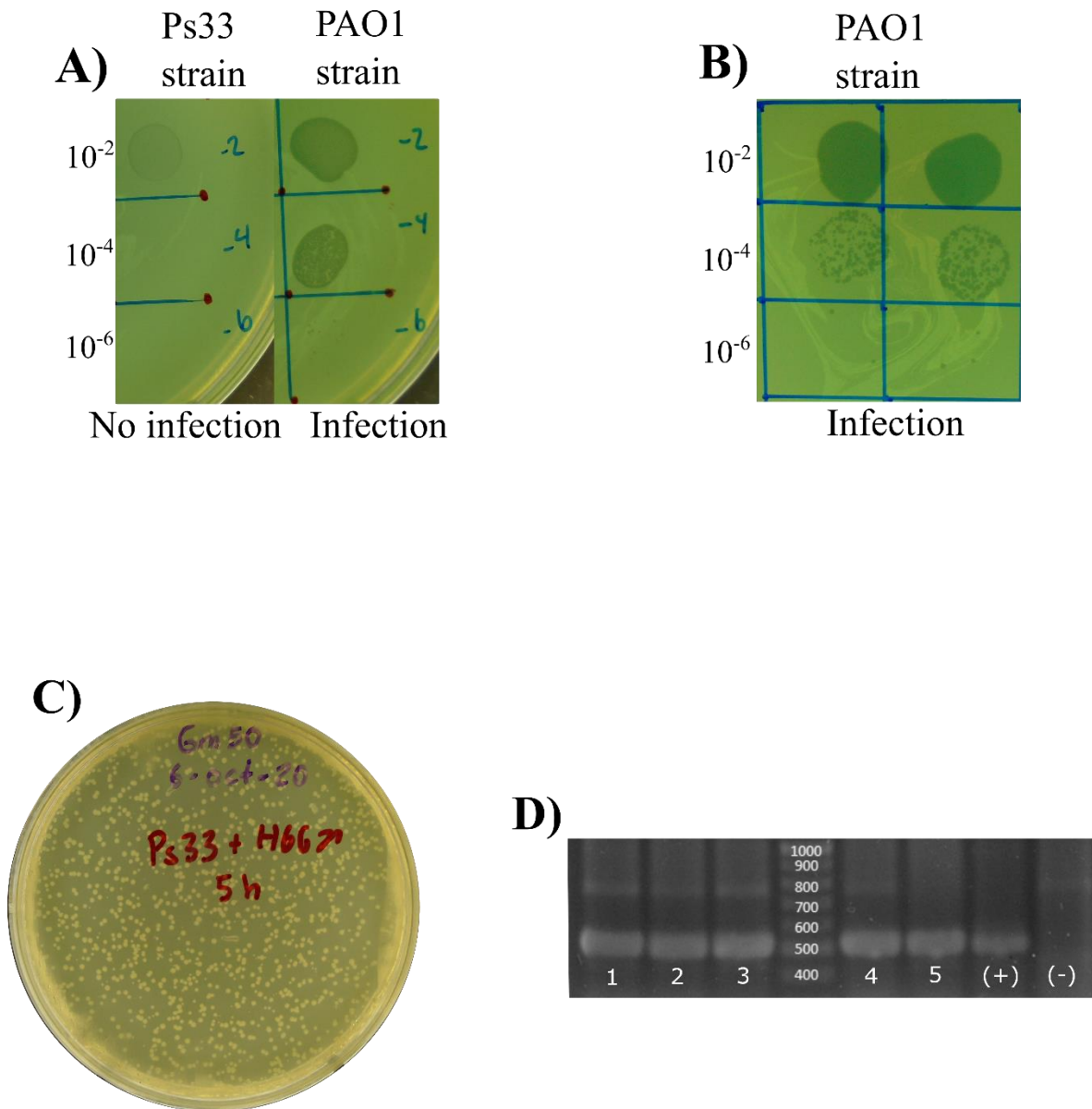


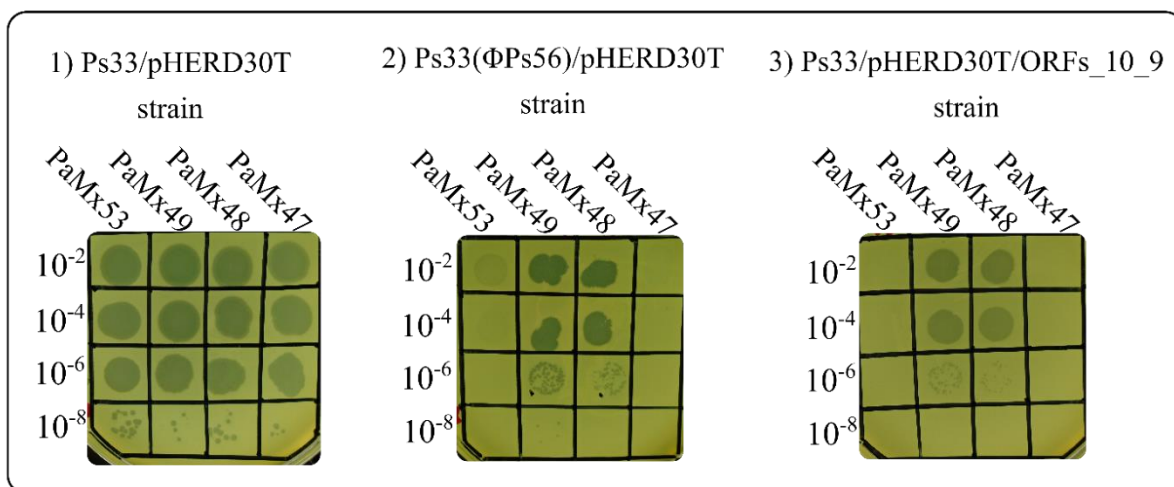
Figura 31. Transfección del ADN del fago H66γ en la cepa Ps33. A) Se muestran diluciones del fago H66γ infectando a la cepa PAO1 (derecha) pero no a la cepa Ps33 (izquierda). B) El fago H66γ producido en la cepa Ps33 por transfección fue capaz de infectar a la cepa PAO1 (duplicado). C) 100 μL del cultivo de la cepa lisógena Ps33(H66γ) produjeron aproximadamente 500 UFC después de una incubación de 5 horas a 37°C con agitación después de ser plaqueados en una caja de LB con 50 μg/mL de gentamicina. D) Para comprobar que la cepa Ps33(H66γ) era real se realizó la PCR de colonia en 5 UFC provenientes de la caja de LB con 50 μg/mL de gentamicina. Todas dieron positivo para el ORF 70 (500 bp). El control positivo fue la cepa PAO1(H66γ) y el control negativo sólo la misma agua usada para las reacciones de PCR.

8.7 Electroporación de genomas de fagos que no infectan a la cepa Ps33

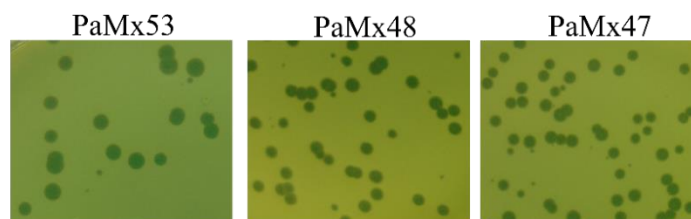
En el trabajo de Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 se estableció que el fenotipo de exclusión de fagos es provocado por la acción concertada de los genes 9 y 10 del fago Ps56 cuando están clonados juntos en el vector de expresión pHERD30T en la cepa Ps33. Bajo esta afirmación, el método de transfección de genomas de fagos descrito en este trabajo fue usado para identificar si el mecanismo de exclusión a la superinfección ocurre a nivel de envoltura o a nivel de citoplasma. Para identificar esto, el ADN purificado de los fagos líticos PaMx47, PaMx48 y PaMx53 fue mezclado con bacterias de las cepas Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9 y Ps33/pHERD30T de un cultivo overnight previamente lavadas con agua MilliQ a 4°C e introducido mediante un pulso eléctrico de tipo onda cuadrada.

Después de la electroporación, a cada una de las muestras se les añadió medio LB y se dejaron en incubación. Posteriormente el sobrenadante de cada muestra se recuperó por centrifugación y se vertió por separado en tapices de Ps33. Al día siguiente se encontraron UFPs en todas las muestras, lo cual sugirió que el ADN de los fagos PaMx47 y PaMx53 transfectado por electroporación se expresó y permitió el ensamblaje de virus viables a nivel de citoplasma en la bacteria Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9 sin ninguna clase de inhibición. El ADN del fago PaMx48 también permitió la generación de virus, sin embargo, solo se usó como un control positivo porque es bien sabido que no es excluido por Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9 y puede infectarla por goteo sin necesidad de electroporación (Fig. 32). Este hallazgo sugirió que el mecanismo de exclusión de fagos no sucede en el citoplasma y probablemente ocurre a nivel de envoltura tal como el ensayo de adsorción realizado por Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 indicó en su momento.

A)



B)



C)

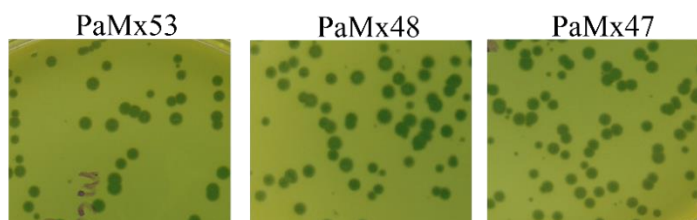


Figura 32. Fenotipo de exclusión a la superinfección a nivel de envoltura demostrado por la electroporación de ADN de fagos líticos. A) Comprobación de los fenotipos de exclusión antes del experimento mediante ensayos de infección con diluciones de los fagos líticos PaMx47, PaMx48, PaMx49 y PaMx53. PaMx48 y PaMx49 infectaron todas las cepas. PaMx47 y PaMx53 solo infectaron a la cepa Ps33 que no portaba los genes 9 y 10 en el plásmido pHERD30T. Por otro lado, PaMx47 y PaMx53 fueron bloqueados por el fenotipo de exclusión generado por la cepa lisógena Ps33(Φ Ps56) y por la cepa con ambos genes 9 y 10 en el plásmido pHERD30T. B) Placas claras de los fagos PaMx53, PaMx48 y PaMx47 fueron producidos en el citoplasma de la cepa Ps33/pHERD30T. C) Placas claras de los fagos PaMx53, PaMx48 y PaMx47 fueron producidos en el citoplasma de la cepa Ps33/pHERD30T/ORFs_10_9. Nota: 19: gen 10 y 18: gen 9.

IX. DISCUSIÓN

En 2017 la OMS (Organización Mundial de la Salud) publicó una lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. La lista de la OMS se dividió en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías. Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (Comunicado de prensa, Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. 2017).

Lo anterior posiciona a la investigación básica de bacteriófagos como una importante alternativa para encontrar soluciones a las bacterias resistentes a antibióticos. De estas bacterias, *P. aeruginosa* ha tenido gran relevancia, y dentro de los estudios para lograr entender su relación con los bacteriófagos, los trabajos sobre el fenómeno de exclusión a la superinfección han sido muy importantes.

Como ya se mencionó en los antecedentes, los fenómenos de exclusión a la superinfección han sido descritos en cepas de *P. aeruginosa* como PAO1 y PA14. En este laboratorio, hace dos años, se publicó un trabajo (Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020) sobre este fenómeno en la cepa clínica Ps33 con el profago Ps56 que sirvió como punto de partida para este proyecto.

Los fenotipos de exclusión/infección realizados en ese trabajo fueron los correctos, sin embargo, la falta de un control que a simple vista no parecía necesario derivó en los experimentos de resección del gen 9. Esto no es tan sorprendente si se toma en cuenta que en ese mismo trabajo observaron que la exclusión era viable cuando sólo estaba clonado el 64% del gen 9 y el 100% del gen 10. En este trabajo, sin embargo, se demostró que un 16% del gen 9 aún presentaba el fenotipo de exclusión. Por lo que se concluyó que podía ser descartado del fenómeno.

Esto provocó que solamente quedara el gen 10 posible responsable del fenotipo de exclusión. Lo más importante de los experimentos de mutagénesis fue que se demostró que la traducción de la proteína 10 era necesaria para el fenómeno. Hubo algunos inconvenientes.

Cuando se intentó realizar el mismo procedimiento en la construcción pSEVA55/ORF_10 siempre ocurrieron inconvenientes. Algunos ejemplos de esto fueron las pocas UFC provenientes de la transformación con el plásmido mutagenizado que al final resultaban ser plásmidos parentales sin la modificación y colonias candidatas que no producían plásmido. Al final se descubrió que las lecturas de la cuantificación del plásmido en el NanoDrop no eran similares a las cantidades que se corrían en un gel de agarosa, lo que hizo suponer que el problema en la mutagénesis se debía una cantidad insuficiente de plásmido parental. A pesar de los problemas, se pudo demostrar que la proteína con los genes clonados de la forma más similar a como se encuentran en el fago Ps56 podía ser visualizada y tenía los aminoácidos esperados.

El trabajo de Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020 demostró que el ORF 10 clonado en pHERD30T no produce el efecto de exclusión. En este trabajo se demostró lo contrario, pero hay que remarcar que el fenotipo se observó en un plásmido distinto, el pSEVA55. Por lo anterior, vale la pena señalar algunas características entre estos plásmidos y posteriormente dar una posible explicación a este dilema. Se sabe que el origen de replicación de pSEVA55 (RSF1010) es de bajo número de copias (Jahn *et al.*, 2016) y que contrasta bastante con el origen de replicación de pHERD30T (pRO1600/ColEI) que es bien conocido por ser de alto número de copias al menos en *E. coli* (Silva-Rocha *et al.*, 2013). También se ha estudiado que la variabilidad en el número de copias de los plásmidos en las bacterias puede tener una distribución desigual causada por una partición imperfecta hacia las células hijas, un proceso estocástico que afecta especialmente a los plásmidos de bajo número de copias y que es capaz de ocasionar una dosis variable del gen que se esté intentando expresar en dicho sistema (Summers *et al.*, 1991 y Jahn *et al.*, 2015). Sin darle mucha importancia al hecho de que las secuencias reportadas para la construcción del ORF 10 en pHERD30T no demostraron la existencia de una región promotora, en este trabajo se puede concluir que la discrepancia entre los fenotipos tan diferentes que produce el ORF 10 en ambos plásmidos se debe a la posible distribución heterogénea de la construcción pSEVA55/ORF_10 en la cepa Ps33.

La hipótesis anterior puede ser apoyada por algunas observaciones que siempre sucedían cada vez que se trabajaba con esta bacteria, como su lento crecimiento en cultivos líquidos de LB y su fenotipo de exclusión más marcado si se compara con la cepa lisógena Ps33(Ps56) que fue donde se descubrió el fenotipo de exclusión. Se concluyó que la construcción pHERD30T con el gen 10, aunque nunca se analizó si producía la proteína o tenía correctas

las regiones promotoras, no presentó el fenotipo de exclusión y estudios adicionales son requeridos para revelar la causa exacta de este fenómeno.

Un estudio realizado en este laboratorio (Ramírez-Sánchez *et al.*, datos no pub) ha confirmado la presencia de genes anti-sentido al ORF 10 cuyas proteínas ejercen el fenotipo de exclusión contra fagos temperados en la etapa de lisogenia de la cepa lisógena PAO1(Fc02). El fago Fc02 pertenece a la misma familia B3-like que el fago Ps56. Este estudio también sugirió (mediante la técnica de RNA-Seq) que el ORF 10 del fago Fc02 no se transcribe en la etapa de lisogenia, y muy probablemente lo haga en la etapa de lisis. Aunque los ORFs 10 y 9 entre los fagos Ps56 y Fc02 son muy parecidos en cuanto a secuencia de ADN (más del 80%) y organización, hace falta un análisis de transcripción en la cepa lisógena Ps33(Ps56), similar al que se hizo para el Fc02, para poder afirmar que el fenotipo de exclusión en ambos casos ocurre debido a las proteínas producidas por los genes anti-sentido al ORF 10 presentes en ambos fagos. Sobre todo, porque quedó demostrado en este trabajo que sin la proteína 10 el fenómeno de exclusión no existe, al menos en la cepa Ps33 cuando se reta contra fagos líticos. Tomando todos estos resultados, se puede afirmar que la proteína 10 producida por el fago Ps56 durante la etapa de lisis en la cepa Ps33 es la responsable del fenotipo de exclusión a la superinfección contra fagos líticos.

En resumen, la cepa Ps33 demostró distintos fenotipos provocados por la combinación de los genes 9 y 10 provenientes del fago Ps56. Se puede concluir que exclusión siempre se llevó a cabo por la cepa lisógena y por la acción del gen 10. Aunque en la construcción pHERD30T/ORF 10 no se observó el fenotipo esperado.

Tabla 1. Resumen de los fenotipos de exclusión/infección en la cepa Ps33

Cepa	UFP/mL en dilución 10 ⁻⁸			
	PaMx47	PaMx48	PaMx49	PaMx53
Ps33 pHERD30T vacío	+	+	+	+
Ps33(ΦPs56)	-	+	+	-
Ps33 pHERD30T/ORFs_10_9	-	+	+	-
Ps33 pHERD30T/ORF_10	+	+	+	+
Ps33 pSEVA55/ORF_10	-	+	+	-

Ps33 pHERD30T/ORFs_STOP_10_9	+	+	+	+
Ps33 pHERD30T/ORF_STOP_10	+	+	+	+

Nota: (+): infección y (-) exclusión

El método de electroporación desarrollado en este trabajo fue el primer método en este laboratorio para transfectar genomas de fagos, al menos en la cepa de *P. aeruginosa*. Sirvió para transfectar fagos que infectan y que no infectan a la cepa clínica Ps33 y para confirmar el resultado ya confirmado en el trabajo de Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020. La importancia de este método no radica en su originalidad (a pesar de que hay pocos trabajos publicados sobre el tema) sino en ser una técnica nunca vista en este laboratorio y haber sido aplicada en la cepa clínica Ps33 altamente transformable que nadie más ha usado para los mismos fines (en teoría). Este método constituye una alternativa cuando las excepciones a los métodos actuales se hacen presentes y las necesidades de la investigación básica de fagos exigen soluciones rápidas y confiables.

X. CONCLUSIONES

- Se demostró que el fenotipo de exclusión a la superinfección en la cepa Ps33 puede ser provocado únicamente por el ORF 10.
- Se descartó la utilidad del ORF 9 en el mecanismo de exclusión a la superinfección.

- Se comprobó que la proteína 10 es real y necesaria para llevar a cabo el fenotipo de exclusión a la superinfección.
- Se desarrolló un método de electroporación de genomas de bacteriófagos que infectan y que no infectan a la cepa Ps33.
- Se confirmó mediante la técnica de electroporación, que el fenotipo de exclusión a la superinfección ocurre a nivel de la envoltura celular.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- 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. <https://doi.org/10.1128/JVI.00953-20>

- Choi, K. H., Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *Journal of microbiological methods*, 64(3), 391–397. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.06.001>
- Diver, J. M., Bryan, L. E., & Sokol, P. A. (1990). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Analytical biochemistry*, 189(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90046-c](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90046-c)
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 16(13), 6127–6145. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>
- Enderle, P. J., & Farwell, M. A. (1998). Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *BioTechniques*, 25(6), 954–958. <https://doi.org/10.2144/98256bm05>
- Farinha, M. A., & Kropinski, A. M. (1990). High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions. *FEMS microbiology letters*, 58(2), 221–225. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1990.tb13982.x>
- Heery, D. M., & Dunican, L. K. (1989). Improved efficiency M13 cloning using electroporation. *Nucleic acids research*, 17(19), 8006. <https://doi.org/10.1093/nar/17.19.8006>
- Itoh, N., Kouzai, T., & Koide, Y. (1994). Efficient transformation of pseudomonas strains with pNI vectors by electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(7), 1306–1308. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1306>
- Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K., & Takamura, Y. (1994). Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(5), 851–854. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.851>
- Janež, N., Meglič, S. H., Flisar, K., Miklavčič, D., & Peterka, M. (2019). Introduction of Phage Genome into *Escherichia coli* by Electroporation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1898, 51–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8940-9_4
- Lyra, C., Savilahti, H., & Bamford, D. H. (1991). High-frequency transfer of linear DNA containing 5'-covalently linked terminal proteins: electroporation

of bacteriophage PRD1 genome into *Escherichia coli*. *Molecular & general genetics* : MGG, 228(1-2), 65–69. <https://doi.org/10.1007/BF00282449>

- Pires, D. P., Monteiro, R., Mil-Homens, D., Fialho, A., Lu, T. K., & Azeredo, J. (2021). Designing *P. aeruginosa* synthetic phages with reduced genomes. *Scientific reports*, 11(1), 2164. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81580-2>
- Planelles, L., Marañón, C., Requena, J. M., & López, M. C. (1999). Phage recovery by electroporation of naked DNA into host cells avoids the use of packaging extracts. *Analytical biochemistry*, 267(1), 234–235. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2963>
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sepúlveda-Robles, O., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2012). High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4510–4515. <https://doi.org/10.1128/AEM.00065-12>
- Sheng, Y., Mancino, V., & Birren, B. (1995). Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic acids research*, 23(11), 1990–1996. <https://doi.org/10.1093/nar/23.11.1990>
- Smith, A. W., & Iglewski, B. H. (1989). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic acids research*, 17(24), 10509. <https://doi.org/10.1093/nar/17.24.10509>
- Taketo A. (1989). RNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochimica et biophysica acta*, 1007(1), 127–129. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(89\)90142-5](https://doi.org/10.1016/0167-4781(89)90142-5)
- Wang, W., Li, Y., Tang, K., Lin, J., Gao, X., Guo, Y., & Wang, X. (2022). Filamentous prophage capsid proteins contribute to superinfection exclusion and phage defence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 10.1111/1462-2920.15991. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15991>
- Eynard, N., Rodriguez, F., Trotard, J., & Teissié, J. (1998). Electrooptics studies of *Escherichia coli* electropulsation: orientation, permeabilization, and gene transfer. *Biophysical journal*, 75(5), 2587–2596. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77704-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77704-5)

- Chung, I. Y., Jang, H. J., Bae, H. W., & Cho, Y. H. (2014). A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(31), 11503–11508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403537111>
- Biggs, K., Bailes, C. L., Scott, L., Wichman, H. A., & Schwartz, E. J. (2021). Ecological Approach to Understanding Superinfection Inhibition in Bacteriophage. *Viruses*, 13(7), 1389. <https://doi.org/10.3390/v13071389>
-

XII. APÉNDICE

Preparación de Medios de Cultivo

Agar suave (Stab Agar)

Para un litro se prepara con: Bacto-nutrient broth (10g), Bacto-agar (6g) y NaCl (8g) (Sepúlveda-Robles, datos no pub.).

Medio LB (Medio Luria-Bertani)

Para un litro se prepara con: Bacto-triptona (10g), Extracto de levadura (5g) y NaCl (5g). Cuando se preparan cajas, se añade: Agar (15g) (Sepúlveda-Robles, 2007).

Medio T ϕ

Para un litro se prepara con: Triptona (10g), Agar (10g), NaCl (2.5g), NaOH 2M (2mL) y MgSO 4 1M (10mL). Cuando se preparan cajas no se añade MgSO 4 (Cocina

Bacteriológica. DGBM-CINVESTAV, datos no pub).

Medio TMG-SM

Para un litro se prepara con: NaCl (11.7g), Gelatina (1g), Tris HCl 1M a pH 8.0 (1mL) y MgSO 4 1M (0.5mL). La mezcla se ajusta a un pH de 7.4 con KOH (Cocina Bacteriológica. DGBM-CINVESTAV, datos no pub).

XIII. EQUIPO

- Agitador New Brunswick Scientific
- Modelo: G10 Gyrotory® Shaker.

- Centrífuga eppendorf
- Modelo: 5415R (con refrigeración).

- DNA SpeedVac® Savant
- Modelo: DNA 120

- NanoDrop®
- Modelo: ThermoScientific NanoDrop2000

- Transilluminator UVP®
- Modelo: Multi Doc-It

- Thermocycler Bio-Rad®
- Modelo:

XIV. PERSPECTIVAS

- Secuenciar la región promotora del plásmido pHERD30T/ORF 10
- Sobreexpresar la posible proteína 10 en pHERD30T/ORF 10
- Probar el método de electroporación con otras cepas de *P. aeruginosa*
- Clonar el gen 10 en un plásmido donde pueda estar flanqueado por regiones terminadoras.