



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Análisis transcripcional por la inducción del fago Fc02 en la cepa de  
*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mediante RNA-Seq específico de  
cadena”**

**TESIS**

Que presenta

**M. en C. IRAIS RAMÍREZ SÁNCHEZ**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Director de la tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

Ciudad de México

Agosto, 2022

## **ASESORES**

Dr. Luis Marat Álvarez Salas

Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV, Zacatenco

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular  
CINVESTAV, Zacatenco

Dr. David René Romero Camarena

Centro de Ciencias Genómicas  
UNAM

Dr. Juan Enrique Morett Sánchez

Instituto de Biotecnología  
UNAM

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

El trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el proyecto 255255 y el fondo SEP-Cinvestav de apoyo a la investigación FIDSC2018/37. La autora agradece la beca otorgada por el CONACyT durante el periodo de elaboración del proyecto (CVU 625007).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor, Dr. Gabriel Guarneros Peña, cuyo alto nivel de exigencia ayudó a concluir este trabajo, así como por el apoyo económico durante la ausencia de beca.

A mi comité tutorial, Dr. Luis Marat Álvarez Salas, Dr. David René Romero Camarena, Dr. Juan Enrique Morett Sánchez y Dr. Luis Kameyama Kawabe, quienes aportaron sus conocimientos, consejos y apoyo en la realización de este trabajo.

A mi familia, quienes me apoyaron emocional y económicamente durante la realización de este trabajo.

Al M. en C. Marco Magos Castro, quien me apoyó en realizar los últimos experimentos para redondear este trabajo.

A la Dra. Eva Jacinto Loeza, quien me enseñó algunas de las técnicas usadas en este trabajo, y realizaba preguntas y sugerencias que realmente enriquecían el trabajo.

A Flor Revillas, quien siempre realizó su trabajo de la mejor manera y fue un apoyo emocional en el último periodo de elaboración del proyecto.

A mi amiga y compañera de laboratorio Sandra Ortega y a Enith Plancarte, quienes fueron mis mentoras en el laboratorio.

A mis amigas Guadalupe Valencia y Yéssica Vázquez, quienes fueron un apoyo emocional, y además me ofrecieron su ayuda en el laboratorio y en discutir los resultados.

A Silvia porque sin su apoyo no hubiera podido terminar este trabajo.

A mis también amigas Sara Espinoza y Elissa Ballinas.

A Hebert, quién durante el periodo de pandemia, donde el acceso era restringido me apoyo en esterilizar el material.

A Gabriela Mora, quien me ayudó a realizar trámites escolares, pero también trámites del laboratorio, siempre realizando su trabajo de manera eficiente, y me brindó todo el apoyo posible para que esto fuera posible.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres.*

## ÍNDICES

### ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>11</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>12</b> |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....  | <b>12</b> |
| Bacteriófagos .....  | <b>12</b> |
| Fagos de <i>Pseudomonas spp.</i> .....   | <b>14</b> |
| Fc02 .....   | <b>15</b> |
| Secuenciación de ARN .....   | <b>16</b> |
| Mecanismos de exclusión .....  | <b>17</b> |
| Traslape de genes .....  | <b>18</b> |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....   | <b>23</b> |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....  | <b>24</b> |
| <b>ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>26</b> |
| <b>MATERIAL</b> .....  | <b>26</b> |
| Material biológico y medios de cultivo.....                                    | <b>26</b> |
| <b>MÉTODOS</b> .....   | <b>28</b> |
| Análisis in silico. ....   | <b>28</b> |
| Tapiz bacteriano. ....   | <b>29</b> |
| Propagación del fago.....  | <b>29</b> |
| Purificación de fago por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio.<br>..... | <b>30</b> |
| Diálisis de los fagos.....   | <b>31</b> |
| Obtención del título del fago.....   | <b>31</b> |
| Extracción de ADN fágico.....  | <b>31</b> |
| Geles de agarosa y electroforesis. ....  | <b>32</b> |
| Restricción enzimática. ....   | <b>32</b> |

|   |    |
|---|----|
| Ensayo de estría cruzada. ....  | 33 |
| Curva de crecimiento bacteriano.....  | 33 |
| Mutagénesis al azar de la lisógena.....   | 34 |
| Amplificación por PCR.....  | 35 |
| Ligación de plásmidos.....  | 35 |
| Construcción de plásmidos .....   | 36 |
| Clonación en el vector de transición .....  | 36 |
| Secuenciación de DNA. ....  | 37 |
| Preparación de bacterias quimiocompetentes de <i>E. coli</i> .....                    | 38 |
| Transformación química de plásmidos en <i>E. coli</i> .....                           | 38 |
| Selección de candidatas.....  | 38 |
| Extracción de plásmido .....  | 39 |
| Purificación de bandas de gel de agarosa .....  | 39 |
| Preparación de bacterias quimiocompetentes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....     | 40 |
| Electroporación de plásmidos en cepas de <i>P.aeruginosa</i> electrocompetentes ..... | 40 |
| Mutagénesis del profago por recombinación .....                                       | 41 |
| Extracción de ARN .....   | 42 |
| Precipitación de ácidos nucleicos.....  | 43 |
| Tratamiento con DNasaI.....   | 43 |
| Generación de cDNA.....   | 44 |
| Secuenciación de ARN .....  | 44 |
| Análisis de datos de secuenciación .....  | 44 |
| Mutagénesis sitio dirigida de plásmidos.....  | 45 |
| Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas. ....                        | 46 |
| Lisis celular y obtención del clarificado.....  | 46 |
| Purificación en columnas de Níquel.....   | 46 |
| SDS-PAGE.....   | 47 |
| Tinción con Coomassie. ....   | 49 |
| Tinción con Nitrato de Plata. ....  | 49 |
| Western blot.....   | 49 |
| Transferencia húmeda. ....  | 49 |

|  |            |
|--|------------|
| Bloqueo de membrana e incubación con Anticuerpo .....  | 50         |
| Cuantificación de fluorescencia .....  | 51         |
| <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>52</b>  |
| Propagación y caracterización del fago Fc02.....   | 52         |
| Obtención y caracterización de la lisógena de Fc02.....  | 53         |
| Análisis <i>in silico</i> de los genes candidatos para el gen que codifica para el represor tipo cI del fago Fc02..... | 55         |
| Mutagénesis al azar .....  | 57         |
| Obtención de la mutante PAO1 (Fc02repcts) mediante mutagénesis sitio dirigida.....                                     | 62         |
| Caracterización de la inducción de la cepa PAO1(Fc02repcts).....   | 66         |
| Extracción y secuenciación de ARN de la cepa PAO1(Fc02repcts)....  | 73         |
| Control de calidad de las secuencias de ssRNASeq. ....   | 79         |
| Análisis transcripcional de la inducción del profago Fc02 repcts.....  | 84         |
| Evaluación de la transcripción de genes en el profago.....   | 87         |
| Clonación de la región <i>upstream</i> al represor.....  | 91         |
| Evaluación del promotor pC1.....   | 96         |
| Análisis transcripcional de los genes de PAO1.....   | 99         |
| <b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....   | <b>104</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | <b>109</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>110</b> |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | <b>111</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....  | <b>116</b> |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos. ....  | 13 |
| Figura 2. Fago Fc02 y su genoma. ....   | 16 |
| Figura 3. Esquema de la secuenciación por síntesis .....  | 17 |
| Figura 4. Esquema de algunos ejemplos de proteínas de exclusión a la superinfección.<br>.....   | 18 |
| Figura 5. Esquema de los tipos de traslape de genes. ....   | 19 |
| Figura 6. Esquema de placa con estría cruzada.....  | 33 |
| Figura 7. Esquema de la metodología de los geles tris-tricina SDS-PAGE.....   | 48 |
| Figura 8. Dispositivo de transferencia. ....  | 50 |
| Figura 9. Caracterización del fago Fc02. ....   | 52 |
| Figura 10. Caracterización de PAO1(Fc02). ....  | 53 |
| Figura 11. Inducción de Fc02 con Mitomicina C.....  | 54 |
| Figura 12. Participación de RecA en la inducción del profago Fc02.....  | 55 |
| Figura 13. Genes con dominio de unión a ADN en el fago Fc02. ....   | 56 |
| Figura 14. Predicción de las estructuras proteicas de los ORF's 11 y 12 del fago Fc02.<br>.....   | 56 |
| Figura 15. Alineamiento de las estructuras proteicas de los ORF's 11 y 12 con<br>estructuras conocidas de represores y antirepresores de bases de datos. .... | 57 |
| Figura 16. Mutagénesis al azar con Nitrosoguanidina de la cepa PAO1(Fc02).....  | 58 |
| Figura 17. Búsqueda de placas claras. ....  | 59 |
| Figura 18. Aislamiento de placas claras.....  | 59 |
| Figura 19. Crecimiento de candidatas de mutagénesis en LB a diferentes<br>temperaturas. ....  | 60 |
| Figura 20. Caracterización de la lisógena mutante a 32 y a 43 °C. ....  | 61 |
| Figura 21. Posición de la sustitución G191A.....  | 62 |
| Figura 22. Estrategias de recombinación para obtener la lisógena PAO1(repctsFc02).<br>.....   | 63 |
| Figura 23. Clonación del ORF12 en los vectores pJET1.2/blunt y pSEVA648.....  | 64 |
| Figura 24. Curva de crecimiento de PAO1(Fc02cIts).....  | 66 |
| Figura 25. Curva de crecimiento de resguardos de PAO1(Fc02cIts).....  | 67 |
| Figura 26. La disminución en la densidad óptica se ve favorecida a 40°C.....  | 68 |
| Figura 27. Comportamiento de las colonias bacterianas y las partículas virales durante<br>la iducción. ....   | 69 |
| Figura 28. Viriones liberados después de la inducción con y sin cloroformo.....   | 70 |
| Figura 29. Comprobación de la ausencia de ADN en las muestras. ....   | 71 |
| Figura 30. PCR punto final de genes fágicos en diferentes tiempos de inducción. ....  | 72 |
| Figura 31. Búsqueda de amplicones en el cDNA de la región entre ner y el ORF8. ..   | 73 |
| Figura 32. Curva de crecimiento de PAO1(Fc02repcts). ....   | 74 |
| Figura 33. Integridad del ARN de las muestras de PAO1 y PAO1(Fc02repcts). ....  | 75 |
| Figura 34. Tercera extracción de ARN de PAO1. ....  | 76 |
| Figura 35. Evaluación de la integridad del ARN de las 30 muestras de ARN.....   | 77 |
| Figura 36. Análisis de calidad de los archivos fastq. ....  | 80 |
| Figura 37. Eliminación de las secuencias de los adaptadores.....  | 81 |
| Figura 38. Esquema del porcentaje de lecturas mapeadas con las respectivas<br>secuencias de PAO1. ....  | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 39. Gráfica de las lecturas mapeadas en el genoma de Fc02.....  | 83  |
| Figura 40. Análisis de componentes principales de las lecturas. ....   | 84  |
| Figura 41. Cobertura de las lecturas antes y después de la inducción. ....   | 85  |
| Figura 42. Regiones de transcripción al reverso del inicio de los genes <i>mor</i> y <i>transposasa B</i> .....                | 86  |
| Figura 43. Esquema del promotor previo al ORF40. ....  | 87  |
| Figura 44. Transcripción previa al inicio del represor.....  | 88  |
| Figura 45. Promotor de los ORFs sin anotar que se expresan a 30°C. ....  | 89  |
| Figura 46. Alineamiento del gen <i>olg1</i> y <i>olg2</i> .....  | 91  |
| Figura 47. Clonaciones de la región antisentido en pSEVA648. ....  | 92  |
| Figura 48. Secuencia del plásmido pHERD30T. ....   | 94  |
| Figura 49. La sobreexpresión de <i>olg1</i> y ORF10 evitan la infección por otros fagos..                                      | 94  |
| Figura 50. Búsqueda de la proteína <i>Olg1</i> .....   | 95  |
| Figura 51. Búsqueda de la proteína <i>Olg2</i> .....   | 96  |
| Figura 52. Evaluación de los promotores en pSEVA227R. ....   | 97  |
| Figura 53. Ensayo de fluorescencia para evaluar pC1. ....  | 98  |
| Figura 54. Búsqueda de la proteína <i>mcherry</i> fusionada con el promotor pC1, de la región antisentido. ....                | 99  |
| Figura 55. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 a 30°C. ....   | 100 |
| Figura 56. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 5 minutos después de la inducción. ....                              | 101 |
| Figura 57. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 a 10 minutos después de la inducción. ....                           | 101 |
| Figura 58. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 20 minutos después de la inducción. ....                             | 102 |
| Figura 59. Diagrama de Venn de los genes con expresión diferencial a 30°C y hasta los 20 minutos después de la inducción. .... | 102 |
| Figura 60. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 40 minutos después de la inducción. ....                             | 103 |

## RESUMEN

Poco se conoce acerca de la transcripción de los genes de los fagos temperados que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*. En este trabajo, se desarrolló un sistema inducible de la lisógena PAO1(Fc02) mutando el gen de represor *repc*, para inducir el ciclo lítico por el aumento de la temperatura. Para conocer el perfil de transcripción de la cepa PAO1(Fc02 *repc* ts) se tomaron muestras por triplicado de la lisógena a 30°C y 5, 10, 20 y 40 minutos después de la inducción para analizarlas por RNAseq específico de cadena. Se encontró que a 30°C se expresa un pequeño grupo de genes, entre los que se encuentra el represor y de un accesorio *e4* ubicado río abajo. Pero un análisis más preciso permitió identificar que había ORFs en regiones de transcripción río arriba al inicio del gen represor. Una vez inducida la lisógena a 40°C comienza la transcripción de los genes del fago anotados hacia la izquierda, comenzando con el gen *ner-like*, que codifica para el putativo antirepresor, que se espera tenga el efecto de inducir el ciclo lítico, *downstream* a *ner* se encuentra otros genes involucrados en la integración y replicación del virus, es importante mencionar que el último gen en transcribirse en esa región es el gen *mor*, que en otros virus se encarga de activar la transcripción de genes tardíos, para Fc02 este bloque tardío está del lado derecho del genoma y comienza su transcripción a los 20 minutos, siendo los primeros en transcribirse, genes de estructura del virión seguidos de aquellos genes involucrados en el empaquetamiento del ADN y lisis bacteriana, cuyo incremento es notorio a los 40 minutos después de la inducción. Es en este último punto, donde se observa un mayor número de genes bacterianos expresados diferencialmente, la mayoría de ellos disminuyen su expresión en esta etapa tardía de la inducción. Este trabajo permitió identificar un ORF que no estaba anotado en la secuencia, así como un promotor previo al mismo, el gen *olg1* el cual codifica una proteína de 7.9 kDa capaz de evitar la infección de otros fagos temperados, y que traslape en dirección opuesta al ORF10, el cual tiene una función similar, previamente descrita.

## ABSTRACT

Little is known about the transcription of temperate phages that infect *Pseudomonas aeruginosa*. In this work, an inducible system of the lysogen PAO1(Fc02) was developed in which the repressor *repc* gene was mutated, so that induces the lytic cycle due to the increase in temperature. To know the transcription profile of the PAO1(Fc02 *repc* ts) strain, triplicate samples were taken from the lysogen at 30°C and 5, 10, 20 and 40 minutes after induction and analyzed by strand-specific RNA sequencing. We found that at 30°C a small cluster of genes is expressed, as expected, the repressor and *e4*, an accessory gene downstream were transcribed. However, a more precise analysis allowed us to identify a region transcribed upstream the start codon of the repressor gene. Once the repression is lifted at 40°C, the transcription of the annotated genes to the left of the genome begins, starting with the *ner*-like gene, which codes for the putative antirepressor, and is expected to have the effect of inducing the lytic cycle. Downstream to *ner* there are other genes involved in the integration and replication of the virus. It is important to mention that the last gene to be transcribed in this region is the *mor* gene, which in other viruses is responsible for activating the transcription of late genes. At 20 minutes the transcripts corresponding to the late genes that are on the right end appear, the first genes transcribed are virion structure genes, and finally those involved in DNA packaging and bacterial lysis, such as those of *holin* and *endolysin*, whose increase is evident at 40 minutes after induction. In addition, at this time point the genes of the bacteria reach their maximum in terms of differential expression, most of them decreasing their transcription at this late stage of induction. This work made it possible to identify an ORF that was not annotated in Fc02 genome, as well as the promoter prior to it, the *olg1* gene, which encodes a 7.9 kDa protein that exclude the infection of other temperate phages, and that overlaps in the opposite direction to the ORF10, which has a similar function, previously identified in a phage from the B3-like group.

## INTRODUCCIÓN

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo mono-flagelado, aeróbico, Gramnegativo. Esta bacteria está considerada como un patógeno oportunista, responsable de infecciones agudas y graves en personas con el sistema inmune comprometido, es de especial importancia clínica en pacientes con fibrosis quística y en pacientes con quemaduras (Moradali et al., 2017). La Organización Mundial de la Salud publicó en 2018 una lista de patógenos en los que se debe priorizar la investigación y desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos por ser bacterias multi-drogo-resistentes, entre las bacterias de prioridad alta de esta lista figura *Pseudomonas aeruginosa* (Tacconelli et al., 2018).

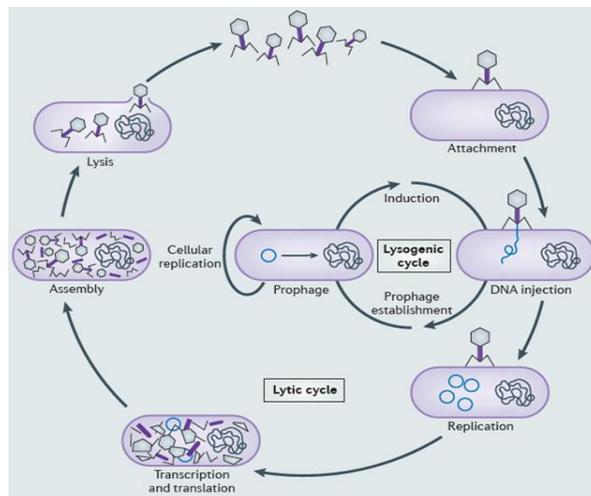
*P. aeruginosa* tiene un genoma de entre 5 y 7 Mpb, en el cual están codificadas una gran cantidad de enzimas regulatorias del metabolismo, transporte y eflujo de compuestos orgánicos, lo que le confiere una gran versatilidad metabólica para usar diversos nutrientes y adaptarse a los diferentes cambios ambientales (Klockgether et al., 2011, Stover et al., 2000).

### **Bacteriófagos**

Los bacteriófagos o fagos, son parásitos intracelulares obligados que infectan a las bacterias. Pueden encontrarse en cualquier ambiente natural, desde el tracto gastrointestinal humano hasta el océano (Dion et al., 2020). Cada virión consiste en una molécula de ARN o ADN de cadena sencilla o doble, contenida en una capa proteica (Ceyssens and Lavigne, 2010).

Los fagos pueden tener un ciclo de vida lítico o lisogénico, en ambos casos para que el virus infecte a la bacteria, primero debe interactuar con los receptores celulares para poder ser adsorbido y posteriormente inyecta su genoma. La estrategia de replicación subsecuente depende de si el fago es

virulento o temperado. Los fagos virulentos, solo son capaces de replicarse mediante el ciclo lítico, este proceso involucra la producción de la progenie viral y la liberación de la bacteria, generalmente por lisis de esta. Por otra parte, los fagos temperados pueden entrar al ciclo lítico o formar un estado de asociación estable con la célula hospedera, denominada lisogenia. Durante la lisogenia el ADN se integra al cromosoma bacteriano en un estado que se conoce como profago, o puede ocurrir que el ADN del fago se mantenga en un estado *plasmid-like*, y el contenido genético se replique junto con el de la bacteria. Bajo condiciones de estrés, los profagos pueden salir del estado lisogénico, producir más viriones y liberarlos. Normalmente, la liberación de la progenie viral resulta en la muerte de la bacteria, sin embargo, hay fagos que se liberan por secreción por la membrana externa, como es el caso de algunos fagos filamentosos (Salmond and Fineran, 2015).



**Figura 1. Ciclo lítico y lisogénico de los bacteriófagos.** Esquema del ciclo lítico en la parte externa, y en la interna cuando se integra el genoma como profago en el ciclo lisogénico (Salmond and Fineran, 2015).

Estudios recientes en fagos de *Salmonella typhimurium* han revelado un tercer ciclo pseudolisogénico denominado *phage carrier state*, en donde el ADN del fago se mantiene como episoma, sin integrarse al genoma bacteriano, no se replica de una manera estable y no es heredado simétricamente a las células hijas (De Smet et al., 2017).

La regulación del estado lisogénico depende de varios factores, entre ellos la compatibilidad genética, la fisiología de la bacteria y la proporción de fago. La lisogenia podría dividirse en tres etapas: el establecimiento, el mantenimiento y la inducción del ciclo lítico. Durante el establecimiento el genoma del fago debe asociarse al genoma bacteriano, ya sea por integración en sitios específicos o al azar, o como episoma. Posteriormente durante el mantenimiento el genoma vírico se replicará como parte del cromosoma bacteriano o en sincronía con el mismo. Esto puede tener implicaciones en la bacteria, alterando procesos celulares y el fenotipo de la misma o también en el profago, el cual queda propenso a cambios evolutivos. La última de las etapas es la inducción del ciclo lítico, la cual puede ocurrir espontáneamente o como resultado de agentes externos (Howard-Varona et al., 2017).

A partir de la creciente investigación genómica, se ha visto que los bacteriófagos codifican una gran cantidad de proteínas virales que no tienen homólogos conocidos, por lo que carecen de una función biológica asignada. A pesar de los conocimientos actuales todavía se desconoce mucha información de los fagos y su ciclo de vida (Salmond and Fineran, 2015).

### **Fagos de *Pseudomonas spp.***

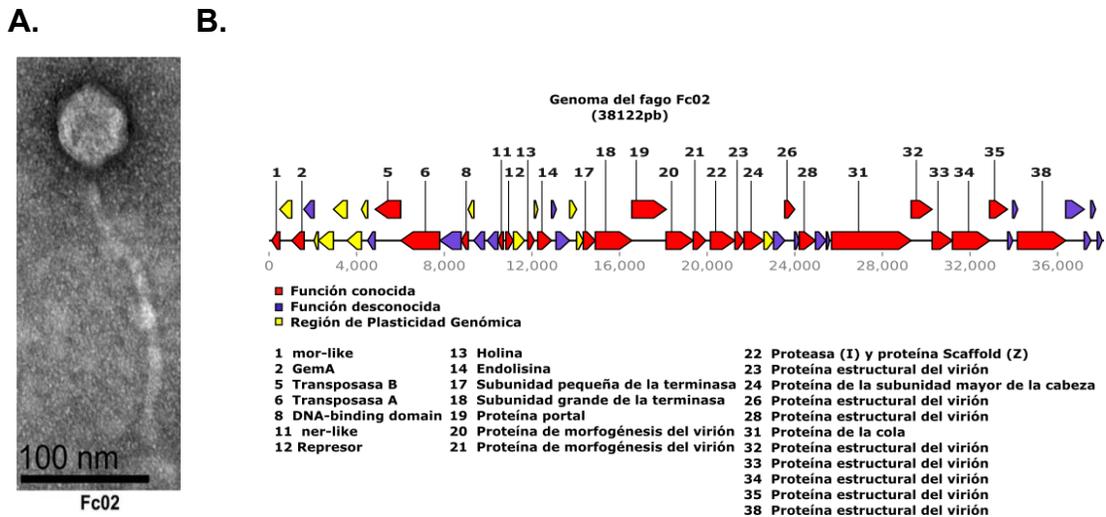
La gran diversidad de *Pseudomonas spp.* se ve reflejada también en los virus que la infectan. La mayoría de la diversidad genómica entre los fagos se encuentra en lo que se conoce como 'materia oscura viral' representada por una gran cantidad de *Open Reading Frames* (ORF) cuya función se desconoce, estos ORF's están presentes en regiones hipervariables, muchas veces relacionadas con el reconocimiento de la bacteria, la adsorción del fago y la adaptación a condiciones específicas de la célula hospedera, pero que en su mayoría aún se desconoce su función (De Smet et al., 2017).

La secuenciación de nueva generación ha sido de ayuda para conocer más a fondo la diversidad de fagos de *Pseudomonas aeruginosa*. Específicamente los fagos temperados han retomado importancia, dado que frecuentemente están presentes en los genomas bacterianos y pueden representar hasta el 20 % del mismo y participan en el estado fisiológico celular y en la patogenicidad de la bacteria. Un estudio reciente identificó 6852 profagos en 5383 genomas de *P. aeruginosa* y solo poco más de la mitad se pudieron identificar por similitud con otros fagos anotados en bases de datos y de acuerdo a la secuencia la mayoría de los fagos se pudieron identificar como sifovirus (Johnson et al., 2022).

## **Fc02**

El bacteriófago Fc02 es un virus temperado aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* proveniente de un paciente con fibrosis (Castañeda-Montes et al., 2018). Este fago es capaz de infectar a la cepa PAO1, donde produce placas turbias de 3 -5 mm. En cuanto a su morfología los viriones consisten en una cápside de morfotipo B1 unida a una cola larga, flexible y no contráctil típica de la familia (Carballo-Ontiveros et al., 2020).

El genoma de Fc02 (Genbank número de acceso MH719189) consta de 38 122 pares de bases y presenta similitud a nivel de secuencia con fagos de la familia B3-like (Braid et al., 2004). El análisis de la secuencia del fago Fc02 identificó 54 posibles regiones codificantes (ORFs), de los cuales a 23 se les pudo asignar una función, quedando poco más de la mitad sin una función conocida. Catorce de estos ORFs se encuentran dentro de regiones de plasticidad genómica (Carballo-Ontiveros et al., 2020) .



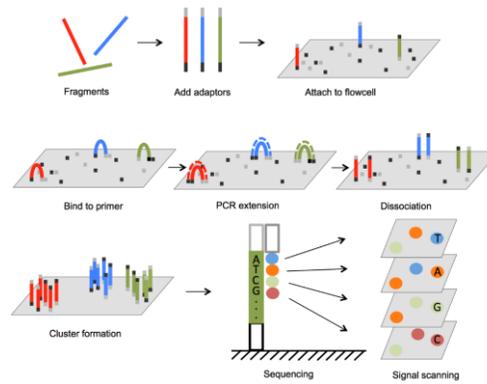
**Figura 2. Fago Fc02 y su genoma.** A. Micrografía del sífovirus Fc02 (Carballo-Ontiveros et al., 2020). B. Esquema anotado del genoma del fago Fc02.

## Secuenciación de ARN

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han evolucionado durante los últimos años, y sus avances han permitido usarlas para diferentes aplicaciones. Estas plataformas de nueva generación tienen algunas ventajas frente a las plataformas anteriores como la secuenciación tipo Sanger. Entre estas es que permiten la obtención una mayor cantidad de información (lecturas), sin embargo, también conllevan ciertas desventajas como la tasa de error más elevada y las longitudes de las lecturas más cortas (Goodwin et al., 2016).

Una de las plataformas NGS más utilizadas en la actualidad es la de Illumina, la cual se basa en la secuenciación por síntesis, en esta aproximación se amplifican clonalmente los fragmentos de ADN de la biblioteca en una superficie sólida (*Flow cell*). La amplificación se hace en dos pasos, el primero es la denominada amplificación cíclica reducida, donde se unen los *primers* para generar la hebra complementaria y el segundo paso es una amplificación en puente, que permite la generación de *clusters* para amplificar la señal.

Finalmente se adicionan nucleótidos marcados con fluoróforos específicos que generan una señal, la cual es detectada por un sistema de detección óptica para hacer el llamado de base y generar la secuencia (ver figura 3).



**Figura 3. Esquema de la secuenciación por síntesis (Illumina Sequencing Platform – Biomarker Technologies, no date).**

El uso de la secuenciación de bibliotecas de ADN complementario (cDNA) obtenidas a partir de ARN fue desarrollada hace más de 13 años (Emrich et al., 2007), y desde entonces se ha usado para el análisis de expresión diferencial de genes cuyos pasos esenciales inician con la extracción de ARN, seguida de un enriquecimiento de ARN mensajero (mRNA) o la reducción del ARN ribosomal, posteriormente se sintetiza el cDNA, se ligan los adaptadores de la biblioteca para ser secuenciada y finalmente un análisis computacional para determinar estadísticamente los cambios a nivel transcripcional (Stark et al., 2019) .

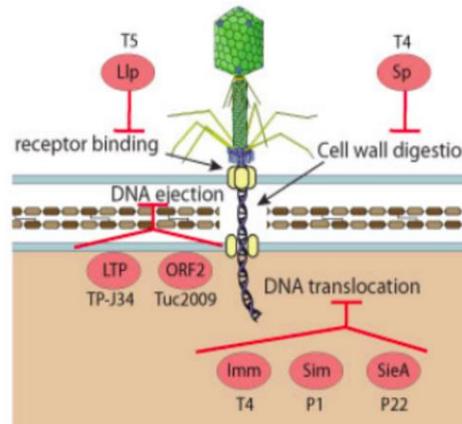
### **Mecanismos de exclusión**

Se ha descrito que las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a la infección de los fagos a diferentes niveles:

- Mecanismos que previenen la adsorción de los fagos (Bloqueando los receptores celulares, aumentando la producción de matriz extracelular o produciendo inhibidores competitivos)

- Mecanismos que evitan la entrada del ADN (sistemas de exclusión a la superinfección)
- Mecanismos de modificación de ácidos nucleicos (sistemas de restricción modificación y el sistema CRISPR-Cas)
- Sistemas de infección abortiva

Se han descrito diversos genes de fagos, en su mayoría de fagos temperados, que codifican proteínas involucrados en alguno de estos mecanismos de resistencia, evitando la infección por fagos tanto del mismo grupo como de otros fagos (Labrie et al., 2010) .



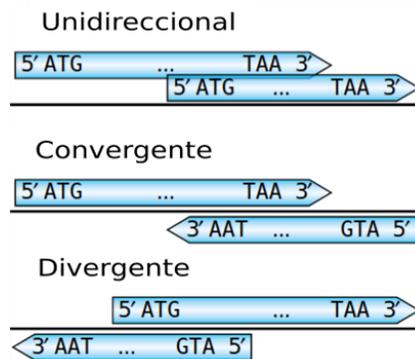
**Figura 4. Esquema de algunos ejemplos de proteínas de exclusión a la superinfección.** Tomado y modificado de ViralZone (*Superinfection exclusion ~ ViralZone*, no date).

### Traslape de genes

Los marcos abiertos de lectura (ORFs) por sus siglas en inglés) son secuencias nucleotídicas en el ADN de los organismos, que se transcriben en los ARN mensajeros, que contienen tripletes que será traducidos en aminoácidos y que son interrumpidos por un codón de paro. A los ORFs que se transcriben a partir de ARNm traducibles en polipéptidos o proteínas, con o sin función demostrable,

se llaman genes. Cuando los ORFs contienen de 10 a 100 codones y tienen una función putativa se consideran smallORFs; por su tamaño, a veces escapan de la anotación genómica (Couso and Patraquim, 2017) .

Otro grupo de genes que también es difícil de anotar en los genomas por las técnicas de anotación convencionales son los denominados *overlapping* o genes traslapados. En procariontas y virus se considera que hay traslape de genes cuando dos secuencias codificantes comparten nucleótidos en el mismo marco o en marcos de lectura diferentes en la misma secuencia de ADN, estos pueden estar traslapados por completo o parcialmente, en la misma o en hebras opuestas(Wright et al., 2022) .



**Figura 5. Esquema de los tipos de traslape de genes.** Modificado de *Rogozin et al* (Rogozin et al., 2002)

## ANTECEDENTES

El proceso de interacción entre fago- hospedero es altamente complejo y para su entendimiento se han usado tecnologías genómicas que ayudan a un mejor entendimiento de este. El conocimiento del panorama transcriptómico, es una aproximación frecuentemente usada para entender la regulación de las bacterias y los fagos que las infectan. La importancia de realizar RNA-Seq o sus mejoras, radica en aumentar el conocimiento de la regulación de la expresión de los genes del fago durante la infección, hallar los procesos que puedan verse afectados en la bacteria por efecto del fago y poder entender la funcionalidad de la gran mayoría de los genes virales de los cuales aún se desconoce el objetivo de su expresión (Wicke et al., 2021).

Diversas investigaciones se han enfocado en entender la expresión de los genes del fago una vez que ingresa a la bacteria hospedera. Entre los más recientes está el estudio del fago  $\phi$ Abp1 en *Acinetobacter baumannii*, donde a partir de los datos de secuenciación del ARN se clasificaron los 54 genes del fago en 4 *clusters* de temporalidad de expresión diferente. Además, se determinaron genes de la bacteria que se expresaron diferencialmente, demostrando que la infección por el fago  $\phi$ Abp1 provoca una mayor activación de genes de AB1, de los cuales la mayoría están involucrados en procesos de estrés, mientras que los genes que vieron inhibida su expresión estaban en su mayoría involucrados en procesos metabólicos y de transporte de nutrientes. También encontraron que mientras había genes de virulencia que eran reprimidos, genes involucrados con la resistencia a los antimicrobianos eran activados (Wicke et al., 2021).

Específicamente para fagos de *Pseudomonas spp.*, se han realizado diversos estudios donde analizan el ARN para determinar algunos puntos de la regulación de la expresión de los genes de estos virus. Es el caso del estudio a nivel transcripcional del fago LUZ19, un podovirus perteneciente al género

*Phikmvlikevirus*. En esta investigación lograron determinar, a partir de datos de microarreglos y RNA-Seq, el patrón temporal de expresión de los genes del fago, y lograron observar la disminución en la expresión de 13 operones bacterianos y algunos genes relacionados con la membrana, como el caso de la disminución de genes del pilus tipo IV. Después de 15 minutos del comienzo de la infección con el bacteriófago encontraron que cerca de 220 genes bacterianos aumentaron su expresión, algunos de ellos están asociados al metabolismo energético de la bacteria (Lavigne et al., 2013).

Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios son a partir de fagos virulentos, son escasas las publicaciones donde evalúen bacteriófagos temperados. En 2015, un estudio transcripcional de la infección del fago temperado PaP3 a la cepa PA3 de *Pseudomonas aeruginosa*, encontró mediante el uso de microarreglos y secuenciación de ARN la expresión diferencial del 38% de los genes de *Pseudomonas*. Después de la infección del fago PaP3, el análisis de las rutas metabólicas demostró que había ciertos procesos bacterianos afectados dependiendo de la etapa de infección del fago, mientras procesos como la motilidad se veían afectados en etapas tempranas, la síntesis de proteínas se alteró en etapas tardías de la inducción del fago (Zhao et al., 2016).

Un estudio reciente en el fago temperado phiYY (dsRNA), mediante RNA-Seq encontró que solo el 12.45% de los genes de PAO1 se expresaron diferencialmente, dentro de este porcentaje pudieron describir que la inducción del ciclo lítico generaba un aumento de la respuesta a estrés oxidativo, también pudieron definir que el gen PA0800 tiene un efecto en la infección del fago, ya que su delección incrementó el número de placas (Zhong et al., 2020).

Si bien el perfil transcripcional de los fagos B3-like no ha sido reportado aún, se ha reportado recientemente la configuración de los dos genes regulatorios (*repc* y *ner*-like) los cuales están precedidos por dos promotores divergentes,

esto fue descrito en el fago  $\Phi$ SHP3 que infecta *Stenotrophomonas maltophilia* (Wu et al., 2021), un fago temperado B3-like.

Dentro de los antecedentes de los fagos B3-like, Carballo et al. describieron que un fago perteneciente a este grupo (Ps56, capaz de infectar a la cepa PS33 de *P. aeruginosa*) cuando se encuentra como profago evita la infección por un panel de fagos virulentos. Ellos concluyeron que la expresión de los ORF's 9 y 10 en una construcción plasmídica generaba el mismo efecto de exclusión de los fagos virulentos que la lisógena y concluyeron que la exclusión era a nivel de inyección del ADN (Carballo-Ontiveros et al., 2020).

El creciente desarrollo de mejores tecnologías de secuenciación, así como de metodologías para estudiar la expresión de los genes de un organismo (RNA-Seq y Ribo-Seq) han permitido caracterizar de una manera más precisa los ORF's e inclusive identificar small ORFs que no se pueden identificar por las técnicas de anotación genómica convencional, como lo son los ORF's traslapados. En las bacterias y los virus que las infectan se han descrito varios casos de genes traslapados, como por ejemplo el gen *pop* (pH-regulated overlapping protein-coding gene) de *E. coli* que se traslapa completamente en el gen *ompA* (Kreitmeier et al., 2022). En *P. aeruginosa* se identificaron dos overlapping genes, *olg1* y *olg2*, que traslapan con el gen *tle3* para el caso de *olg1*, mientras que el segundo traslapa con 2 genes bacterianos diferentes (*galE* y PA1383).

En el fago  $\phi$ X174 se han descrito diversos traslapes de genes a lo largo de su genoma (Linney and Hayashi, 1974, Sanger et al., 1977, Weisbeek et al., 1977), inclusive un estudio reciente pudo determinar que la configuración que involucra el traslape de diversos genes es importante para el correcto desarrollo y replicación del fago (Wright et al., 2020).

## JUSTIFICACIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno cuya creciente resistencia a los fármacos ha despertado el interés por entender los procesos que afectan su desarrollo. Los fagos que la infectan pueden tener un gran efecto en su comportamiento, no solo por la lisis de esta bacteria por fagos virulentos, sino también las consecuencias de la inserción y expresión de genes de profagos y su consecuente inducción en ciertas condiciones.

A pesar de que cada vez se identifican y caracterizan más fagos que infectan a *Pseudomonas aeruginosa*, todavía existe una brecha importante en cuanto a la función de muchos de los genes de estos bacteriófagos.

Una aproximación importante para poder entender la interacción entre el fago y la bacteria, son los análisis de expresión génica. Este tipo de estudios permiten entender la regulación, expresión y efectos de esta expresión de genes víricos en la bacteria. Una de las técnicas que permiten lo anterior es la secuenciación de ARN, esta es una herramienta que permite analizar el transcriptoma de una célula y es importante para poder interpretar los elementos funcionales del genoma del fago, así como caracterizar la temporalidad de expresión de los genes, el efecto que tiene la inducción del ciclo lítico del fago en su hospedero, la identificación de genes que alteran al hospedero y para determinar elementos regulatorios de la expresión génica.

Específicamente Fc02, que infecta a la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, es un fago temperado que tiene alrededor de 55% de sus genes sin una función asignada, además de que no se ha caracterizado la temporalidad de expresión de sus genes, y no se sabe el efecto que tiene en la bacteria hospedera. Una característica importante de estas lisógenas es que excluyen a una amplia cantidad de otros fagos, esto le da una ventaja de supervivencia a PAO1 cuando Fc02 se encuentra como profago. Por lo tanto, caracterizar este fago sería de vital importancia para comprender un poco más acerca del efecto de la presencia de Fc02 como profago y el efecto de la inducción de este fago en su cepa hospedera.

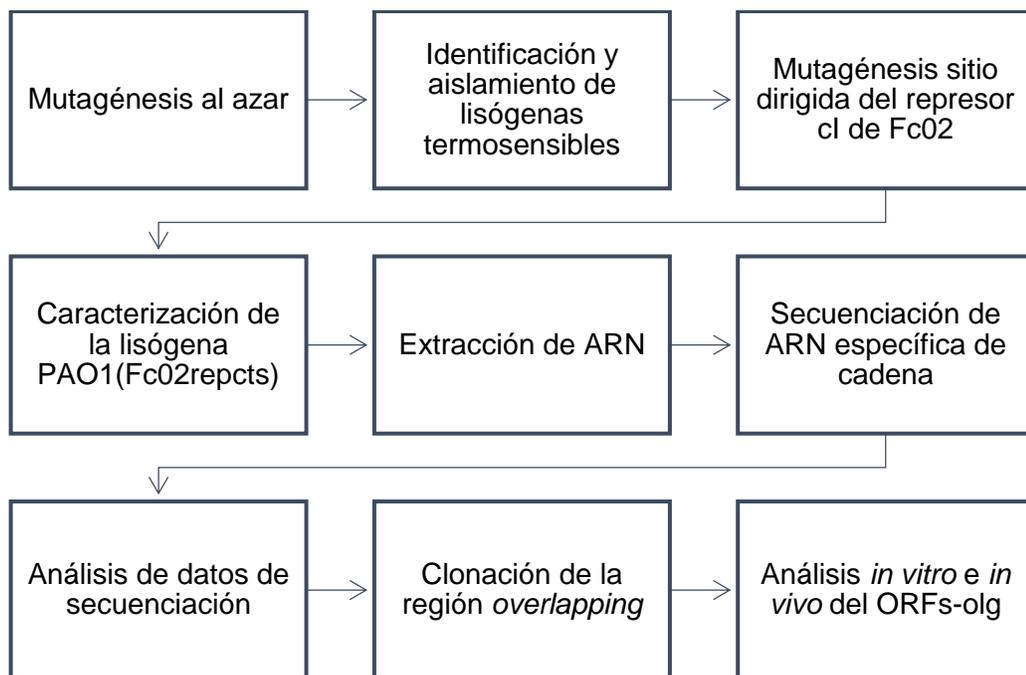
## **OBJETIVO GENERAL**

Obtener el perfil global de transcripción del genoma de Fc02 para analizar los cambios que genera la inducción del profago en la bacteria en sus distintas etapas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- I. Obtener el fago Fc02 con una mutación termosensible en el represor.
- II. Realizar el análisis de la expresión génica del ciclo lítico y lisogénico de Fc02 cuando es inducido en PAO1 mediante *strand-specific* RNA-Seq.
- III. Ejecutar el análisis de los datos de secuenciación y relacionar los resultados con procesos importantes en el fago y en la bacteria.
- IV. Identificar si los transcritos que se expresan en el profago, previamente sin anotar e identificados por RNA-Seq, se expresan a nivel de proteína.

## ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## MATERIALES Y MÉTODOS

### MATERIAL

#### Material biológico y medios de cultivo.

Los cultivos bacterianos se realizaron en medio Luria-Bertani (LB) ver ANEXOS. Para las bacterias transformadas con uno o dos plásmidos, el medio LB fue suplementado con el antibiótico y la concentración apropiadas. Para las cepas de *Escherichia coli* las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Ampicilina 100 µg/mL, Gentamicina 15 µg/mL, Tetraciclina 12.5 µg/mL y Kanamicina 50 µg/ml. Para las cepas de *P. aeruginosa*: Gentamicina 50 µg/mL, Tetraciclina 100 µg/mL y Kanamicina 1500 µg/ml. La evaluación del crecimiento bacteriano se siguió mediante la determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de  $\lambda = 600\text{nm}$  (D.O.  $\lambda = 600\text{nm}$ , DU® 640 spectrophotometer BECKMAN).

Las cepas, fagos y plásmidos utilizados se encuentran en la siguiente tabla.

**Tabla 1. Cepas, fagos y plásmidos.**

| Cepa, fago o plásmido                        | Genotipo o Fenotipo   | Referencia                              |
|--|---|---|
| E.coli                                       |   |   |
| DH5 $\alpha$                                 | F– <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 <math>\phi</math>80dlacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), <math>\lambda</math>–</i> | Stock de laboratorio                    |
| XL1-Blue                                     | <i><math>\Delta</math>(mcrA)183 <math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIq Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup> )]</i>     | Stock de laboratorio                    |
| P.aeruginosa                                 |   |   |
| PAO1   | Silvestre (WT)  | Stock de laboratorio                    |
| PAO1(Fc02)                                   | Lisógena del fago Fc02 construida sobre PAO1  | Este trabajo                            |
| PW7144                                       | Tet <sup>R</sup> , RecA mutante (PA3617::lsphoA/hah) construida sobre PAO1  | (Jacobs <i>et al.</i> , 2003)           |
| Plásmidos                                    |   |   |
| pJET1.2/blunt                                | Amp <sup>R</sup> , rep(pMB1)  | Thermo Fisher Scientific                |
| pHERD30T                                     | Gm <sup>R</sup> , origen pBR322, origen pRO1600, promotor P <sub>BAD</sub> .  | (Qiu <i>et al.</i> , 2008)              |
| pSEVA648                                     | Gm <sup>R</sup> , origen pRO1600, promotor P <sub>M-Xy/S</sub>  | (Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)      |
| pSEVA658-ssr                                 | Gm <sup>R</sup> , origen RSF1010, P <sub>M-Xy/S</sub> , contiene la recombinasa Ssr   | (Aparicio <i>et al.</i> , 2016)         |
| pSEVA227R                                    | Km <sup>R</sup> , origen RK2, contiene la proteína mCherry  | (Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)      |
| Fagos  |   |   |
| Fc02   |   | (Castañeda-Montes <i>et al.</i> , 2008) |
| Fc04   |   |   |
| Fc17   |   |   |
| Fc1  |   |   |
| Amp <sup>R</sup> - resistencia a ampicilina  |   |   |
| Km <sup>R</sup> - resistencia a kanamicina   |   |   |
| Gm <sup>R</sup> -resistencia a gentamicina   |   |   |
| Tet <sup>R</sup> -resistencia a Tetraciclina |   |   |

## MÉTODOS

### Análisis in silico.

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas fueron obtenidas de las bases de datos *GenBank* y *RefSeq*. Los alineamientos locales se realizaron con el software CLUSTAL Omega y la visualización de los mismos mediante JalView, SeaView y ESPript . La predicción de los modelos de estructura tridimensional de las proteínas, así como la comparación entre estructuras se realizó mediante el *software* I-TASSER y la visualización de las estructuras con el programa ChimeraX. La búsqueda de *motifs* y promotores se llevó a cabo con los *softwares* MEME, BProm, Sapphire, PhagePromoter y BacPP, la de terminadores con ARNold y BTerm.

**Tabla 2. Números de acceso de las secuencias analizadas.**

| Nombre entidad   | Número de acceso<br>(Genbank)                    |
|------------------|--|
| PAO1             | NC_002516.2<br>GCF_000006765.1_ASM676v1 (RefSeq) |
| B3               | NC_006548.1                                      |
| Fc02             | MH719189.1                                       |
| Fc22             | MH719191.1                                       |
| Ps56             | MH719192.1                                       |
| Ps59             | MH719195.1                                       |
| Ps60             | MH719194.1                                       |
| H71              | MH719190.1                                       |
| H72              | MH719193.1                                       |
| JBD18            | NC_027986.1                                      |
| JBD25            | NC_027992.1                                      |
| JBD67            | NC_042135.1                                      |
| vB_PaeS_PM105    | NC_028667.1                                      |
| UMP151           | MK934841.1                                       |
| vB_Pae-SS2019XII | MN536027.1                                       |

### **Tapiz bacteriano.**

Se mezclaron 3.5 ml de TΦ agar suave (ver ANEXOS) con 100 μl de un cultivo bacteriano líquido *overnight* (vórtex). La mezcla se vertió en una caja con medio TΦ (ver ANEXOS) cuidando que la distribución de la mezcla en la caja fuera uniforme. La caja se dejó enfriar para la solidificación del medio y después se incubó toda la noche a 30°C, 37°C o 42°C.

### **Propagación del fago.**

Se realizó un cultivo líquido *overnight* de la cepa bacteriana PAO1, crecida en agitación (200rpm) en medio LB a 37°C, posteriormente se colocaron 10 μl del fago, se extendió la gota sobre el tapiz bacteriano y se incubó 12 h a 30°C, 37°C o 42°C (dependiendo del fago). Se recolectó con un palillo estéril una de las placas aisladas de la caja y se hizo pasar en línea recta sobre la superficie de un nuevo tapiz y se incubó *overnight*. Del tapiz bacteriano se tomaron 15 placas con una pipeta Pasteur estéril y se depositaron en un tubo Eppendorf® de 1.5ml con 1 ml de TMG-SM (ver ANEXOS). El tubo se dejó en agitación (120rpm) por 12 h a 4°C, después se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se almacenó en otro tubo Eppendorf® de 1.5ml estéril a 4°C.

Para aumentar la concentración del *stock* del fago, se mezclaron 300μl de la cepa bacteriana hospedera con un volumen del fago en relación 1:3, se dejó adsorber el fago por 15 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron al tubo 3.5ml de medio TΦ caliente. La mezcla se vertió sobre una caja de TΦ, se dejó solidificar y se incubó 12 h a la temperatura correcta. Después de la incubación se recuperó el tapiz con ayuda de una espátula previamente esterilizada y se depositó en un tubo cónico de 50ml. Se adicionaron 5mL de medio TMG-SM a la caja a la que se le raspó el tapiz y se dejó en agitación (250rpm) por 30 min. Posteriormente se recuperó el TMG-SM de la placa y se vertió al tubo cónico con el tapiz. El tubo se dejó en agitación a 120 rpm por

12h a 4°C. Después se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante, se trató con 2ml de cloroformo, se centrifugó de nuevo y el sobrenadante se guardó en un tubo estéril a 4°C.

### **Purificación de fago por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio.**

El tubo obtenido a partir de la propagación del fago se pasó por un filtro de jeringa de 0.45µm, después se le adicionaron DNAsa y RNAsa a una concentración de [1 µg/ml] y se incubó por 30 minutos a 37°C. Después se adicionaron 4 g de Polietilenglicol 8000 y 2g de NaCl y se almacenó toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de TMG-SM que fueron repartidas en dos alícuotas de 500µl a las que se les adicionaron 200 µl de cloroformo, se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos y la fase acuosa se depositó en un nuevo tubo Eppendorf® que se almacenó a 4°C (Maniatis et al., 1982).

La fase acuosa se sometió a un gradiente discontinuo de cloruro de cesio (CsCl), con las siguientes densidades de reactivo: 1.08, 1.31, 1.51 y 1.72 (**ver ANEXOS**) en un tubo Beckman Ultra-Clear™. Las soluciones de diferente densidad se adicionaron de mayor a menor densidad, colocando 3.5 ml para la mayor y 2.5 ml para el resto. La última solución se mezcló con 2ml del fago. El gradiente preparado se centrifugó a 61,000 g durante 2:30 h a 4°C haciendo uso de un rotor SW 40 Ti Beckman, sin freno. Mediante la perforación del tubo con una aguja hipodérmica de 20G, se extrajo el concentrado de fago que se observó como una banda blanca en la zona correspondiente a la densidad de 1.51. El volumen recuperado de la banda se almacenó en frío (Maniatis *et al.*, 1982).

### **Diálisis de los fagos.**

Para eliminar el CsCl de la fracción del fago, se dializaron las muestras, para esto se colocaron en tubos de membrana Spectra/Pro® con porosidad de 6-8,000kDa. La membrana con la muestra se sumergió en buffer de diálisis (en proporción 1:1000) (ver ANEXOS) y se realizaron 3 cambios del buffer cada hora. Finalmente se recuperó la solución con las partículas virales purificadas, se repartieron en tubos de 1.5ml y fueron almacenadas a 4°C.

### **Obtención del título del fago.**

Para conocer el título viral o unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml) en el *stock* obtenido anteriormente, se hicieron diluciones seriadas del resguardo de fagos. La primera dilución en una proporción 1:100 (factor de dilución 10<sup>2</sup>), de la siguiente manera: 990 µl de medio TMG (ver ANEXOS) más 10 µl del *stock* de fago. Después se siguieron con los factores de dilución de 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup>. De cada una de las diluciones se gotearon 5 µl sobre un tapiz bacteriano, se dejaron secar y se incubó toda la noche a la temperatura indicada. Al siguiente día se contaron las placas de la última dilución y se determinó el título viral con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{ml} = \frac{(Número\ de\ placas\ en\ una\ gota \times Factor\ de\ dilución)}{Volumen\ gotado\ (ml)}$$

### **Extracción de ADN fágico.**

A partir del *stock* de partículas fágicas purificadas se usó la técnica de extracción de ADN mediante fenol básico-cloroformo (Maniatis, 1982) de la siguiente manera. Se mezclaron 500 µl del *stock* viral con un volumen equivalente de una solución fenol-cloroformo en proporción 1:1, se agitó manualmente por inversión y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo Eppendorf® de 1.5ml y se repitió el

tratamiento con la solución fenol-cloroformo tres veces más, para garantizar la remoción de proteínas. Nuevamente se recuperó la fase acuosa y se colocó en otro tubo nuevo, al que se le adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión y se almacenó 2hr a -20°C. La mezcla se centrifugó a 13 000rpm por 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó dos veces con 1ml de etanol al 70% frío. Finalmente se secó la muestra a temperatura ambiente y el ADN se resuspendió en 100 µl de agua inyectable estéril. La calidad del ADN extraído del fago fue confirmada por electroforesis y el ADN se cuantificó por espectrofotometría usando el Nanodrop 2000 de ThermoScientific.

### **Geles de agarosa y electroforesis.**

Se pesó 1 g de agarosa (Invitrogen) y se disolvió en 100 ml de buffer TAE 1X (ver ANEXOS), calentando la solución en un horno de microondas por intervalos de 15 segundos, hasta la disolución completa. Se dejó enfriar un poco y se vertió en un molde de electroforesis sellado en ambos extremos con cinta adhesiva, se colocaron los peines y se dejó solidificar en frío. Después se retiró la cinta adhesiva, se colocó el molde en una cámara de electroforesis, la cual se llenó con buffer TAE 1X hasta la señal indicada y se retiró el peine. Se colocaron las muestras disueltas en buffer de carga en cada pozo y se corrió el gel a 70 V durante 1hr 30min. Finalmente, los geles se tiñeron por 15 minutos en una solución de bromuro de etidio y se observaron con luz UV.

### **Restricción enzimática.**

Las enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron EcoRI, HindIII y SpeI (Jena Bioscience), las condiciones de la reacción se presentan en la siguiente tabla, en las restricciones necesarias se sustituyó HindIII por SpeI, pero con las mismas concentraciones.

| Reactivo         | Concentración | Volumen( $\mu$ l) |
|------------------|---------------|-------------------|
| EcoRI            | 10 U          | 1                 |
| HindIII          | 10 U          | 1                 |
| Buffer Universal | 1X            | 1                 |
| ADN              | 1 $\mu$ g     | 5                 |
| Agua             | -             | 2                 |

### Ensayo de estría cruzada.

Para este ensayo se utilizó un asa bacteriológica, que inicialmente se esterilizó en la flama del mechero y se enfrió en el agar de la caja, con el asa se tomó una alícuota de una colonia de la bacteria PAO1 y se estrió verticalmente en la caja con LB. Posteriormente el asa se esterilizó, se enfrió, y se usó para tomar alícuotas de los fagos a probar y se aplicaron estrías más cortas que cruzaran la estría vertical de la bacteria, como se muestra en la siguiente figura 6. Se dejó secar y se incubó a 32 y 43°C por 16 horas.

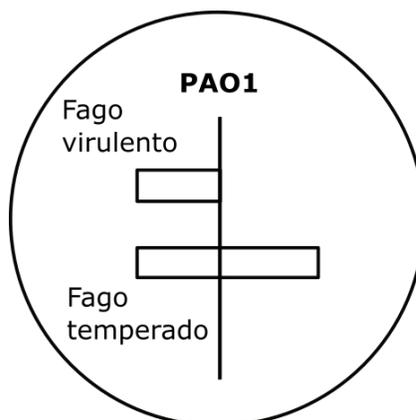


Figura 6. Esquema de placa con estría cruzada.

### Curva de crecimiento bacteriano

A partir de un cultivo *overnight* se realizaron cultivos de 50 ml, con una dilución 1:100 con LB a 30°C, 37°C o 43°C, y suplementado con el antibiótico respectivo, de acuerdo con la cepa usada. Se monitorearon y se obtuvieron muestras para el conteo de UFC/ml y UFP/ml (para el caso de las lisógenas) cada hora. En el caso de la inducción mitomicina C, se creció un cultivo de PAO1(Fc02) hasta una D.O. de 0.3 y en este punto se adicionó mitomicina C en una concentración de [4µg/ml]. Para la lisógena termosensible se creció a 30°C hasta una D.O. de 0.3 y en ese momento se agregó el LB suficientemente caliente para alcanzar rápidamente la temperatura de 42°C. Para el caso de cultivos para la sobreexpresión de genes, los cultivos se dejaron crecer y se monitorearon hasta obtener una D.O. de 0.3, en ese momento se agregó el inductor adecuado (arabinosa al 0.3% para los vectores pHERD, ácido *m*-Toluico 2mM para los vectores pSEVA) y se fueron registrando las densidades ópticas cada hora, durante 6 horas.

### **Mutagénesis al azar de la lisógena.**

Se realizaron tres cultivos exponenciales de PAO1(Fc02) en LB hasta una densidad óptica de 0.3, estos se incubaron 30 y 50 minutos con 100 µg/ml de N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Se agregó LB nuevo a los cultivos, en una dilución 1:100 con respecto al volumen inicial y se permitió su recuperación *overnight* con aireación a 32°C. Posteriormente se centrifugaron los cultivos por 5 minutos a 8, 000 rpm y se le agregó LB nuevo, se hicieron 3 lavados, al finalizar los lavados se resuspendió el botón celular y se incubó en agitación 3 horas a 43°C. Los cultivos se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 minutos, se obtuvo el sobrenadante y éste fue tratado con 30 µl de cloroformo. Se tomaron 100µl del sobrenadante y se colocaron junto con un tapiz bacteriano *overnight* a 43°C. Se picaron con un asa recta las placas claras y se estriaron sobre un tapiz de PAO1 para ser aisladas, a partir de las placas aisladas se picaron y estriaron en 2 tapices de PAO1, uno se creció por 12 horas a 32°C y el otro a 43°C.

## Amplificación por PCR

Para amplificar los genes usados en este trabajo se utilizó la enzima *High Fidelity DNA Polymerase* (Jena Bioscience), dNTPs (Jena Bioscience), ADN purificado y los *primers* de la Tabla ANEXOS. Las condiciones de amplificación usadas fueron las siguientes:

| Reactivo                            | Concentración          | Volumen ( $\mu$ l) |
|-------------------------------------|------------------------|--------------------|
| Oligos Fwd y Rev (10mM)             | 0.2 $\mu$ M (cada uno) | 0.2 (cada uno)     |
| Buffer de reacción 10X              | 1X                     | 1                  |
| dNTPs (10mM)                        | 2 $\mu$ M              | 0.2                |
| <i>High Fidelity DNA polymerase</i> | 1.25 U                 | 0.1                |
| ADN molde                           | 100 ng/ $\mu$ l        | 1                  |
| Agua                                | -                      | 7.3                |

| Condición                 | Temperatura               | Tiempo |
|---------------------------|---------------------------|--------|
| Desnaturalización inicial | 97°C                      | 5 min  |
| Desnaturalización         | 96°C                      | 30 s   |
| Alineamiento              | De acuerdo con los oligos | 30 s   |
| Extensión                 | 72°C                      | 30 s   |
| Extensión Final           | 72°C                      | 7 min  |

## Ligación de plásmidos

La reacción de ligación se hizo con la enzima T4 DNA Ligasa de Jena Bioscience con las siguientes condiciones:

| Reactivo     | Cantidad        |
|--------------|-----------------|
| Buffer (10X) | 1 $\mu$ l       |
| Vector       | 300 ng          |
| Inserto      | 56 ng           |
| Ligasa T4    | 1 $\mu$ l       |
| Agua         | Para 10 $\mu$ l |

Se incubó la reacción a 16°C durante 24 horas.

## Construcción de plásmidos

### Clonación en el vector de transición

Para la construcción de todos los plásmidos usados en este trabajo primero se amplificaron los fragmentos específicos mediante PCR, el producto de cada reacción fue ligado al vector de transición pJET1.2/blunt, siguiendo el procedimiento descrito en el manual *CloneJet PCR Cloning kit* (ThermoFisherScientific):

| <b>Reactivo</b>                  | <b>Volmen<br/>(<math>\mu</math>l)</b> |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Buffer de reacción (2X)          | 10                                    |
| Producto de PCR sin<br>purificar | 1                                     |
| pJET1.2/blunt (50 ng/ $\mu$ l)   | 1                                     |
| T4 DNA ligasa                    | 1                                     |
| Agua                             | 7                                     |

La reacción de ligación se incubó a 22°C por 25 minutos.

## Secuenciación de DNA.

Se usó el *stock* de ADN (fago o plásmido) purificado para llevar a cabo las 2 reacciones de PCR (primer forward y reverse) con el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Thermo Fisher Scientific):

| Reactivo                | Cantidad   |
|-------------------------|------------|
| Sequencing buffer (5X ) | 4 µl       |
| Ready reaction Mix      | 4 µl       |
| DNA                     | 1 µg       |
| Oligo Fw o Rv (10µM)    | 2 µl       |
| Agua                    | Para 20 µl |

| Condición                 | Temperatura (°C) | Tiempo |           |
|---------------------------|------------------|--------|-----------|
| Desnaturalización inicial | 94               | 5 min  |           |
| Desnaturalización         | 94               | 30 seg | 30 ciclos |
| Alineamiento              | 55               | 20 seg |           |
| Extensión                 | 60               | 4 min  |           |
| Extensión final           | 60               | 7 min  |           |

Al finalizar la reacción, esta se purificó mediante columnas Centri-sep (Princeton Separations). Primero se centrifugó la columna para bajar todo el contenido de la columna, se removió la tapa superior, se agregaron 800 µl de agua miliQ estéril y se mezcló en el vórtex para hidratar el gel. Para evitar la presencia de burbujas se golpeó ligeramente la columna, se dejó en hidratación por 2h en una gradilla a temperatura ambiente. Se quitó la tapa superior de la columna, luego la inferior y se colocó en un tubo colector. Se centrifugó a 8000rpm durante 2 min en una centrífuga EPPENDORF 5415C. Se transfirieron los 20 µl de la reacción de PCR en el centro de la columna, con cuidado de no tocar el gel y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min. La muestra fue secada en Speed-vac sin calor por 20 minutos y enviada al

servicio de secuenciación del Departamento de Genética del CINVESTAV o a la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE-Cinvestav).

### **Preparación de bacterias quimiocompetentes de *E. coli***

Se usó un cultivo overnight de *E. coli* y se hizo una dilución 1:100 en medio SOB (ver ANEXOS). Se puso a incubar en agitación con aireación a 37°C hasta que alcanzó una D.O. de 0.4-0.5. Se incubó 5 minutos en hielo. Después se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió suavemente en 33 ml de solución TfbI (ver ANEXOS). Se incubó 10 min en hielo y se centrifugó otra vez a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 4 ml de solución TfbII (ver ANEXOS). Se hicieron alícuotas de 100 µl en tubos Eppendorf®, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

### **Transformación química de plásmidos en *E. coli***

En un tubo Eppendorf® estéril se colocaron 100 µl de bacterias *E. coli* DH5α o XL1-Blue quimiocompetentes, junto con 10 µl de la reacción de ligación o 100 ng de plásmido, se incubaron 30 minutos a 4°C, seguido de una incubación de 5 min a 42°C y otra de 3 min a 4°C. Se agregó 1 ml de LB y se incubó a 37°C 1 h en agitación (500 rpm). Se centrifugó a 12 000 rpm por 3 min, se descartaron 900 µl del sobrenadante y los 100 µl restantes se usaron para resuspender el botón celular. Finalmente, los 100 µl se plaquearon en una caja de LB con el antibiótico de selección y se dejó en la incubadora *overnight* a 37°C.

### **Selección de candidatas**

Se seleccionaron 10 colonias después de la transformación de la reacción de ligación en las bacterias quimiocompetentes, se picaron con un asa bacteriológica y se resembraron para su aislamiento. A partir de colonias individuales se realizó *colony* PCR para verificar la presencia del inserto.

### **Extracción de plásmido**

Se utilizó el kit de extracción de plásmido de Jena Bioscience. A partir de un cultivo semilla de 5 ml, se obtuvo el pellet celular y se resuspendió en 300 µl de solución de lisis, para detener la reacción se adicionaron 300 µl de Buffer de neutralización, se mezcló por inversión de 4 a 6 veces y se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos. Se preparó la columna "*Binding column*" agregando 100 µl de Buffer de activación, la columna se colocó en un tubo de colección y fue centrifugado a 8000 rpm por 30 segundos.

El sobrenadante de la lisis bacteriana se colocó en la columna activada, se centrifugó 30 segundos a 8000 rpm, después se hicieron dos lavados con 500 µl y 700 µl de Buffer de lavado, centrifugando a 8000 rpm por 30 segundos después de cada uno, finalmente el tubo con la columna sin solución se centrifugaron otros 2 minutos a las mismas revoluciones, se tomó la columna y se colocó en un tubo Eppendorf®, en el centro de la columna se agregaron 50µl de Buffer de elución, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, el ADN en solución se cuantificó en NanoDrop2000 (ThermoFisher Scientific) y se almacenó a -20°C.

### **Purificación de bandas de gel de agarosa**

Se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Se cortó la banda del tamaño deseado de un gel de agarosa al 0.7% y se pesó. Por cada 10 mg de gel se añadieron 10 µl de Membrane Binding Solution. Se mezcló y se incubó 10 min a 60°C mezclando por inversión cada 3 minutos. Se colocó una minicolumna SV en un tubo colector y se transfirió el gel

derretido, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000rpm por 1 min. Se desechó el filtrado y se hicieron dos lavados el primero con 700 µl de Membrane Washing Solution y el segundo con 500 µl de la misma solución, centrifugando a 13,000 g durante 5 min y se desechó el filtrado. Se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas (precalentada a 50°C) al centro de la columna, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 min. El DNA purificado se cuantificó y guardó a -20°C.

### **Preparación de bacterias electrocompetentes de *Pseudomonas aeruginosa***

Se creció un cultivo de 5ml de la bacteria PAO1, PAO1(Fc02) o PAO1(Fc02repcts) en medio LB toda la noche, este cultivo se usó para inocular en una dilución 1:100 un nuevo cultivo de 50 ml. Este cultivo de 50 ml se creció en agitación continua a 37 o 30°C, hasta alcanzar una D.O. de 0.3. En este punto se centrifugó 10 min a 10 000 rpm para obtener el botón celular, al cual se le realizaron 3 lavados con 1ml de Sacarosa 300mM y se centrifugó entre cada lavado 10 min a 10 000 rpm en frío. Después del último lavado se agregaron 500µl de Sacarosa 300 mM y se realizaron alícuotas de 100 µl cada una en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las alícuotas se congelaron con Nitrógeno líquido y se resguardaron a -70°C.

### **Electroporación de plásmidos en cepas de *P.aeruginosa***

Se tomó una alícuota de 100 µl de células electrocompetentes a las cuales se le adicionaron 500 ng de plásmido, se dejaron reposar 30 minutos en hielo y se colocaron en celdas de electroporación (Cellprojects de 2mm) frías. Se electroporaron en el equipo Gene Pulser Xcell Total System en las siguientes condiciones: Protocolo exponencial con un voltaje de 2.2kV, capacitancia de 25 µF y una resistencia de 200 Ω. Después de la electroporación se agregó a

la celda 1ml de LB nuevo y estéril, el contenido se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se dejó crecer por 3 h en agitación constante en un ThermoStat a 30 o 37°C.

### **Mutagénesis del profago por recombinación**

Se creció un cultivo exponencial de PAO1(Fc02), cuando llegó a una densidad óptica de 0.3, se realizó el procedimiento para hacer estas células electrocompetentes y se le electroporó el plásmido pSEVA658-*ssr*. Se creció un cultivo *overnight* de las siguientes bacterias: PAO1, PAO1(Fc02*repcts*) y PAO1(Fc02) + pSEVA658-*ssr* y se siguió el protocolo de electroporación de plásmido para obtener las siguientes bacterias:

| <b>Cepa</b>               | <b>Plásmido</b>     |
|---------------------------|---------------------|
| PAO1                      | pSEVA648            |
| PAO1(Fc02)                | pSEVA648            |
| PAO1(Fc02)                | -                   |
| PAO1(Fc02)                | pJET_ <i>repc</i>   |
| PAO1(Fc02)                | pJET_ <i>repcts</i> |
| PAO1(Fc02) + pSEVA658_PPβ | -                   |
| PAO1(Fc02) + pSEVA658_PPβ | pJET_ <i>repc</i>   |
| PAO1(Fc02) + pSEVA658_PPβ | pJET_ <i>repcts</i> |

Todas las bacterias fueron recuperadas en crecimiento con agitación constante 4 horas a 32°C. Después de este tiempo se centrifugaron a 10 000 rpm 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces con LB estéril. Después del último lavado el botón celular se resuspendió en 1ml de LB y se incubó en agitación constante a 43°C por 3 h. Finalmente se centrifugó 10 minutos a 10 000rpm y se recuperó el sobrenadante, con este se hicieron diluciones seriadas y se gotearon 50 µl de estas diluciones en tapices de PAO1 que se crecieron a 43°C para la búsqueda de placas claras. Las placas claras

se picaron y se estriaron sobre un tapiz de PAO1 por triplicado y las placas aisladas del último pase se usaron para purificar el fago mutante.

### **Extracción de ARN**

Se agregó al cultivo solución *stop* (ver ANEXOS) en una proporción 1:10 (5ml solución *stop* + 45ml de cultivo), se colocó en un tubo cónico de 50 ml en agua-hielo para posteriormente agitar vigorosamente 20 veces, y se centrifugó en frío a 8000 rpm por 15 minutos. Se removió el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 600 µl de buffer de lisis (ver ANEXOS) y se le añadieron 600 µl de fenol ácido. Se incubó a 65°C por 10 minutos, agitando por inversión cada minuto. Después se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos en frío, la fase acuosa se colocó en otro tubo con 600 µl de fenol ácido:cloroformo (1:1) precalentado a 65°C, se mezcló suavemente por inversión y se incubó en agitación (300 rpm) por 3 minutos a 65°C. El tubo Eppendorf se pasó inmediatamente a hielo y se vortexeó de la siguiente manera: 3 veces en vórtex, con descansos en hielo de 1 minuto entre cada agitación, la primera de 30 segundos, y las últimas dos de 60 segundos cada una. Se centrifugó a 13 000 rpm 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó a un tubo con el mismo volumen de fenol ácido:cloroformo (1:1). Se centrifugó a máxima velocidad 10 minutos en frío, se recuperó la fase acuosa que se mezcló con 1 volumen de la mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se pasó por el vórtex 60 segundos y se reposó en hielo por 2 minutos. Se centrifugó a máxima velocidad en frío 10 minutos, se recuperó la fase acuosa y se le agregó 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 1 µl de glicógeno y una décima parte de acetato de sodio 3M pH 5.0, este tubo se colocó a -70°C por una noche.

## Precipitación de ácidos nucleicos

A la solución acuosa de ADN o ARN se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, 1µl de glicógeno y una décima parte de acetato de sodio 3 M pH 5.0, este tubo se colocó a -70°C por una noche. Se centrifugó 30 minutos a 13 000 rpm en frío, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 75% frío, se centrifugó a máxima velocidad 15 minutos en frío, se decantó el sobrenadante y se dejó secar (a temperatura ambiente para el caso de muestras de ARN y en el SpeedVac por 10 minutos sin calor para las muestras de ADN). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua DEPC estéril.

## Tratamiento con DNasal

La reacción para remover el remanente de ADN de las muestras de ARN se siguió de acuerdo con el proveedor (ThermoFisher) de la siguiente manera:

| Reactivo                             | Cantidad                     |
|--------------------------------------|------------------------------|
| 1µg de ARN                           | 1µg                          |
| 10µl de Buffer con MgCl <sub>2</sub> | 1µl                          |
| DNasal (1U/µl)                       | 1µl                          |
| Agua DEPC                            | Hasta volumen final de 10 µl |

Esta mezcla se incubó 30 minutos a 37°C, y una vez finalizado el tiempo se le agregó 1µl de EDTA 50mM y se incubó 10 minutos a 65°C para inactivar a la DNasal. Para remover el exceso de DNasal, después de la inactivación se precipitó el ARN siguiendo el procedimiento antes mencionado.

## Generación de cDNA

Para generar ADN complementario (cDNA) a partir de ARN se realizó la reacción de acuerdo con el proveedor (BioRAD) de la siguiente manera:

| Reactivo              | Cantidad                             |
|-----------------------|--------------------------------------|
| Reaction Mix          | 4 $\mu$ l                            |
| Random Primers        | 2 $\mu$ l                            |
| RNA                   | 1 $\mu$ g                            |
| Reverse Transcriptase | 1 $\mu$ l                            |
| Agua                  | Hasta el volumen final de 20 $\mu$ l |

La reacción se incubó 5 minutos a 25°C, después 30 minutos a 42°C y finalmente 5 minutos a 85°C.

## Secuenciación de ARN

Las muestras de ARN fueron cuantificadas en el Nanodrop 2000 de ThermoScientific, y se verificó su integridad en un gel de agarosa al 3%. De 2-20 $\mu$ g de ARN resuspendidos en 20 $\mu$ l de agua DEPC estéril se colocaron en la parte inferior de los tubos GENEWIZ RNA Stabilization Tubes, se inubaron 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se mezcló lentamente 10 veces usando la micropipeta, se removieron las tapas y se secó el material en el Speed-Vac por 1 hora sin calor, se taparon, se etiquetaron y fueron enviados por paquetería a la empresa GENEWIZ, para su procesamiento.

## Análisis de datos de secuenciación

El análisis de calidad de las lecturas de secuenciación se realizó con el *software* FastQC, el alineamiento de las lecturas se hizo con Bowtie2 versión 2.3.5 y HISAT2 versión 2.1.0, la visualización de las lecturas se hizo con Artemis. Se usó DesSeq2 para la normalización y análisis de expresión

diferencial. Las gráficas de componentes principales, volcano y Heatmap, se realizaron en R usando el paquete ggplot y se usó el programa REVIGO para el análisis de los términos GO.

### Mutagénesis sitio dirigida de plásmidos

Se diseñaron los *primers* para realizar los cambios específicos, de acuerdo con las especificaciones del proveedor (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit-Agilent Technologies). Posteriormente se realizó la reacción de PCR como se muestra a continuación.

| Reactivo                              | Cantidad   |
|---------------------------------------|------------|
| 10X Reaction Buffer                   | 5µl        |
| DNA template                          | 50ng       |
| Primer1                               | 125ng      |
| Primer2                               | 125ng      |
| dNTP's                                | 1µl        |
| PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U/µl) | 1µl        |
| Agua                                  | Hasta 50µl |

Se colocó en el termociclador con las siguientes condiciones:

| Segmento | Ciclos   | Temperatura          | Tiempo  |
|----------|--|----------------------|---|
| 1        | 1  | 95°C                 | 30 segundos   |
| 2        | 12-18<br>(dependiendo el<br>tipo de<br>mutación) | 95°C<br>55°C<br>68°C | 30 segundos<br>1 minuto<br>1 min/kb<br>longitud del<br>plásmido |
|          |  | 4°C                  | 5 minutos   |

Posteriormente se agregó 1  $\mu$ l DpnI (10 U/ $\mu$ l) y se incubó a 37°C por 1 hora y finalmente se tomó 1  $\mu$ l de la reacción y se transformó en 100 $\mu$ l de células quimiocompetentes.

### **Enriquecimiento de proteínas con etiquetas de histidinas.**

Las cepas PAO1 o PAO1(Fc02) fueron transformadas con los plásmidos: PHERD30T, pHERD30 $\Delta$ as1a $\Delta$ 6His, pHERD $\Delta$ as1ab6His, pHERD $\Delta$ as1b $\Delta$ 6His, pSEVA648, pSEVA648 $\Delta$ as1a $\Delta$ 6His y pSEVA648 $\Delta$ as1ab6His. Con la metodología previamente descrita para el crecimiento de cultivos bacterianos, se obtuvieron las muestras para la extracción de proteínas. Una vez transcurrido el periodo de inducción, los cultivos fueron enfriados en agua-hielo durante 10 minutos para después centrifugarlos a 10 000rpm durante 10 min a 4°C, la pastilla se lavó dos veces con 30 ml solución Tris 25 mM (pH. 8.0), centrifugando a 8 000rpm durante 5 min y se resuspendió en Buffer de lisis. (ver ANEXOS).

### **Lisis celular y obtención del clarificado.**

Las pastillas se resuspendieron en 3ml de buffer de lisis frío (ver ANEXOS), se sonicaron con 3 pulsos de 10s con amplitud del 100% en el sonicador. Las células sonicadas se centrifugaron a 10 000rpm durante 30 min a 4°C para retirar los restos celulares. Para el caso de búsqueda de proteínas membranales, el botón celular se resuspendió en PBS-Tween20 (0.25%).

### **Purificación en columnas de Níquel.**

Se colocaron 100 $\mu$  de Ni-NTA agarosa en suspensión al 50% de etanol (QIAGEN) en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se adicionaron 500 $\mu$ l del clarificado y se dejó en agitación a 4°C toda la noche.

Se centrifugó a 1 000rpm 10s y se descartó el sobrenadante. La resina se lavó dos veces incrementando la concentración del imidazol de 10 mM a 20 mM en el buffer de lavado (ver ANEXOS), para retirar las proteínas unidas inespecíficamente a la resina. Finalmente, las proteínas etiquetadas con histidinas fueron eluidas con 200µl del buffer de elución (ver ANEXOS), tres veces y guardadas a 4°C cubiertas con aluminio.

## SDS-PAGE

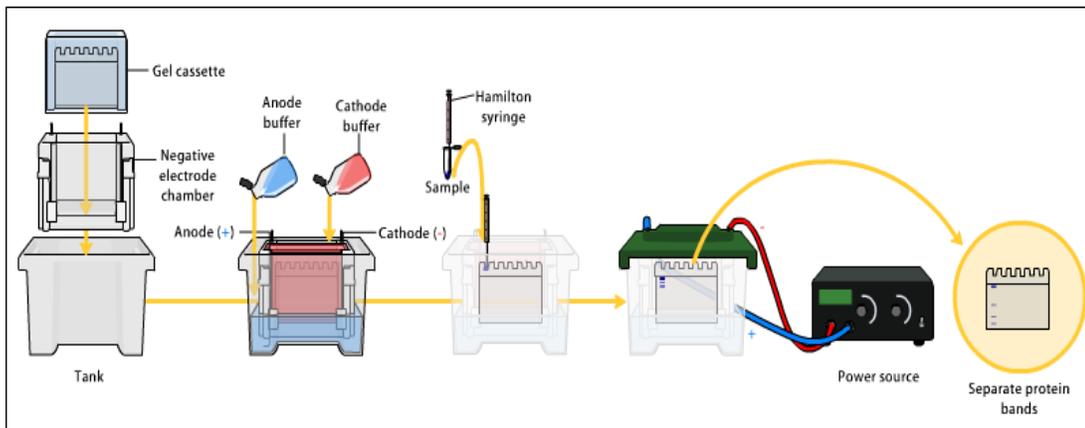
Se colocaron vidrios para hacer geles (Mini-PROTEAN® Short Plates de Bio-Rad) de 0.75 mm de grosor y se colocaron en un marco (Mini-PROTEAN® Casting Frame de Bio-Rad) sobre una goma (Mini-PROTEAN® Casting Stand Gasket de Bio-Rad) en el soporte para colocar los vidrios (Mini-PROTEAN® Casting Stand de Bio-Rad).

Se verificó que no hubiera fuga de líquido y se preparó la mezcla de los geles, comenzando con el gel separador (16%), luego el de 10% y finalmente el gel de 4% en un vaso de precipitados de 100 ml. Los reactivos se fueron añadiendo y mezclando en el orden en que aparecen en la siguiente tabla.

| <b>Solución</b> | <b>Gel 4%</b> | <b>Gel 10%</b> | <b>Gel 16%</b> |
|-----------------|---------------|----------------|----------------|
| AB-6            | -             | -              | 3.33 ml        |
| AB-3            | 500 µl        | 600 µl         | -              |
| Gel Buffer (3X) | 1.5 ml        | 1 ml           | 3.33 ml        |
| Agua destilada  | 4 ml          | 1.383 ml       | 3.33 ml        |
| APS (10%)       | 45 µl         | 30 µl          | 66.6 µl        |
| TEMED           | 5 µl          | 3 µl           | 6 µl           |

Una vez adicionado el TEMED se mezcló todo y se vació inmediatamente en el interior de los vidrios, con una micropipeta de 1 ml. Rápidamente, pero de manera suave, se agregó 1 ml de isopropanol y se dejó solidificar por 10 min. Luego se retiró el isopropanol y se quitó el exceso en los vidrios con un papel filtro. Se preparó la mezcla para el siguiente gel y se vertió hasta cubrir

aproximadamente 1cm, con ayuda de una micropipeta de 1 ml, se agregó 1 ml de isopropanol y se dejó solidificar por 10 min, finalmente, se preparó la mezcla para el gel concentrador y se vertió hasta el borde con ayuda de una micropipeta de 1 ml e inmediatamente después se colocó el peine para los pozos, con cuidado de no formar burbujas. Se dejó polimerizando durante 10 min y luego se retiró el peine. Se hizo otro gel de la misma forma. Ambos fueron colocados en una cámara de electroforesis para proteínas Mini-PROTEAN® Tetra HandcastSystems de Bio-Rad. Se vació el buffer del cátodo (ver ANEXOS) en medio de los dos geles hasta que los cubrió y en el espacio entre la cámara y los geles se llenó con el buffer del ánodo. Las muestras fueron mezcladas con 10 µl de buffer de lisis (ver ANEXOS) para proteínas y se hirvieron por 5 minutos para después centrifugarlas a 15 000rpm por 10 minutos, excepto el marcador. Se montó el dispositivo, como se muestra en el siguiente diagrama.



**Figura 7. Esquema de la metodología de los geles tris-tricina SDS-PAGE.**

Las muestras se cargaron en los pozos del gel y se corrieron con el voltaje de acuerdo con la siguiente tabla.

| Voltaje | Tiempo                       |
|---------|------------------------------|
| 30V     | 30 min                       |
| 90V     | 2 hr                         |
| 110V    | Hasta que salga el colorante |

### **Tinción con Coomassie.**

Una vez que terminó la electroforesis, el gel se colocó 1hr en solución fijadora y teñido con azul de Coomassie (ver ANEXOS) toda la noche en agitación. Para visualizar las bandas de proteínas fue necesario desteñir el exceso del colorante azul de Coomassie con la solución desteñidora (ver ANEXOS) realizando cambios de la solución hasta que el gel quedó lo más transparente posible. Se cambió la solución de desteñir por agua destilada para permitir la rehidratación del gel a temperatura ambiente.

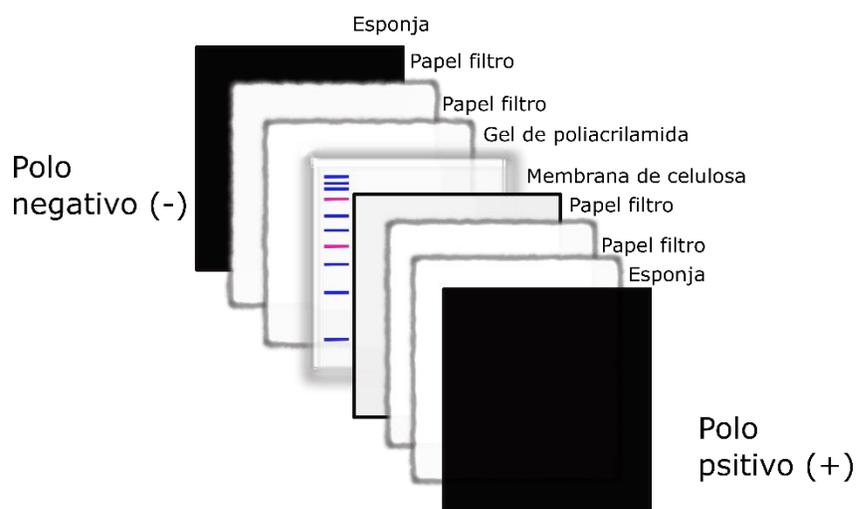
### **Tinción con Nitrato de Plata.**

El gel se incubó en solución Fijadora (ver ANEXOS) por 1 hora, posteriormente se realizaron 2 lavados con agua destilada, a continuación, se sensibilizó el gel incubándolo en una solución de tiosulfato de sodio 0.005%, por una hora. Se incubó con nitrato de plata al 0.1%, por el mismo periodo de tiempo que se usó para fijar, se lavó con agua destilada, a la postre se incubó en la solución desarrolladora (ver ANEXOS) por 5 minutos. Finalmente, para detener la reacción, se incubó el gel con EDTA 50 mM por una hora.

### **Western blot.**

#### **Transferencia húmeda.**

Una vez concluida la electroforesis se usó uno de los geles para montarlo en el dispositivo de transferencia (Figura 8), el cual fue dispuesto en la cámara Mini Trans-Blot® Cell de Biorad, cuidando de que el paso de corriente permitiera que las proteínas se desplazaran hacia el polo positivo y quedaran atrapadas en la membrana. Se llenó la cámara con Buffer de transferencia (ver ANEXOS) frío y se dejó toda la noche a 20 V a 4°C.



**Figura 8. Dispositivo de transferencia.**

### **Bloqueo de membrana e incubación con Anticuerpo**

La membrana se lavó 2 veces con TBS-T 0.05% (ver ANEXOS), en agitación. Posteriormente, para evitar inespecificidades de los anticuerpos, fue necesario bloquear la membrana con TBS-T 0.05%-caseína al 5% y se puso en agitación suave durante 2 horas a temperatura ambiente.

Una vez concluido el tiempo de bloqueo, se realizaron 3 lavados con TBS-T 0.05% en agitación suave por 10 minutos. Consecutivamente se procedió a incubar con el anticuerpo primario (anti-MAT-tag de Sigma), el cual fue resuspendido en TBST-T-caseína 5%, en una concentración de 1/2,000. La incubación se hizo toda la noche en agitación suave a 4°C. Después se realizó otra serie de 3 lavados con TBS-T 0.05% en agitación suave por 10 minutos. Una vez terminada la segunda serie de lavados se procedió a incubar con el anticuerpo secundario (Rabbit anti-Mouse IgG de Invitrogen), el cual también fue resuspendido en TBST-T-caseína 5%, en una dilución 1/2,000; y se incubó en agitación suave por toda la noche.

Finalmente, se hace una última serie de 3 lavados con TBS-T 0.05% por 15 minutos en agitación fuerte. Para revelar se usó el substrato quimioluminiscente SuperSignal™ West FemtoMaximumSensitivitySubstrate

de Thermo Fisher Scientific. Se mezclaron las soluciones A y B del kit, en proporciones iguales, siendo el total de 200  $\mu$ l, los cuales se agregaron a la membrana sobre una base de plástico. Enseguida se colocó la membrana en el escáner C-DiGit® Blot de LI-COR con la cara que recibió la solución hacia abajo. Se cerró el escáner y se eligió la sensibilidad Alta (Acquire→Sensitivity→High, 12 min). Se guardaron las mejores imágenes (Selección de imagen deseada → menú principal → Export → Singleimageview → Currentimage → Seleccionar características, nombrar y elegir la carpeta de destino → Save). El procedimiento alternativo al C-Digit, fue colocar la membrana entre una cubierta de plástico y colocar una placa radiográfica, esperar 5 minutos, y usar las soluciones reveladoras y fijadoras para revelar la luminiscencia en el cuarto oscuro.

### **Cuantificación de fluorescencia**

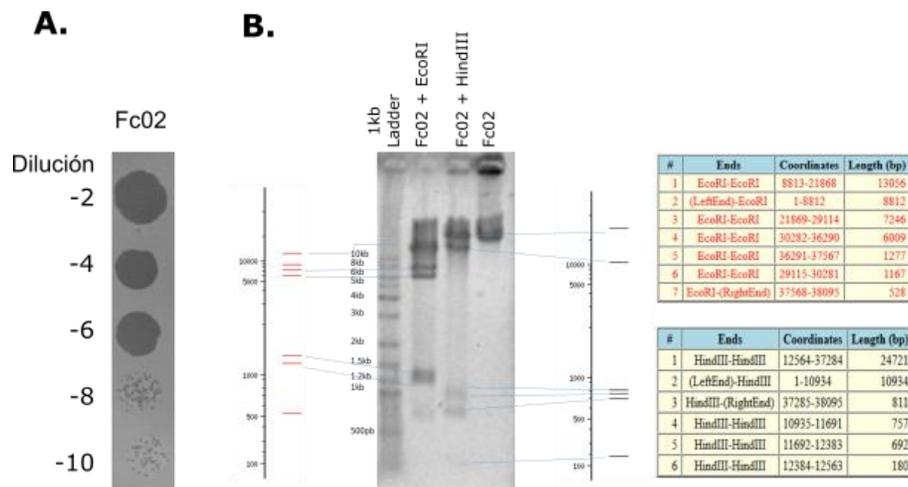
Se crecieron los cultivos PAO1 + pSEVA227R, PAO1Fc02(*repcts*) + pSEVA227R, PAO1 + pSEVA227\_Fusion y PAO1(Fc02*repcts*) + pSEVA227\_fusion, hasta una densidad óptica de 0.5. Se obtuvo el equivalente a 1 D.O. y se centrifugó a 10 000rpm por 5min, y el botón celular se lavó 3 veces con 500 $\mu$ l de PBS, finalmente se resuspendió en 200 $\mu$ l de PBS y ese volumen se cargó en una placa para leer fluorescencia. Para la detección de la fluorescencia se utilizó el equipo Sinergy4.

## RESULTADOS

### Propagación y caracterización del fago Fc02.

A partir de un *stock* de partículas fágicas de Fc02, se realizó la propagación de este en la cepa hospedera PAO1. En la figura 9A se muestra un tapiz bacteriano de PAO1 goteado con las diluciones del fago Fc02 para su cuantificación, el resultado mostró un título de  $1.5 \times 10^{10}$  UFP/ml, título suficiente para purificarlo mediante gradientes de Cloruro de Cesio.

Con las partículas fágicas purificadas, se procedió a la extracción de ADN del fago Fc02; la concentración de la alícuota de ADN fue de 1200 ng/ $\mu$ l y su integridad se verificó corriendo 1  $\mu$ g en un gel de agarosa. Posteriormente, para caracterizar el ADN fágico obtenido, se restringió usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, para después comparar los patrones de restricción experimental, con los patrones de bandas obtenidos *in silico* mediante el software *NEBcutter V2.0*, observándose el mismo patrón. Figura 9 B.



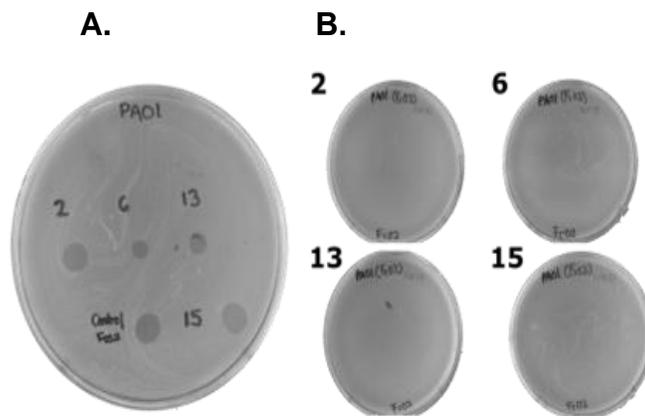
**Figura 9. Caracterización del fago Fc02.** A. Tapiz bacteriano de PAO1 goteado con diluciones del fago Fc02, título de  $1.5 \times 10^{10}$  UFP/ml. B. Restricción enzimática del ADN de Fc02. Gel de agarosa al 1%, de izquierda a derecha, el primer carril es el marcador de peso molecular, el segundo la restricción del

ADN con EcoRI, el tercero a restricción con HindIII y el último carril ADN sin restringir. A un lado del gel de agarosa, se encuentran las restricciones *in silico*, y las tablas con los fragmentos y tamaños esperados, en rojo EcoRI y en negro HindIII.

### Obtención y caracterización de la lisógena de Fc02

Se goteó una alícuota del fago purificado por Cloruro de Cesio en un tapiz de PAO1, y se picó el centro de algunas placas aisladas, para después estriarlas en una caja de LB. De la caja de LB se escogieron 17 colonias candidatas y se resembraron para aislarlas, finalmente estas colonias fueron probadas para verificar de que se trataran de bacterias lisógenas de Fc02, mediante 2 técnicas: producción de fago en PAO1 (Figura10 A) y finalmente ensayo de autoinmunidad (Figura 10 B).

Se escogieron las candidatas 2, 6, 13 y 15, para corroborar la producción de fago y realizar el ensayo de autoinmunidad, comprobando que el sobrenadante de las 4 lisógenas candidatas generaban placas en un tapiz de PAO1 (Figura 10A) y que un tapiz de cada una de las lisógenas candidatas no generaba placas cuando se goteó una alícuota del fago Fc02 sobre este tapiz. (Figura10 B)

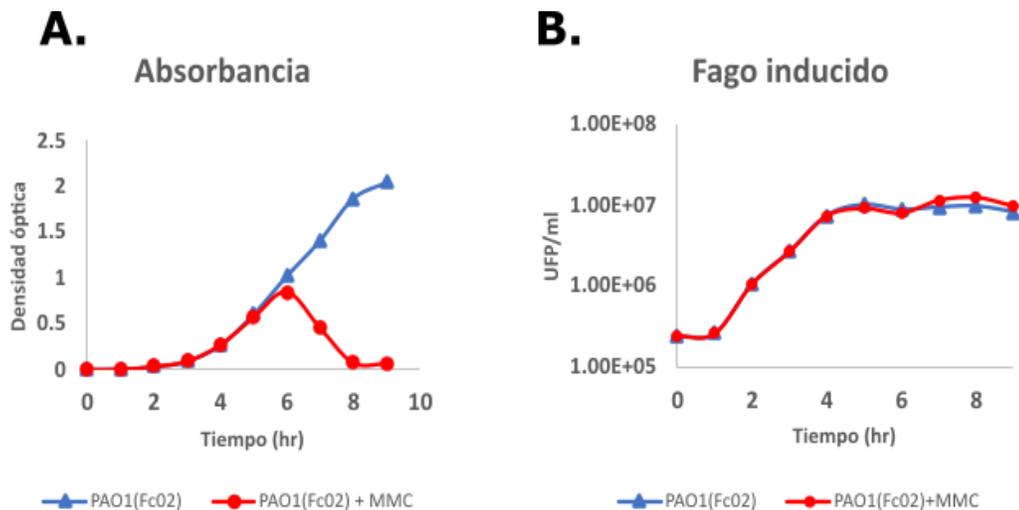


**Figura 10. Caracterización de PAO1(Fc02).** A. Producción de fago. El sobrenadante de las candidatas 2, 6, 13 y 15 se goteó sobre un tapiz de PAO1,

para verificar la presencia de un *spot* de lisis por efecto del fago Fc02. B. Prueba de autoinmunidad. Una alícuota (10  $\mu$ l) del fago Fc02 purificado se goteó sobre un tapiz de cada una de las lisógenas candidatas.

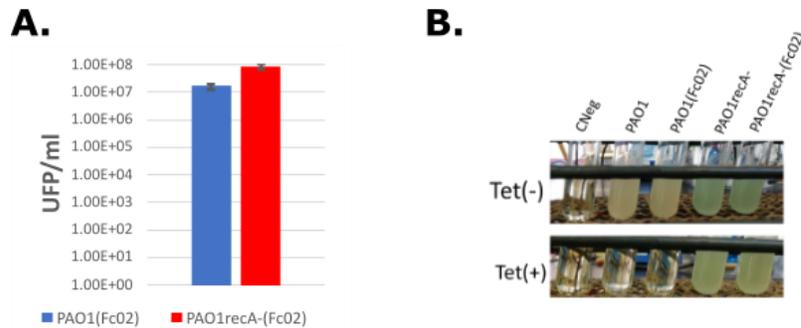
De las cepas PAO1(Fc02), se seleccionaron las candidatas 13 y 15 para hacer resguardos y trabajar con estas.

Se realizó la inducción del fago Fc02 en la lisógena usando la Mitomicina C en una concentración de 4  $\mu$ g/ml, la curva de la absorbancia reveló que la Mitomicina C generó una disminución en la densidad óptica después de 2 horas de haber agregado el fármaco en el cultivo (Figura 11A), pero no se observó un incremento de las placas del fago liberado por efecto de la Mitomicina C en el medio y este permaneció en títulos similares al crecimiento de la lisógena control, donde no hay Mitomicina C (Figura 11B).



**Figura 11. Inducción de Fc02 con Mitomicina C.** A. Curva de la absorbancia del cultivo de PAO1. Se creció el cultivo hasta una densidad óptica de 0.3 y se dividió en 2, a uno se le adicionó mitomicina C [4 $\mu$ g/ml] y al otro no. B. Cuantificación del fago liberado antes y después de la inducción con Mitomicina C.

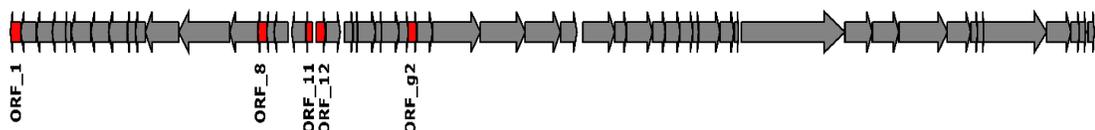
Al no observar inducción por mitomicina C, se trató de saber si la regulación de la inducción del profago Fc02 estaba mediada por la proteína RecA, se realizó la infección de la cepa mutante PAO1*recA*<sup>-</sup> con el fago Fc02 y se cuantificó el fago liberado por las lisógenas de Fc02 en PAO1 y en PAO1*recA*<sup>-</sup>, y no se encontraron diferencias significativas en el título viral, lo cual indica que la proteína RecA no participa en la inducción del ciclo lítico del fago Fc02.



**Figura 12. Participación de RecA en la inducción del profago Fc02.** A. Gráfica de barras de las UFP/ml en los cultivos de PAO1(Fc02) en azul y PAO1*recA*<sup>-</sup>(Fc02) en rojo. Se muestran las placas liberadas en tres cultivos independientes. B. Comprobación de la resistencia antimicrobiana, por la interrupción del gen *recA*<sup>-</sup> con el gen de resistencia a la tetraciclina.

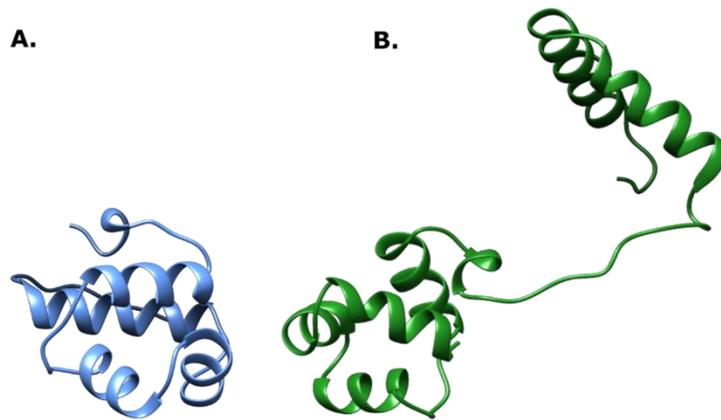
### Análisis *in silico* de los genes candidatos para el gen que codifica para el represor tipo cI del fago Fc02.

De acuerdo con el mapa del fago Fc02, se buscaron aquellos ORFs cuyos productos génicos contaran con un dominio HTH, de unión a DNA. Se consideraron los ORFs 11 y 12, como los candidatos a represor, dado que se encuentran en la región de convergencia entre los genes que mantienen el estado lisogénico y los de morfogénesis y lisis. Figura 13



**Figura 13. Genes con dominio de unión a ADN en el fago Fc02.** En el genoma de Fc02 se encontraron 5 ORFs cuyo producto génico cuenta con dominio HTH, los cuales están señalados en rojo.

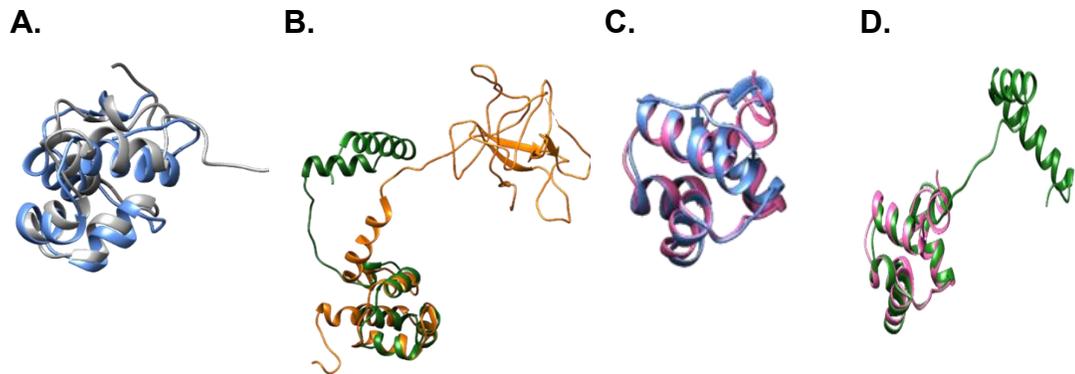
Para analizar los ORFs 11 y 12, se predijeron las estructuras de las proteínas putativas de estos 2 genes mediante el software I-TASSER. Se escogieron las estructuras con mayor confianza (valor más alto de C-score), las cuales se muestran la figura 14 A y B.



**Figura 14. Predicción de las estructuras proteicas de los ORF's 11 y 12 del fago Fc02.** A. Predicción de la estructura proteica del ORF11. C-score: -1.27. B. Predicción de la estructura proteica del ORF12. C-score: 0.03. Las predicciones se realizaron mediante el software I-TASSER.

Usando las estructuras predichas mediante el software i-TASSER (figura 15), se realizó un alineamiento de las estructuras tridimensionales para los ORFs 11 y 12 con estructuras proteicas del RCSB Protein Data Bank anteriormente caracterizadas. Se comparó el ORF11 con la proteína Ner de Mu, este alineamiento tiene un *TM-score* de 0.51642 (normalizado por la longitud de la proteína Ner de Mu), como se ve en la figura A. En cuanto a el ORF12 (figura 15 B), éste tiene un plegamiento que se asemeja al del represor  $\text{cI}$  de lambda en su amino terminal, pero difiere en el extremo carboxilo, donde el

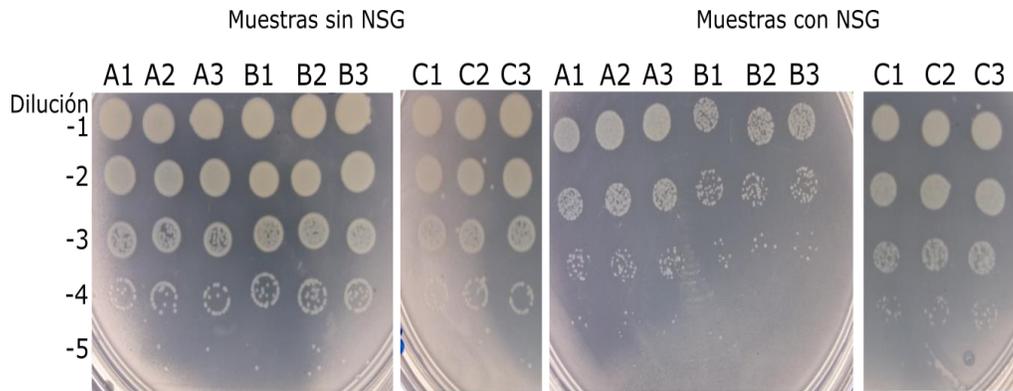
correspondiente de Fc02 es de menor tamaño, el alineamiento tiene un *TM-score* de 0.46390 con respecto a la longitud del ORF12. También se realizó el alineamiento del ORF11 y el ORF12 con el represor c2 del fago P22, en el primer caso el *TM-score* es de 0.79427(figura 15 C) y para el segundo el *TM-score* es de 0.76236 (figura 15 D).



**Figura 15. Alineamiento de las estructuras proteicas de los ORF's 11 y 12 con estructuras conocidas de represores y antirepresores de bases de datos. A. Alineamiento del ORF11 y Ner del fago Mu. B. Alineamiento ORF12 y represor c1 del fago lambda. C. Alineamiento del ORF11 con el represor c2 del fago P22. D. Alineamiento del ORF12 con el represor c2 del fago P22**

### **Mutagénesis al azar**

Se realizó mutagénesis al azar usando la Nitrosoguanidina (NSG) sobre un cultivo de PAO1(Fc02) en fase exponencial, se probó con una concentración de NSG de 100 µg/ml por 30 minutos, correspondientes a las muestras A1, A2 y A3 de la figura; con 100 µg/ml por 50 minutos, muestras B1, B2 y B3; y con 150 µg/ml por 30 minutos para C1, C2 y C3.

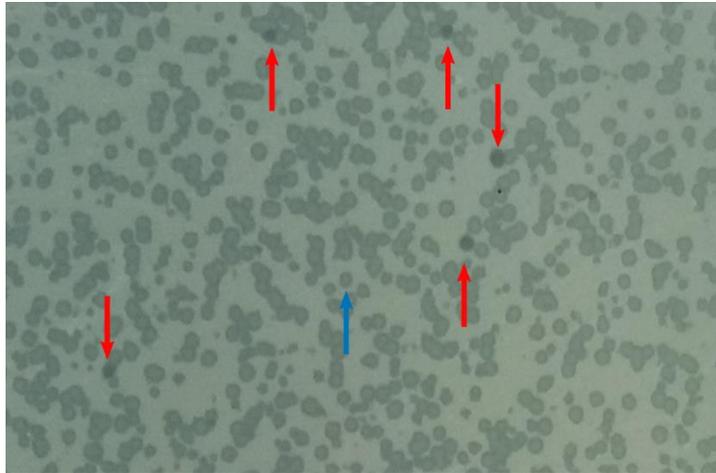


**Figura 16. Mutagénesis al azar con Nitrosoguanidina de la cepa PAO1(Fc02).**

Las primeras muestras son los triplicados de 3 ensayos independientes A, B y C. En el ensayo A antes de que el cultivo se pusiera en contacto con la NSG se contabilizaron  $4.5 \times 10^4$  UFC/ml, en el B  $7.4 \times 10^4$  UFC/ml y en el C  $4.8 \times 10^4$  UFC/ml. Después del contacto con NSG en A se contabilizaron  $8.6 \times 10^3$  UFC/ml, en B  $1.5 \times 10^3$  UFC/ml y en C  $4.2 \times 10^4$  UFC/ml.

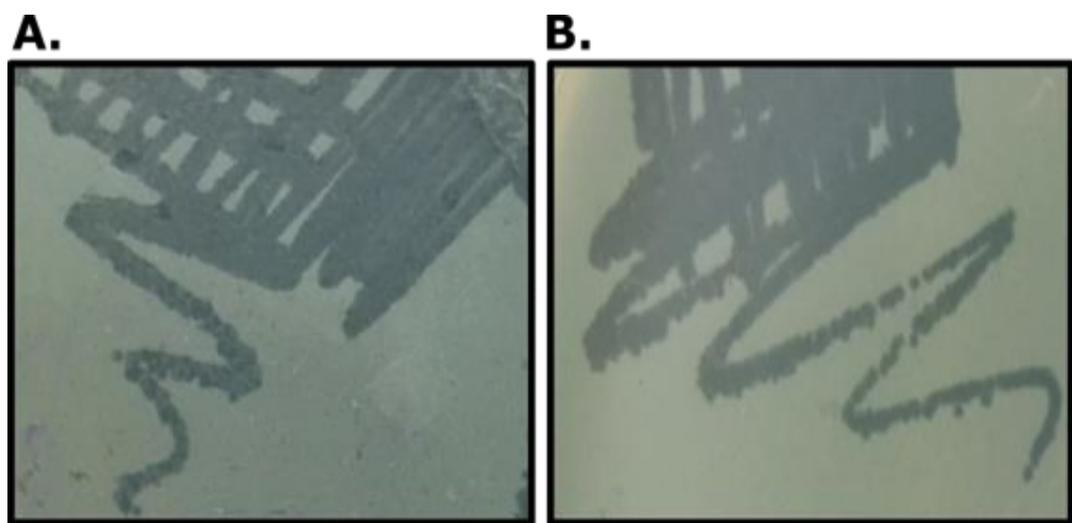
Se tomó el crecimiento bacteriano como un indicador de la efectividad de la mutagénesis y se observó que después de la interacción del cultivo de PAO1(Fc02) por 50 minutos con  $100 \mu\text{g/ml}$  de Nitrosoguanidina, las colonias disminuían 10 veces con respecto a la cantidad de bacterias previo al tratamiento, por lo que para ensayos posteriores se usaron estas condiciones.

Después del procedimiento para la mutagénesis al azar con NSG, se goteo el fago sobre un tapiz de PAO1 y se buscó la presencia de fagos mutantes que tuvieran el fenotipo de placas claras cuando fueran goteados en un tapiz bacteriano de PAO1 a  $43^\circ\text{C}$ .



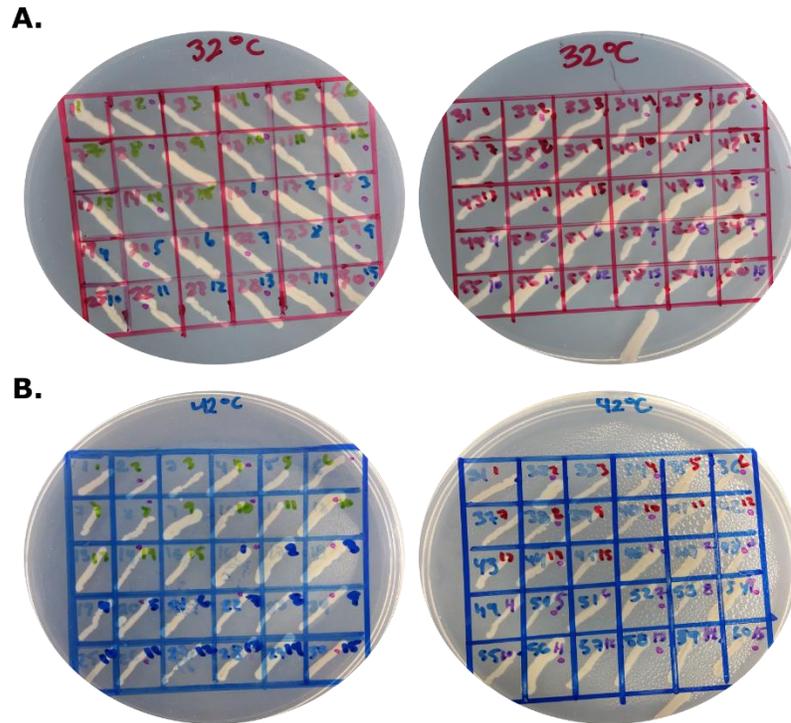
**Figura 17. Búsqueda de placas claras.** Tapiz de PAO1 goteado con el sobrenadante de PAO1(Fc02) tratado con NSG. La flecha azul señala una placa turbia característica de los fagos temperados, observada cuando se gotea el fago Fc02 en un tapiz de PAO1. Las flechas rojas señalan placas claras, generadas por mutaciones en el genoma del fago Fc02.

De los tapices que presentaban placas claras, se picaron para aislarlas, estriando el fago en tapices de PAO1 y con varios pases consecutivos, hasta tener un solo tipo de placa clara, finalmente se picó una placa aislada y se propagó el fago mutante.



**Figura 18. Aislamiento de placas claras.** Aislamiento de placas claras estriando por la técnica de estría cruzada de las placas en un tapiz de PAO1.

Una vez aisladas las placas claras a 43°C también fueron estriadas en un tapiz de PAO1 a 32°C, de las placas turbias se picó el centro de estas. Cada candidata se estrió en una caja diferente, y se tomaron colonias aisladas para evaluar su crecimiento a 32°C y 43°C. Figura



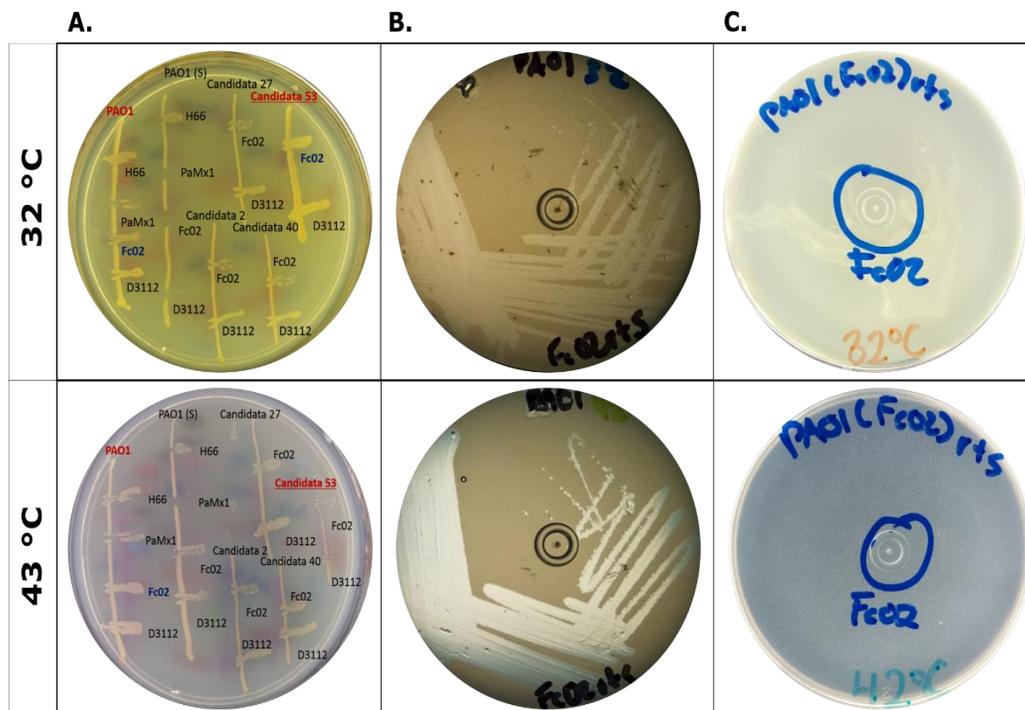
**Figura 19. Crecimiento de candidatas de mutagénesis en LB a diferentes temperaturas.** A. Bacterias PAO1(Fc02) mut candidatas a 32°C. B. Bacterias PAO1(Fc02) mut candidatas a 43°C.

Se escogieron algunas de las candidatas cuyo crecimiento a 43 °C era menor que a 32°C las cuales fueron estriadas en cajas de LB. Una vez que se obtuvieron colonias aisladas, se realizó el ensayo de estría cruzada para observar el comportamiento de la lisógena a 32 °C y a 43°C frente a otros fagos y frente al fago Fc02(Figura 20 A).

De acuerdo con los resultados se escogió la candidata 53 por su pobre crecimiento a 43°C, a partir de colonias aisladas de esta candidata se realizó un cultivo *overnight* con el cual se hicieron dos pruebas. En la primera se tomó

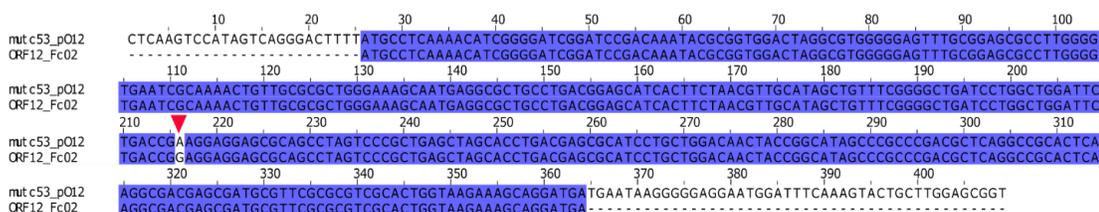
el sobrenadante de este cultivo, se trató con cloroformo y con ayuda de un palillo estéril se estrió sobre tapices de PAO1, finalmente se incubó a 32 y 43 °C, observándose que la candidata generaba exclusivamente placas turbias a 32°C y placas claras a 43°C (Figura 20B).

El segundo experimento consistió en hacer un tapiz bacteriano de la candidata de PAO1(Fc02) y gotear en éste el fago Fc02 *WildType* (WT) para corroborar el efecto de autoinmunidad de la lisógena candidata, esto sucedió para el tapiz a 32°C donde se ve el crecimiento bacteriano, pero no un spot de lisis por el goteo del fago Fc02, sin embargo, a 43°C hay lisis en el tapiz bacteriano, y no se pudo observar el fenómeno de autoinmunidad. (figura 20C)



**Figura 20. Caracterización de la lisógena mutante a 32 y a 43 °C.** A. Ensayo de estría cruzada. Las estrías verticales corresponden estrías de la bacteria PAO1 y de cada una de las lisógenas mutantes candidatas, la estría horizontal corresponde a fagos temperados (H66, Fc02 y D3112) y un lítico (PaMx1). B. Tapiz de PAO1 estríado con el fago Fc02 rts de la candidata 53. C. Tapiz de la lisógena candidata 53 PAO1(Fc02rts).

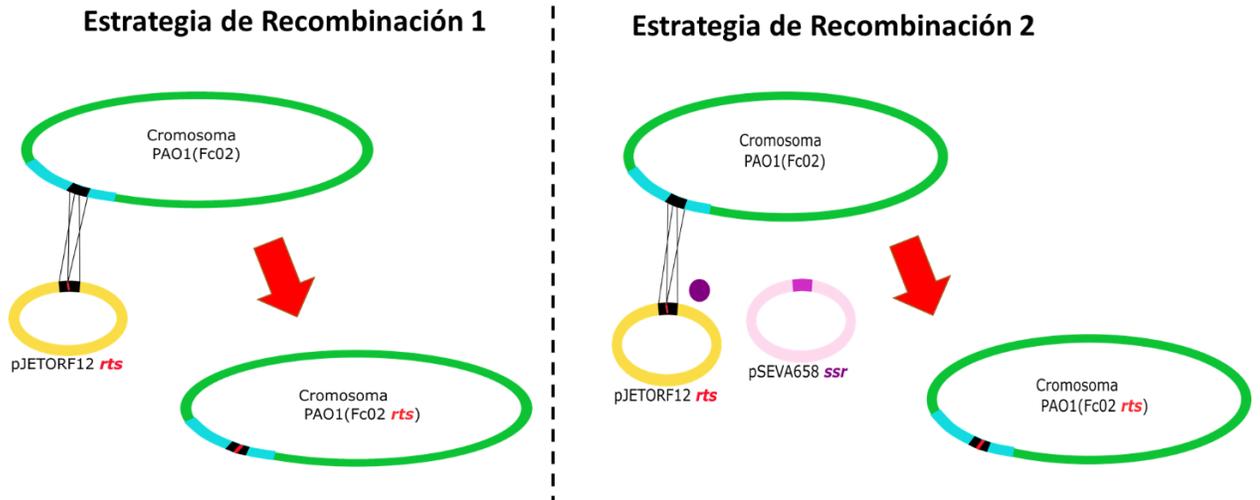
Después de corroborar el fenotipo de termosensibilidad de la candidata 53, se secuenció el ADN de la región que abarca desde el ORF11 hasta el final del ORF12(Figura suplementaria 1), encontrándose una única mutación en la base 191 del ORF 12, la sustitución de una G por una A en esta base determina el cambio de aminoácidos G64E en el ORF del represor putativo (Figura 21).



**Figura 21. Posición de la sustitución G191A.** Alineamiento de los nucleótidos del ORF12 en el fago mutante c53 (arriba) y la secuencia original (abajo). En azul los nucleótidos compartidos, indicado con una flecha roja la mutación.

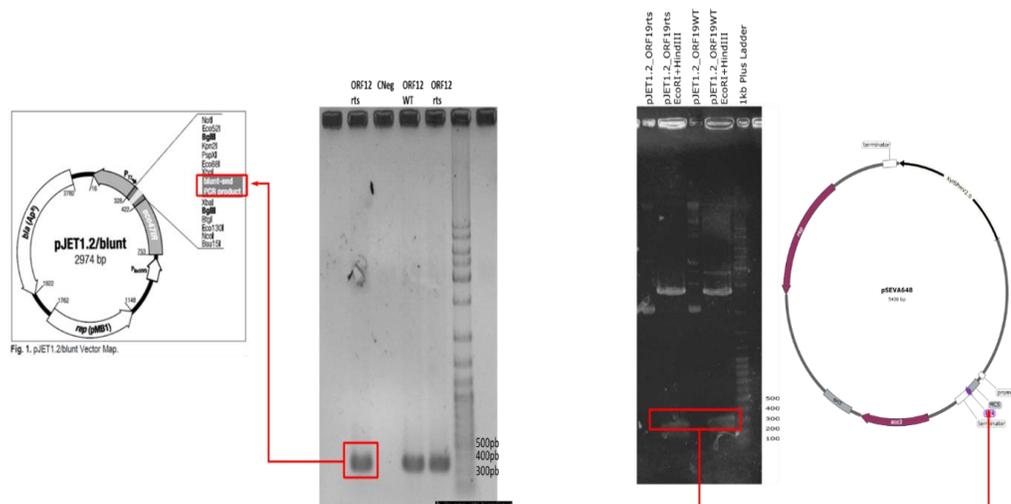
### Obtención de la mutante PAO1 (Fc02repcts) mediante mutagénesis sitio dirigida

Con la finalidad de evitar otras mutaciones en el genoma de Fc02, se procedió a realizar mutagénesis sitio dirigida para añadir la sustitución G64E en el ORF12, la mutagénesis se llevó a cabo con dos estrategias ilustradas en la figura 22. La primera se basa en la recombinación homóloga propia de PAO1 y la segunda metodología es un procedimiento modificado de *Ricaurte et al., 2018*, en el que se favorece la recombinación con un plásmido que expresa el gen *ssr* que codifica para una recombinasa de *Pseudomonas putida*.



**Figura 22. Estrategias de recombinación para obtener la lisógena PAO1(repctsFc02).**

Para el ensayo de mutagénesis por recombinación se usó un vector suicida, incapaz de replicarse en *P. aeruginosa*, como molde para favorecer la recombinación. Este vector suicida corresponde a la clonación del ORF12ts en el vector de transición pJET1.2/blunt. La construcción se usó también para comprobar que el ORF12 es el represor tipo cl del fago Fc02, para lograr esto, se subclonó el ORF12ts en el vector de expresión pSEVA648 (Figura 23), ambas clonaciones se verificaron por secuenciación (ver ANEXOS).



**Figura 23. Clonación del ORF12 en los vectores pJET1.2/blunt y pSEVA648.** A. Clonación del producto de PCR del ORF12ts en pJET1.2/blunt. B. Clonación del fragmento restringido con las enzimas EcoRI y HindIII en el vector de expresión pSEVA648.

Posterior a los ensayos de recombinación, se analizaron los fagos liberados por las lisógenas sometidas a la mutagénesis, el fago fue goteado en tapices de PAO1 y se analizó el fenotipo de las placas a 43°C, como se muestra en la Tabla 3. Posteriormente se analizó que las placas fueran turbias a 32°C y claras a 43°C.

|  | UFP <sub>r</sub> /ml | UFP <sub>c</sub> /ml | Frecuencia |
|--|----------------------|----------------------|------------|
| PAO1(Fc02)<br>pSEVA658_PPβ                   | 1.282E6              | 1120                 | 8.7E-5     |
| PAO1(Fc02)<br>pSEVA658_PPβ<br>pJET_O12*G179A | 2.27E6               | 1440                 | 6.3E-4     |
| PAO1(Fc02)                                   | 2.94E6               | 800                  | 2.7E-3     |
| PAO1(Fc02)<br>pJET_O12*G179A                 | 2.68E6               | 940                  | 3.5E-3     |

|  | UFP <sub>r</sub> /ml | UFP <sub>c</sub> /ml | Frecuencia |
|--|----------------------|----------------------|------------|
| PAO1(Fc02)<br>pSEVA658_PPβ                   | 1.256E5              | 820                  | 6.52E-3    |
| PAO1(Fc02)<br>pSEVA658_PPβ<br>pJET_O12WT     | 1.658E5              | 1160                 | 6.99E-3    |
| PAO1(Fc02)<br>pSEVA658_PPβ<br>pJET_O12*G179A | 1.052E5              | 1400                 | 1.3E-2     |
| PAO1(Fc02)                                   | 6.18E5               | 320                  | 5.17E-4    |
| PAO1(Fc02)<br>pJET_O12WT                     | 8.46E5               | 520                  | 6.14E-4    |
| PAO1(Fc02)<br>pJET_O12*G179A                 | 7.94E5               | 860                  | 1.08E-3    |

**Tabla 3.** Frecuencia de placa claras resultado del experimento de recombinación. Se realizaron 2 ensayos independientes. En la tabla se muestra los resultados y la frecuencia de placas claras en cada una de las condiciones probadas.

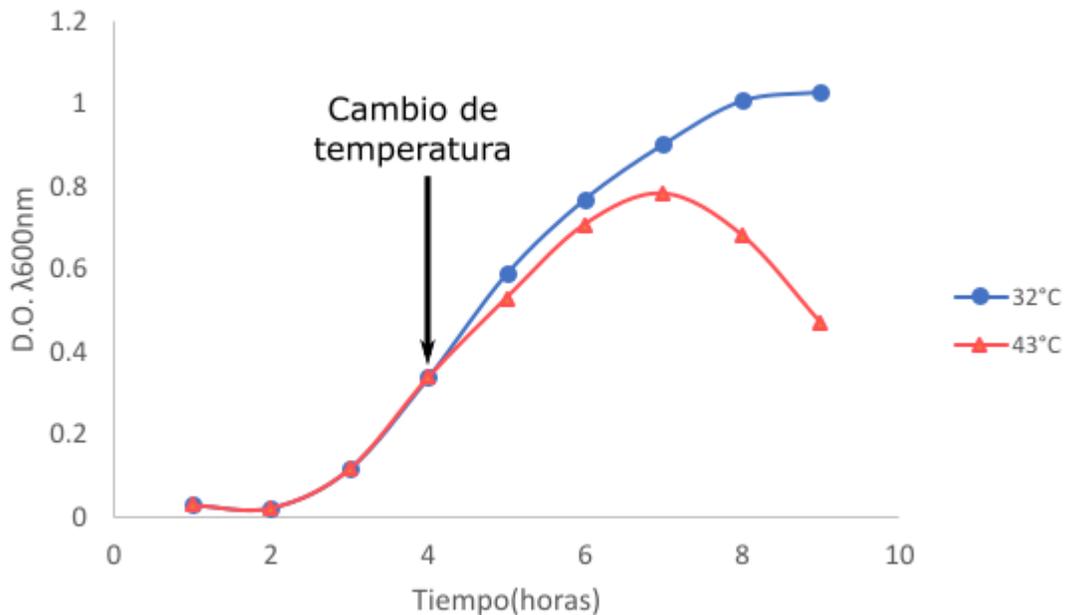
De estos fagos se secuenció el fago liberado de una de las candidatas (c26R) proveniente de la recombinación usando el plásmido de la recombinasa, cuyo crecimiento en LB a 43°C era nulo y cuyas placas a esta temperatura fueran claras. Se verificó por secuenciación la sustitución que genera la mutación G191A en el ORF12 (ver ANEXOS). Por lo que esta candidata tiene el fenotipo y el genotipo necesario para seguir con los ensayos de RNA-seq.

Adicionalmente al fago Fc02*repcts*, se decidió analizar 2 fagos con fenotipo de placa clara a 43°C provenientes del control del ensayo correspondiente a la

lisógena *wild type*, encontrándose en ambos fagos una mutación en la región no codificante, previa al inicio del ORF12, en el putativo SD (ver ANEXOS).

### Caracterización de la inducción de la cepa PAO1(Fc02repcts)

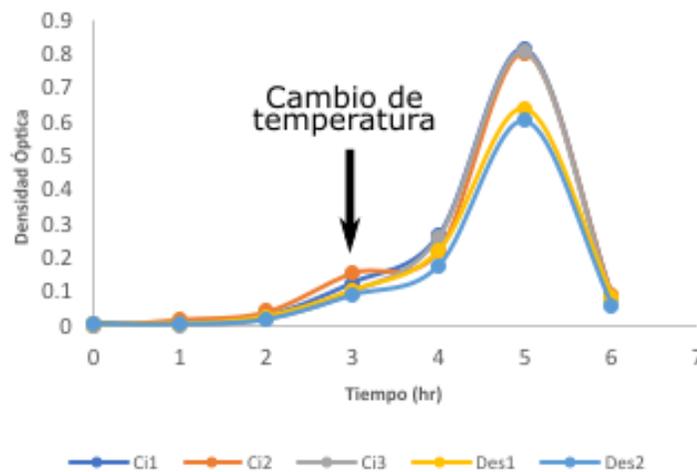
Se realizó un cultivo de PAO1(Fc02repcts) en medio LB líquido el cual se creció a 32°C, cuando la lectura de la densidad óptica fue de 0.3, el cultivo se dividió en dos partes, a uno de los cultivos se le cambió la temperatura a 43°C mientras que el otro permaneció a 32°C y se monitoreo la absorbancia de ambos cultivos.



**Figura 24. Curva de crecimiento de PAO1(Fc02clts).** Crecimiento de PAO1(Fc02repcts) en medio LB a 32°C, cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>300</sub>=0.3, se dividió el cultivo en 2 partes iguales, una continuó a 32°C (línea azul) y la segunda se cambió a una temperatura de 43°C (línea roja).

En la figura 24 se puede observar la disminución de la densidad óptica 3 horas después del aumento de la temperatura, lo cual indica la lisis bacteriana por la inducción del profago.

Se evaluó la disminución de la absorbancia en 3 colonias aisladas, así como la disminución de la absorbancia cuando el inóculo del *overnight* se tomaba de la descarga, y se encontró que las que provenían de una colonia aislada alcanzaban una densidad óptica mayor que las que provenían de la descarga una hora después del cambio de temperatura, y que la disminución a las 2 horas caía prácticamente al mismo punto, por lo que se continuó trabajando con colonias aisladas. (Figura 25)

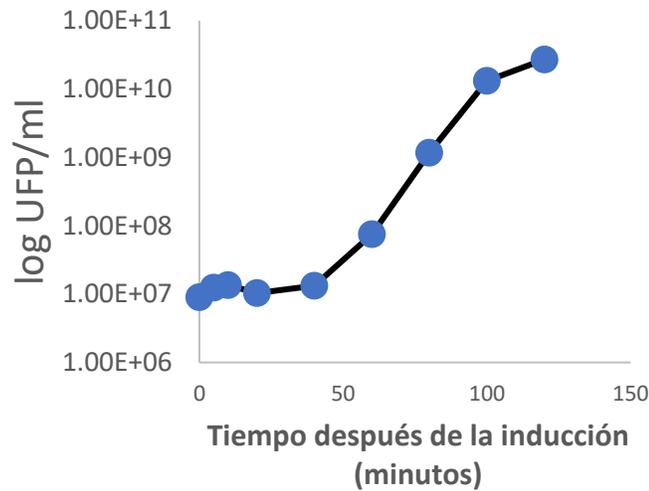


**Figura 25. Curva de crecimiento de resguardos de PAO1(Fc02clts).** Crecimiento de PAO1(Fc02clts) en medio LB a 32°C, cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>300</sub>=0.3, se cambió la temperatura a 40°C y se midió la densidad óptica.

Cuando se realizó el ensayo para determinar las Unidades Formadoras de Placa, una vez que se incrementó la temperatura a más de 45°C y se pudo observar que el incremento de la temperatura afectaba la formación de placas, por lo que se decidió disminuir la temperatura de inducción a 40°C.

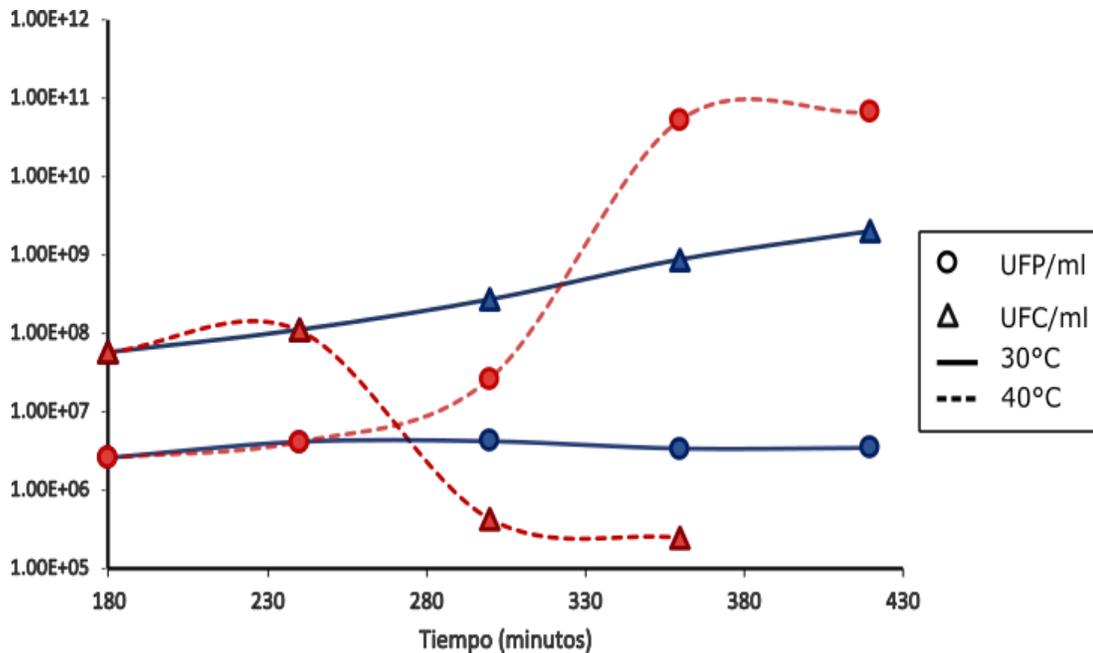
Se analizó como se modificaba la absorbancia antes y después del cambio de temperatura de 30°C a 40°, y se pudo ver que una hora después del cambio de temperatura la absorbancia alcanzaba una densidad óptica de 0.6 y que

disminuía gradualmente después de este tiempo, mientras que en la lisógena termosensible a 30°C continuaba aumentando la absorbancia.



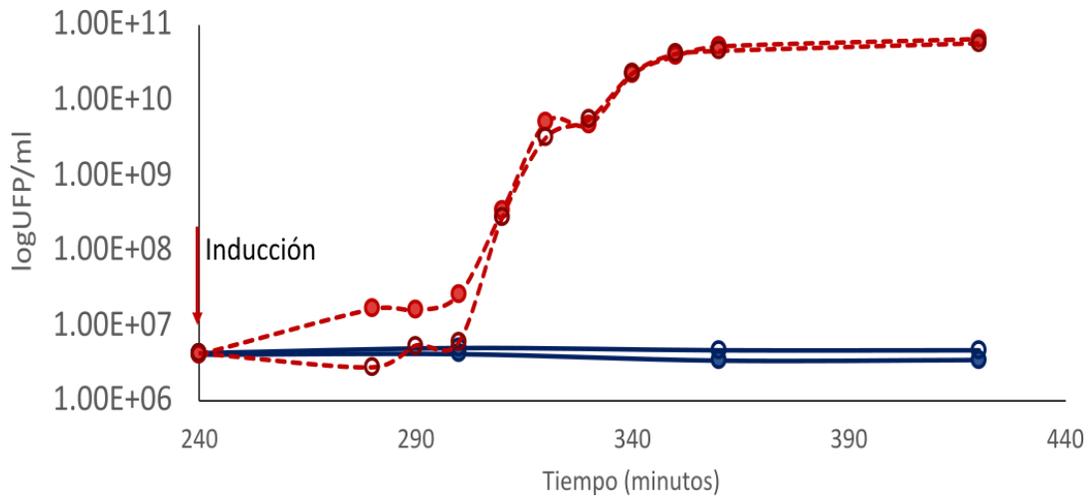
**Figura 26. La disminución en la densidad óptica se ve favorecida a 40°C.** Curva de crecimiento de PAO1(Fc02repcts) a 30 y 40°C. El eje de las X representa el tiempo (hr) y el eje Y la densidad óptica del cultivo.

Para poder caracterizar la inducción se realizó el cambio de temperatura cuantificando la Unidades Formadoras de Colonia (UFC/ml) y las Unidades Formadoras de Placa (UFP/ml) del cultivo de PAO1(Fc02repcts) como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 27. Comportamiento de las colonias bacterianas y las partículas virales durante la inducción.** Curva de crecimiento de PAO1(Fc02repcts) a 30 y 40°C. El eje de las X indica el tiempo del cultivo(min) y el eje Y las UFC/ml y las UFP/ml.

En la figura 27 se puede observar que en la lisógena 1 hora después del cambio de temperatura, las UFP/ml incrementan aproximadamente 1000 veces más, indicando que el ciclo lítico del fago se activó y liberó más viriones, lisando a las bacterias, esto se observa en la disminución de las UFC/ml después del incremento de temperatura. A diferencia de cuando la bacteria se mantiene a 30°C donde las UFP/ml después de las 4 horas de cultivo permanecen constantes y su incremento es proporcional al incremento de las UFC/ml.



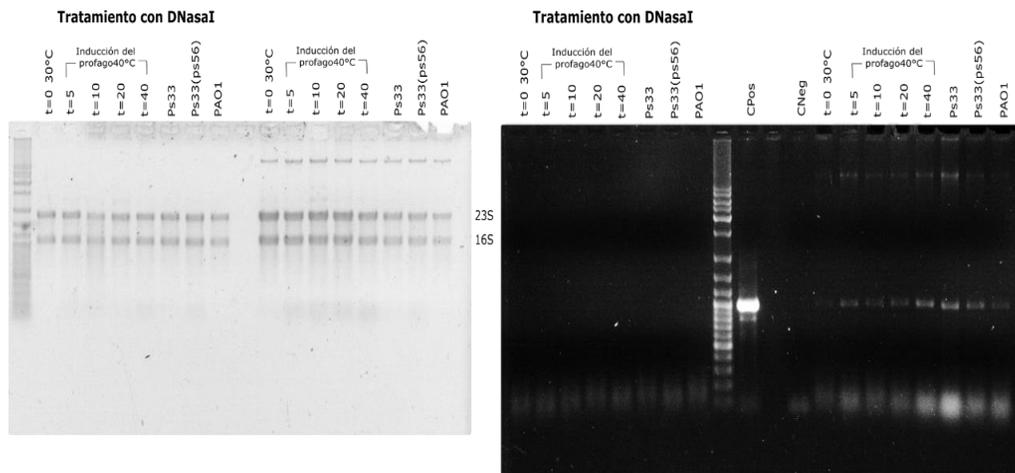
**Figura 28. Viriones liberados después de la inducción con y sin cloroformo.** Se graficaron las UFP/ml a partir del sobrenadante del crecimiento de la lisógena después de la inducción, en rojo, y sin cambio de temperatura en azul. Las viñetas (círculo) vacías son las muestras tratadas con cloroformo, mientras que las de fondo de color son las UFP/ml, sin tratamiento.

Con la finalidad de determinar el periodo de latencia del fago Fc02rpects, el cultivo de la lisógena fue tratado con cloroformo, sin embargo, se observó que el cloroformo tenía un efecto negativo en el número de placas, pero no en el punto de inflexión de la curva, por lo que se decidió no usar cloroformo para los siguientes experimentos (figura 28).

A partir de los resultados del ensayo con cloroformo se encontró que el periodo de latencia y el de eclipse son similares y cercanos a los 50 minutos, por lo que se decidió que las muestras para extracción de ARN se harían en el intervalo de los 5 y 50 minutos después del cambio de temperatura. Se decidió tomar 5, 10, 20 y 40 minutos después de la inducción, y se evaluó cualitativamente el uso de estos tiempos mediante PCR punto final.

Primero se extrajo el ARN en los tiempos antes mencionados, como se indica en Materiales y Métodos, posteriormente se realizó una PCR con las muestras de ARN, antes y después del tratamiento con la DNAsal (figura 29). El gel de

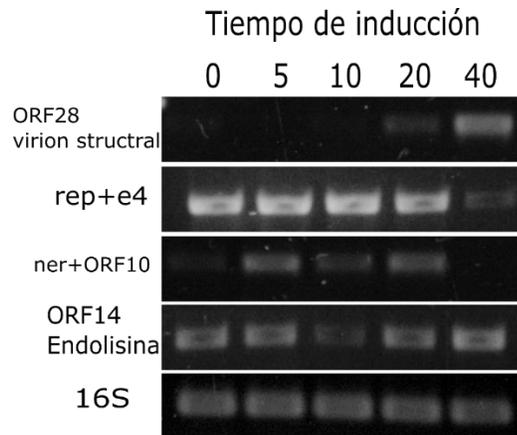
agarosa corroboró que las muestras ya no contenían ADN, por la ausencia de amplicon tras la PCR del ARN tratado con DNasaI (figura 29).



**Figura 29. Comprobación de la ausencia de ADN en las muestras.** Gel 1. El gel de la izquierda corresponde a un gel al 1% de agarosa en TBE1X en cada carril se corrieron 500 ng de ARN, del lado izquierdo del marcador las muestras después del tratamiento con DNasaI y del lado derecho las muestras previas al tratamiento. Gel 2. El gel del lado derecho corresponde a un gel al 0.7% en TAE 1X, todos los carriles fueron cargados con 10  $\mu$ l de la reacción de PCR de la extracción de ARN, las muestras del lado izquierdo al marcador de peso tratadas con DNasaI y del lado izquierdo sin tratamiento. El amplicón corresponde al gen *ppsA* de *P. aeruginosa*.

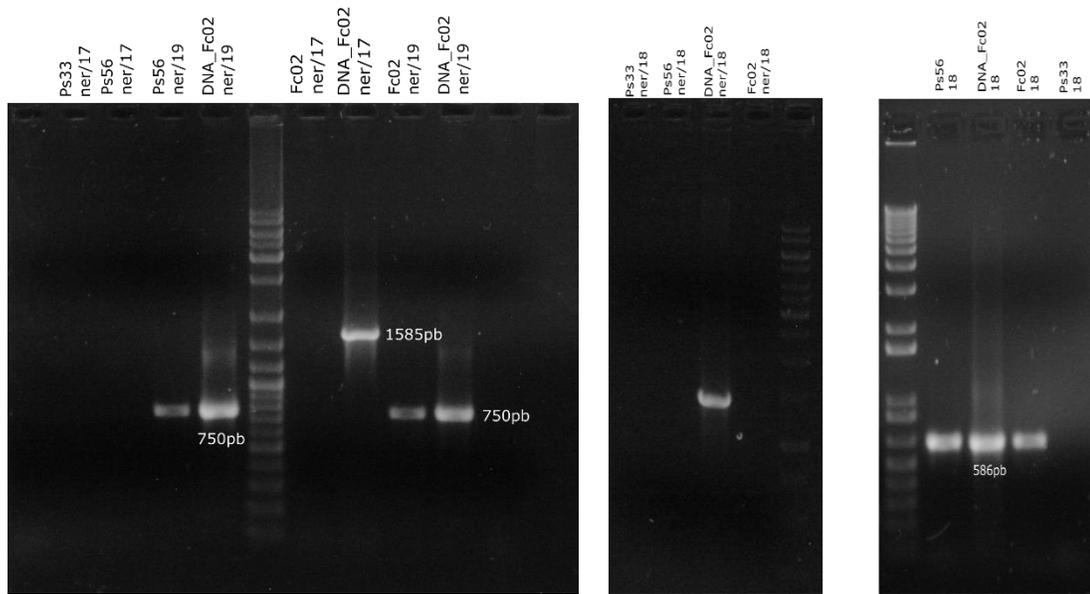
Se prosiguió a la obtención de cDNA y a la evaluación de diferentes genes del fago, usando como control el gen del ARN ribosomal 16S. Para la PCR de cDNA con los oligos específicos se usaron 50 ng de cDNA como molde y los ciclos de la PCR se redujeron a 20, todas las muestras y todos los primers fueron usados en esas mismas condiciones. Se encontró que el amplicón correspondiente al ORF28, que codifica para una putativa proteína de estructura del virión, se ve claramente después de los 20 minutos, previo a este no se observa amplicón. Contrario a lo que ocurre con el amplicón correspondiente a los genes *ner* y ORF10, que se ve claramente en las muestras hasta los 20 minutos, pero a los cuarenta minutos ya no se ve el

amplicón. El producto de la PCR del represor y el gen e4, se observa en todas las muestras, así como el del ORF14, que codifica para la putativa endolisina.



**Figura 30. PCR punto final de genes fágicos en diferentes tiempos de inducción.** Los genes analizados se especifican en el lado izquierdo de la imagen, y los tiempos en los que se extrajo el ARN se encuentra en la parte superior. Todos los geles se realizaron al 1% y se cargaron 500 ng de la reacción de PCR.

Adicionalmente, se analizaron los genes ORF9, ORF10 y ner en cDNA obtenido a partir de PAO1(Fc02) y de Ps33(Ps56), se encontró amplicón para el ORF9 en PAO1(Fc02) y Ps33(Ps56), se encontró que la PCR daba positivo cuando se amplificaba el fragmento que contiene a ner y al ORF10 tanto en la lisógena de Fc02 como en la lisógena de Ps56, pero no se logró identificar el amplicón de la región desde ner hasta el ORF9, ni en PAO1(Fc02) ni en Ps33(Ps56).

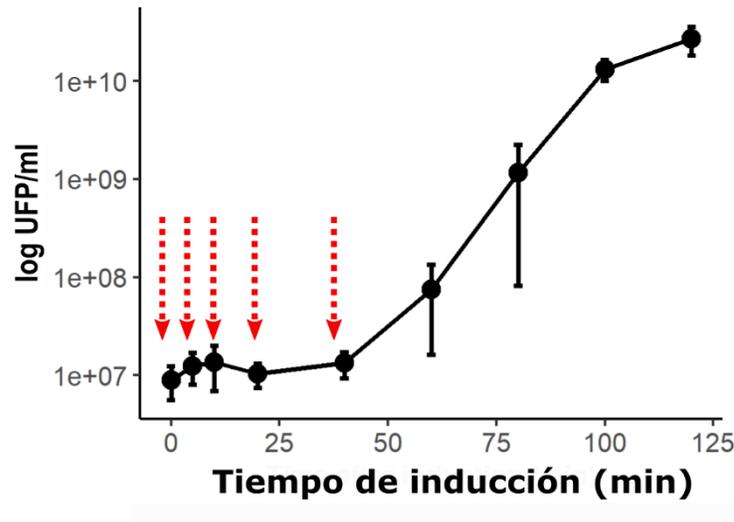


**Figura 31. Búsqueda de amplicones en el cDNA de la región entre ner y el ORF8.** El primer gel de la derecha es la búsqueda de amplicones de 750 pb (ner+ORF10) y de 1585pb (ner+ORF10+ORF9+ÓRF8). En el segundo gel se buscó el amplicon de 1392pb (ner+ORF10+ORF9). El tercer gel corresponde a la evaluación del gen ORF9 de 586 pb. En todos los casos se usó como control positivo el ADN genómico del fago Fc02 y como control negativo el cDNA de Ps33.

### **Extracción y secuenciación de ARN de la cepa PAO1(Fc02repcts)**

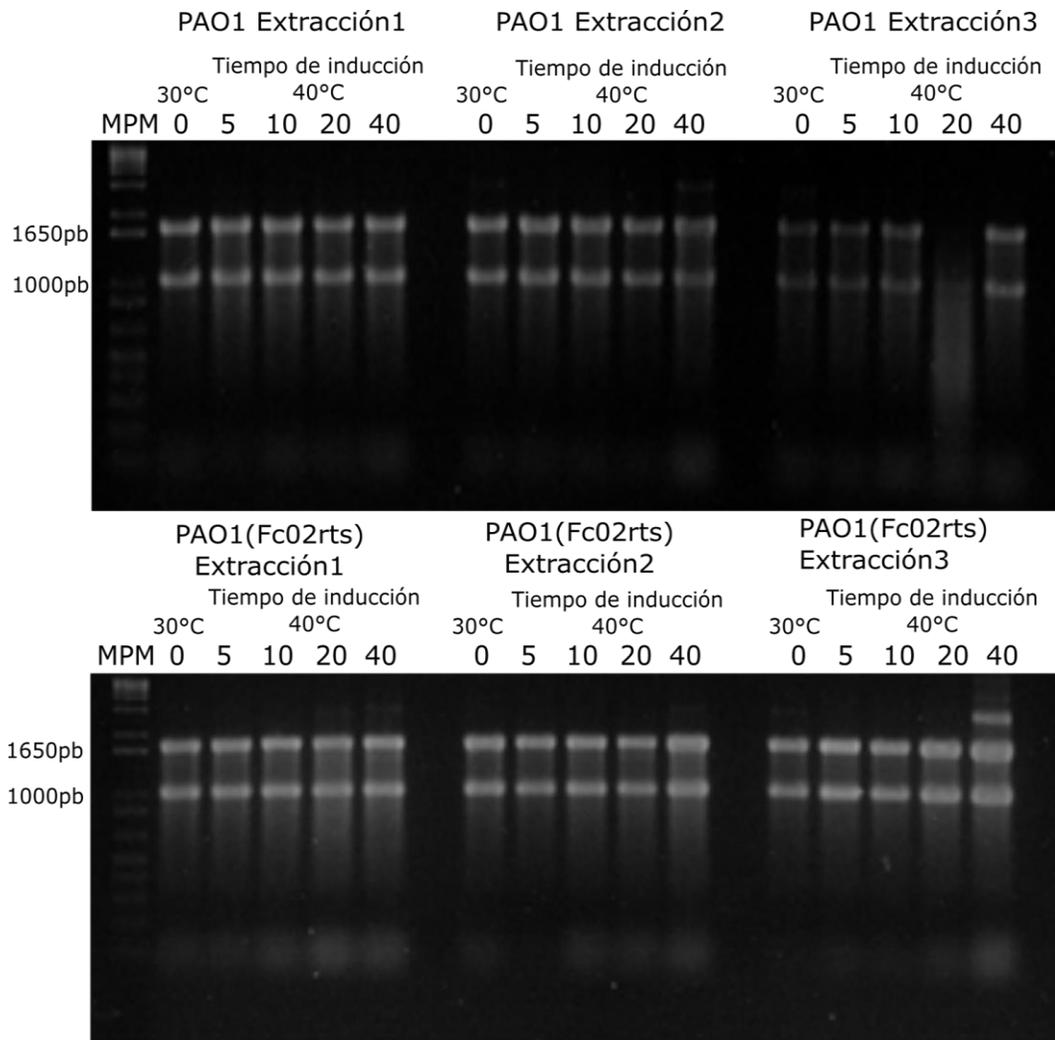
Se realizó por triplicado la inducción del cultivo de PAO1(Fc02repcts) en medio LB líquido, usando 30°C como la temperatura inicial, cuando la lectura de la densidad óptica fue de 0.3, el cultivo se dividió en 2, uno de los cultivos se cambió la temperatura a 40°C mientras que el otro permaneció a 30°C y se extrajeron muestras a 30°C, 5, 10, 20 y 40 minutos después del cambio de temperatura.

Las muestras extraídas se usaron para cuantificar las placas de Fc02 liberadas, a partir de las cuales se observó que el número de placas permaneció entre  $8.9 \times 10^6$  y  $1.35 \times 10^7$  UFP/ml hasta los 40 minutos y llegó a su punto máximo 2 horas después de incrementar la temperatura hasta alcanzar un título de  $2.71 \times 10^{10}$  UFP/ml (Figura 32).



**Figura 32. Curva de crecimiento de PAO1(Fc02repcts).** Se cuantificaron las UFP/ml cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.3, después de 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos después del aumento de la temperatura a  $40^\circ\text{C}$ . Los puntos representan el promedio de los triplicados experimentales y las barras de error, la desviación estándar.

Estos mismos triplicados experimentales se usaron para la extracción de ARN, al mismo tiempo un cultivo de PAO1 se trató con las mismas condiciones y se extrajo ARN en los mismos tiempos. Después de verificar la ausencia de ADN en las muestras de ARN, se corrió una alícuota de cada una de las muestras en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ARN, y presentarlas como evidencia para enviar las muestras para secuenciación (Figura 33).

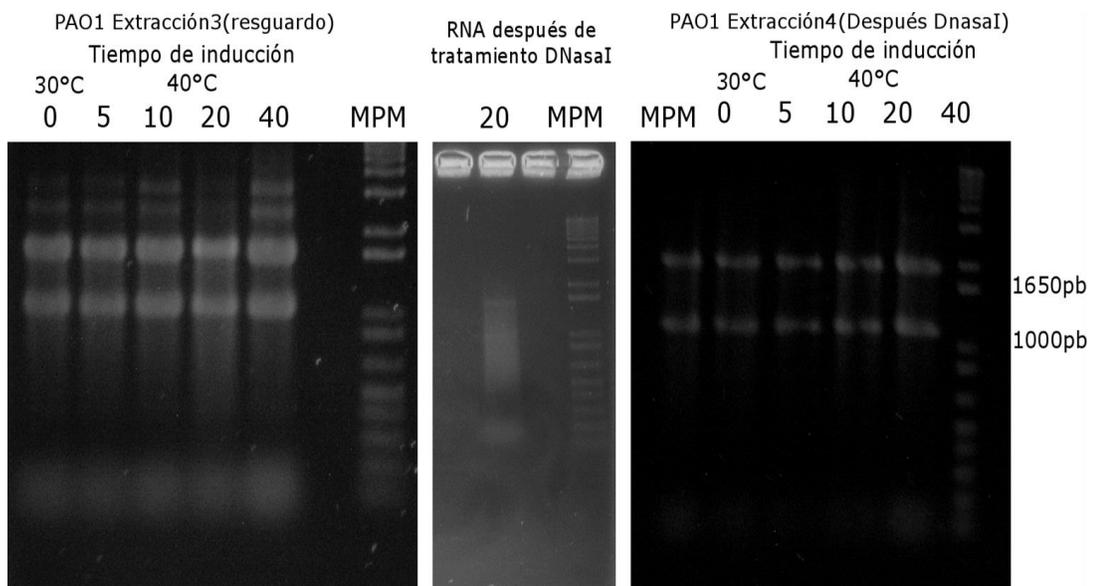


**Figura 33. Integridad del ARN de las muestras de PAO1 y PAO1(Fc02repcts).** Gel de Agarosa al 1% en TBE 0.5X. En cada carril se cargaron 500ng de ARN.

En el gel se puede observar que la muestra de 40 minutos del triplicado número 3 de la lisógena todavía tienen ADN, esto se ve en la presencia de una banda en la parte superior de la banda correspondiente al ARN ribosomal 23S. Además, en el triplicado número 3 de la extracción de ARN de muestras de PAO1, se observó en el gel degradación del ARN de la muestra de 20 minutos.

Para solucionar lo anterior la muestra de la lisógena se trató una segunda vez con DNasaI, con lo cual se eliminó el ADN restante en la muestra (ver ANEXOS)

Para la muestra de la bacteria que estaba degradada, se determinó que la degradación estaba en la muestra de ARN y no se había generado en el tratamiento con DNasaI, por lo que se decidió obtener una nueva muestra, para esto se tuvo que repetir la extracción de las muestras de PAO1 en todos los tiempos. Después de la extracción de ARN se trató con DNasaI y se corrieron las muestras en un gel de agarosa, donde ya no se observó degradación ni presencia de ADN (Figura 34).

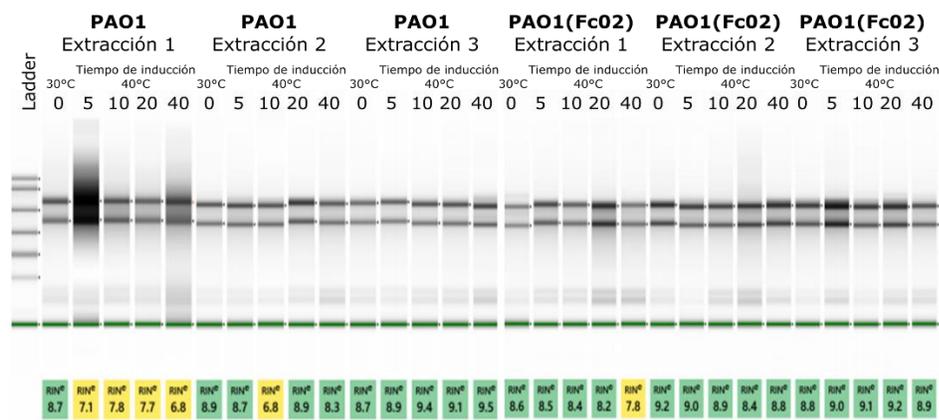


**Figura 34. Tercera extracción de ARN de PAO1.** Geles de agarosa al 1%, el último carril del lado derecho de cada gel corresponde al marcador de peso molecular y se muestran las bandas de los ARN ribosomales 16S y 23S. El primer gel de la izquierda corresponde a las muestras de la tercera extracción de ARN de PAO1. El gel intermedio muestra el ARN de la muestra de 20 minutos después del tratamiento con DNasaI. El tercer gel muestra una cuarta extracción de ARN, después de ser tratada con DNasaI.

Para corroborar la ausencia de ADN en las muestras de ARN se realizó una PCR de las muestras antes y después del tratamiento con DNasaI. También se verificó la capacidad de generar cDNA a partir del ARN de las muestras, y

este cDNA se usó para hacer una PCR punto final usando primers que amplifican una región de 300 pb del gen 16S (figura suplementaria 7).

Finalmente, las muestras de ARN fueron enviadas a la empresa GENEWIZ, donde se llevó a cabo en primera instancia un control de calidad del ARN de las muestras, mediante electroforesis capilar se analizó la integridad del ARN y en base a las bandas correspondientes al ARN 23S y 16S (ver ANEXOS), se calculó el RIN (RNA integrity number) para cada una de las muestras de ARN el cual fue superior a 6 en todas las muestras (Figura 35).



**Figura 35. Evaluación de la integridad del ARN de las 30 muestras de ARN.** Imagen del gel obtenido con RNAScreenTape, en la parte superior de la imagen se identifican cada una de las muestras y en recuadros amarillos y verdes se muestra el RIN.

Para cuantificar el ARN en las muestras se usó un fluorómetro Qubit, y se determinó que había más de 10 µg de ARN en cada muestra.

**Tabla 4. Cuantificación de las 30 muestras de ARN**

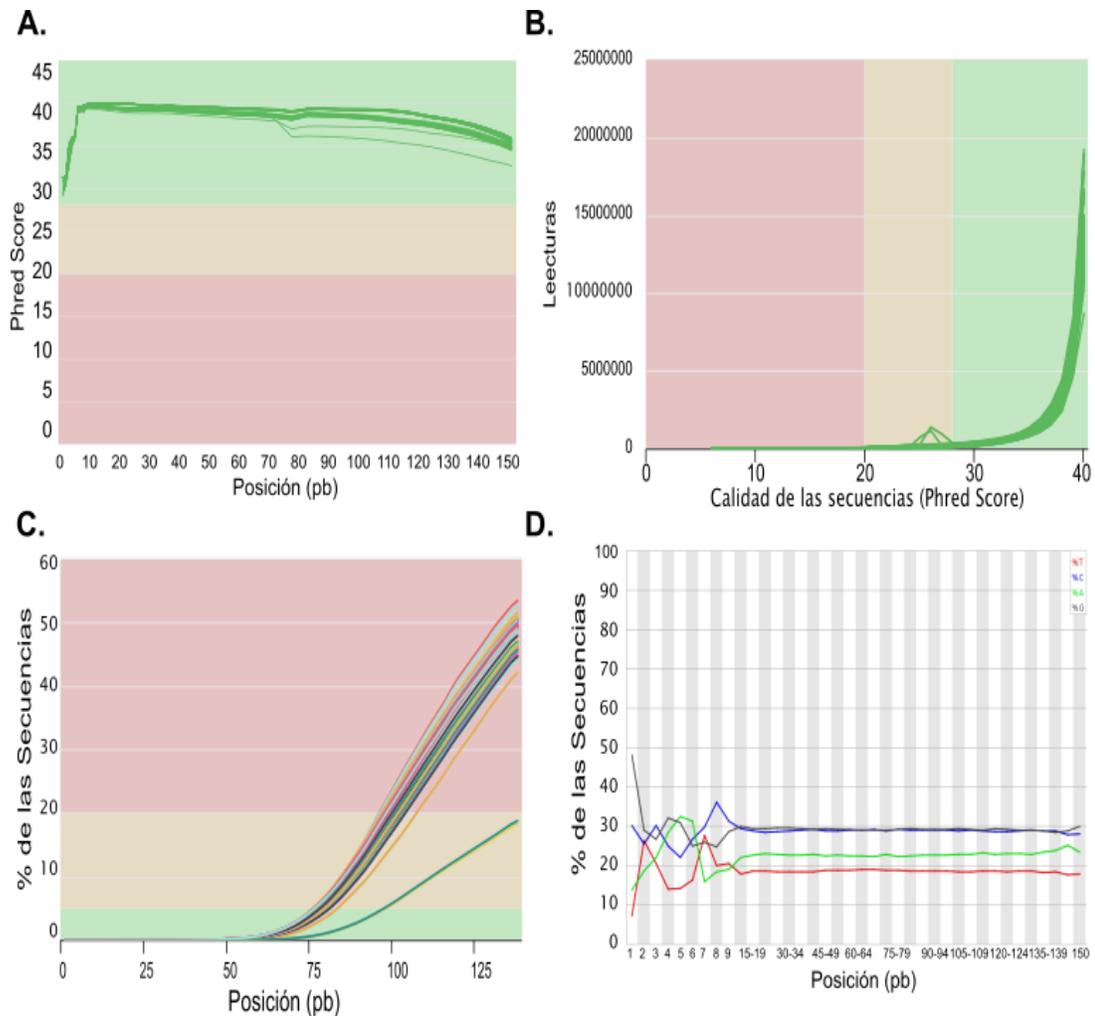
| Sample Name | RNA Qubit       |                            |                                   | Total Amount (ng) | RIN | DV200 for RNA (%) |
|-------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----|-------------------|
|             | Dilution Factor | Nucleic Acid Conc. (ng/ul) | Actual Nucleic Acid Conc. (ng/ul) |                   |     |                   |
| P100        | 5.00            | 85.66                      | 428.3                             | 12420.7           | 8.7 | 94.94             |
| P105        | 5.00            | 97.01                      | 485.05                            | 14066.45          | 7.1 | 94.28             |
| P110        | 5.00            | 104.89                     | 524.45                            | 15209.05          | 7.8 | 95.78             |
| P120        | 5.00            | 94.87                      | 474.35                            | 13756.15          | 7.7 | 95.15             |
| P140        | 5.00            | 91.33                      | 456.65                            | 13242.85          | 6.8 | 93.62             |
| P200        | 5.00            | 83.34                      | 416.7                             | 12084.3           | 8.9 | 96.64             |
| P205        | 5.00            | 94.56                      | 472.8                             | 13711.2           | 8.7 | 96.92             |
| P210        | 5.00            | 91.29                      | 456.45                            | 13237.05          | 6.8 | 97.69             |
| P220        | 5.00            | 99.45                      | 497.25                            | 14420.25          | 8.9 | 97.56             |
| P240        | 5.00            | 101.83                     | 509.15                            | 14765.35          | 8.3 | 96.28             |
| P300        | 5.00            | 89.71                      | 448.55                            | 13007.95          | 8.7 | 96.28             |
| P305        | 5.00            | 75.63                      | 378.15                            | 10966.35          | 8.9 | 97.99             |
| P310        | 5.00            | 94.84                      | 474.2                             | 13751.8           | 9.4 | 97.45             |
| P320        | 5.00            | 85.22                      | 426.1                             | 12356.9           | 9.1 | 96.75             |
| P340        | 5.00            | 96.05                      | 480.25                            | 13927.25          | 9.5 | 97.04             |
| L100        | 5.00            | 77.57                      | 387.85                            | 11247.65          | 8.6 | 96.88             |
| L105        | 5.00            | 99.27                      | 496.35                            | 14394.15          | 8.5 | 97.46             |
| L110        | 5.00            | 91.64                      | 458.2                             | 13287.8           | 8.4 | 97.21             |
| L120        | 5.00            | 135.88                     | 679.4                             | 19702.6           | 8.2 | 97.82             |
| L140        | 5.00            | 92.73                      | 463.65                            | 13445.85          | 7.8 | 97.20             |
| L200        | 5.00            | 112.98                     | 564.9                             | 16382.1           | 9.2 | 97.61             |
| L205        | 5.00            | 99.99                      | 499.95                            | 14498.55          | 9.0 | 98.16             |
| L210        | 5.00            | 99.48                      | 497.4                             | 14424.6           | 8.9 | 96.94             |
| L220        | 5.00            | 124.21                     | 621.05                            | 18010.45          | 8.4 | 93.86             |
| L240        | 5.00            | 117.55                     | 587.75                            | 17044.75          | 8.8 | 97.85             |
| L300        | 5.00            | 107.37                     | 536.85                            | 15568.65          | 8.8 | 98.08             |
| L305        | 5.00            | 141.38                     | 706.9                             | 20500.1           | 9.0 | 97.68             |
| L310        | 5.00            | 105.17                     | 525.85                            | 15249.65          | 9.1 | 97.49             |
| L320        | 5.00            | 122.39                     | 611.95                            | 17746.55          | 9.2 | 98.33             |
| L340        | 5.00            | 94.72                      | 473.6                             | 13734.4           | 8.9 | 97.54             |



Con estos parámetros las muestras fueron aceptadas para secuenciación en un equipo HiSeq2000. Los datos generados por la secuenciación fueron enviados, junto con un análisis de calidad en donde la empresa determinó que se obtuvieron en total 923,771,754 lecturas en todas las muestras, donde el 92.54% de las bases leídas tenían un *quality score* igual o superior a 30.

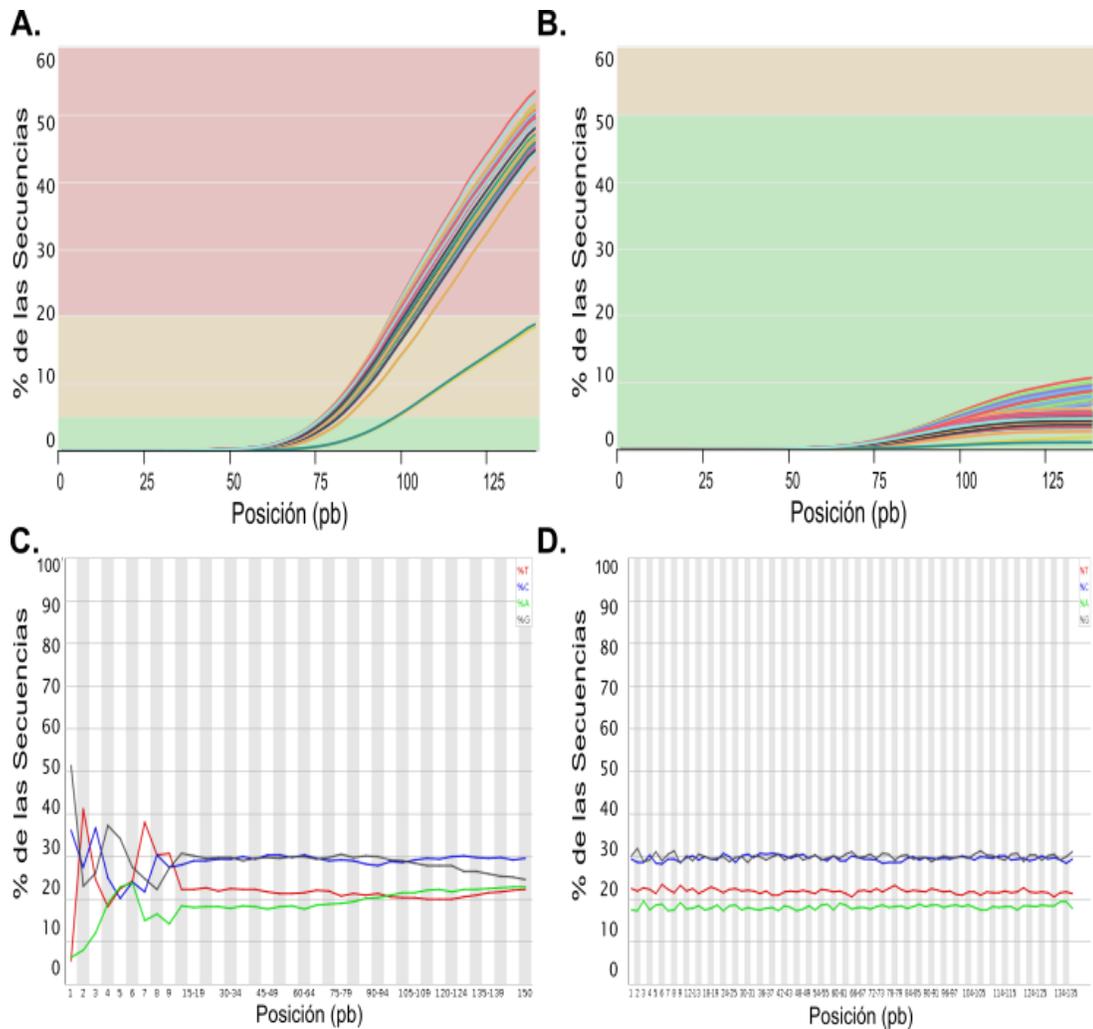
### **Control de calidad de las secuencias de ssRNASeq.**

Las lecturas recibidas fueron analizadas mediante los *softwares* FastQC y MultiQC, la calidad de la mayoría de las lecturas fue mayor a 30 en la escala phred, como se muestra en las figuras A y B. Sin embargo, la gráfica de contenido de adaptadores mostró un contenido mayor al 20% de secuencias que corresponden a los adaptadores usados en la secuenciación. En el apartado de contenido de bases por secuencia se observó que había un contenido desigual de las 4 bases.



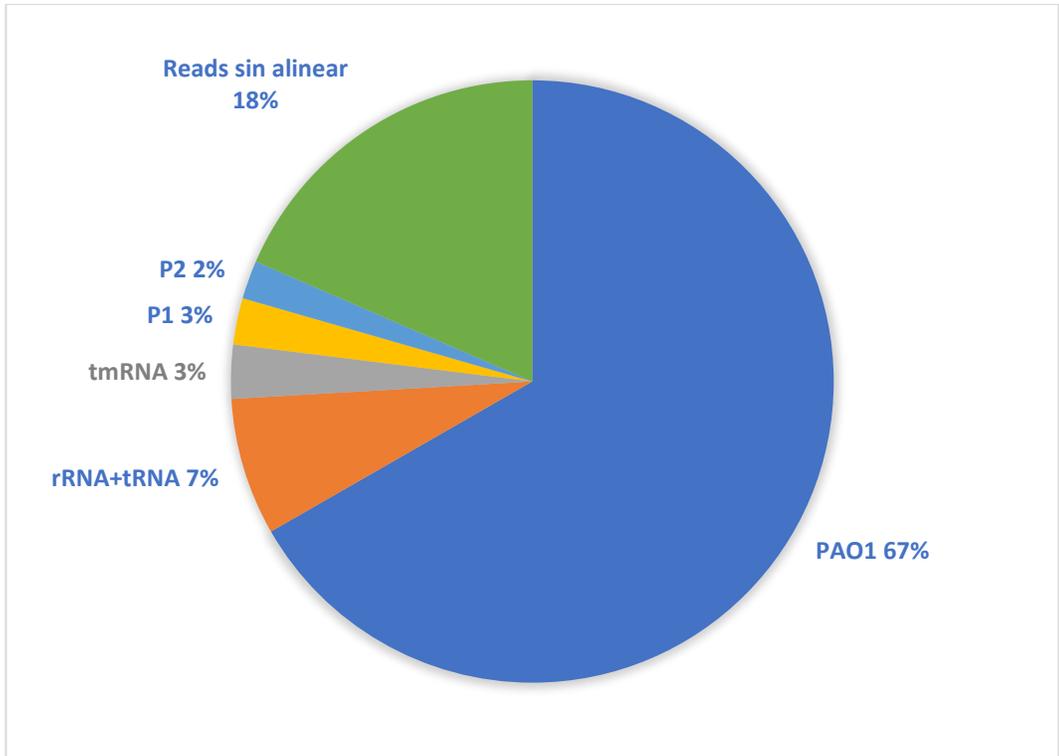
**Figura 36. Análisis de calidad de los archivos fastq.** Las gráficas corresponden al análisis de los 30 archivos fastq y se obtuvieron con MultiQC. A. Gráfica del promedio del score de calidad por posición. B. Gráfica de score de calidad por secuencia. C. Gráfica del porcentaje de secuencias de adaptadores por posición. D. Gráfica del porcentaje del contenido de cada nucleótido por posición.

Para corregir los errores en la secuenciación se corrió el programa TRIMMOMATIC 0.39, y se logró eliminar artificios de la secuenciación que generaban errores en el análisis de calidad, como lo son la presencia de adaptadores.



**Figura 37. Eliminación de las secuencias de los adaptadores.** Las dos gráficas del panel superior corresponden a gráficas del porcentaje de secuencias de adaptadores por posición el panel A antes y B después de la remoción de secuencias adaptadoras. Las dos gráficas en la parte inferior corresponden a Gráficas del contenido de nucleótidos por posición A antes y B después del corte de las bases de las primeras posiciones.

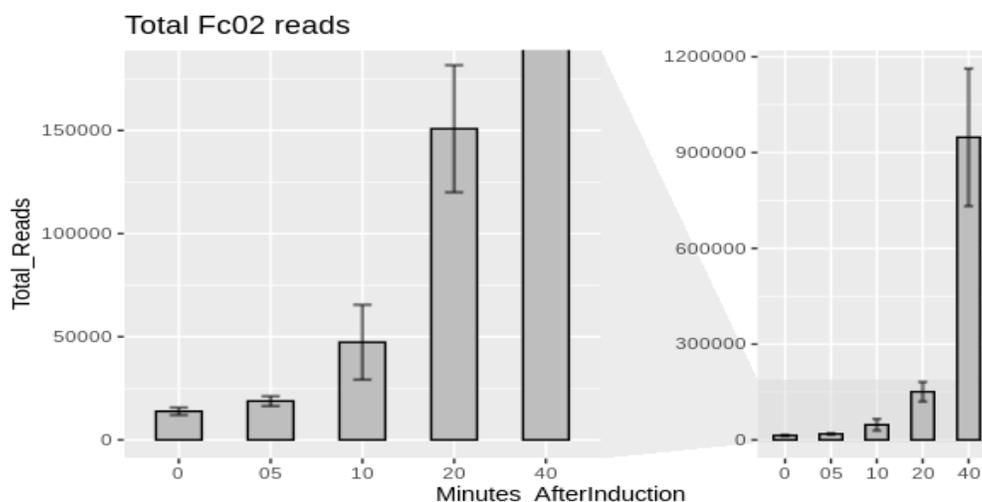
Ya que se recortaron y analizaron las secuencias, se realizó el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia, en este caso la cepa de *P.aeruginosa* PAO1 y el fago Fc02, usando los programas Bowtie2 y .HISAT2.



**Figura 38. Esquema del porcentaje de lecturas mapeadas con las respectivas secuencias de PAO1.**

En promedio de las 30 muestras analizadas se obtuvieron 9 547 048 lecturas en cada una, que alinearon correctamente con el genoma de PAO1, lo que representa el 69.57% del total de las lecturas, descartando las secuencias del tmRNA, rRNA y tRNA, así como las secuencias de los profagos crípticos de P1 y P2.

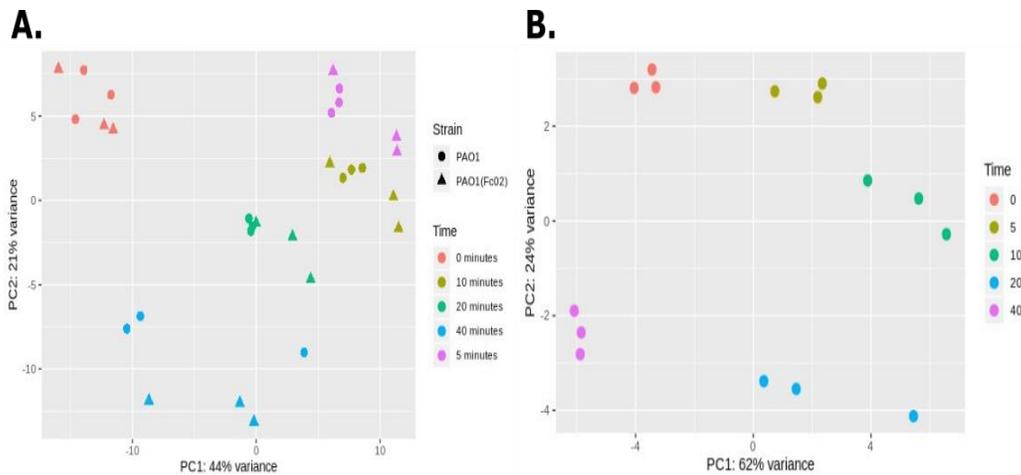
En cuanto al alineamiento de las muestras correspondientes a la lisógena, alineadas con el genoma del fago Fc02, se observó que la proporción de las lecturas totales de Fc02 después de la inducción por temperatura aumenta con respecto al tiempo, empezando con 0.17% de las lecturas en las muestras de 30°C y representando hasta un máximo del 7% tras 40 minutos de inducción. (Figura 39)



**Figura 39. Gráfica de las lecturas mapeadas en el genoma de Fc02.** Gráfica de barras del total de lecturas (Eje y) mapeadas en el genoma de Fc02 en cada uno de los tiempos de inducción. La gráfica de la izquierda es un acercamiento correspondiente a menos de 200 000 lecturas en el eje vertical.

Después del análisis estadístico con el *software* DESeq2, una primera aproximación a entender el comportamiento de los datos es realizar un estudio exploratorio de los datos transcriptómicos en su totalidad, para lo cual, se llevó a cabo un análisis de componentes principales de todas las muestras.

Como se observa en la figura A, las muestras se agrupan de acuerdo con la temporalidad del cambio de temperatura, tanto lisógena como cepa parental. En la gráfica de la figura B solo se analizaron la variabilidad de los datos de los genes del fago, y se puede apreciar que los triplicados de las muestras se agrupan de acuerdo con la temporalidad de la inducción, y que las mayores diferencias se encuentran entre los grupos de 30°C y los de 20 minutos después de la inducción, y en el grupo de 10 y 20 minutos comparado con el grupo de 40 minutos.



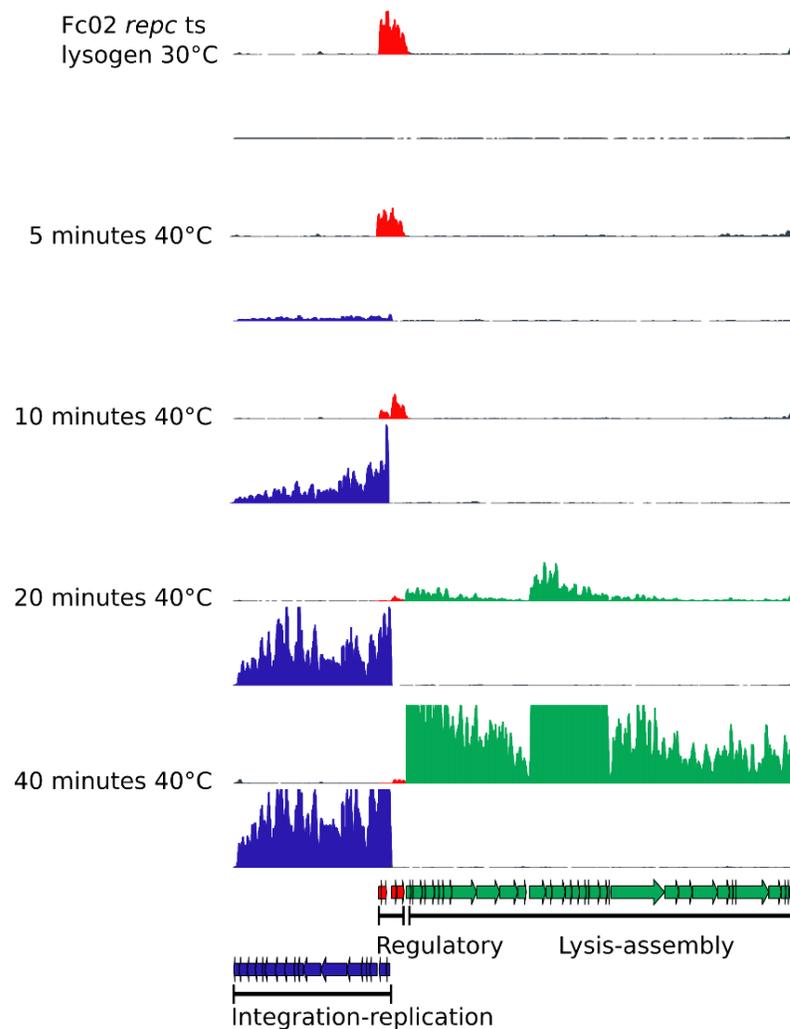
**Figura 40. Análisis de componentes principales de las lecturas.** A. PCA de las lecturas de las cepas PAO1 y PAO1(repc ts), antes y después del cambio de temperatura B. PCA de las lecturas del fago Fc02.

Posterior al análisis de componentes principales se analizó mediante gráficas de, la distribución de la expresión de los genes tanto del fago como de la bacteria a los diferentes tiempos de inducción.

### **Análisis transcripcional de la inducción del profago Fc02 *repc*ts.**

Se calculó la cobertura de las lecturas en el genoma de Fc02 antes y después de la inducción, como se ve en la figura 41. Se encontró que, durante el estado de profago, solo se expresa un pequeño grupo de genes en la zona central del genoma (en rojo) donde se da la divergencia entre los genes que se transcriben a la derecha y los que se transcriben hacia la izquierda, en ese *cluster* está localizado el gen *repc*. Una vez levantada la represión por el cambio de temperatura, empiezan a tomar relevancia los genes a la izquierda del genoma, siendo el primer gen en transcribirse el putativo gen antirepresor o *ner*-like, seguido del ORF10 y algunos otros genes importantes para la integración y replicación del fago, al final de esa sección se encuentra el gen *mor*-like. Este *cluster* de genes incrementa su transcripción durante los primeros 20 minutos de la inducción (en azul), momento en el cual comienzan a tomar relevancia los genes del bloque derecho (verde). Es justo en esta

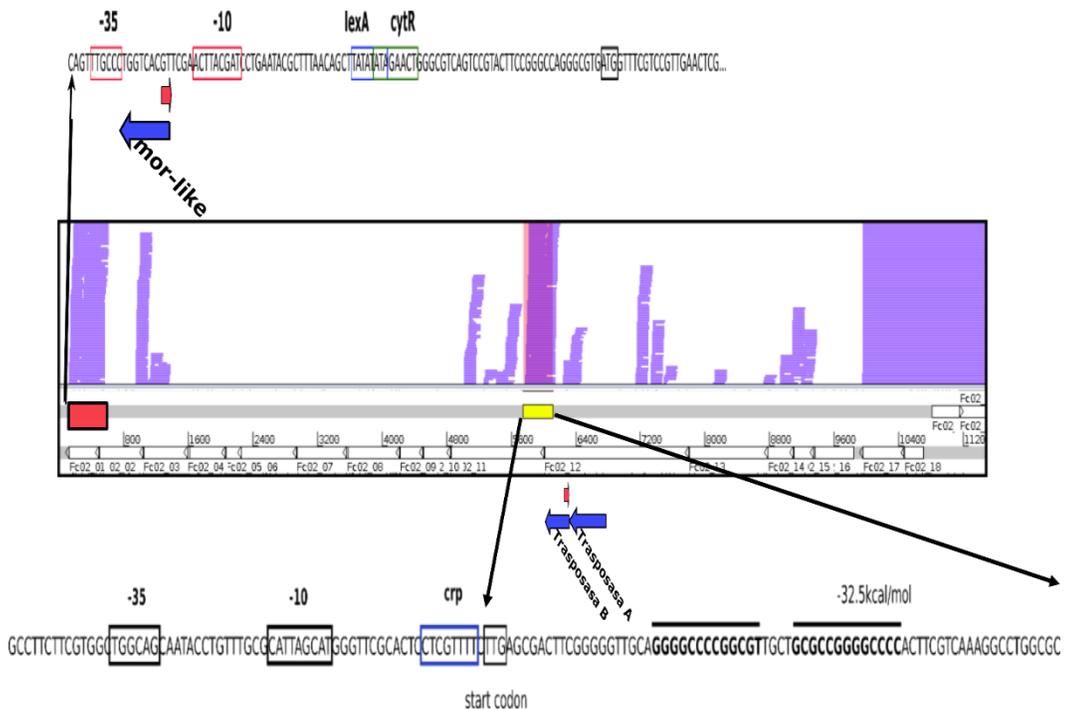
sección del genoma donde se pueden identificar tres diferentes bloques de transcripción, el primero de ellos en la parte media que es el mayoritariamente transcrito a los 20 minutos e involucra en su mayoría genes estructurales del virión y parece estar delimitado por un putativo terminador *rho*-independiente. El bloque que se encuentra inmediatamente después del bloque de regulación de la lisogenia, alcanza su punto máximo de transcripción a los 40 minutos y dentro de esta región están codificados genes como los de la putativa holina, endolisina y algunos genes involucrados en el empaquetamiento del ADN. El último de los *clusters* que también se observa se expresa en su mayoría a los 40 minutos es el que se encuentra en el extremo derecho del genoma de Fc02.



**Figura 41. Cobertura de las lecturas antes y después de la inducción.** Gráficas de barras, donde en el eje y están representado la cobertura de las lecturas,

con un límite superior de 8K. El eje de las x corresponde a cada base del genoma de Fc02. El diagrama de la parte inferior del genoma de Fc02 indica la posición de los genes a lo largo del eje. Está indicado para cada par de gráficas a que muestra corresponde. La gráfica superior de cada tiempo corresponde a las lecturas que mapearon en la hebra *forward* de ADN, mientras que la inferior a la hebra reversa. Las gráficas están coloreadas con respecto al bloque de genes que transcriben.

Además, la gráfica de cobertura a 30°C nos permitió identificar que existe una proporción de lecturas que se transcribe en sentido opuesto al inicio de los genes *mor*-like y la *transposasa B* (figura 44).



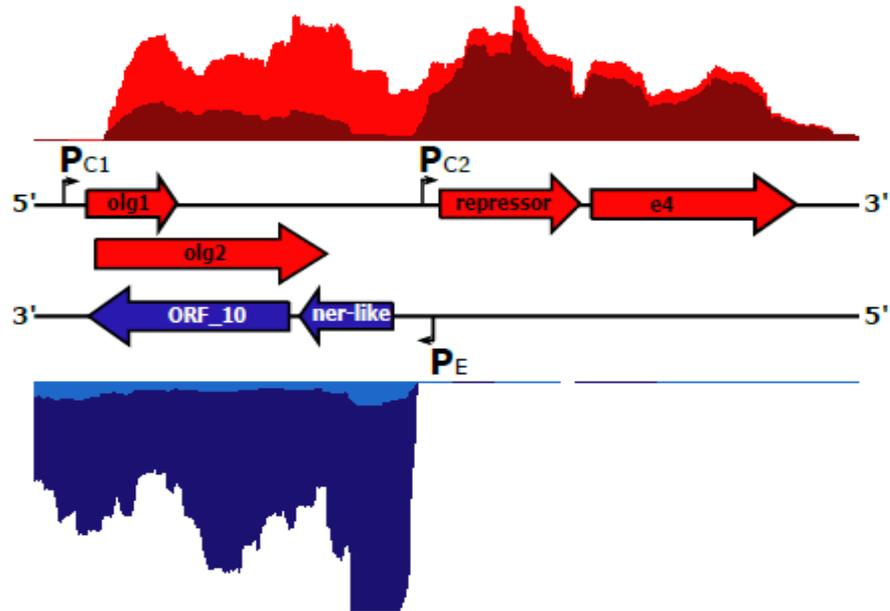
**Figura 42. Regiones de transcripción al reverso del inicio de los genes *mor* y *transposasa B*.** Esquema donde se muestra las putativas secuencias promotoras previas a los picos de transcripción observadas en las lecturas de la hebra *forward* de la lisógena a 30°C en dirección contraria a la que se expresan los genes *mor* y *transposasa B*.

Un caso peculiar de perfil de transcripción es el del ORF 40 el cual se encuentra en el extremo derecho del genoma de Fc02, al estar en esta región



P<sub>C1</sub>, y que además está conservado en los demás fagos del grupo (figura 45B).

(A)



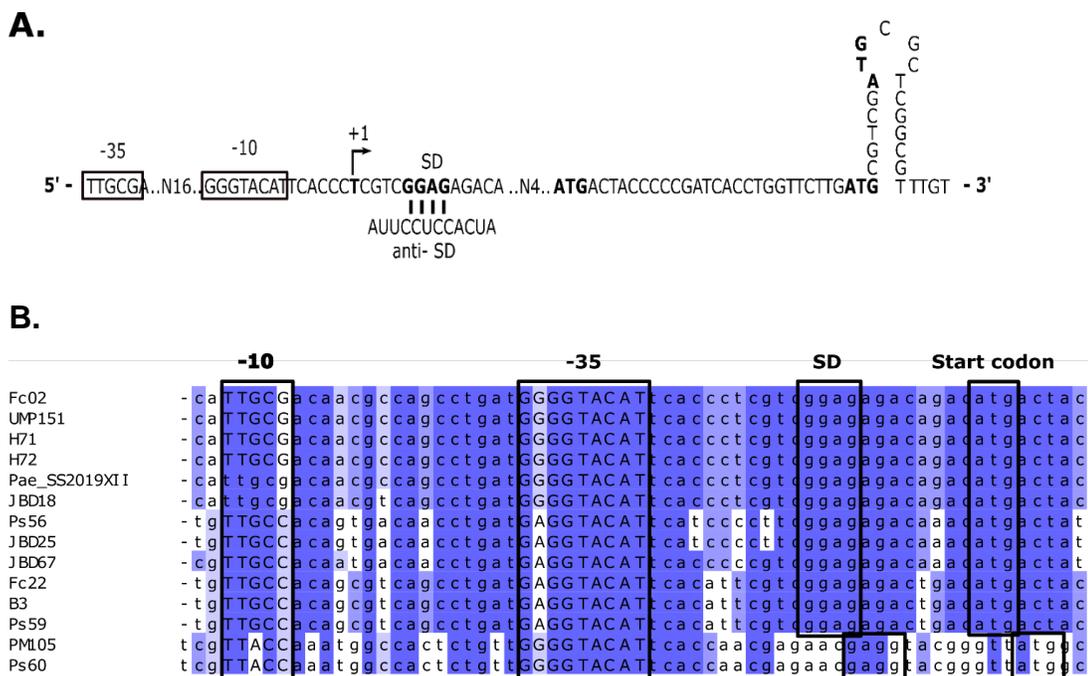
(B)



**Figura 44. Transcripción previa al inicio del represor.** En el panel A se observa las gráficas de cobertura con un máximo de 5K, en rojo las lecturas correspondientes a la hebra *forward*, y en azul las coberturas de la hebra *reverse*, en tonalidades claras la transcripción a los 5 minutos de la inducción y en tonalidades oscuras las coberturas 10 minutos después de la inducción el largo coincide con la región del genoma ejemplificada entre ambas gráficas. En el panel B con rojo y con una flecha se identifican las secuencias de los probables promotores.

Como se mencionó con anterioridad, a 30°C se encontraron transcritos previo el inicio del represor, estos se encuentran a 900 bases *upstream* del inicio del gen *repc*. Dentro de esta región se hizo una búsqueda de ORFs, la cual arrojó

8 putativos ORF's de los cuales se analizaron los dos más cercanos a la región promotora, *olg1* y *olg2*, que tienen características diferentes, como se ve en la figura 45A. El codón de inicio de *olg1* está a 9 bases del putativo SD, y el ATG de *olg2* está 25 bases *downstream* del inicio de *olg1*. Ambos ORFs se traslapan en el ORF10 (que se transcribe hacia la izquierda), *olg1* se traslapa por completo en el ORF10 en -1, mientras que *olg2* en +1 abarca no solo la mayor parte del ORF10, sino también el inicio del gen *ner-like* (figura 44A).



**Figura 45. Promotor de los ORFs sin anotar que se expresan a 30°C.** A. Secuencia nucleotídica de la putativa región promotora previa a *olg1*. B. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos previa al putativo codón de inicio del ORF traslapado, esta coloreado de acuerdo con el porcentaje de identidad, en tonos azules se marcan los nucleótidos que se comparten entre las distintas secuencias de los fagos del grupo B3-like.

Mediante el software ARNfold se encontró una estructura de tallo-burbuja en el inicio de *olg2*, la G del codón de inicio parece formar parte de este *stem*-

*loop*, que pudiera tratarse de un atenuador o de una estructura responsable de un *frameshifting*.

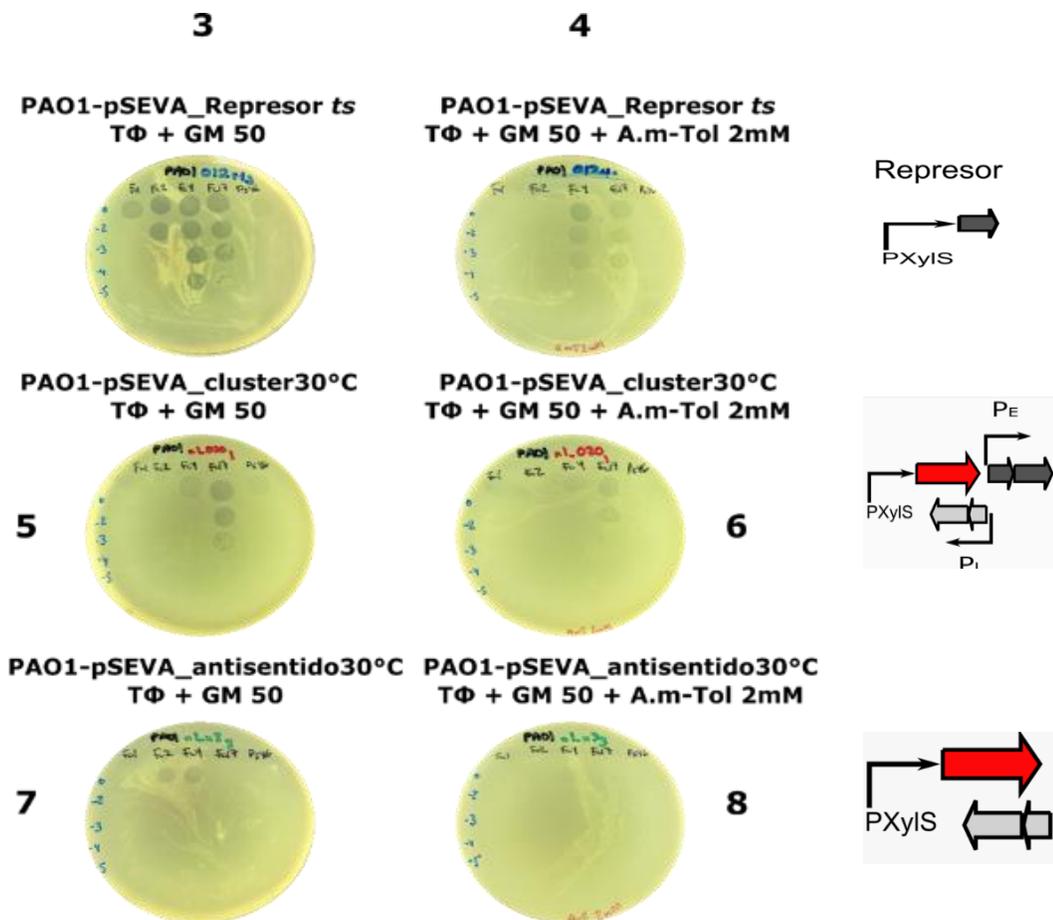
Después de 10 minutos después de la inducción, se puede observar una evidente disminución de la región de transcritos antes mencionada (*olg1+olg2*) como se ve en la figura 44 A.

En cuanto al análisis informático a nivel de las putativas proteínas Olg1 y Olg2, se hizo un alineamiento a nivel de secuencia de aminoácidos y se encontró que la región amino terminal de Olg1 tiene un elevado porcentaje de identidad entre las diferentes secuencias de los fagos B3-like, a diferencia de lo que ocurre con Olg2, que si bien hay un grupo dentro de los fagos B3-like que comparten una secuencia aminoacídica con un alto porcentaje de identidad, destaca el hecho de que algunos fagos B3-like tendrían una proteína trunca, siendo el fago JBD67 el que tendría la de menor tamaño, con apenas 10 aminoácidos (figura 46). Un BLASTp de Olg1 arrojó un probable dominio de endonucleasa, mientras que Olg2 en HHPred se encontró que contiene un putativo dominio transmembranal.



hacer un tapiz bacteriano y gotearle algunos fagos temperados, dos de ellos del mismo grupo de inmunidad (Carballlo, datos no pub.), y otros de diferente grupo, se encontró que cuando se agregaba el inductor, la bacteria transformada no permitía la infección de los fagos probados, a excepción del fago Fc17.

Dado que esta construcción contiene íntegro el promotor del gen *ner* (Figura 47), se decidió acortarla, y se volvió a evaluar la capacidad de exclusión, se encontró que en presencia del inductor esta construcción evitaba la infección de todos los fagos temperados probados.

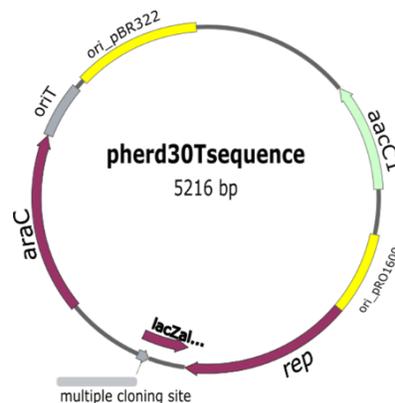


**Figura 47. Clonaciones de la región antisentido en pSEVA648.** En la parte superior de cada tapiz viene indicado la clonación expresada en PAO1, los carriles 3,5 y 7 son sin inductor y los carriles 4, 6 y 8 con inductor (ác.m-tol

2mM). Del lado derecho un esquema de los genes de Fc02 que están dentro de la clonación.

Dado que solo se fue recortando la región previa al represor, y no son clonaciones específicas de ORFs, se hizo una búsqueda de marcos abiertos de lectura mediante el *software* ORF Finder y se decidió hacer un set de tres clonaciones nuevas, la primera que contuviera *olg1+olg2*, con un tag de histidinas en *olg2*, la segunda solo *olg1* marcado en el carboxilo terminal con un tag de 6 histidinas y la tercera la clonación individual de *olg2* también con un tag de 6 histidinas en el carboxilo terminal.

Sin embargo, las clonaciones en pHERD30T se hicieron con las enzimas EcoRI y HindIII, esto generaba un problema en el inicio de la traducción, ya que posterior a la secuencia SD existían dos codones de inicio, el del gen *lacZα* propio de pHERD30T y el ATG de los genes clonados, por lo que se hizo mutagénesis del plásmido (QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit- Agilent Technologies) para eliminar la secuencia del recuadro azul de la figura 48.



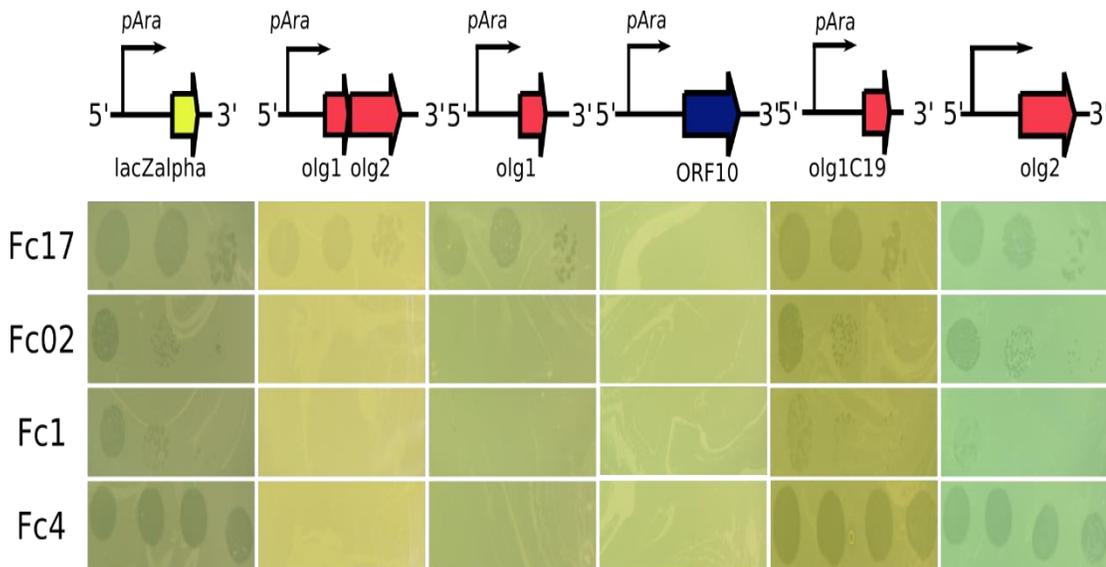
ACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTT  
 GCTATGCCATAGCATT TTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTC  
 CATACCCGTTTTTTGGGCTAGAAATAATTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATACCCATGGGATCTGATAA

**GAATTC**atgactacccccgatcacctgg  
 EcoRI

**Figura 48. Secuencia del plásmido pHERD30T.** En la parte superior un esquema del plásmido y en la parte inferior la secuencia promotora, el SD y el inicio de los genes en rojo el inicio de *olg1* en el recuadro azul la región que deletó.

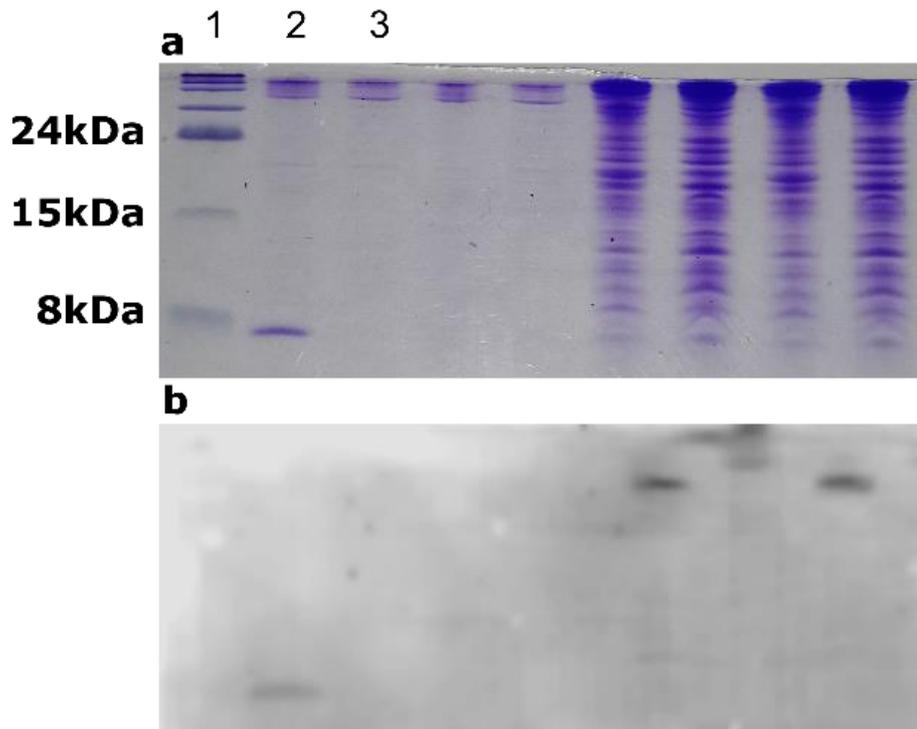
A partir del resultado de la figura 47 se probó la capacidad de exclusión en las tres clonaciones (figura 49), para elucidar si el responsable de la exclusión era *olg1* o *olg2* se clonaron por separado, y se encontró que *olg1* codifica para una proteína de 7.9 kDa (figura 49) que es capaz de evitar la infección de los fagos fc1, fc2 y fc4, pero no Fc17, la clonación de *olg2* permite la infección de todos los fagos analizados. Además, azarosamente se obtuvo una clonación con una inserción de una citosina en la base 19 (*olg1C19*) que generó un codón de paro prematuro 4 codones río debajo de la mutación, esta clonación no evita la infección de los fagos superinfectantes.

También se clonó el ORF10 para comprobar que el ORF10 homólogo al reportado por *Carballo et al.*, participa en la exclusión de fagos superinfectantes. En la figura 49 se muestran los tapices de PAO1 con cada una de las clonaciones, con inductor.



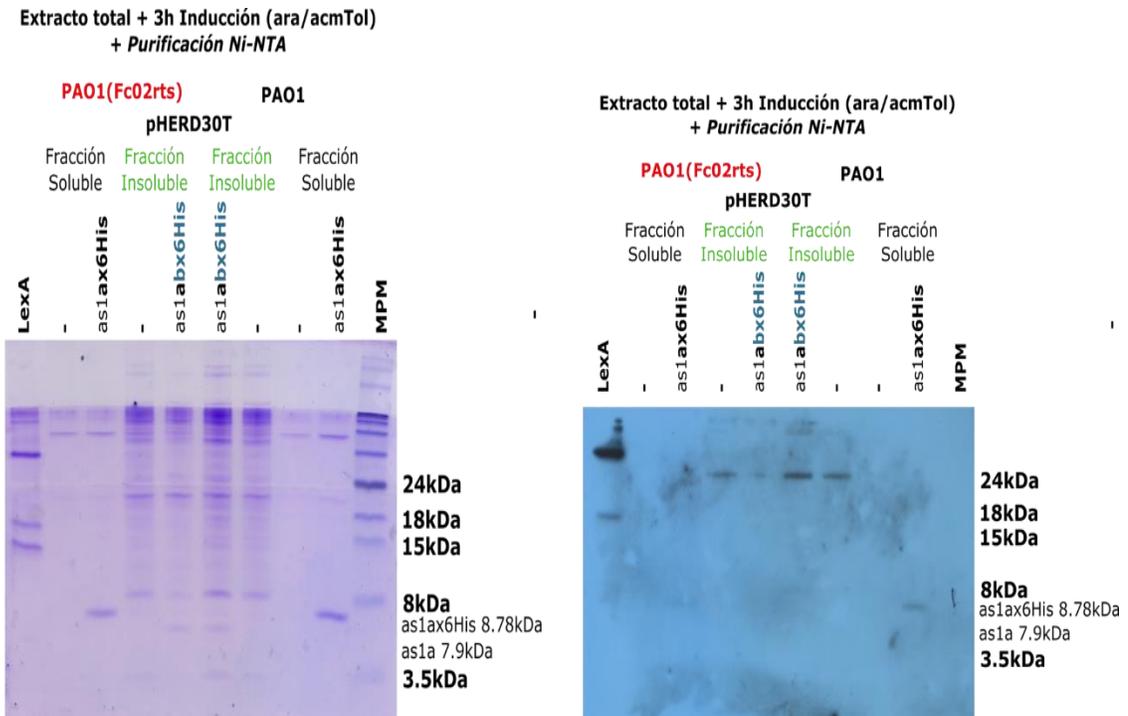
**Figura 49. La sobreexpresión de *olg1* y ORF10 evitan la infección por otros fagos.** Tapices de las construcciones plasmídicas señaladas en la parte superior expresadas en PAO1 con 0.3% arabinosa

Con estos mismos cultivos, inducidos se buscó la proteína de Olg1 y Olg2, En el carril 2 de la figura 50 se observa la proteína enriquecida y purificada mediante un tag de histidinas en el carboxilo terminal correspondiente al Olg1 con un tamaño de aproximadamente 8 kDa, se corroboró por western blot, la presencia de la proteína Olg1.



**Figura 50. Búsqueda de la proteína Olg1.** a. Tricine SDS-PAGE teñido con coomassie b. WesternBlot. Después del MPM los 4 primeros carriles de izquierda a derecha corresponden a la purificación con columna de níquel de pHolg1 3h arabinosa 0.3%, pHolg1 sin arabinosa, pHERD30T 3h arabinosa 0.3% y pHERD sin arabinosa. Los últimos carriles son las mismas muestras, pero del extracto total.

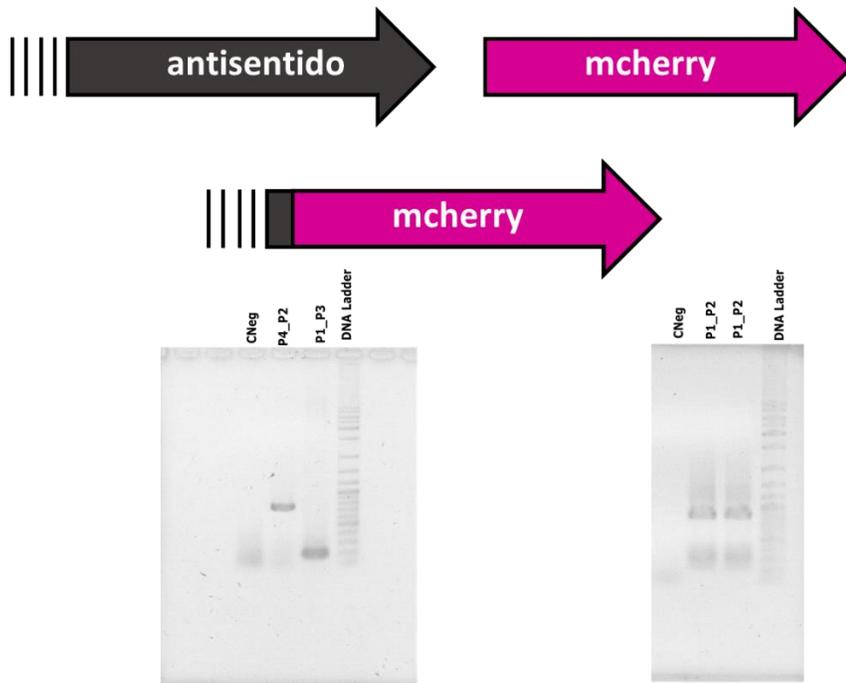
La proteína Olg2 se buscó en la construcción *olg1 + olg2*, tanto en la fracción soluble como en la insoluble, pero no se vio sobreexpresión en un SDS-PAGE y la señal que se observó era una inespecificidad porque también se observó en el control del plásmido pHERD30T.



**Figura 51. Búsqueda de la proteína Olg2.** SDS-PAGE de las construcciones señaladas en la parte superior, del lado izquierdo gel de acrilamida teñido con Coomassie y del lado derecho el Westernblot del mismo gel.

### Evaluación del promotor pC1

Para evaluar la funcionalidad del promotor previo a la región antisentido a ner y ORF10, desde donde se expresa *olg1*, se clonó la región promotora y 100 bases *upstream* a esta, fusionando los primeros codones de *olg1* a la proteína fluorescente mcherry, en el vector de expresión pSEVA 227R, como se muestra en la figura 52.



**Figura 52. Evaluación de los promotores en pSEVA227R.** En la parte superior se encuentra un esquema de la clonación, las líneas punteadas esquematizan la región promotora, el antisentido *olg1*, el gen *mcherry* y la fusión pC1+*olg1*+*mcherry*. En la parte inferior los productos de PCR necesarios para generar la fusión.

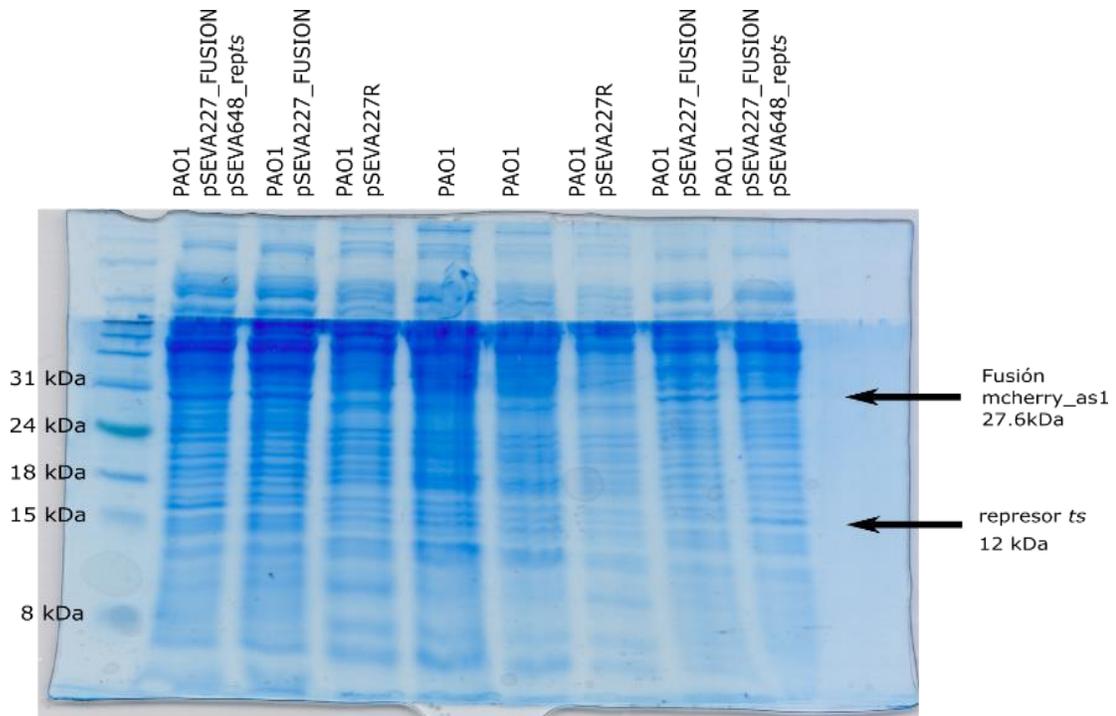
Se cuantificó la fluorescencia de los cultivos en crecimiento que tuvieran la clonación pSEVA227R\_ pC1+*olg1*+*mcherry* (Fusión), y se comparó con la cepa PAO1 sin plásmido, con el vector pSEVA227R y una co-transformación pSEVA227R\_ pC1+*olg1*+*mcherry* (Fusión) + pSEVA648\_O12(rts) (represor).

En ninguno de los tres ensayos se observó fluorescencia en PAO1, pero al ver fluorescencia en pSEVA227R en uno de los ensayos, no pudimos valorar si la fluorescencia era real, o si había diferencias estadísticas con respecto a las construcciones con la fusión, dado que los triplicados no lograron ser constantes, variando resultados ente ellos.



**Figura 53. Ensayo de fluorescencia para evaluar pC1.** Gráficas que representan en el eje y las unidades de fluorescencia y en el eje z, cada una de las muestras analizadas.

Se hizo una aproximación de buscar la proteína mCherry en las construcciones pSEVA227R, pSEVA227R\_ pC1+*olg1+mcherry* (Fusión) y pSEVA227R\_ pC1+*olg1+mcherry* (Fusión) + pSEVA648\_O12(rts), y como se muestra en la figura 51, se observó una proteína del tamaño esperado de aproximadamente 28kDa, que se observaba en las construcciones pSEVA227R\_ pC1+*olg1+mcherry* (Fusión) y pSEVA227R\_ pC1+*olg1+mcherry* (Fusión) + pSEVA648\_O12(rts) pero no en el plásmido sin promotor pSEVA227R.



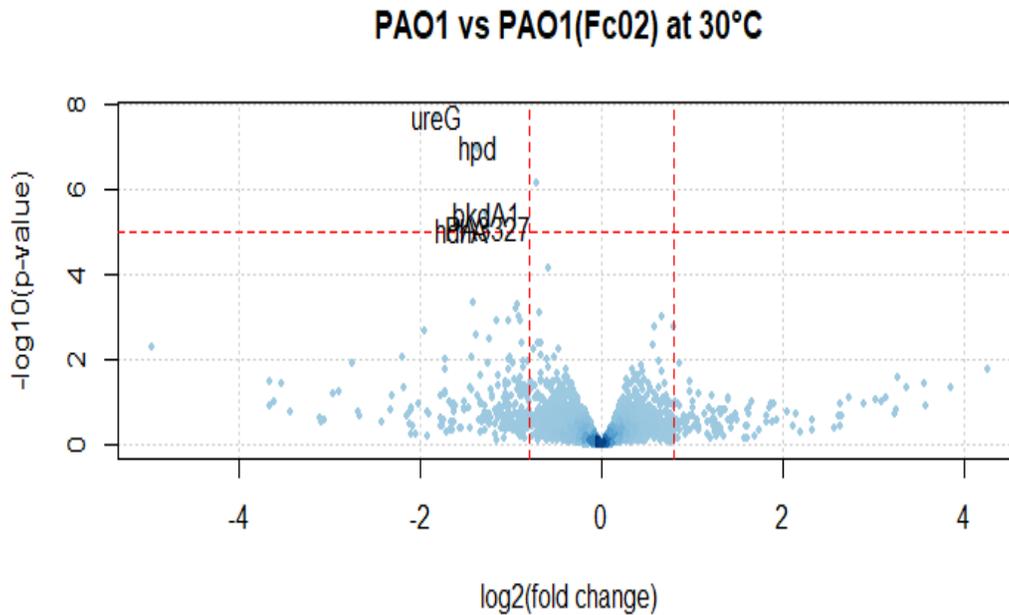
**Figura 54. Búsqueda de la proteína mcherry fusionada con el promotor pC1, de la región antisentido.** SDS-PAGE teñido con Coomassie, se señala en la parte superior la construcción plasmídica que se transformó en PAO1, así como la bacteria sin plásmido. Señalado con flechas las bandas que se ven diferencialmente con respecto a los controles.

### **Análisis transcripcional de los genes de PAO1.**

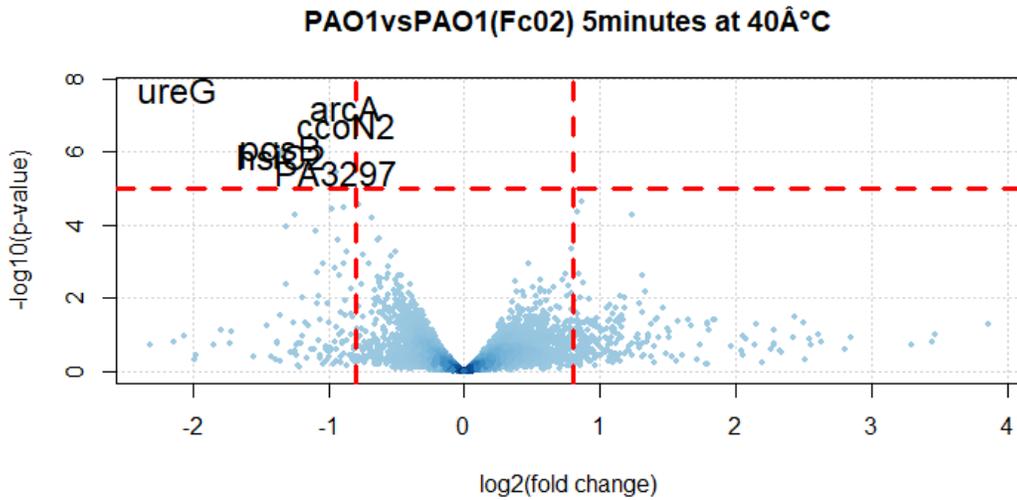
Las secuencias que mapearon con el genoma de referencia de PAO1 fueron analizadas para determinar su expresión diferencial, y buscar genes que se transcribieran en diferente proporción en la lisógena comparada con la cepa parental, descartando los cambios por el aumento de temperatura. Los parámetros usados para esto fueron Fold change +/- 2 y p-value 0.00001.

Como se muestra en las gráficas tipo volcano, fueron muy pocos los genes que tuvieron una expresión diferencial, por la presencia del profago y hasta los 20 minutos después de la inducción (figuras 55-58).

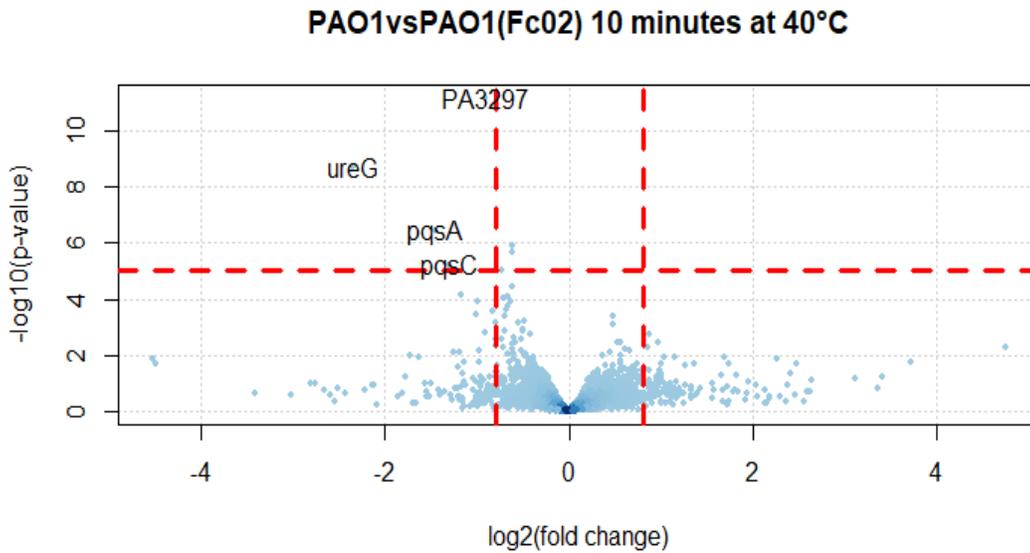
Destaca que los genes que se encuentran transcritos diferencialmente están disminuidos en la lisógena, con respecto a la PAO1 entre ellos, como se muestra en la figura 59 se comparten entre las 4 condiciones, la disminución en la expresión de UreG, PA4893 y PA3297.



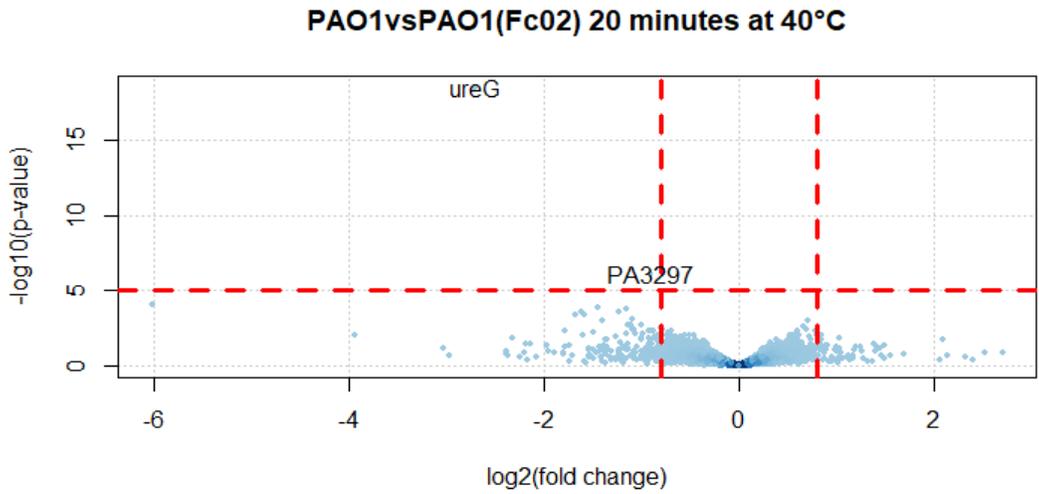
**Figura 55. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 a 30°C.** Gráfica tipo volcano, donde cada punto equivale a un gen, y las líneas rojas punteadas son los límites de p-value y fold change.



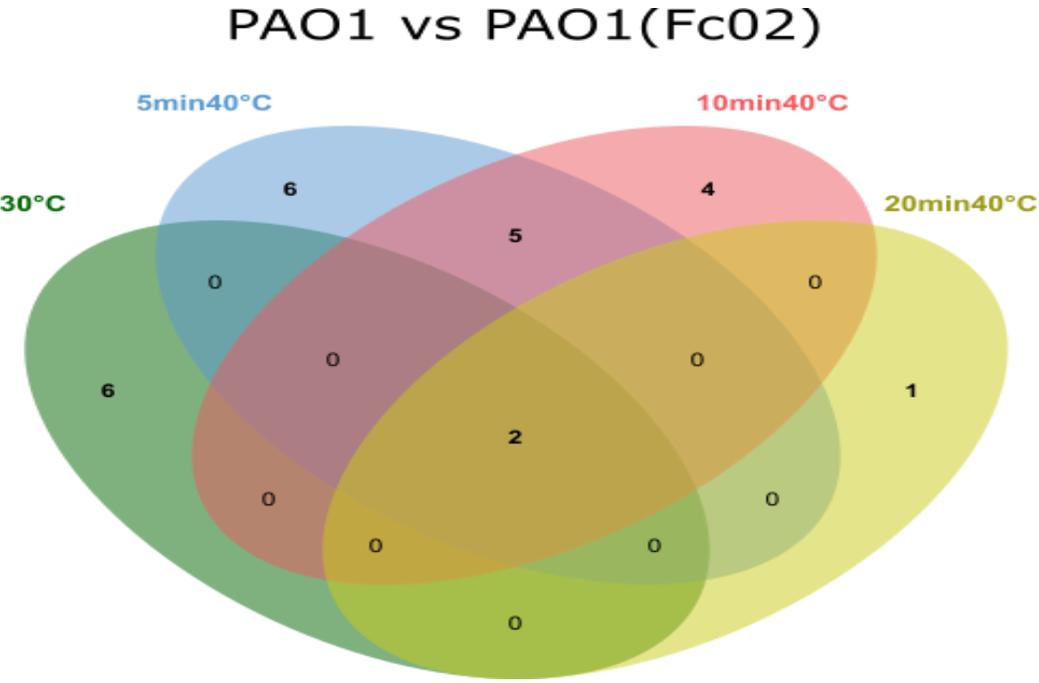
**Figura 56. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 5 minutos después de la inducción.** Gráfica tipo volcano, donde cada punto equivale a un gen, y las líneas rojas punteadas son los límites de p-value y fold change.



**Figura 57. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 a 10 minutos después de la inducción.** Gráfica tipo volcano, donde cada punto equivale a un gen, y las líneas rojas punteadas son los límites de p-value y fold change.



**Figura 58. Expresión diferencial entre la lisógena y PAO1 20 minutos después de la inducción.** Gráfica tipo volcano, donde cada punto equivale a un gen, y las líneas rojas punteadas son los límites de p-value y fold change.



**Figura 59. Diagrama de Venn de los genes con expresión diferencial a 30°C y hasta los 20 minutos después de la inducción.**



## DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

El fago Fc02 pertenece al grupo de los B3-like, a pesar de que este fago fue caracterizado en 2004 (Braid et al., 2004), todavía se desconocen muchos aspectos de la replicación y de la funcionalidad de los genes codificados en estos fagos.

A pesar de que en la publicación de *Braid et al.* se anotaron varios de los genes por homología, entre ellos el probable represor, no se comprobaron experimentalmente, y como el uso de mitomicina C para inducir el fago no fue posible, para obtener una lisógena termosensible, se realizó primero una mutagénesis al azar. El resultado de esta, reveló que la mutación ts en el nucleótido 191 que generó el cambio G64E a nivel de aminoácidos, no se encuentra dentro de las hélices de unión al ADN, se encuentra justo después de la última hélice, a pesar de esto le confiere la termo-sensibilidad. Existen algunas mutaciones en represores como en el del fago modelo Lambda, que no necesariamente están en las hélices de unión al ADN y que hace a las proteínas termosensibles (Jana et al., 1999). En el caso de esta mutación, si bien no está en alguna de las hélices, la glicina mutada es un aminoácido conservado en el represor de los fagos B3-like que infectan *P. aeruginosa*, por lo que a pesar de desconocer por qué pierde la función el represor por este cambio, al estar conservado este aminoácido y el fenotipo observado, se puede suponer que este aminoácido es de vital importancia para la correcta funcionalidad de Repc de este grupo de fagos.

Después de la mutagénesis al azar, se obtuvo una mutante Repc G64E, mediante un protocolo basado en recombinación. Durante este proceso, se observó que la exposición del fago a 42°C sin ningún otro complemento generaba placas claras, se tomaron 2 de estas placas y ambas tenían la misma mutación previa al codón de inicio del gen *repc*. Este cambio pareciera estar en el putativo *Shine-Dalgarno*, lo cual podría explicar su fenotipo de placa clara

por el hecho de que un SD defectuoso impediría la traducción del represor y por lo tanto el fenotipo sería de un fago virulento.

La lisógena PAO1(Fc02 *repcts*) se usó para los análisis posteriores, una vez secuenciado el ARN de la inducción del profago, se pudo notar que a pesar de que los alineamientos tenían un alto porcentaje de alineamiento, existían secuencias que quedaban sin alinear. Un porcentaje de ellas se pudo alinear con rRNA, tRNA y tmRNA, pero otra proporción de las lecturas, aproximadamente del 20% no podían ser alineadas con secuencias de PAO1 ni con Fc02 en el caso de las lisógenas. Para reducir este 20% se alineó las secuencias con los fagos crípticos P1 y P2, encontrándose en porcentajes similares alrededor del 2% cada uno, aun así todavía quedó alrededor del 18% de las secuencias que no pudieron alinearse. Este porcentaje podría deberse a la astringencia con la que se corrió el alineamiento, pero también puede deberse a que la cepa PAO1 con la que se trabajó es una cepa de laboratorio que ha sufrido y acumulado cambios que no se encuentran en la secuencia de referencia que se usó para el alineamiento.

Como se puede ver en los análisis de PCA, no hay diferencia significativa entre los triplicados, ya que estos se agrupan en un campo de la gráfica, sin embargo, en el PCA de todas las muestras se pueden observar que en el tiempo de 40 minutos tanto en la lisógena como en la PAO1 pudieran encontrarse *outliers* que pudieran verse reflejadas por la variabilidad o el rápido cambio del estado celular en ese tiempo. Con respecto al cambio entre condiciones, se puede ver que la mayor variabilidad de los datos es con respecto al componente principal 1 a lo largo del eje x, por lo que se podría decir que las muestras que más difieren entre sí son las de 30°C con respecto a los 5, 10 y 20 minutos. Estas tres últimas, si bien están separadas en el eje de las y, están en la misma sección del eje horizontal, y vuelve a haber una diferencia cuando ya han transcurrido 40 minutos, por lo que en posteriores análisis es de esperarse que los grandes cambios a nivel de expresión

diferencial se den entre 30°C y los 5 minutos de inducción, y entre los 20 y 40 minutos.

Con respecto al análisis de los datos transcriptómicos de las lecturas mapeadas al genoma de Fc02, se pudo observar a manera general tres bloques de transcripción. El primero es el que se transcribe en la lisógena a 30°C, involucrado en la regulación del estado de profago; un segundo bloque de expresión temprana tras la inducción, que corresponden a los genes de replicación e integración, y un último bloque de genes tardíos involucrados en la morfogénesis del virión y lisis bacteriana. Si bien la configuración de los genes es diferente a la de otros fagos como los fagos Mu-like (Cazares et al., 2014), parecen obedecer un patrón en el que hay un pequeño *cluster* de genes que regulan y mantienen la lisogenia, que una vez liberada la represión transcriben a un gen anti represor, y otro conjunto de genes, entre ellos algunos activadores o reguladores de la transcripción, como es el caso del ORF1 o *mor*-like, al tener identidad con el gen *mor* de Mu es de esperarse que este cumpla una función similar de activar la transcripción en otra región del genoma (Kumaraswami et al., 2011). Finalmente se activan un bloque de genes tardíos, los cuales, por los patrones observados en estos resultados parecieran tener una regulación específica y controlada, permitiendo formar las partes del esqueleto del virión, y no expresar inmediatamente las proteínas de lisis.

Cuando se analizó de cerca la transcripción de los genes en la región de regulación nos percatamos de la presencia de transcritos 900 nucleótidos antes del inicio del represor. Dentro de estos 900 nucleótidos es muy probable que hubiera regiones codificantes, por lo que una búsqueda de ORFs nos arrojó la probabilidad de que existieran 8 ORFs. Sin embargo, nosotros nos enfocamos en la región más lejana al represor, y buscamos promotores que funcionaran para la transcripción de esa sección. Efectivamente se encontró un promotor, el cual a pesar de tener un espaciador entre -10 y -35 poco convencional por su longitud, se ha visto que en *P. aeruginosa* espaciadores

de ese tamaño son funcionales (McLean et al., 1997). Es de esperarse que cerca de esta región promotora exista en las distancias habituales un codón de inicio, el cual se encontró 9 bases después del probable SD. Cuando se evaluó la fluorescencia y los resultados no fueron constantes, se podría atribuir al bajo número de copias del plásmido, o a su estabilidad dentro de la bacteria, ya que presentamos dificultades al momento de propagarlo y purificarlo, siempre obteniendo muy poca cantidad de ADN plasmídico, dado el resultado de hallar una proteína del tamaño esperado de mcherry. Este resultado es el que apoya la funcionalidad de este promotor.

A nivel de secuencia, la región promotora y el probable ORF *olg1* tienen un elevado porcentaje de homología en todos los fagos B3-like de *P.aeruginosa*, específicamente la región promotora en su región -10 es la misma en todos los fagos analizados, aunque la región -35 presenta ligeras variaciones. En cuanto a la probable proteína codificada a partir de ese promotor, se encontró que a nivel aminoácidos está altamente conservada en el grupo de los B3-like, por lo que es de esperarse que juegue un importante papel en la biología del fago. Esto difiere de lo encontrado para el putativo ORF *olg2*, el cual varía entre los diferentes fagos del grupo en cuanto a la composición, pero sobre todo en cuanto a tamaño, inclusive hay algunos casos de fagos del grupo que no la contienen o la contienen de un tamaño mucho menor.

Debido a la falta de conocimiento de esta región se decidió clonar ambos ORF's en un vector de expresión con un tag de histidinas en el extremo carboxilo, y debido a que se traslapa con el ORF10, uno de los implicados en la exclusión de otros fagos (Carballo-Ontiveros *et al.*, 2020), se decidió probar si estos genes tenían la misma o una función similar, y se decidió probar en fagos temperados. Se encontró que el gen *olg1* es responsable de evitar la infección de otros fagos y tiene una función similar que la del ORF10, gen con el que traslapa en la hebra contraria. Es probable que *olg1* trabaje a nivel de restricción-modificación del ADN, ya que el BLASTp arrojó la posibilidad de que esta pequeña proteína tenga un dominio de endonucleasa, mientras que

el ORF10 participe a nivel de ingreso del ADN como lo plantearon *Carballo et al.* en el 2020.

Olg2 al ser analizado en HHPRed, se observó la probable presencia de un dominio transmembranal, por lo que se esperaba que éste participara en la exclusión, sin embargo, los resultados aquí obtenidos dicen que en las condiciones en las que nosotros evaluamos no permitieron la expresión y funcionalidad de *olg2*, por lo que existe la posibilidad de que este ORF no sea un transcrito traducible o requiera de condiciones específicas para traducirse.

En cuanto al análisis de expresión diferencial, era de esperarse que la bacteria sufriera muy pocos cambios por efecto de la presencia del profago, ya que en el profago el *cluster* de genes que se expresan es pequeño, por lo menos son 3 genes ya identificados y una región aún no caracterizada entre *olg1* y el represor. En este *cluster* aún permanece desconocida la función del accesorio *e4*, y de la región de transcritos entre *olg1* y el represor, identificada en este trabajo, pero no pudo ser totalmente caracterizada. Sería conveniente buscar una asociación de *e4*, o la región antisentido, con los genes que disminuyen su transcripción a 30°C con respecto a PAO1. Durante los 5, 10 y 20 minutos tampoco hubo muchos cambios con los parámetros usados para el análisis de expresión diferencial. Sin embargo, el cambio notable se dio a los 40 minutos, probablemente porque la célula ya estará en las últimas etapas previo a la lisis, es interesante en este último tiempo, el aumento de la transcripción del único gen *upregulated* en este tiempo el PA5530, gen identificado como un gen codificante para un transportador, involucrado en la asimilación de alfa-cetoglutarato (Lundgren et al., 2014).

## CONCLUSIONES

- La mutación G64E que se encuentra en el extremo amino terminal del ORF19 genera un fenotipo termosensible en la lisógena de Fc02.
- El efecto a nivel de transcripción de los genes de la bacteria se ve mayormente afectados hasta los 40 minutos después de la inducción del ciclo lítico, siendo que la gran mayoría de los genes afectados disminuyen su transcripción.
- Se encontró una región transcripcionalmente activa que se traslapa con la expresión del gen del anti-represor y el ORF10.
- Se identificó una proteína (Olg1) de 7.9kDa que se expresa antisentido al ORF10.
- Se encontró que la proteína Olg1 y la proteína codificada por el ORF10 de Fc02 tienen la misma función de evitar la infección por otros fagos.
- Las proteínas Olg1 y 10 no se expresan en el mismo ciclo, mientras Olg1 se expresa en la lisógena, 10 se expresa una vez que el represor se inactiva.
- El mecanismo de exclusión de 10 y *olg1* es diferente, ya que se encontró que mientras *olg1* no evita la infección de Fc17, la expresión del ORF10 si la evita.

## PERSPECTIVAS

- Definir el mecanismo o mecanismos involucrados en la regulación de la transcripción a partir del promotor previo a la región antisentido.
- Determinar si hay otras proteínas o polipéptidos en la región transcripcionalmente activa entre *olg1* y el represor.
- Determinar si *olg2* se traduce y en qué condiciones se da su expresión.
- Determinar si la función *olg2* es a nivel de membrana, y con qué proteínas bacterianas está interactuando.
- Identificar si existen otros genes traslapados en las secuencias de PAO1.
- Valorar la participación de *e4* y/o de los transcritos antisentido previo al represor, en la disminución de expresión de genes bacterianos.
- Determinar si hay un gen o genes en el fago responsable del aumento de la transcripción de PA5530 en la etapa tardía de la inducción.
- Identificar los mecanismos de exclusión de *olg1* y ORF10 en Fc02.

## REFERENCIAS

- BRAID, M. D., SILHAVY, J. L., KITTS, C. L., CANO, R. J. & HOWE, M. M. 2004. Complete genomic sequence of bacteriophage B3, a Mu-like phage of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 186, 6560-74.
- 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, e00953-20.
- CASTAÑEDA-MONTES, F. J., AVITIA, M., SEPÚLVEDA-ROBLES, O., CRUZ-SÁNCHEZ, V., KAMEYAMA, L., GUARNEROS, G. & ESCALANTE, A. E. 2018. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* through a MLST approach and antibiotic resistance profiling of a Mexican clinical collection. *Infect Genet Evol*, 65, 43-54.
- CAZARES, A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. & GUARNEROS, G. 2014. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC Genomics*, 15, 1146.
- CEYSSENS, P. J. & LAVIGNE, R. 2010. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future Microbiol*, 5, 1041-55.
- COUSO, J.-P. & PATRAQUIM, P. 2017. Classification and function of small open reading frames. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 575-589.
- DE SMET, J., HENDRIX, H., BLASDEL, B. G., DANIS-WLODARCZYK, K. & LAVIGNE, R. 2017. *Pseudomonas* predators: understanding and exploiting phage-host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 15, 517-530.
- DION, M. B., OECHSLIN, F. & MOINEAU, S. 2020. Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 125-138.
- EMRICH, S. J., BARBAZUK, W. B., LI, L. & SCHNABLE, P. S. 2007. Gene discovery and annotation using LCM-454 transcriptome sequencing. *Genome Res*, 17, 69-73.

- GOODWIN, S., MCPHERSON, J. D. & MCCOMBIE, W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17, 333-51.
- HOWARD-VARONA, C., HARGREAVES, K. R., ABEDON, S. T. & SULLIVAN, M. B. 2017. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, 11, 1511-1520.
- JANA, N. K., ROY, S., BHATTACHARYYA, B. & MANDAL, N. C. 1999. Amino acid changes in the repressor of bacteriophage lambda due to temperature-sensitive mutations in its *cl* gene and the structure of a highly temperature-sensitive mutant repressor. *Protein Engineering, Design and Selection*, 12, 225-233.
- JOHNSON, G., BANERJEE, S. & PUTONTI, C. 2022. Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Temperate Phages. *mSphere*, 7, e0101521.
- KLOCKGETHER, J., CRAMER, N., WIEHLMANN, L., DAVENPORT, C. F. & TÜMMLER, B. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2, 150.
- KREITMEIER, M., ARDERN, Z., ABELE, M., LUDWIG, C., SCHERER, S. & NEUHAUS, K. 2022. Spotlight on alternative frame coding: Two long overlapping genes in *Pseudomonas aeruginosa* are translated and under purifying selection. *iScience*, 25, 103844.
- KUMARASWAMI, M., AVANIGADDA, L., RAI, R., PARK, H.-W. & HOWE, M. M. 2011. Genetic analysis of phage Mu Mor protein amino acids involved in DNA minor groove binding and conformational changes. *The Journal of biological chemistry*, 286, 35852-35862.
- LABRIE, S. J., SAMSON, J. E. & MOINEAU, S. 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 317-327.
- LAVIGNE, R., LECOUTERE, E., WAGEMANS, J., CENENS, W., AERTSEN, A., SCHOofs, L., LANDUYT, B., PAESHUYSE, J., SCHEER, M., SCHOBERT, M. & CEYSSENS, P. J. 2013. A multifaceted study of *Pseudomonas aeruginosa* shutdown by virulent podovirus LUZ19. *mBio*, 4, e00061-13.

- LINNEY, E. & HAYASHI, M. 1974. Intragenic regulation of the synthesis of  $\Phi$ X174 gene A proteins. *Nature*, 249, 345-348.
- LUNDGREN, B. R., VILLEGAS-PEÑARANDA, L. R., HARRIS, J. R., MOTTERN, A. M., DUNN, D. M., BODDY, C. N. & NOMURA, C. T. 2014. Genetic analysis of the assimilation of C5-dicarboxylic acids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*, 196, 2543-51.
- MCLEAN, B. W., WISEMAN, S. L. & KROPINSKI, A. M. 1997. Functional analysis of sigma-70 consensus promoters in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Can J Microbiol*, 43, 981-5.
- MORADALI, M. F., GHODS, S. & REHM, B. H. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 39.
- ROGOZIN, I. B., SPIRIDONOV, A. N., SOROKIN, A. V., WOLF, Y. I., JORDAN, I. K., TATUSOV, R. L. & KOONIN, E. V. 2002. Purifying and directional selection in overlapping prokaryotic genes. *Trends Genet*, 18, 228-32.
- SALMOND, G. P. & FINERAN, P. C. 2015. A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol*, 13, 777-86.
- SANGER, F., AIR, G. M., BARRELL, B. G., BROWN, N. L., COULSON, A. R., FIDDES, J. C., HUTCHISON, C. A., SLOCOMBE, P. M. & SMITH, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature*, 265, 687-695.
- STARK, R., GRZELAK, M. & HADFIELD, J. 2019. RNA sequencing: the teenage years. *Nature Reviews Genetics*, 20, 631-656.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J., BRINKMAN, F. S., HUFNAGLE, W. O., KOWALIK, D. J., LAGROU, M., GARBER, R. L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L. L., COULTER, S. N., FOLGER, K. R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G. K., WU, Z., PAULSEN, I. T., REIZER, J., SAIER, M. H., HANCOCK, R. E., LORY, S. & OLSON, M.

- V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406, 959-64.
- TACCONELLI, E., CARRARA, E., SAVOLDI, A., HARBARTH, S., MENDELSON, M., MONNET, D. L., PULCINI, C., KAHLMETER, G., KLUYTMANS, J., CARMELI, Y., OUELLETTE, M., OUTTERSON, K., PATEL, J., CAVALERI, M., COX, E. M., HOUCHEMS, C. R., GRAYSON, M. L., HANSEN, P., SINGH, N., THEURETZBACHER, U. & MAGRINI, N. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18, 318-327.
- WEISBEEK, P. J., BORRIAS, W. E., LANGEVELD, S. A., BAAS, P. D. & VAN ARKEL, G. A. 1977. Bacteriophage phiX174: gene A overlaps gene B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2504-8.
- WICKE, L., PONATH, F., COPPENS, L., GEROVAC, M., LAVIGNE, R. & VOGEL, J. 2021. Introducing differential RNA-seq mapping to track the early infection phase for *Pseudomonas* phage  $\phi$ KZ. *RNA Biol*, 18, 1099-1110.
- WRIGHT, B. W., MOLLOY, M. P. & JASCHKE, P. R. 2022. Overlapping genes in natural and engineered genomes. *Nature Reviews Genetics*, 23, 154-168.
- WRIGHT, B. W., RUAN, J., MOLLOY, M. P. & JASCHKE, P. R. 2020. Genome Modularization Reveals Overlapped Gene Topology Is Necessary for Efficient Viral Reproduction. *ACS Synth Biol*, 9, 3079-3090.
- WU, H., ZHANG, Y., JIANG, Y., WU, H., SUN, W. & HUANG, Y. P. 2021. Characterization and Genomic Analysis of  $\phi$ SHP3, a New Transposable Bacteriophage Infecting *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Virol*, 95.
- ZHAO, X., CHEN, C., SHEN, W., HUANG, G., LE, S., LU, S., LI, M., ZHAO, Y., WANG, J., RAO, X., LI, G., SHEN, M., GUO, K., YANG, Y., TAN, Y. & HU, F. 2016. Global Transcriptomic Analysis of Interactions between

*Pseudomonas aeruginosa* and Bacteriophage PaP3. *Scientific Reports*, 6, 19237.

ZHONG, Q., YANG, L., LI, L., SHEN, W., LI, Y., XU, H., ZHONG, Z., CHEN, M. & LE, S. 2020. Transcriptomic Analysis Reveals the Dependency of *Pseudomonas aeruginosa* Genes for Double-Stranded RNA Bacteriophage phiYY Infection Cycle. *iScience*, 23, 101437.

## **ANEXOS**

### **Anexo 1. Medios y soluciones.**

#### **Medios**

- Medio LB: 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl. Agregar 20 g agar cuando se preparan cajas. Llevar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.
- SOB: 20 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, 10 ml KCl 250 mM. Esterilizar con autoclave.
- TMG: 11.7 g NaCl, 1 g gelatina, 1 ml tris HCl 1 M a pH 8.0, 0.5 ml MgSO<sub>4</sub> 1 M. Ajustar el pH a 7.4 con KOH. Esterilizar con autoclave.
- TØ suave: 10 g bacto-triptona, 10 g agar, 2.5 g NaCl, 2 ml NaOH 2 M. Agregar 1 ml MgSO<sub>4</sub> 1 M cuando se preparen cajas. Llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar con autoclave.

#### **Diálisis de fagos**

- Solución de diálisis: 25 ml Tris-Hcl 2M(pH de 7-8), 2.5ml NaCl 4M, 2.5 ml de MgCl<sub>2</sub> 4M. Aforar a 1000 ml

#### **Preparación de células quimiocompetentes**

- Solución TfbI: 3 ml KOAc 5 M, 6g RbCl<sub>2</sub>, 5 ml CaCl<sub>2</sub> 1 M, 12.5 ml MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 2 M, 75 ml glicerol al 100%. Ajustar pH a 5.8 con ácido acético. Esterilizar por filtración.
- Solución TfbII: 1 g MOPS, 37.5 ml CaCl<sub>2</sub> 1 M, 10 ml RbCl<sub>2</sub> 0.5 M, 75 ml glicerol al 100%. Ajustar pH a 6.5-6.8 con NaOH. Esterilizar por filtración.

#### **Electroforesis**

- Buffer stock TAE 50X: 242 g tris, 57.1 ml ácido acético, 100 ml EDTA 0.5 M pH 8.0. Llevar a un litro con agua destilada.

#### **Enriquecimiento de proteínas**

- Solución stock tris-HCl 1 M pH 8.0: 60.57 g tris pH 8.0. Llevar a 500 ml con agua milli Q (ajustar el pH a 8.0 con HCl). Esterilizar por filtración.

- Solución stock NaCl 5 M: 146.1 g NaCl. Llevar a 500 ml con agua milli Q. Esterilizar por filtración.

El volumen de las siguientes soluciones va a depender del número de muestras a tratar y se preparan al momento de usar a partir de los stocks arriba mencionados. Los siguientes cálculos están ajustados para el volumen requerido en este trabajo:

- Buffer de lisis: 1.5 ml tris-HCl 1M pH 8.0, 3 ml NaCl 5 M, 150  $\mu$ l Tritón X-100, 21.43  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoetanol, 1.5 ml glicerol 100%, 0.02 g imidazol. Llevar a 30 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de equilibrio: 2.5 ml tris-HCl 1 M pH 8.0, 5 ml NaCl 5 M, 25  $\mu$ l Tritón X-100, 2.5ml glicerol 100%. Llevar a 50 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de lavado: 25 ml tris-HCl 1 M pH 8.0, 50 ml NaCl 5 M. Llevar a 500 ml con agua destilada estéril.
- Buffer de elución: 50 ml de buffer de lavado, 1.02 g imidazol.

### **Gel de proteínas**

- Monómeros (49.5%T, 3%C): 48 g de acrilamida, 1.5 g de bis-acrilamida. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril. Filtrar y guardar a 4°C en frasco ámbar.
- Buffer gel: 36.4 g tris, 3 g SDS. Llevar a 100 ml con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.45 con HCl). Filtrar y guardar a 4°C.
- Buffer cátodo: 12.22 g tris, 17.92 g tricina, 1 g SDS. Llevar a un litro con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.25 con NaOH).
- Buffer ánodo: 24.2 g tris. Llevar a un litro con agua milli Q estéril (ajustar el pH a 8.9 con HCl).
- Buffer de lisis para proteínas: 2.5 ml tris-HCl 0.125 M pH 6.8, 4 ml SDS 10%, 2 ml glicerol, 1 ml  $\beta$ -mercaptoetanol. Llevar a 10 ml con agua destilada estéril.

- Solución de tinción: 0.125 g Coomassie Blue R-250, 200 ml metanol, 3.5 ml ácido acético. Mezclar antes el Coomassie Blue R-250 con el metanol durante 5 min. Llevar a 500 ml con agua destilada.
- Solución para desteñir: 50 ml metanol, 35 ml ácido acético. Llevar a 500 ml con agua destilada.

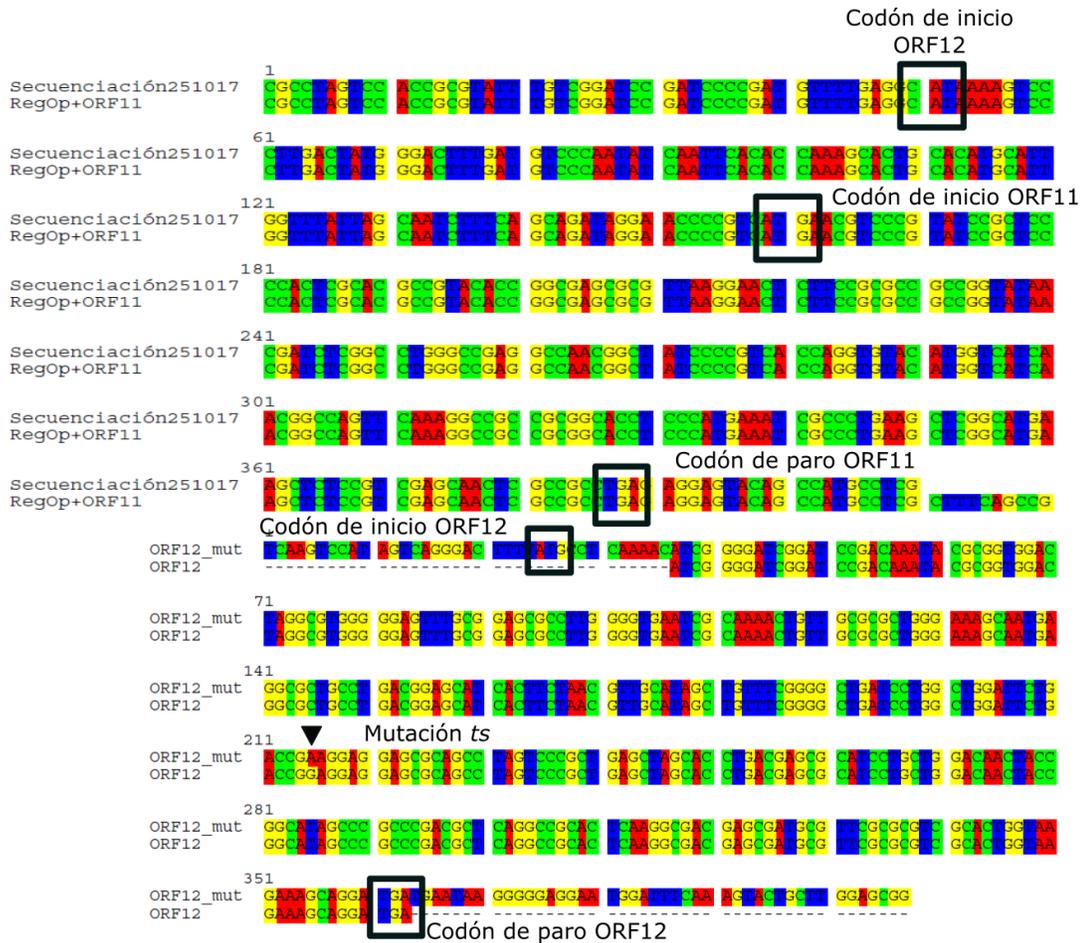
#### **Tinción con Nitrato de Plata**

- Solución Fijadora: 50% metanol, 10% ácido acético, acetato de amonio 100 mM.
- Solución desarrolladora: 2% carbonato de sodio anhidro, 0.036% formaldehído.

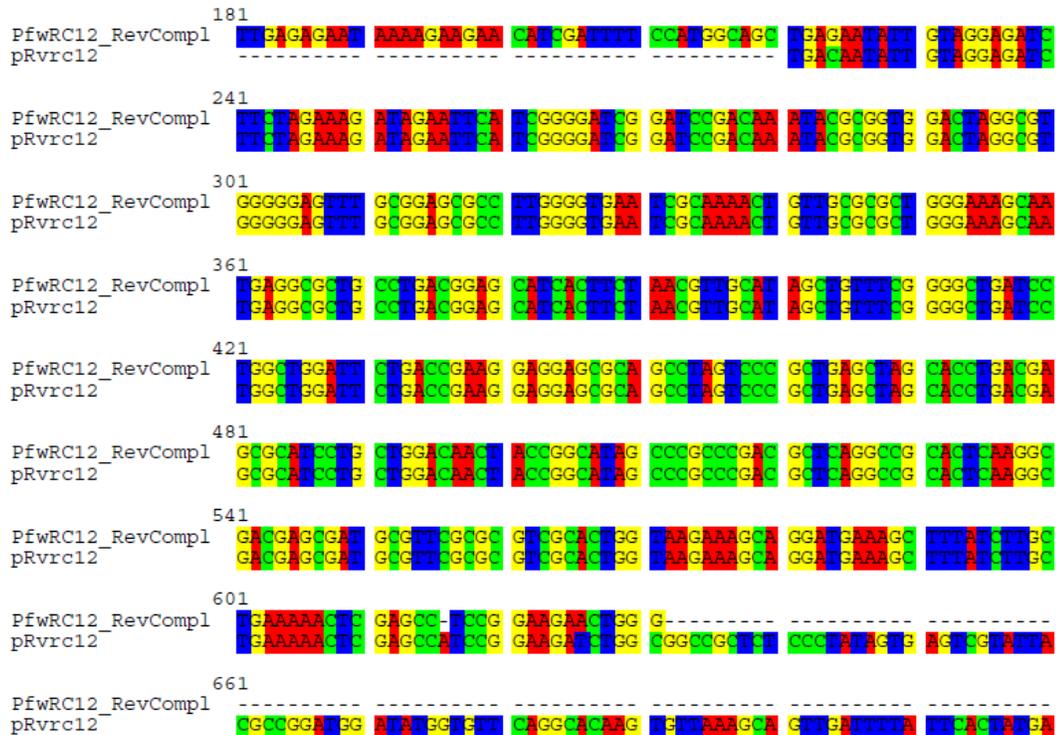
#### **Western blot**

- Buffer de transferencia: 100 ml tank buffer, 200 ml metanol. Llevar a un litro con agua destilada.
- Tank buffer: 12 g tris, 57.6 g glicina, 40 ml de SDS al 10%. Llevar a un litro con agua destilada. No es necesario medir el pH.
- Stock TBS 10X: 6.05 g Tris, 8.76 g NaCl. Llevar a un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7.6 con HCl 1 M.
- TBS-T 0.05%: 50 ml stock TBS 10X, 1 ml Tween 20. Llevar a 500ml con agua destilada.

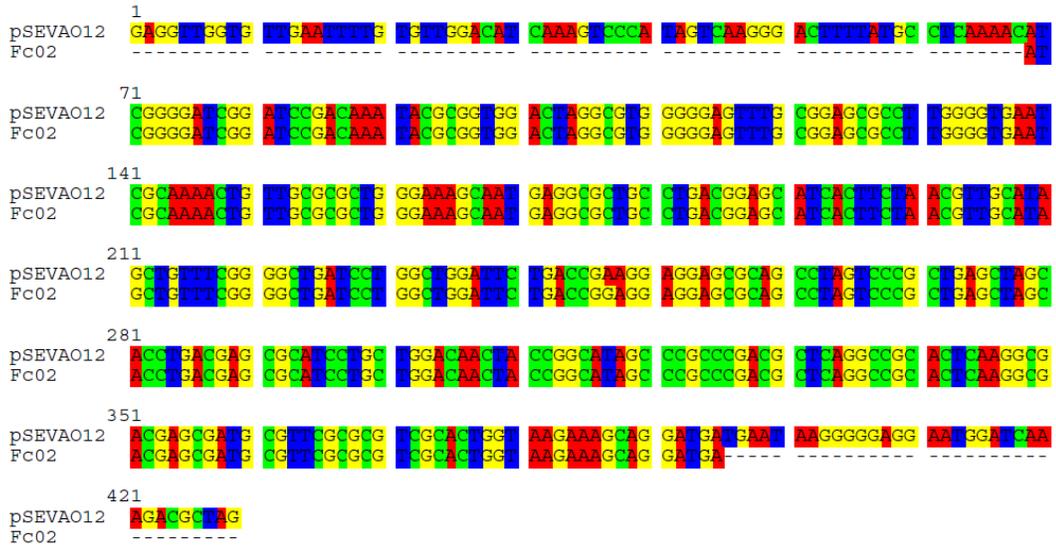
## Anexo 2. Figuras Suplementarias



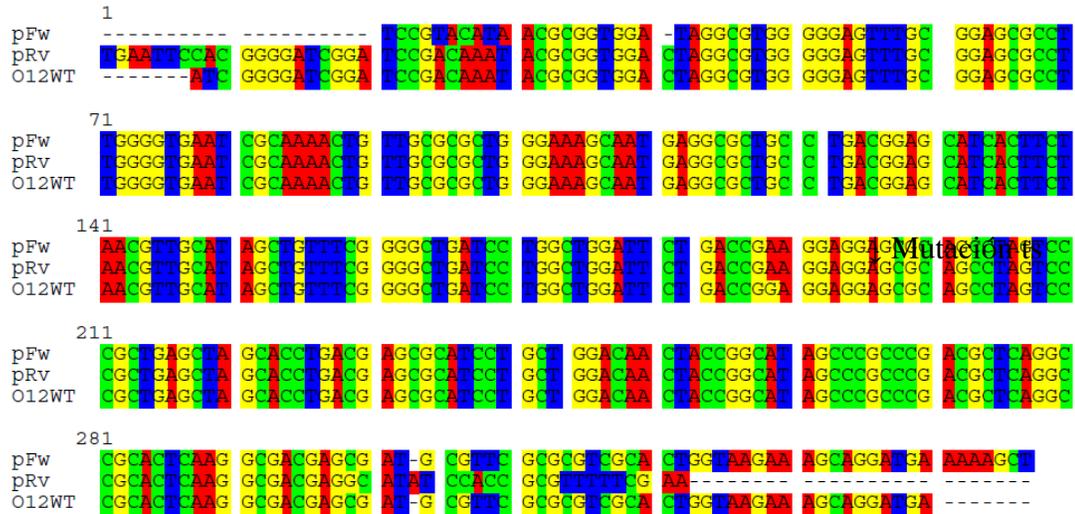
**Figura Suplementaria 1.** Secuencia de la región intergénica del fago Fc02\_mutc53. Alineamientos de la secuencia del ADN del fago mutante (secuencia superior) con la secuencia de Fc02 *WildType* (secuencia inferior). En rectángulos negros los codones de inicio y paro para los ORF's 11 y 12, la mutación está señalada con un triángulo negro.



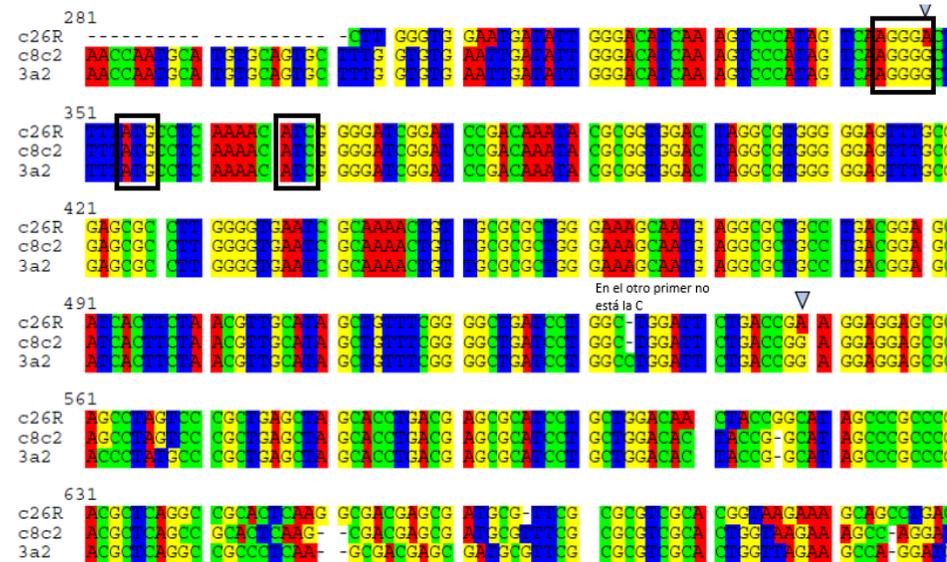
**Figura Suplementaria 2.** Alineamiento de la secuencia del gen clonado en el vector pJET1.2/blunt, se muestra el resultado de la secuenciación usando los *primers* indicados por el proveedor para secuenciar el sitio múltiple de clonación.



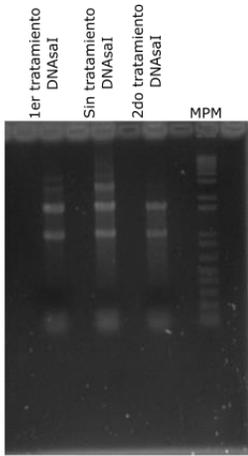
**Figura Suplementaria 3.** Alineamiento de la secuencia del gen O12*repts* clonado en el vector pSEVA648(secuencia superior) con la secuencia del fago Fc02.



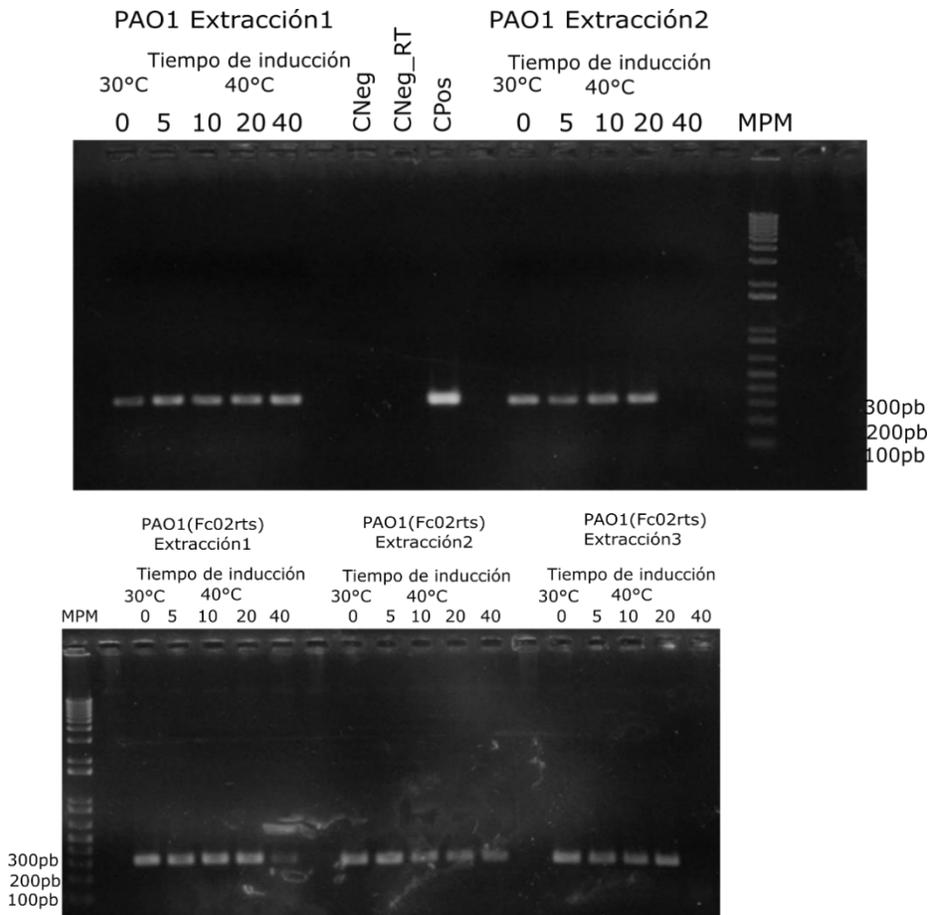
**Figura Suplementaria 4.** Secuencia parcial del O12ts después de la recombinación. Alineamiento de la secuencia del ADN del fago mutante (primer y segundo carril) con la secuencia de Fc02 *WildType* (secuencia inferior). Esta indicado con una flecha la posición de la mutación.



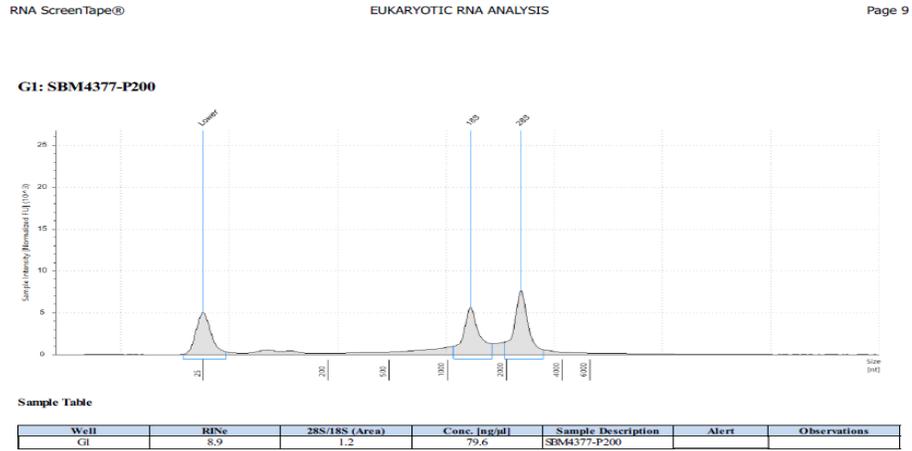
**Figura Suplementaria 5.** Secuencia del ADN de 3 fagos después del procedimiento de recombinación. Alineamiento de nucleótidos de la región del O12, el primer carril el candidato c26R (mutación *ts*), segundo carril candidato c8c2 y tercer carril candidato 3a2. Solo se indicaron con un rectángulo azul las mutaciones que se identificaron en ambos primers usados para secuenciar.



**Figura suplementaria 6.** Remoción de ADN genómico de la muestra de 40 minutos. Se muestran 4 carriles cargados, en la parte superior se indica el tratamiento de cada carril. El último carril de la derecha corresponde al marcador de peso molecular.

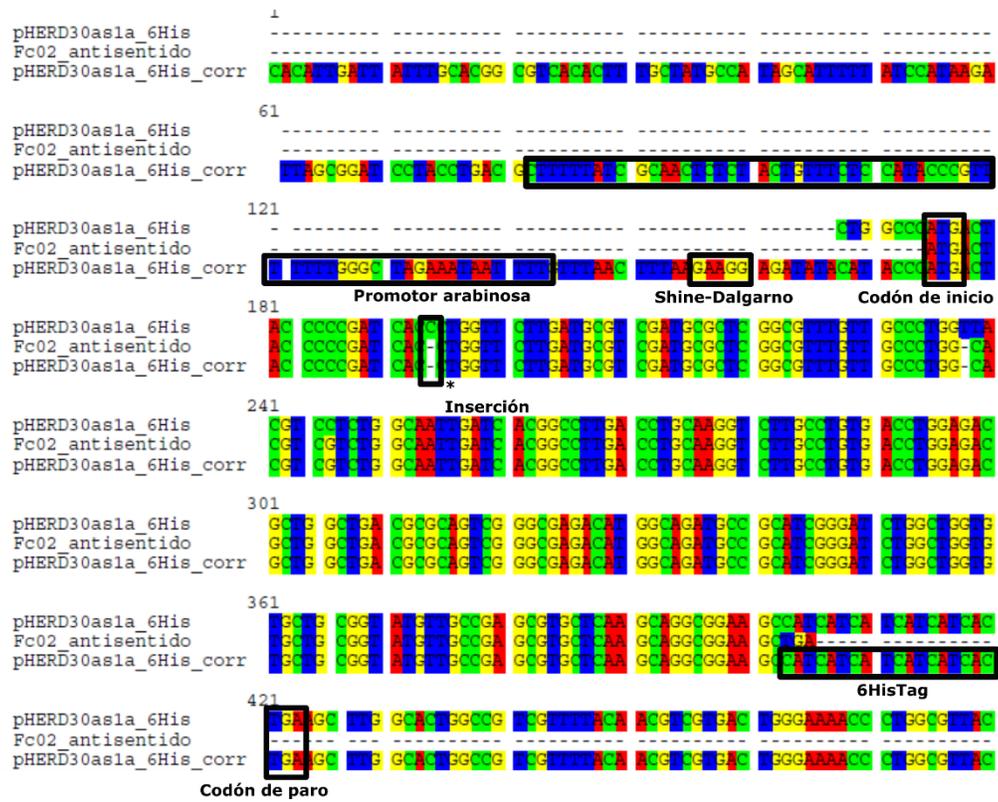


**Figura Suplementaria 7.** Geles de Agarosa al 1% en TAE. Se amplificó el gen 16S en cDNA a partir de las muestras que se indican en la parte superior de cada carril.



**Figura suplementaria 8.** Electroforesis capilar del RNA. Electroferograma de una de las 30 muestras, obtenido en el RNA Screen Tape. El valor del RIN es calculado por el e





**Figura suplementaria 10. Clonación pHERD30 $\Delta$ as1a.** Alineamiento de la secuencia de Fc02 con las secuencias del plásmido con la inserción *olg1C19*, y el plásmido corregido sin inserción.