



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Genètica i Microbiologia

**Caracterització del genoma i anàlisi del
regulador gènic del bacteriòfag SE1 de
*Salmonella enterica***

Núria Busquets i Martí

2005

Índex

1. Introducció	1
1.1. Generalitats dels bacteriòfags	1
1.1.1. Història.....	1
1.1.2. Bacteriòfags: composició i estructura	2
1.1.2.1. Composició.....	2
1.1.2.1.1. Àcids nucleics virals.....	2
1.1.2.1.2. Proteïnes virals.....	4
1.1.2.1.3. Lípids virals.....	5
1.1.2.2. Estructura	5
1.1.3. Taxonomia	6
1.1.4. Adsorció dels bacteriòfags i injecció de l'àcid nucleic	8
1.2. Bacteriòfags virulents	11
1.2.1 Expressió del genoma del bacteriòfag virulent T4.....	13
1.2.2 Reciclatge de l'mRNA del bacteriòfag T4.....	15
1.2.3. Morfogènesi del bacteriòfag T4 i lisi cel·lular	15
1.3. Bacteriòfags temperats	16
1.3.1. Organització gènica dels fags lambdoides.....	18
1.3.1.1. Estructura modular	18
1.3.1.2. Organització funcional	19
1.3.2. Recircularització del DNA viral.....	20
1.3.3. Decisió entre cicle lític i lisogènic.....	21
1.3.3.1. Relacions interprotèiques: proteïnes cII, cIII i FtsH.....	22
1.3.3.1.1. La proteïna CII.....	22
1.3.3.1.2. La proteïna FtsH.....	23
1.3.3.1.3. La proteïna cIII.....	24
1.3.3.2. Factors externs que afecten la decisió.....	25
1.3.4. Integració del Profa.	27
1.3.4.1. La integrasa del bacteriòfag.....	28
1.3.4.2. El factor IHF	29

1.3.4.3. Intasoma i recombinació integrativa	29
1.3.5. Modificacions en les cèl·lules lisogèniques.....	31
1.3.5.1. Conversió lisogènica	31
1.3.5.2. Sistemes d'exclusió de la sobreinfecció de soques lisogenes pel fag P22	33
1.3.6. Manteniment de la lisogènia i inducció del cicle lític: regulador o interruptor genètic	35
1.3.6.1. Manteniment del cicle lisogènic	36
1.3.6.3.1. <i>Octamerització del repressor cI</i>	39
1.3.6.2. Inducció del cicle lític.....	40
1.3.6.3. Interaccions proteïna- DNA.....	42
1.3.6.4. Element regulador <i>immI</i> del bacteriòfag P22.....	45
1.3.7. Regulació del cicle lític. Efecte dels antiterminadors	47
1.3.7.1. La proteïna antiterminadora N	48
1.3.7.2. La proteïna antiterminadora Q.....	49
1.3.8. Escissió del profag.....	50
1.3.9. Replicació del DNA viral.....	51
1.3.10. Ensamblatge de les partícules víriques.....	54
1.3.11. Lisi cel·lular.....	56
1.3.11.1. Regulació de l'holina.....	57
1.3.12. Bacteriòfags com agents transductors.....	58
1.3.12.1. Transducció especialitzada	58
1.3.12.2. Transducció generalitzada	59
1.3.13. Bacteriòfag SE1	60
1.4. Objectius	62
2. Material i mètodes	65
2.1. Soques, plasmidis i oligonucleòtids	65
2.2. Mètodes de cultiu i conservació de soques.....	75
2.2.1. Medis i solucions de cultiu	75
2.2.2. Antibiótics utilitzats.....	78
2.3. Mètodes microbiològics	78

2.3.1. Càlcul del nombre de viables.....	78
2.3.2. Test de la gota.....	79
2.3.3. Sembra en doble capa.....	79
2.3.4. Preparació de llisats fàgics.....	79
2.3.5. Titulació de llisats fàgics.....	80
2.3.6. Augment del títol d'un llisat fàgic.....	80
2.3.7. Obtenció de mutants de calva clara.....	81
2.3.8. Obtenció de soques lisogenes.....	81
2.3.9. Recuperació de bacteriòfags a partir d'una soca lisogena.....	82
2.3.10. Tècnica de <i>One Step Growth</i>	82
2.3.11. Experiment de Doerman.....	83
2.3.12. Eficiència d'inducció profàgica espontània.....	83
2.3.13. Eficiència de lisogenització.....	84
2.4. Mètodes genètics.....	85
2.4.1. Transformació.....	85
2.4.1.1. Transformació amb clorur càlcic.....	85
2.4.1.1.1. Preparació de cèl·lules competents.....	85
2.4.1.1.2. Transformació per xoc tèrmic.....	86
2.4.1.2. Electrotransformació.....	86
2.4.1.2.1. Preparació de les cèl·lules competents.....	87
2.4.1.2.2. Electrotansformació.....	87
2.4.2. Obtenció de mutants o inactivació de gens utilitzant productes de PCR.....	88
2.4.2.1. Preparació del DNA per a la substitució.....	88
2.4.2.2. Transformació de la soca receptora.....	89
2.4.2.3. Escissió del gen de resistència.....	90
2.5. Mètodes de manipulació del DNA.....	91
2.5.1. Extracció de DNA fàgic.....	91
2.5.2. Extracció de DNA cromosòmic.....	93
2.5.3. Extracció de DNA plasmídic.....	94
2.5.3.1. Miniextracció de DNA plasmídic.....	94
2.5.3.2. Maxiextracció de DNA plasmídic.....	95

2.5.4. Digestió amb enzims de restricció i tampons.....	96
2.5.5. Electroforesi de DNA	97
2.5.5.1. Preparació dels gels d'agarosa	97
2.5.5.2. Marcadors.....	98
2.5.6. Quantificació del DNA.....	98
2.5.7. Clonació en vectors plasmídics	99
2.5.7.1. Purificació de fragments de DNA.....	99
2.5.7.2. Preparació dels vectors i dels inserts.....	100
2.5.7.2.1. Reompliment d'extrems.....	100
2.5.7.2.2. Defosforilació de l'extrem 5'.....	100
2.5.7.2.3. Precipitació del DNA.....	101
2.5.7.2.4. Reacció de lligació.....	101
2.5.8. Amplificació del DNA.....	102
2.5.8.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	102
2.5.8.2. Seqüenciació.....	104
2.5.8.2.1. Marcatge amb el kit <i>fmol[®] DNA Sequencing System</i>	104
2.5.8.2.2. Marcatge amb el kit <i>thermo sequenase Cy5 Dye terminator cycle sequencing System</i>	105
2.5.8.2.4. Preparació del gel de seqüenciació.....	107
2.6. Mètodes de manipulació de l'RNA.....	107
2.6.1. Extracció d'RNA	108
2.6.1.1. Extracció d'RNA utilitzant el kit <i>RNeasy[®] Mini</i> (QUIAGEN)	108
2.6.2. Tractament amb DNAsaI	106
2.6.3. Precipitació del RNA	109
2.6.4. Quantificació de RNA	110
2.6.5. Amplificació del RNA.....	110
2.6.5.1. RT-PCR	110
2.7. Mètodes de manipulació de proteïnes.....	111
2.7.1. Clonació i sobreexpressió de proteïnes	111
2.7.1.1. Clonació en el vector pET15b	112
2.7.1.1.1. Preparació del DNA que codifica per la proteïna que es desitja sobreexpressar	112
2.7.1.1.2. Preparació del vector plasmídic de sobreexpressió pET15b.....	113

2.7.1.2. Sobreexpressió de proteïnes	113
2.7.2. Extractes crus de proteïnes	114
2.7.3. Purificació de proteïnes	115
2.7.4. Gels d'electroforesis de proteïnes SDS-PAGE.....	116
2.7.5. Assaig de mobilitat electroforètica (EMSA).....	118
2.7.5.1. Marcatge de fragments de DNA	118
2.7.5.2. Reacció d'unió proteïna-DNA	118
2.7.5.3. Preparació del gel de poliacrilamida i electroforesi	119
2.7.5.4. Transferència.....	120
2.7.5.5. Revelat i detecció.....	120
2.7.6. Assaigs de protecció contra la DNAsaI o de <i>footprinting</i>	121
2.8. Tampons i solucions	123
3. Resultats i discussió	135
3.1. Seqüenciació completa i caracterització gènica del genoma del bacteriòfag SE1	135
3.1.1. Seqüència completa del genoma del bacteriòfag SE1	135
3.1.1.1. Construcció de la genoteca fàgica	135
3.1.1.2. Seqüenciació i alineament de les seqüències obtingudes	136
3.1.2. Anàlisi de la seqüència genòmica del bacteriòfag SE1	136
3.1.2.1. Comparació de la seqüència genòmica del fag SE1 amb la base de dades GeneBank	136
3.1.2.2. Possibles terminadors de transcripció en el genoma del fag SE1.....	144
3.1.2.3. Control traduccional: <i>Ribosome Binding Sites</i> (RBS)	145
3.1.2.4. Ús de codó.....	146
3.1.2.5. Organització gènica. Evidència modular	148
3.1.2.6. El genoma del fag SE1 com a mosaic genètic	153
3.1.2.7. Comparació gènica del fag SE1 en relació amb altres bacteriòfags. Consideracions evolutives	157
3.1.2.7.1. Comparació filogenètica entre els fags P22, ST64T, ST104 i SE1	160
3.2. Conversió lisogènica	161
3.3. Estudi del regulador o interruptor genètic del bacteriòfag SE1	165

3.3.1. Establiment de la lisogènia. Activador transcripcional cII del bacteriòfag SE1	165
3.3.2. Clonació, sobreexpressió i purificació del repressor cI del fag SE1	167
3.3.3. Identificació dels operadors als quals s'uneix la proteïna cI del bacteriòfag SE1	169
3.3.3.1. Especificitat de la proteïna cI del fag SE1 per la regió reguladora	170
3.3.3.2. Unió cooperativa de la proteïna cI a la regió reguladora	171
3.3.3.3. Acotament de l'operador O _{R3} del bacteriòfag SE1	172
3.3.3.4. Assaig de protecció de la DNAsaI o <i>footprinting</i> de la regió reguladora per part de la proteïna cI del bacteriòfag SE1	173
3.3.3.5. Anàlisi mutacional del motiu de reconeixement per cI	175
3.3.3.6. Caracterització de la seqüència consens dels operadors del interruptor genètic	176
3.3.4. Comparació de la proteïna cI del fag SE1 i els seus operadors respecte altres bacteriòfags relacionats	178
3.4. Caracterització del gen <i>orf23</i> del bacteriòfag SE1.....	182
3.4.1. Anàlisi transcripcional del gen <i>orf23</i>	182
3.4.2. Construcció del mutant <i>orf23</i> del bacteriòfag SE1.....	184
3.4.3. Estudi del cicle lític dels bacteriòfags SE1 salvatge i el SE1 mutant <i>orf23</i>	187
3.4.4. Anàlisi de l'efecte del mutant lisogen per SE1 <i>orf23</i> en l'establiment de la lisogènia	188
3.4.5. Anàlisi de la integració del bacteriòfag SE1.....	190
3.4.6. Anàlisi de l'efecte del mutant lisogen per SE1 <i>orf23</i> en el manteniment de la lisogènia.....	194
3.4.7. Anàlisi dels dominis de la proteïna Orf23 i de la proteïna cI del bacteriòfag SE1	195
3.4.7.1. Anàlisi comparatiu dels dominis de la proteïna Orf23.....	195
3.4.7.2. Anàlisi comparatiu del domini amino-terminal de la proteïna cI	199
3.4.8. Assaigs d'inducció del bacteriòfag SE1 salvatge i del bacteriòfag SE1 mutant pel gen <i>orf23</i> amb mitomicina C	201

4. Conclusions	207
5. Bibliografia	211

1. Introducció

1.1. Generalitats dels bacteriòfags

1.1.1. Història

El primer indici sobre el que es coneix com a bacteriòfag va ser publicat fa més d'un segle. L'any 1896, Hankin es va adonar que alguna substància present a les aigües dels rius Ganges i Jumna, a l'Índia, tenia una important activitat antimicrobiana i, a més, podia passar a través dels filtres de porcellana, usats en aquella època per retenir els bacteris. El 1915, Frederic Tort va aïllar unes entitats filtrables capaces de destruir cultius bacterians i produir unes petites zones clares en confluents bacterians. Dos anys més tard, el 1917, Félix D'Hèrelle, un microbiòleg francocanadenc que treballava a l'Institut Pasteur de Paris, va anunciar el mateix fenomen i va anomenar bacteriòfags (o fags) els virus causants de les zones clares en un conluent bacterià. D'Hèrelle s'adonà que els bacteriòfags tenien la capacitat de matar bacteris que causaven malalties infeccioses en humans, plantes i animals.

Félix D'Hèrelle va potenciar l'ús terapèutic dels bacteriòfags. L'any 1933 va cofundar juntament amb George Eliava, un microbiòleg de Georgia, un institut per a la investigació dels bacteriòfags a la república soviètica de Georgia. El *George Eliava Institute of Bacteriophage* proveïa bacteriòfags per a usos terapèutics a tota la Unió Soviètica després de la Segona Guerra Mundial, ja que els antics països del bloc comunista van ser una excepció a l'ús generalitzat dels antibiòtics per combatre les infeccions.

A l'Oest, tot i que l'ús de la teràpia fàgica va decaure quan la penicil·lina i altres antibiòtics químics van ser descoberts a principis dels anys quaranta, la recerca dels bacteriòfags continuava, la seva naturalesa i composició química van ser clarament establertes, i es va demostrar que estaven formats de DNA i proteïnes. Als anys trenta i les dècades posteriors, pioners en la virologia, com ara Luria, Delbruck i molts d'altres van utilitzar aquests virus com a models genètics, d'estructura viral, etcètera. Els bacteriòfags han estat fins ara molt importants per al desenvolupament del coneixement d'altres virus, incloent-hi els que afecten els humans, més complexos i difícils de propagar. L'any 1952, gràcies a l'experiment de Hershey i Martha Chase amb

el bacteriòfag T2 es va demostrar, que l'àcid nucleic és el que únicament entra a la cèl·lula hoste i que aquest presenta la informació genètica necessària i suficient per a la formació de nous bacteriòfags a l'interior de la cèl·lula bacteriana. Actualment hi ha un renovat interès per la teràpia fàgica, a causa de l'augment de les resistències bacterianes a antibiòtics generades per l'ús poc racional d'aquests en tractaments per a la salut pública (López, 2004).

1.1.2. Bacteriòfags: composició i estructura

Els bacteriòfags (virus bacterians o fags) són agents infecciosos que es repliquen com a paràsits intracel·lulars obligats dins dels bacteris, i que per fer-ho utilitzen la maquinària biosintètica del seu hoste.

Els bacteriòfags són molt abundants en tot tipus d'hàbitat. Estudis de recompte de bacteriòfags en els sòls han mostrat que s'hi troben molt representats, tant, que s'ha de subratllar el seu paper en la depredació dels bacteris, essent alhora, controlador i estimulador del creixement bacterià (Ashelford *et al.*, 2003). Altres estudis realitzats en gran varietat d'ambients aquàtics han documentat que, generalment, hi ha un ordre de magnitud superior de virus que de bacteris, per la qual cosa es consideren la classe més abundant a la biosfera (Bergh *et al.*, 1989) (Wommack i Colwell, 2000).

1.1.2.1. Composició

Les partícules fàgiques extracel·lulars són metabòlicament inertes i estan formades principalment per àcid nucleic (DNA o RNA, però no ambdós) i proteïnes .

1.1.2.1.1. Àcids nucleics virals

L'àcid nucleic d'un virus conté la informació específica, i el potencial operacional, per modificar la maquinària de la cèl·lula infectada i dirigir-la cap a la producció específica dels components necessaris per a la formació de noves partícules virals.

Hi ha quatre possibles tipus d'àcid nucleic viral: DNA de cadena senzilla, DNA de cadena doble, RNA de cadena senzilla i RNA de cadena doble.

- i. **DNA de cadena doble (dsDNA)** és present a diversos virus, com per exemple el bacteriòfag lambda. Aquest es caracteritza per tenir uns extrems cohesius, amb seqüències complementàries que permeten la formació de molècules circulars de DNA o dímers, una vegada es troba dins de la cèl·lula hoste. D'altra banda, el bacteriòfag P22 presenta dsDNA lineal amb redundància terminal. Aquesta repetició permet la recircularització, per recombinació homòloga, després de la infecció. Altres casos, com el fag SSV1 s'observa dsDNA en forma circular.
- ii. **DNA de cadena senzilla (ssDNA)**, es troba de manera circular en bacteriòfags com el colifag ϕ X174, o de manera lineal en el bacteriòfag ϕ f1.
- iii. **RNA de cadena doble (dsRNA)**, és present, per exemple, en el bacteriòfag ϕ 6, aquest fag conté tres molècules de dsRNA lineal.
- iv. **RNA de cadena senzilla (ssRNA)**, típic de la família *Leviviridae*, on l'RNA serveix directament de RNA missatger, preparat per ser traduït.

Alguns bacteriòfags presenten àcids nucleics que contenen bases modificades per protegir-se de l'atac de les nucleases de l'hoste durant la infecció. Per exemple, el bacteriòfag PBS1 incorpora uracils en substitució de timines. Els bacteriòfags T2, T4 i T6 presenten hidroximetilcitosina en lloc de citosina.

En l'última dècada s'ha desenvolupat una gran varietat de tècniques i mètodes que permeten determinar la seqüència de qualsevol tipus d'àcid nucleic. La primera seqüència completa d'un RNA viral va ser la del fag MS2 d'*Escherichia coli*, determinada pel grup de Walter Fiers, el 1976. L'1977, Fred Sanger i els seus col·laboradors van publicar la seqüència completa del genoma de DNA del colifag ϕ X174. Posteriorment, molts altres genomes virals de més grandària i complexitat han estat seqüenciats totalment o parcialment. La seqüenciació de genomes virals ha permès establir-ne l'organització gènica.

Els genomes virals són més petits que els genomes dels bacteris més simples; per això els virus han desenvolupat estratègies per obtenir una màxima capacitat d'emmagatzemament de la informació genètica. Una d'elles consisteix en el solapament de gens, de manera que dins la seqüència d'un gen s'inclou la seqüència d'un altre que continua més enllà del final del primer. Una altra estratègia consisteix en la superposició de gens, on un segment d'àcid nucleic, que correspon a un gen, inclou

dins seu un altre que codifica una proteïna més petita. Aquesta multiplicitat de marcs de lectura és característica de molts genomes virals, i això implica la necessitat dels bacteriòfags d'una complexa regulació i coordinació de l'expressió gènica.

La grandària del material genètic varia segons el bacteriòfag. Els fags més senzills només codifiquen de 3 a 12 productes gènics, com ara el fag ϕ X174 o el fag filamentós M13. Altres de més complexos presenten molècules d'àcid nucleic de 2×10^5 parells de bases (pb) de llargària que codifiquen uns 100-200 productes gènics, com per exemple el fag T2.

1.1.2.1.2. Proteïnes virals

Les proteïnes virals formen una càpside proteica que té, principalment, dues funcions: d'una banda, protegir l'àcid nucleic dels agents ambientals extracel·lulars, com les nucleases i, de l'altra, permetre la unió del viriò a la membrana de la cèl·lula hoste; aquesta presenta càrrega negativa com a resultat del seu contingut polisacàrid, i no permetria la unió directa de l'àcid nucleic (Dreiseikermann, 1994). Les proteïnes de la càpside no entren dins l'hoste, sinó que injecten l'àcid nucleic a l'interior de la cèl·lula.

Les proteïnes que formen les subunitats de la càpside interaccionen amb la cadena o cadenes d'àcid nucleic viral per formar la partícula vírica. La càpside està formada per múltiples còpies d'una única o d'unes poques proteïnes de baix pes molecular. Per tant, la informació viral per formar la càpside es troba continguda en un nombre reduït de gens. El procés d'ensamblatge de la càpside és independent de les instruccions externes, ja que la informació necessària per construir els complexos moleculars es troba dins de la mateixa proteïna. Aquest fenomen d'autoensamblatge és particularment rellevant per als bacteriòfags (i per a altres sistemes biològics), gràcies als seus atributs d'economia i eficiència, ja que les subunitats defectuoses són eliminades automàticament. Els enllaços entre les subunitats i les interaccions dels aminoàcids de les proteïnes amb el medi aquós són els que determinen la conformació espacial de la proteïna i les múltiples unions formades durant l'agregació de les subunitats, contribuint així, a l'emascament dels llocs potencialment susceptibles a l'acció de les proteases. D'aquesta manera, les proteïnes de la càpside viral adquireixen una major resistència a la calor i a altres agents físics.

1.1.2.1.3. Lípids virals

Alguns bacteriòfags presenten una membrana lipídica, aquesta pot estar localitzada externament, formant un embolcall, com per exemple, el fag $\phi 6$ (Laurinavičius *et al.*, 2004), o bé, internament respecte les proteïnes de la càpside, com és el cas del bacteriòfag PM2 (Camerini-Otero i Franklin, 1972 i Kivelä *et al.*, 2002). Actualment encara no s'ha descrit el mecanisme de formació d'aquesta membrana durant el procés de morfogènesi de la partícula fàgica.

1.1.2.2. Estructura

Les suspensions de partícules fàgiques es conserven durant llargs períodes de temps gràcies a la seva gran estabilitat. Les partícules víriques aconseguixen un estat de mínima energia lliure, establint el màxim nombre d'unions entre les proteïnes que formen la càpside i, com que són relativament asimètriques, és necessari que estiguin disposades de manera simètrica per poder formar aquest màxim nombre d'unions entre elles.

Hi ha un nombre limitat de possibilitats o estructures de la càpside que permeten l'ensamblatge simètric, format de subunitats asimètriques:

- i. **Virus filamentosos:** el DNA dels bacteriòfags filamentosos té una topologia d'anell i està envoltat per proteïnes; aquest conjunt adopta una estructura lineal o filamentosa (Marvin, i Hohn, 1969). Han anomenat bacteriòfags Ff els fags filamentosos fd, f1 i M13, aquests són uns dels virus més petits.
- ii. **Virus esfèrics o icosaèdrics:** disposen les subunitats de proteïna en les cares d'un cos amb simetria cúbica, com l'icosaèdre, constituït a partir de 20 o múltiples de 20 triangles equilàters. Aquest tipus d'estructura representa una de les poques opcions en què subunitats asimètriques poden ser acomodades de manera simètrica sobre la superfície d'una esfera. Aquest tipus de virus es caracteritza per tenir un mínim d'energia lliure; això explica que hi hagi un elevat nombre de virus esfèrics o amb part de la càpside esfèrica.
- iii. **Virus de càpside complexa o de tipus *cap-cua*:** presenten una part en forma de tub (cua), unida a un vèrtex de la carcassa del bacteriòfag (cap). La cua està relacionada amb la interacció bacteriòfag-hoste i la injecció del DNA. Aquests

tipus d'arquitectura es pot subdividir en fags de cua curta, fags de cua llarga no contràctil, i fags amb cues contràctils i complexes amb altres tipus d'estructures com coll, plaques basals i fibres. El bacteriòfag T4 és un clàssic exemple d'aquest tipus de virus. Tot i la seva complexitat estructural, els principis que governen l'ensamblatge d'aquests fags són semblants als dels bacteriòfags més senzills. Els caps d'aquests fags tenen, normalment, una simetria icosaèdrica, les cues tenen una simetria helicoidal i el coll i la placa basal tenen una simetria hexagonal. El cap, la cua i les fibres són ensamblades per vies independents, i unides posteriorment, per formar la partícula vírica madura (Leiman *et al*, 2003).

iv. **Virus pleomòrfics:** adopten diferents tipus de formes.

La grandària de les partícules víriques és variable, des dels més petits que mesuren aproximadament 24 nm, fins als fags més grans, com el bacteriòfag T4, que mesuren de 80-100 nm.

1.1.3. Taxonomia

Durant vuitanta anys s'ha anomenat els bacteriòfags sense cap tipus de normativa, basant-se en criteris morfològics, la qual cosa ha generat un estat de confusió important amb la seva nomenclatura, ja que aquesta no reflecteix les propietats bàsiques dels fags, com el seu àcid nucleic o la seva estructura. Actualment, organismes com ara l'ICTV (*The International Committee on Taxonomy of Viruses*) han descrit una sèrie de normes a seguir per a la formulació d'un nou nom. L'ICTV ha llistat els noms dels bacteriòfags de maneres diferents; agrupant-los per família (taula 1), pel gènere de l'hoste, per ordre alfabètic o numèric (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm).

Taula 1. Breu descripció de les famílies dels bacteriòfags.

Família	Característiques
<i>Corticoviridae</i>	Càpside icosaèdrica amb membrana lipídica, dsDNA circular
<i>Cystoviridae</i>	Càpside icosaèdrica amb embolcall, tres molècules lineals de dsRNA
<i>Fuselloviridae</i>	Pleomòrfic sense càpside amb lípids, dsDNA circular
<i>Inoviridae</i> , gènere <i>Inovirus</i>	Filament llarg amb simetria helicoïdal, ssDNA circular
<i>Inoviridae</i> gènere <i>Plectrovirus</i>	Filaments curts amb simetria helicoïdal, ssDNA circular
<i>Leviviridae</i>	Càpside quasiicosaèdrica, una molècula de ssRNA lineal
<i>Lipothrixviridae</i>	Filaments amb embolcall, dsDNA lineal
<i>Microviridae</i>	Càpside icosaèdrica, ssDNA circular
<i>Myoviridae</i> , A1	Cua contràctil, cap isomètric
<i>Myoviridae</i> , A2	Cua contràctil, cap allargat (ràtio llarg/ample = 1,3-1,8)
<i>Myoviridae</i> , A3	Cua contràctil, cap allargat (ràtio llarg/ample = 2 o més)
<i>Plasmaviridae</i>	Pleomòrfic amb embolcall sense càpside, dsDNA circular
<i>Podoviridae</i> , C1	Cua curta i no contràctil, cap isomètric
<i>Podoviridae</i> , C2	Cua curta i no contràctil, cap allargat (ratio llarg/ample = 1,4)
<i>Podoviridae</i> , C3	Cua curta i no contràctil, cap allargat (ratio llarg/ample = 2,5 o més)
<i>Rudiviridae</i>	Filaments amb simetria helicoïdal, dsDNA lineal
<i>Siphoviridae</i> , B1	Cua llarga i no contràctil, cap isomètric
<i>Siphoviridae</i> , B2	Cua llarga i no contràctil, cap allargat (ràtio llarg/ample = 1,2-2)
<i>Siphoviridae</i> , B3	Cua llarga i no contràctil, cap allargat (ràtio llarg/ample = 2,5 o més)
<i>Tectiviridae</i>	Càpside icosaèdrica amb vesícula lipoproteica a l'interior, dsDNA lineal

La majoria de bacteriòfags són complexos amb l'estructura de *cap-cua* i pertanyen a un nou ordre anomenat Caudovirals. Les tres famílies que formen aquest ordre són les següents: *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae*. Sis gèneres s'han definit en la família *Myoviridae* (per exemple, el gènere "P2-like" virus), sis en la família *Siphoviridae* (per exemple, el gènere " λ -like viruses"), i tres en la família *Podoviridae* (per exemple, el gènere "P22-like viruses"). Aquests gèneres s'han definit basant-se en la replicació del DNA viral, el seu empaquetament, i algunes característiques específiques, com per exemple, la grandària del genoma, cicle lític/lisogènic, etc. (Maniloff i Ackermann, 1998).

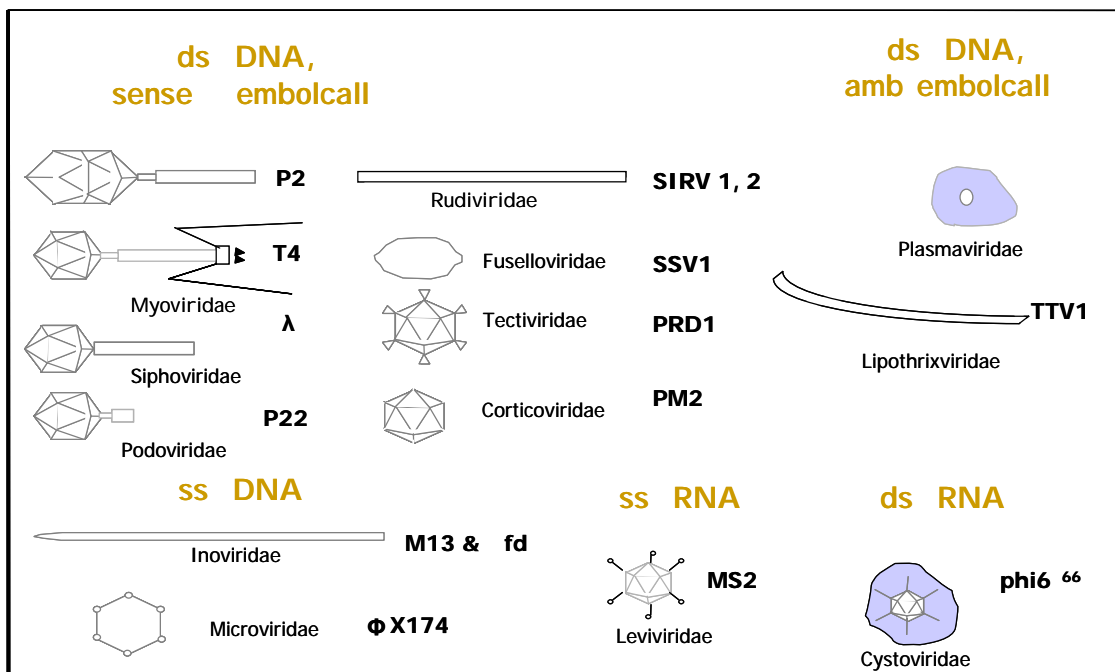


Figura 1.1. Les tretze famílies de bacteriòfags. Figura modificada de Hilla Lee Viener, 2004.

L'augment d'informació de les seqüències genòmiques dels bacteriòfags fa que es plantegi una revaloració dels conceptes d'ordre, família i gènere viral. Amb la informació actual, moltes altres característiques, a part de la morfologia de la càpside o l'estructura viral, poden ser utilitzades per discriminar els bacteriòfags, com ara: el rang d'hoste, la naturalesa patogènica, els mètodes de transmissió, les propietats biofísiques o antigèniques i la seqüència de l'àcid nucleic (Lawrence *et al.*, 2002).

1.1.4. Adsorció dels bacteriòfags i injecció de l'àcid nucleic

Hi ha una gran especificitat en la interacció entre el bacteriòfag i el seu hoste a causa del procés d'adsorció o fixació. Aquesta interacció depèn de la concentració relativa entre fags i bacteris, però també de la càrrega iònica de l'entorn, temperatura, pH i cofactors orgànics que l'envolten. La partícula fàgica presenta una o diverses proteïnes externes, fibres de la cua en bacteriòfags complexos *cap-cua* o una estructura anàloga en bacteriòfags sense cua, que interacciona amb components específics de la superfície de la cèl·lula, anomenats receptors. Aquesta primera interacció és reversible. Els receptors són components habituals de la paret cel·lular de l'hoste, com ara proteïnes de membrana, polisacàrids, complexos lipoproteïna-polisacàrids, fimbries, flagels, pili, càpsula o proteïnes transportadores (Lindberg, 1973). Mutacions en els receptors fan que les cèl·lules esdevinguin resistents a la infecció fàgica. Aquestes mutacions provoquen la supervivència només dels fags que hagin adquirit mutacions a la cua; aquests canvis s'anomenen mutacions de rang d'hoste. Aquests dos successos coordinats mostren el vincle entre l'evolució dels bacteriòfags i les cèl·lules que infecten.

Després del reconeixement es produeixen canvis conformacionals en les proteïnes de la càpside viral i, fins i tot, a vegades, reorganitzacions estructurals del virió sencer, com la contracció de la cua, en el cas del bacteriòfag T4. En aquest moment, la interacció esdevé irreversible, produint canvis que són dirigits per senyals des de la cèl·lula i són induïts per la interacció del bacteriòfag amb el seu receptor, com ara canvis de pH, ambient iònic o per acció de proteases.

En el cas dels bacteriòfags que infecten cèl·lules gramnegatives, i a causa que la replicació de l'àcid nucleic viral té lloc al citoplasma, aquest ha de ser capaç de travessar la membrana externa, l'espai periplasmàtic i la membrana interna.

Segons la morfologia del bacteriòfag, i el tipus d'àcid nucleic, hi ha diferents estratègies per a la internalització del genoma viral. Els bacteriòfags utilitzen mecanismes actius per penetrar la paret cel·lular, presenten gens que codifiquen enzims que modifiquen el peptidoglicà, com les transglicosilases o les endopeptidases, enzims lítics semblants als lisozims, que juguen un paper important en la penetració de la paret cel·lular i formen part dels components estructurals del virió. Per exemple, la placa basal del bacteriòfag T4 conté una proteïna (Gp5) amb activitat lítica, concretament és una *N*-acetilmuramidasa; aquesta proteïna sembla ser necessària per facilitar la penetració de

la cua del bacteriòfag a través de la capa de peptidglicà (Kao i McClain, 1980a i 1980b i Nakagawa *et al*, 1985).

La majoria de bacteriòfags han adoptat un mecanisme d'entrada on la càpside no s'internalitza, sinó que es manté estable sobre la superfície de la cèl·lula hoste. L'àcid nucleic és alliberat de la càpside a través d'un vèrtex en els bacteriòfags icosaèdrics o a través d'un complex circular situat en un dels vèrtex on hi ha la cua en els bacteriòfags amb l'estructura complexa de *cap-cua*. S'ha descrit que durant la infecció dels bacteriòfags complexos es produeixen una sèrie de canvis en la permeabilitat de la membrana de l'hoste, la qual cosa suggereix la formació d'un porus o canal a la seva paret que permetria que l'àcid nucleic la travessés fins a arribar al citoplasma. Una vegada la translocació del DNA fàgic ha estat completada les cèl·lules són repolaritzades (Dreiseikermann, 1994).

Aquests porus o canals poden tenir diferents orígens. Així, el bacteriòfag T4 indueix la fusió entre la membrana plasmàtica i la membrana externa per formar el canal (Tarahovsky *et al*, 1991). El bacteriòfag lambda interacciona amb el seu receptor, la proteïna LamB (sistema de transport de la maltosa), i indueix la formació o obertura d'un porus produït per proteïnes cel·lulars (Roessner i Ihler, 1986).

El fag P22 té una cua curta, aquesta no és suficientment llarga per travessar la paret cel·lular, però permet el contacte amb l'antigen O del LPS. Aquesta cua està formada per sis homotrímers del producte del gen 9 (Goldenberg *et al*, 1982a i 1982b). Una endorhamnosidasa amb activitat endoglicosidasa, que digereix l'antigen O, atacant-ne les unions ramnosil-galactosa (Steinbacher *et al*, 1996). En la primera interacció entre el fag P22 i la cèl·lula hoste, només hi intervé un dels sis homotrímers i una cadena d'antigen O. La digestió d'aquest provoca la migració del bacteriòfag per la cadena i es permet la unió d'una altra proteïna del trímer amb una cadena de l'LPS, i així, fins a tres unions per arribar a l'orientació correcta del fag respecte de la paret cel·lular per iniciar la injecció del DNA (Israel, 1978). La càpside del bacteriòfag P22 conté tres proteïnes petites fortament associades al DNA. Una d'aquestes proteïnes (Gp16) té un paper important en la translocació del DNA durant la infecció, sembla induir la formació d'un porus o la modificació d'un de ja existent (Hoffman i Levine, 1975a i 1975b).

L'adsorció del bacteriòfag i la injecció de l'àcid nucleic són processos dependents d'energia, les estructures dels virions es troben en una conformació metaestable, però la interacció amb l'hoste fa que adoptin una conformació més estable. Aquest canvi

provoca que la unió sigui irreversible i s'alliberi el genoma viral. Els bacteriòfags poden entrar o alliberar el seu genoma només en aquelles cèl·lules que són metabòlicament actives. L'energia disponible pot ser en forma d'ATP (o qualsevol NTP) o en forma de força motriu de protons, ja sigui per diferència de potencial elèctric transmembranal o per gradient de pH transmembranal (Poranen *et al.*, 2002).

1.2. Bacteriòfags virulents

Els bacteriòfags virulents són aquells que només es multipliquen a l'interior del seu hoste i provoquen la mort cel·lular.

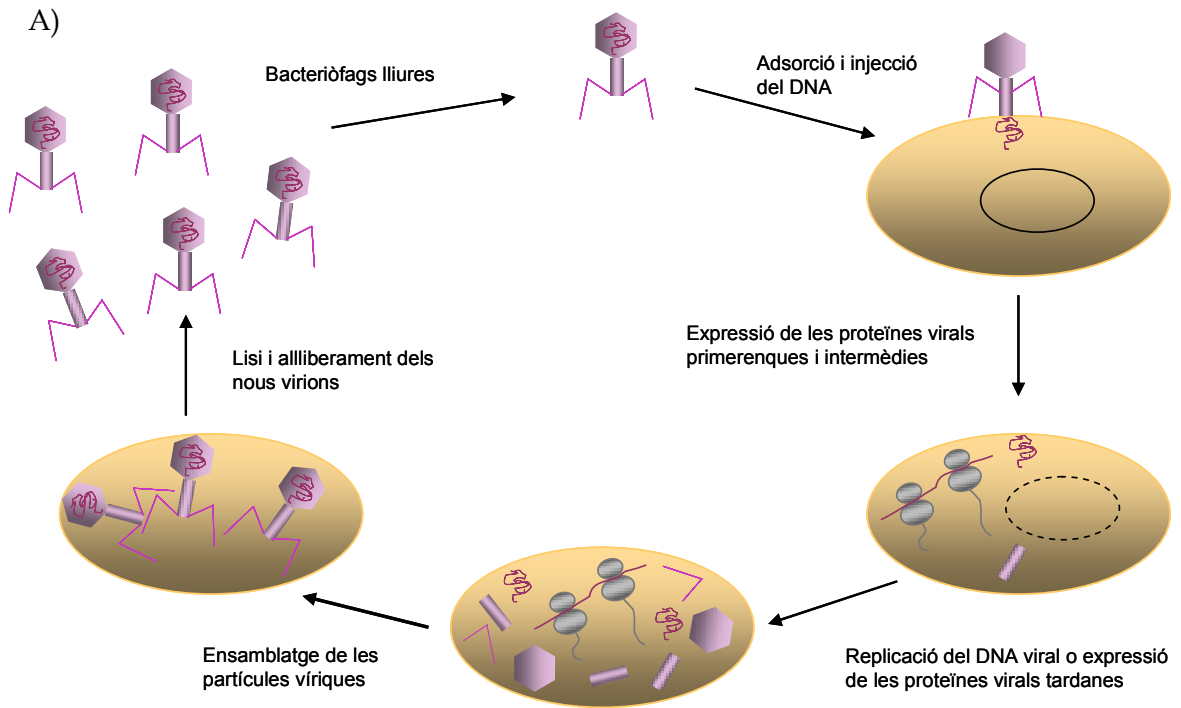
Per microscòpia electrònica s'ha estudiat la cinètica de bacteris infectats per fags virulents, després de l'adsorció i injecció del genoma viral (figura 1.2). S'han establert dos períodes o fases del cicle lític:

i. **Període de latència.** Aquest període varia segons el tipus de bacteriòfag i les condicions del cultiu cel·lular, i se subdivideix en dos períodes o etapes.

- **Període d'eclipsi.** En aquesta fase no es poden detectar partícules fàgiques, ni a l'interior ni a l'exterior de la cèl·lula. Quan s'internalitza l'àcid nucleic, aquest fa servir la maquinària biosintètica de l'hoste per produir el seu mRNA i les proteïnes fàgiques. En aquesta fase, els mRNA i les proteïnes de l'hoste aturen la seva síntesi i el DNA bacterial és ràpidament degradat.

- **Període d'acumulació intracel·lular.** En aquesta fase, l'àcid nucleic i les proteïnes estructurals formades al període anterior s'uneixen per formar les partícules virals madures. Es pot observar que s'acumulen a l'interior de la cèl·lula.

ii. **Període de lisi i alliberament.** En aquesta fase el bacteri comença a ser lissat, a causa de l'acumulació de proteïnes lítiques fàgiques, i alliberen els bacteriòfags al medi extern. El nombre de partícules víriques que s'alliberen per la infecció d'un únic bacteri és conegut com a mida d'explosió, i pot arribar a ser, segons la naturalesa del fag, de mil partícules fàgiques per cada cèl·lula infectada (Baron *et al.*, 1996).



B)

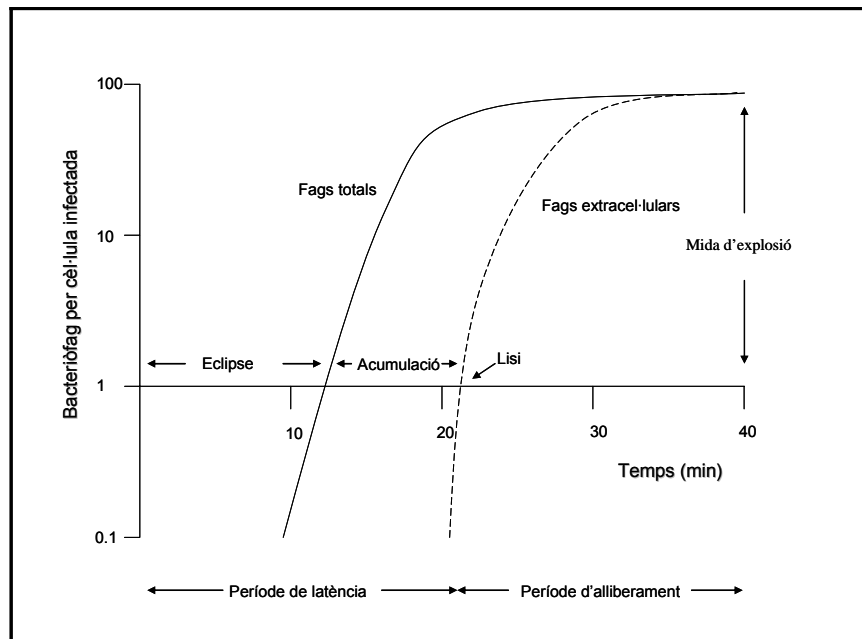


Figura 1.2. A) Estadis del cycle lític del bacteriòfag T4. B) Representació esquemàtica de la cinètica del cycle lític d'un bacteriòfag virulent.

1.2.1 Expressió del genoma del bacteriòfag virulent T4

Com a exemple tipus de bacteriòfag virulent prendrem el bacteriòfag T4; aquest és un dels virus amb el genoma més llarg que s'ha seqüenciat totalment, el seu DNA està format per 168.903 pb, i codifica per uns 300 possibles gens (Miller *et al*, 2003).

Després de l'entrada del DNA viral, la transcripció del bacteriòfag T4 comença a partir de tres classes diferents de promotors: els primerencs, els intermedis i els tardans (figura 1.3.). Cada promotor té una seqüència consens característica, i tots tres dirigeixen els estats de desenvolupament del cicle infectiu del fag. El control de la transcripció ve donat per la producció seqüencial de proteïnes que modifiquen l'especificitat de l'RNA polimerasa (RNAP) de l'hoste per diferents promotors fàgics (Luke *et al*, 2002). Tanmateix, hi ha altres fags lítics, com el bacteriòfag T7, que codifiquen per a una nova RNA polimerasa, específica pels seus promotors (Rochetkov *et al* 1998).

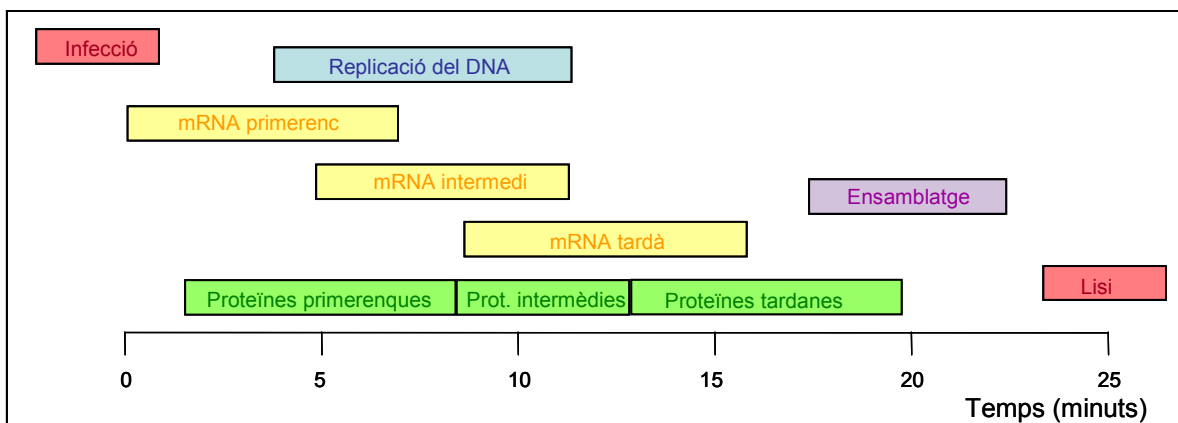


Figura 1.3. Evolució temporal de la infecció del fag T4.

- i. **Transcripció primerenca.** En els cinc primers minuts, després de l'entrada del DNA, es transcriuen 144 gens fàgics a partir de 40 promotors primerencs. Per tant, apareixen ràpidament les proteïnes fàgiques i disminueix radicalment l'expressió dels gens de l'hoste. El bacteriòfag T4 redirigeix la maquinària de transcripció de l'hoste cap als seus promotors amb una gran afinitat, com a resultat d'una petita diferència en les seqüències consens d'unió a la subunitat σ^{70} de l'RNAP d'*E. coli*. El DNA entra a la cèl·lula associat a la proteïna GpAlt, que té activitat ADP-ribosiltransferasa i com a diana els residus d'arginina de

les subunitats α de l'RNAP, modificant-la perquè tingui més afinitat pels promotors primerencs, i augmentant-ne la transcripció. Els transcrits resultants codifiquen tots els components de la maquinària de replicació, i la majoria d'enzims relacionats amb la degradació de l'àcid nucleic i consegüent preparació dels nucleòtids que s'incorporaran a les noves cadenes de DNA replicades. Aquests enzims converteixen els dNDP i dNMP resultants de la degradació del DNA genòmic de l'hoste en dNTP, que seran aportats al complex de replicació per la proteïna fàgica GP32 (Ssb). Poc després de la infecció, s'expressen dues ADP-ribosiltransferases més, ModA i ModB, que perllonguen la transcripció primerenca.

- ii. **La transcripció intermèdia.** En els 5-8 minuts després de l'entrada del DNA a la cèl·lula, es comencen a transcriure 57 gens fàgics a partir de 33 promotors intermedis. Aquests depenen de l'activació transcripcional per part de la proteïna MotA i de la coactivació de la proteïna Asia. Aquesta última coactiva l'RNAP formant heterodímers σ^{70} -Asia (Adelman, 1998), augmentant l'afinitat pels promotors, i tot perllongant la transcripció. D'aquesta manera es produeixen proteïnes relacionades amb la replicació i l'inici de la formació estructural de les partícules víriques.
- iii. **La transcripció tardana.** Des del minut 7 fins al 15 hi ha l'expressió dels 62 marcs oberts de lectura (orfs) tardans. El bacteriòfag T4 codifica per un petit factor σ^{55} , necessari per que l'RNAP iniciï la transcripció a partir dels promotors tardans (Kassavetis i Geiduschek, 1984). Però també són necessàries les proteïnes Gp33, Gp45 i Gp55. Les proteïnes Gp55 i Gp33 conjuntament, constituïrien dues parts del factor σ , i la proteïna Gp45, en forma de trímer, augmenta la progressivitat del DNA, és un estimulador de la formació del complex replicatiu i de la transcripció tardana (Nechaev *et al*, 2004). El complex de replicació del DNA és essencial per a aquesta transcripció, ja que aporta la proteïna Gp45 i DNA de cadena discontinua, i permet una conformació adequada i accessible per a l'RNAP modificada (Tinker *et al*, 1994) (Sanders *et al*, 1997). Els gens transcrits donen lloc a productes necessaris per a la replicació, la recombinació i la síntesi de les proteïnes estructurals del viriò i dels enzims de lisi cel·lular.

1.2.2 Reciclatge de l'mRNA del bacteriòfag T4

Encara que la regulació transcripcional del bacteriòfag es basa en la modificació dels factors σ de l'RNAP, el processament de l'mRNA resultant i la seva degradació, també juguen un paper determinant en l'abundància relativa del transcrit. Per exemple, el canvi tan ràpid entre l'expressió primerenca i la intermèdia és facilitat per la degradació selectiva o per l'estabilització de l'mRNA.

L'RNasa E d'*E. coli* és la primera endonucleasa descrita que contribueix en el processament dels mRNA del bacteriòfag T4 (Mudd *et al*, 1990). També s'ha suggerit que l'RNasa LS d'*E. coli* juga un paper important en el metabolisme de l'RNA, tant de la cèl·lula com del fag T4. Per tant, aquestes endonucleases serien responsables del reciclatge general dels transcrits i podrien tenir diferents preferències a l'hora de degradar mRNA (Otsuka i Yonesaki, 2003). El bacteriòfag T4 codifica per l'endoribonucleasa RegB, ja trobada també en altres bacteriòfags (Piešiniene *et al*, 2004). RegB processa específicament els mRNA primerencs, tallant enmig de la seqüència GGAG, aquesta seqüència es troba majoritàriament en les regions Shine-Dalgarno dels gens primerencs. Aquest enzim permet que els sistemes de traducció quedin lliures i puguin ser utilitzats per mRNAs intermedis i tardans (Sanson *et al*, 2000).

Com a exemple d'estabilitzador de transcrits, el producte del gen *dmd* del fag T4, estabilitza els transcrits tardans, fent que la seva vida mitjana sigui més llarga, i permetent l'expressió dels gens que codifiquen per les proteïnes estructurals i de lisi (Ueno i Yonesaki, 2001).

1.2.3. Morfogènesi del bacteriòfag T4 i lisi cel·lular

Totes les proteïnes que formen el virió madur i altres proteïnes tardanes, com el liozím, són sintetitzades simultàniament i acumulades formant un *pool* de precursors. El bacteriòfag T4 dedica més del 40% de la seva informació genètica per aquests precursors i pel seu ensamblatge.

L'ensamblatge del virió consisteix en quatre subensamblatges: el del cap icosaèdric amb el DNA al seu interior, el de la cua contràctil, el de la placa basal i el de les sis fibres de la cua. Aquests quatre processos són independents, només interactuen entre ells en alguns punts crítics. Quan ja han finalitzat els ensamblatges per separat, les

diferents parts s'associen per formar els virions complets (Casjens i King, 1975). Normalment s'acumulen de 100 a 150 partícules del fag T4 a la cèl·lula abans de la lisi cel·lular.

El procés de lisi requereix dues proteïnes: el liozozim (Gpe) i l'holina (Gpt). L'holina és l'encarregada de formar forats a la membrana plasmàtica cel·lular, i això provoca que el liozozim arribi a la capa de mureïna des del citosol i pugui degradar-la atacant les unions *N*-acetilglucosamines del peptidglicà. El temps de lisi està determinat per l'acumulació de l'holina i per un sistema anomenat rII que inhibeix la seva acció (Miller, 2003).

1.3. Bacteriòfags temperats

Els bacteriòfags temperats són aquells que en infectar la cèl·lula hoste poden simplement replicar-se, produint noves partícules víriques (cicle lític), o bé replicar-se conjuntament amb el genoma de l'hoste, mentre es manté silent (cicle lisogènic).

En el cicle lisogènic, el fag entra en un estat de quiescència, el genoma viral es replica sincrònicament amb el cromosoma bacterià de la cèl·lula hoste, anomenada lisogènica, tot segregant-se de manera conjunta. La majoria dels gens fàgics no es transcriuen, hi ha un estat de repressió de l'expressió del genoma fàgic o profag, exceptuant-ne el repressor viral i els gens implicats en la lisogènia. Tanmateix, en una petita fracció de les cèl·lules lisogèniques, i a causa de la inactivitat del repressor o a la inhibició de la seva síntesi, el profag s'indueix, i dóna lloc a nous virions i a la lisi de la cèl·lula hoste. Les noves partícules fàgiques, alliberades al medi, poden infectar altres cèl·lules no lisogèniques (Lodish *et al.*, 2000), ja que la presència del profag confereix immunitat a la cèl·lula hoste protegint-la contra infeccions addicionals, o a la sobreinfecció duta a terme per fags lliures.

Els fags temperats són majoritàriament virus de dsDNA de més de 20 kb. Es diferencien tres prototips segons la seva manera d'establir la lisogènia:

- i. Els representats pel **fag lambda** introdueixen el seu DNA dins el cromosoma bacterià en una regió concreta, anomenada *att*, per recombinació específica de lloc.

- ii. Els representats pel **fag Mu-1**, aquests introdueixen el seu àcid nucleic en qualsevol lloc del cromosoma de l'hoste, utilitzant una transposasa viral.
- iii. Els representats pel **fag P1**, el DNA dels profags d'aquest grup no s'introdueix al cromosoma bacterià, sinó que es manté com un plasmidi estable (Campbell, 1996).

Un dels bacteriòfags temperats on més s'han estudiat els cicles lític i lisogènic és el fag lambda (figura 1.4). Tant el fag lambda (λ), que infecta *E. coli*, com el fag P22, que infecta *S. typhimurium*, han estat utilitzats en la present tesi doctoral com a bacteriòfags temperats tipus.

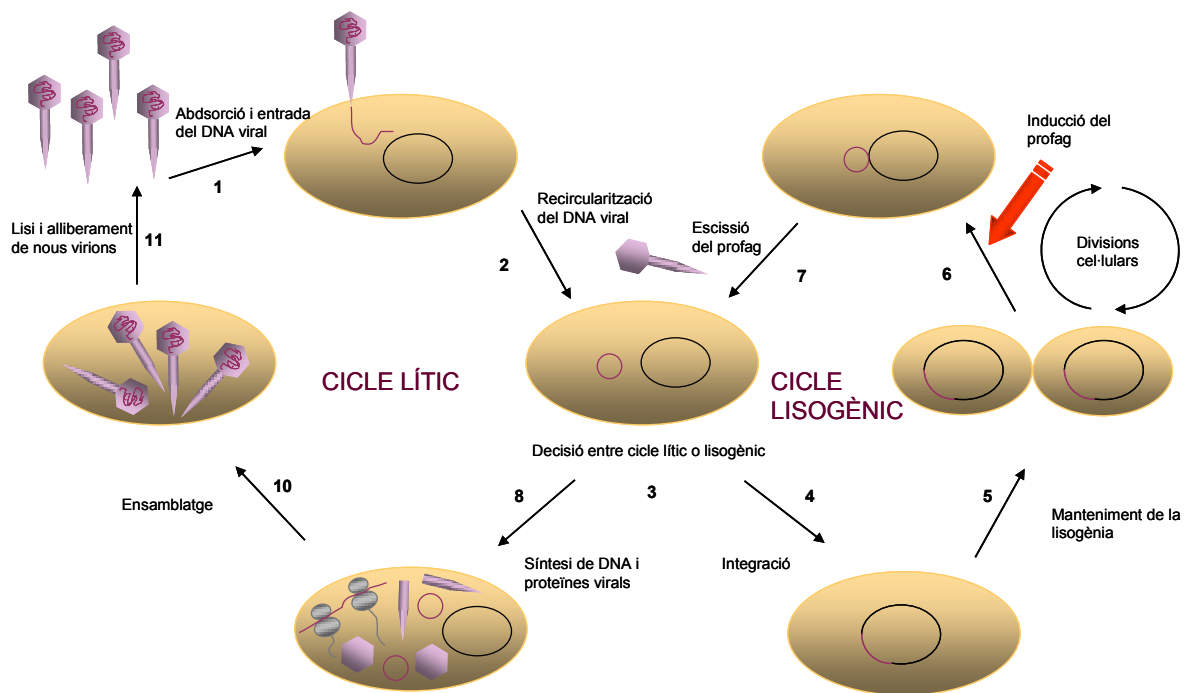


Figura 1.4. Estadis del cicle lític/lisogènic del bacteriòfag Lambda. 1) Adsorció del fag a la cèl·lula hoste i entrada del DNA viral. 2) Recircularització del DNA viral. 3) Decisió entre cicle lític o lisogènic. 4) Integració del genoma viral al cromosoma cel·lular per recombinació específica. 5) Manteniment de la lisogènia (conversió lisogènica, exclusió de la sobreinfecció i replicació sincrònica del DNA viral i bacterià). 6) Inducció del cicle lític. 7) Escissió del DNA viral per recombinació. 8) Regulació gènica per part dels antiterminadors. Expressió dels gens fàgics i replicació del DNA viral. 9) Ensamblatge de les partícules fàgiques. 10) Lisi cel·lular i alliberament dels virus.

1.3.1. Organització gènica dels fags lambdoides

1.3.1.1. Estructura modular

Bacteriòfags de famílies ben diferents, classificats en funció de la seva morfologia, es consideren del mateix grup quan s'utilitza l'organització gènica com a criteri de classificació. Per exemple, el siphovirus lambda o el podovirus P22, són considerats membres del mateix grup, el dels bacteriòfags lambdoides. Els membres d'aquest grup tenen una organització genòmica altament similar. Els gens que es troben junts al genoma s'agrupen en mòduls segons la seva funció biològica. El conjunt de mòduls es combinen per constituir el genoma viral.

El producte de l'evolució dels bacteriòfags és el intercanvi d'elements o mòduls genètics. Així, cada virus és una combinació favorable de mòduls (un per a cada funció necessària) per treballar de manera òptima en un nínxol concret. Es postula la possibilitat que es donin intercanvis entre els mòduls destinats a una mateixa funció de diferents fags dins del mateix grup filogenètic. La conservació d'una certa homologia en els extrems dels mòduls asseguraria un intercanvi correcte entre mòduls d'una mateixa funció per recombinació homòloga (Botstein, 1980).

Aquests intercanvis modulars tenen lloc amb una freqüència igual o major a la freqüència mutacional. Per tant, el sistema modular permetria una resposta més ràpida i flexible a nous factors ambientals que l'evolució vertical (Casjens, 1992).

Una altra manera d'obtenir DNA fàgic, a més dels intercanvis genètics entre fags, és l'intercanvi genètic entre fags i profags críptics, és a dir, genomes fàgics incomplets integrats en els cromosomes bacterians, alguns d'aquests tenen homologia amb els fags lambdoides i, per tant, serien part del reservori de gens susceptibles de ser utilitzats per la recombinació amb fags funcionals. O bé, poden adquirir gens dels genomes dels seus hostes, modificant-los adequadament a les seves necessitats.

Els mecanismes de recombinació no estan gaire clars encara; es creu que poden ser de quatre tipus:

- i. Recombinació homòloga
- ii. Recombinació homòloga entre regions curtes *microhomologia*
- iii. Recombinació il·legítima
- iv. Recombinació de lloc específic

El manteniment de l'ordre genètic permet optimitzar la fisiologia viral i facilitar l'evolució genòmica. Per tant, dins d'un mateix grup fàgic, les unitats o mòduls funcionals poden intercanviar-se amb relativa rapidesa tot mantenint l'organització genètica (Casjens, 1992).

1.3.1.2. Organització funcional

Els gens del fag lambda estan organitzats en tres blocs funcionals regulats de manera independent (figura 1.5):

- i. **El bloc de l'esquerra.** On hi ha el mòdul de recombinació i el d'integració i d'escissió.
- ii. **El bloc de la dreta.** On hi ha els gens relacionats amb la replicació i formació de les partícules víriques. Agrupats en els mòduls de replicació, ensamblatge del cap (on, alhora, hi ha diferents *clusters*; encapsulació del DNA, proteïnes estructurals de la càpside, maduració de la càpside i injecció del DNA), ensamblatge de la cua i lisi.
- iii. **El bloc central.** On hi ha control dels dos tipus de cicle (lític o lisogènic).

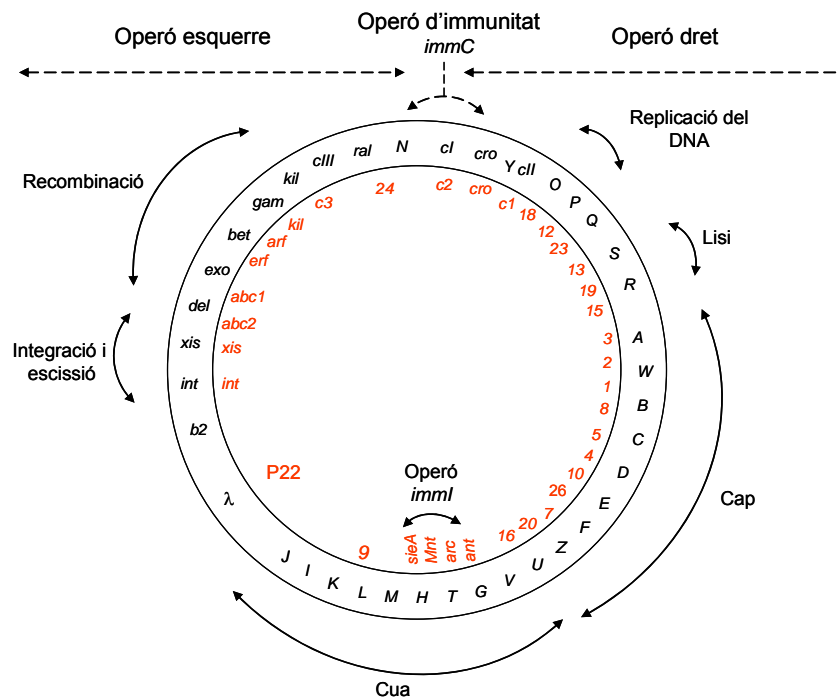


Figura 1.5. Comparació dels mapes genètics dels fags lambda i P22. L'organització genètica d'ambdós fags està representada en forma de cercles perquè quan s'expressen els gens el DNA viral es troba de manera circular.

Els gens del fag λ , no només es troben agrupats segons la seva funció concreta, sinó que sovint se situen propers al seu lloc d'actuació. Així, per exemple, el gen *int* que codifica la integrasa es troba adjacent al lloc *att* on es realitza la integració, els gens necessaris per a la replicació estan situats prop de l'origen de replicació del bacteriòfag, els gens *ci* i *cro* se situen propers als seus operadors. Aquesta proximitat al seu lloc d'acció augmenta l'eficiència reguladora i podria estar relacionat amb la interrelació entre diferents grups funcionals.

Tant el fag lambda com el P22 comparteixen una organització i regulació gènica comunes (figura 1.5), a més de seqüències nucleotídiques homòlogues que són capaces de recombinar per a formar virus híbrids viables (Botstein i Herskowitz, 1974). Així doncs, no és sorprenent que aquests dos bacteriòfags comparteixin moltes característiques de la seva fisiologia (Susskind i Botstein, 1978). D'altra banda, altres gens anàlegs funcionalment, i que es troben en la mateixa posició en el mapa genètic tenen seqüències nucleotídiques divergents, per exemple, els gens implicats en els mecanismes de regulació, replicació i recombinació del DNA (Botstein i Herskowitz, 1974).

1.3.2. Recircularització del DNA viral

El DNA del fag lambda és una molècula de dsDNA de 48.502 pb que entra dins de la cèl·lula en forma de DNA lineal, però ràpidament recircularitza per complementació de 12 bases situades als extrems 5' cohesius de la molècula, anomenats *cos* i s'aparellen per facilitar l'acció d'una ligasa de l'hoste (Taylor i Wegrzyn, 1995).

Altres DNA fàgics, com el del fag P22, presenten redundància terminal (figura 1.13). En aquests casos la recombinació homòloga per la recircularització es duu a terme per la proteïna fàgica Erf o bé, pel sistema Rec bacterià (Weaver i Levine, 1977a i 1977b).

El producte del gen *N* és un antiterminador. Aquest altera l'RNAP perquè superi els senyals de terminació t_{L1} i t_{R1} , i continuï la transcripció a través de quasi tot el genoma del fag lambda (Franklin, 1974).

Els gens que es troben immediatament després dels terminadors t_{L1} i t_{R1} són els gens *cIII* i *cII*, respectivament. Aquets gens es transcriuen ràpidament i són els responsables que el bacteriòfag pugui escollir el cicle lisogènic. Per tant, la proteïna N promouria la lisogènia, però la seva acció també és essencial per al cicle lític, ja que proporciona el transcrit de la dreta que inclou els gens de replicació (gens *O* i *P*), l'origen de replicació i el gen *Q*, antiterminador que permetrà la transcripció dels gens estructurals i de lisi quan s'indueix en cicle lític.

1.3.3.1. Relacions interprotèiques: proteïnes cII, cIII i FtsH

1.3.3.1.1. La proteïna cII

La proteïna cII és un activador transcripcional que activa tres promotors separats en el genoma del fag, tots tres relacionats amb la lisogenització (figura 1.6):

- i. **P_E**; promotor d'establiment de la lisogènia, controla la síntesi del gen *cI* que codifica el repressor del cicle lític, responsable del manteniment del cicle lisogènic.
- ii. **P_I**; promotor d'integració, controla la síntesi de la integrasa que permet la inserció del genoma viral dins el cromosoma bacterià.
- iii. **P_{AQ}**; promotor que es troba al bell mig del gen *Q* i té la mateixa seqüència de reconeixement per la proteïna cII que els dos promotors anteriors (Ho i Rosenberg, 1985). A partir d'aquest promotor es transcriu un RNA antisentit que inhibeix la síntesi de la proteïna Q, un antiterminador que permet l'expressió dels gens estructurals i de lisi, necessaris per al cicle productiu. El promotor es transcriu cap a l'esquerra, en direcció contrària al gen *Q* i els gens responsables del cicle lític que s'expressen des del promotor P_R, la qual cosa suggereix un descens de la seva transcripció (Hoopes i McClure, 1985).

La proteïna cII és un activador transcripcional de classe II que s'uneix a la regió -35 dels promotors que controla, concretament, la repetició directa TTGCN₆TTGC. S'uneix

com a tetràmer a la cara contrària de l'hèlix de DNA, respecte el punt d'unió de la subunitat σ de l'RNAP, i a diferència d'altres activadors de classe II, interacciona amb l'extrem amino terminal de la subunitat α d'aquest complex enzimàtic situat a la posició -41. En un mutant *rpoA341* d'*E. coli* hi ha una inhibició de la lisogènia per al fag lambda, mitjançant la deficiència en la transcripció de dos promotors dependents de cII , P_E i P_I (Kedzierska *et al.*, 2004).

Les proteïnes cII de diferents bacteriòfags lambdoides sovint són intercanviables, encara que no sempre, com seria el cas dels bacteriòfags lambda i P22. Malgrat el seu percentatge de similitud i que ambdós són tetramèrics i amb dominis d'unió al DNA "hèlix-gir-hèlix" (HTH) que permeten el reconeixement al mateix motiu, TTGCN₆TTGC/T de la posició -35 (Ho *et al.*, 1992), són estructuralment diferents.

Els estudis amb el bacteriòfag lambda són instructius, mostren els camins pels quals es prenen les decisions moleculars. Per entendre la decisió entre els dos models de desenvolupament del fag, s'ha d'entendre com la proteïna cII és regulada. Aquesta actua com a antena molecular per decidir l'estat d'infecció fàgica.

La concentració del producte del gen *cII* és qui determina si la cèl·lula entra en cicle lític o lisogènic. L'establiment de la lisogènia s'efectua a una concentració suficientment elevada de cII que promou la síntesi de cI i evita l'acumulació del repressor transcripcional Cro, evitant que aquest causi una progressiva inhibició de la transcripció des del promotor P_R i, per tant, una disminució de la síntesi de cII .

1.3.3.1.2. La proteïna FtsH

La proteïna cII té una vida mitjana molt curta (aproximadament de 2 minuts) a causa que és degradada ràpidament per una endopeptidasa de l'hoste, FtsH, també anomenada HflB (High lysogeny frequency) perquè l'eficiència de lisogènia augmenta quan aquesta proteasa és eliminada per mutació.

La proteïna FtsH es troba majoritàriament localitzada al citosol, tot i ser descrita com a proteïna unida a la membrana citoplasmàtica. Conserva els aminoàcids característics de la família de proteïnes AAA, és dependent d'ATP i degrada substrats petits com el factor σ^{32} o les proteïnes cII , $cIII$, Xis, SecY i YccA. FtsH forma unes estructures multimèriques semblants a un anell de 6-7 nm de diàmetre, la seva cavitat central és el centre actiu on es degraden els substrats. Probablement, l'ATP l'utilitza per

proporcionar l'energia necessària per als canvis conformacionals de la proteasa i per incorporar la proteïna cII al seu centre actiu (Shotland *et al.*, 2000).

La proteïna FtsH es troba majoritàriament en forma de dímers o tetràmers, probablement la interacció entre les molècules es duu a terme per l'associació directa de les seves regions transmembranals (Akiyama *et al.*, 1995). Aquesta proteïna és regulada per un complex proteic de membrana, el complex HflKC. La FtsH té molta més afinitat per la proteïna SecY (proteïna de transport de membrana) que per la proteïna cII. El complex HflKC interacciona amb la proteïna FtsH per inhibir la degradació de la proteïna SecY, la qual cosa permet que es degradi la proteïna cII (Kihara *et al.*, 1997). La regió periplasmàtica de la proteïna FtsH té un paper molt important en la interacció proteïna-proteïna i en la modulació de les seves funcions proteolítiques (Akiyama *et al.*, 1998).

La regió de la proteïna cII reconeguda per la FtsH es troba restringida a una petita cua de l'extrem carboxi terminal de 5 aminoàcids aproximadament, que actua com a senyal per a una ràpida proteòlisi. La seqüència de reconeixement està altament conservada en les proteïnes cII dels fags lambdoides (Kobiler, 2002).

La proteïna HflD de l'hoste també estimula la degradació de la proteïna cII. Aquesta no és una proteasa, sinó que interacciona amb la proteïna cII al citosol portant-la des del DNA, on està actuant, fins a la membrana, on hi ha la proteïna FtsH; per tant, el seu paper és augmentar la freqüència de contacte entre aquestes dues proteïnes provocant un efecte important en la disminució de la lisogènia (Kihara *et al.*, 2001).

La proteïna cII només treballa eficientment a elevades concentracions, probablement perquè la seva forma activa és un tetràmer. En aquest estat és metabòlicament més estable i resistent a la proteòlisi que no pas en forma monomèrica (Ho i Rosenberg, 1982).

1.3.3.1.3. La proteïna cIII

El producte del gen *cIII* és una proteïna petita (54 aminoàcids) que actua inhibint la degradació de la proteïna cII. La proteïna cIII estabilitza la proteïna cII i el factor σ^{32} , ambdós substrats de la proteasa FtsH.

La proteïna cIII és inestable, també és degradada per l'FtsH; això implica una interacció directa entre aquestes dues proteïnes. Per tant, l'estabilització de la proteïna cII i del

factor σ^{32} sembla ser resultat d'una competició pel centre actiu del complex FtsH (Herman *et al.*, 1997).

Altres hipòtesis postulen que el paper de la proteïna cIII com a inhibidor de l'activitat ATPàsica de l'FtsH o fins i tot, la interacció directa amb els substrats evitant-ne la seva degradació, tot i que altres promulgarien la funcionalitat de la proteïna cIII com a xaperona. L'augment dels nivells de cII per sobreexpressió té com a resultat una parcial inactivació de si mateixa, s'especula que podria ser per un efecte de l'agregació de molècules de cII. En aquestes condicions, la reactivació té lloc quan la proteïna cIII és suficientment sobreproduïda, d'aquí el possible paper de la proteïna cIII com un tipus de xaperona que reactivaria la proteïna cII o que n'evitaria l'agregació a concentracions elevadíssimes (Latala *et al.*, 2001).

1.3.3.2. Factors externs que afecten la decisió

Hi ha diferents factors externs que promouen l'entrada de les cèl·lules infectades en un estat de lisogènia, entre altres: la multiplicitat d'infecció, temperatura i riquesa del medi de cultiu (figura.1.6).

- i. L'**alta multiplicitat d'infecció** afavoreix la resposta lisogènica respecte la lítica. Els nivells de proteïna cIII produïts després de la infecció són aparentment limitats pel nombre de còpies del gen *cIII*. Sota condicions d'alta multiplicitat d'infecció, els nivells de cIII augmenten; per tant, la proteïna FtsH és inhibida, incrementant així la freqüència de lisogènia (Herskowitz i Banuett, 1984).
- ii. La **temperatura** també influeix en la dualitat entre lisi-lisogènia. En el fag λ s'ha descrit que a baixa temperatura es produeix la inhibició de la replicació, la qual cosa indica que la proteïna cII augmenta la transcripció del repressor cI, i aquest interfereix en la transcripció des del P_R , disminuint la concentració de les proteïnes necessàries per a la replicació (O i P). A baixes temperatures es bloqueja la lisi, ja que augmenta l'estabilitat de la proteïna cII, que actua com a termòmetre (Obuchowski *et al.*, 1997). Aquest augment podria ser degut a diverses causes, com ara: la inhibició de l'FtsH o del complex HflK/C, la inaccessibilitat de la proteïna cII per l'FtsH o l'augment de la formació de tetràmers de cII que aportarien estabilitat.

iii. Les **condicions de cultiu** tenen un efecte sobre la decisió. La presència de cAMP lliure en *E. coli* és un senyal que l'entorn és pobre en nutrients. L'augment de cAMP estimula la lisogènia. En absència de cAMP i CRP, els fags tendeixen a entrar en cicle lític (Grodzicker *et al.*, 1972). La proteïna CRP és un activador transcripcional amb un llarg domini carboxi terminal que s'uneix al cAMP, i amb un domini amino terminal que s'uneix al DNA amb l'estructura típica *helix-gir-helix* (HTH). Quan CRP uneix cAMP indueix l'activació transcripcional del gen *cI*. El complex CRP-cAMP s'uneix a la posició -35 del promotor *cI* formant una estructura de revolt al DNA que permet el contacte entre l'activador CRP i la subunitat α de la RNAP. Hi hauria una actuació sinèrgica de dos activadors per a un mateix gen; la del complex CRP-cAMP i la del propi *cI*, aquest actua com a activador del seu gen, tot i ser repressor del gens responsables del cicle lític. Per tant, quan hi ha un augment de cAMP, en condicions d'escassetat nutricional, s'incrementa la transcripció del gen *cI*, mantenint la lisogènia i evitant el cicle lític (Joung *et al.*, 1994). D'altra banda, la manca d'aminoàcids, o de nutrients, en general activa l'anomenada resposta astringent, a causa de l'augment de tetrafosfat de guanosina (ppGpp). Aquesta resposta també afavoreix l'establiment de la lisogènia. En situacions d'absència o d'excés de ppGpp s'observa una freqüència de lisogènia més baixa, deguda a una disminució de la transcripció del gen *cII* o bé a un augment de la concentració de la proteasa FtsH (Slominska *et al.*, 1999).

Un dels passos clau per a l'establiment o la decisió entre l'estat de lisi o lisogènia és la interacció de les proteïnes *cI* i *Cro* en el promotor de la dreta (P_R). De fet, és la concentració relativa dels dos repressors qui finalment determina l'establiment de la lisogènia; per tant, el paper de l'activador *cII* s'acaba en aquest estadi, on, després de la inducció del promotor P_E , hi ha una acumulació del repressor *cI*. Si *cI* predomina, aquest activa la transcripció a partir del promotor de manteniment (P_{RM}), es continua la síntesi de *cI* mantenint l'estat de lisogènia i s'inhibeix la transcripció a partir del P_R , evitant la transcripció del gen *cro*. Contràriament, si *Cro* predomina s'inhibeix el P_{RM} , s'evita la síntesi de *cI* i es permet la transcripció dels gens implicats en la producció de partícules víriques.

Com altres fags lambdoides, el bacteriòfag P22 presenta uns promotors P_E i P_{AQ} similars als del bacteriòfag lambda, i els reguladors *C2* (anàleg al *cI* del fag lambda),

C1 (anàleg al cII del fag lambda) i C3 (anàleg al cIII del fag) que actuen de manera equivalent al descrit anteriorment (Retallack *et al*, 1993 i Tokuno i Gough, 1975).

1.3.4. Integració del profag

En una resposta lisogènica, les funcions vinculades al cicle lític, com la replicació del DNA, es troben reprimides; per tant, quan el bacteri es divideix el DNA circular del fag lambda podria ser segregat desigualment a la progènie bacteriana. El fag evita aquest fet amb la integració del seu genoma al cromosoma bacterià, per tal de ser replicat conjuntament, i així poder transmetre's igualment a les cèl·lules filles.

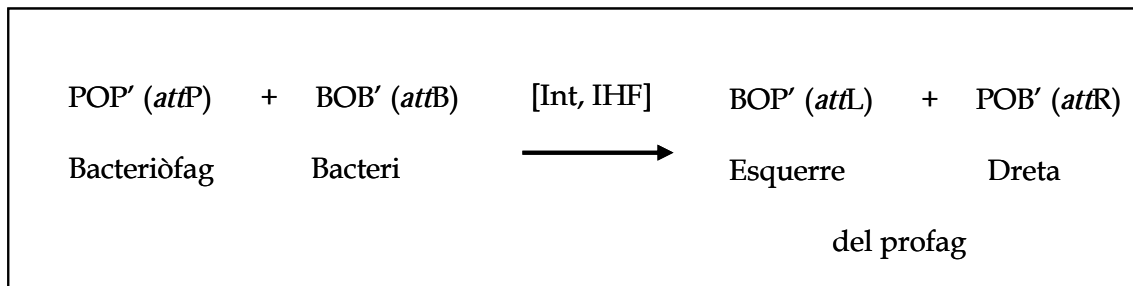
La integració s'efectua per un procés de recombinació específica de lloc dut a terme per la integrasa (Int) codificada pel fag i per proteïnes de l'hoste, anomenades factors d'integració (IHF).

Els llocs on es duu a terme la recombinació integrativa s'anomenen *attP* en el DNA del fag, i *attB* en el cromosoma bacterià. Aquestes dues regions tenen una homologia limitada a uns 30 parells de bases, a diferència de les recombinacions homòlogues generals que requereixen una homologia en les seqüències de centenars de parells de bases de DNA. La integració dels genomes fàgics es caracteritza pel seu alt grau d'especificitat i direccionalitat, segueix el model proposat per Allan Cambell l'any 1967.

El lloc de recombinació *attP* del bacteriòfag conté un nucli de 15 pb i involucra altres seqüències adjacents (155 pb a l'esquerra i 78 pb a la dreta); l'*attB* consta del nucli de 15 pb amb una seqüència homòloga a la del nucli de l'*attP* i d'unes seqüències adjacents, parcialment homòlogues a les del fag lambda de 20-25 pb de llarg. Normalment, l'*attB* no és l'únic punt possible d'integració al genoma, sinó que existeixen llocs d'unió alternatius que són una variant de l'*attB*, més eficient, i presenten freqüències d'integració molt més baixes (Nash, 1981).

La recombinació té lloc per un mecanisme de tall i lligació en el nucli comú.

La reacció d'inserció s'abreua amb l'equació següent:



Se simbolitza el nucli comú com a O, envoltat pels braços esquerre i dret P i P' respectivament, en l'*attP* i envoltat per B i B' en l'*attB*. Les seqüències *attL* i *attR* són els productes de la recombinació integrativa i substrats per l'escissió. La proteïna integrasa participa en ambdós processos.

1.3.4.1. La integrasa del bacteriòfag

La integrasa (Int) pertany a la família tirosina de les recombinases, també referida com família de les integrases, ja que utilitza una tirosina per tallar l'hèlix de DNA durant el procés de recombinació (Groth i Calos, 2004). La integrasa està formada per dos dominis: l'amino terminal (NTD), responsable de la unió als llocs de l'*attP* i el carboxi terminal (CTD), que s'uneix al nucli i conté el centre catalític. Ambdós dominis contribueixen a les interaccions proteïna-proteïna entre els monòmers de la integrasa, aquesta es troba normalment en forma de dímers, trímers o tetràmers. Tanmateix, l'NTD també està implicat en la recombinació (Jessop *et al.*, 2000).

La integrasa té les funcions de recombinasa, d'unió específica al DNA i de topoisomerasa. Aquest enzim és capaç de tallar i lligar les cadenes de DNA per relaxar l'estructura de *holliday* formada i promoure el intercanvi entre les cadenes de DNA del fag i del bacteri. Quan es troba, en forma de multímer, s'uneix al nucli del *attP*, on reconeix un parell de seqüències invertides, i a la seqüència GTCACTAT, repetida directament 5 vegades en els braços *attP* (Lee *et al.*, 1990). La seqüència, el nombre i l'espai entre els llocs d'unió de la integrasa i els braços *attP* varia segons la integrasa de cada bacteriòfag (Groth i Calos, 2004). S'ha demostrat que la integrasa presenta gran afinitat pels braços de l'*attP*, a diferència de la baixa afinitat que té per la regió del nucli. Aquesta discrepància és conseqüència de les diferències nucleotídiques entre

ambdós tipus de seqüències, i de la regió protèica que hi interacciona (Dorgai *et al.*, 1998).

1.3.4.2. El factor IHF

L'IHF (*integration host factor*) d'*E. coli* és una proteïna petita formada equimolarment per dos polipèptids, codificats pels gens *himA* i *hip*, respectivament. El complex IHF presenta tres llocs d'unió en els braços *attP*. Les regions protegides de l'*attP* per les proteïnes Int i IHF són diferents. Aquest conjunt IHF-DNA-Int és necessari per a una integració eficient del fag lambda, ja que crea unes torsions al DNA que ajuden a condensar l'*attP* en una estructura compacta adequada per a la recombinació (Robertson i Nash, 1988). Les torsions generades per aquest permeten que la integrassa que es troba unida al braços s'uneixi al nucli de l'*attP*.

1.3.4.3. Intasoma i recombinació integrativa

Sota la influència del sobreentrellament del DNA, l'*attP*, la integrassa i el factor IHF, formen una estructura sobreentrellada anomenada **intasoma**, responsable de la recombinació integrativa.

D'altra banda, el lloc *attB* és senzill, no conté seqüències d'unió per la proteïna IHF ja que no és necessari el sobreentrellament en aquest DNA per la recombinació. La regió *attB* té la mateixa seqüència de 15 pb al nucli i dues seqüències, similars a la seqüència CAACTT, que l'envolten on s'uneixen les integrasses de l'intasoma i no les presents al citoplasma. L'afinitat de l'intasoma per l'*attB* és dèbil, i necessita que la seqüència del nucli de l'*attB* es mantingui intacta, ja que aquesta influeix en la conformació del DNA o en l'habilitat d'aquest per adaptar-se a la conformació específica una vegada s'hi ha unit l'intasoma (Patsey i Bruist, 1995). És a dir, aquest complex permet l'apropament de les quatre cadenes implicades en la integració.

El model de recombinació integrativa postula la formació d'una estructura sinàptica entre les regions homòlogues de les quatre cadenes de DNA. La integrassa utilitza la tirosina catalítica del seu CTD per tallar una cadena de DNA i unir-s'hi. Una tríada de residus bàsics "Arg-His-Arg" promouen que el grup hidroxil de la tirosina ataqu

nucleofílicament el fosfat de l'àcid nucleic, trencant així les dues cadenes amb la mateixa polaritat. Per tant, l'extrem 3' de les cadenes és unit covalentment a la integrasa, deixat lliure un hidroxil a l'extrem 5', que ataca la unió DNA-proteïna del lloc *att* contrari per lligar-s'hi, i el resultat és una estructura de *holliday*. Probablement, hi ha una petita migració o rotació i el procés sencer es repeteix per resoldre aquesta estructura i relligar les altres cadenes. Finalment, es dona una recombinació completa que requereix quatre complexos d'integrasa, dues a cada molècula de DNA per formar el complex sinàptic tetramèric. El factor IHF és necessari per al primer entrecruament; en canvi, per al segon, tan sols és necessari la integrasa. El complex tetramèric de la integrasa es manté intacte fins que les lligacions s'han dut a terme completament i les molècules de DNA resultants han estat lligades (Lee i Landy, 2004).

El bacteriòfag P22 utilitza el mateix mecanisme d'integració que el bacteriòfag lambda, tot i que les seqüències aminoacídiques de les integrases respectives tinguin una baixa homologia i reconeguin diferents seqüències en les regions *attP* i *attB*. D'altra banda, els mecanismes reguladors són diferents: No hi ha evidències que el gen *int* del P22 s'activi per un promotor semblant al P_i , ja que s'expressa de manera constitutiva en absència de C1 (Leong *et al.*, 1986). El bacteriòfag P22 presenta un promotor P_{AI} situat davant del gen *int* però en orientació contrària; tanmateix, no se sap com aquest gen estaria regulat per l'activador C1 (Wulff *et al.*, 1993).

La regió *attP* del bacteriòfag P22 conté els llocs d'unió del factor IHF, tot i que s'ha demostrat *in vivo* que les freqüències d'integració i d'escissió no varien amb l'absència o la presència d'aquesta proteïna (Cho *et al.*, 1999). Aquest fet suggereix que les estructures nucleoprotèiques per la recombinació es poden dur a terme en absència d'IHF o que altres factors poden substituir la seva funció en la seva formació.

En ambdós bacteriòfags (λ i P22), els gens *int* i *xis* es troben formant un mòdul a prop de la seqüència *attP*. Aquest fet fa que hi hagi una elevada concentració local dels productes gènics Int i Xis propera al seu lloc d'actuació, incrementant l'eficiència d'integració.

En una resposta lítica, on no s'ha de produir la integració, a partir del promotor P_L es transcriuen els gens *xis*, *int* i la regió *sib*. Aquesta regió forma una estructura de nansa sensible al processament per part de l'RNasa III, l'extrem generat per aquesta és susceptible a la degradació per part d'exonucleases en direcció de 3' a 5'. Aquest fet

explicaria la degradació de l'mRNA del gen *int* i que no sigui possible la integració. Aquest control postranscripcional s'anomena **retroregulació** (Plunkett i Echols, 1989).

1.3.5. Modificacions en les cèl·lules lisogèniques

1.3.5.1. Conversió lisogènica

Els bacteriòfags temperats sovint modifiquen els antígens de la superfície o paret cel·lular del seu hoste per l'acció de glicosiltransferases pròpies, induint així la conversió serotípica i alterant el fenotip del bacteri hoste durant el període de lisogènia.

Els bacteriòfags lambdoides de *Shigella flexneri* són clars exemples d'aquest sistema, actuen glicosilant directament l'antigen O de la membrana externa (figura 1.7), lloc d'adsorció d'aquests fags, evitant la interacció amb nous bacteriòfags (Markine-Goriaynoff *et al.*, 2004). Els gens relacionats amb aquest procés es troben organitzats també en un mòdul, format pels gens *gtrA*, *gtrB* i *gtr(type)*, normalment situats immediatament després del mòdul d'integració (Huan *et al.* 1997). Els productes gènics GtrA i GtrB són altament conservats i intercanviables, però el gen Gtr(type) és únic per a cada bacteriòfag.

- i. **La proteïna GtrA:** és una proteïna integral de membrana que actua com a flipasa per transvasar el precursor Und-glucosa que es troba al citosol fins al periplasma. L'undecaprenil fosfat (UnP) és el transportador preferit pels residus de glucosa involucrats en la modificació de l'antigen O (Allison i Verma, 2000).
- ii. **La proteïna GtrB:** és una bactoprenol glucosil transferasa que catalitza la transferència de la glucosa des d'UDP-glucosa al bactoprenol fosfat en el citoplasma per formar Und- β -glucosa (Allison i Verma, 2000).
- iii. **La proteïna Gtr(type):** és una glucosil transferasa que transfereix el residu glicosil de l'UnP-glucosa a un lloc específic de la cadena d'antigen O (Allison i Verma, 2000).

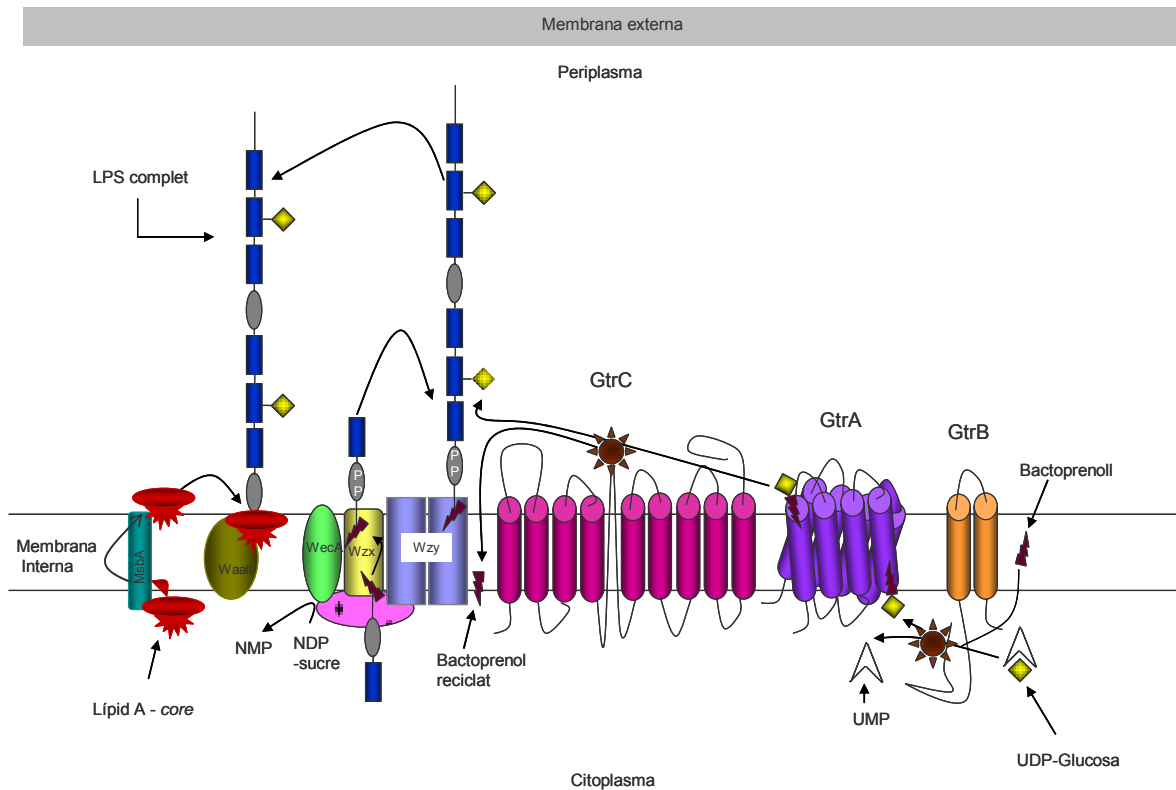


Figura 1.7. Hipotètic model de la síntesi i modificació de l'antigen O (figura adaptada de Korres *et al.*, 2005).

La síntesi de l'antigen O és iniciada per la proteïna WecA, una proteïna de membrana involucrada en la formació d'un sucre unit a undecaprenol-pirofosfat (Und-P-P-sucres). El precursor utilitzat en aquesta reacció és un sucre unit a un nucleòtid difosfat (NDP-sucres) i s'allibera un nucleòtid monofosfat (NMP). A més, altres glucosiltransferases actuen successivament per formar una unitat repetida unida al lípid. Aquest lípid unit a una unitat repetitiva de sucres és translocat al periplasma per la proteïna Wzx, fent que sigui accessible a la proteïna Wzy. La proteïna Wxy juntament amb altres xaperones es troben involucrades en la polimerització d'unitats repetitives i donen lloc a un polímer unit a un Und-P-P. L'antigen O és allargat fins al final, és en aquest moment quan es produeix la modificació de l'antigen O. Aquest procés de modificació comença amb la proteïna GtrB, la qual és responsable de l'ancoratge del bacterioprenol a la unitat d'UDP-glucosa formant el precursor UndP-glucosa i UMP. Aquest procés té lloc al citoplasma i és específicament mediat per l'extrem N-terminal citoplasmàtic de la proteïna GtrB. Es pensa que la proteïna GtrA forma un complex multiproteic que és capaç de translocar o transportar l'UndP-glucosa des del citoplasma al periplasma fent-lo accessible a la proteïna Gtr(*type*). La proteïna Gtr(*type*), en aquest cas GtrV que ancora específicament el residu glucosil a la rhamnosa apropiada de la unitat de

l'antigen O i recicla el portador lipídic (Und) al citoplasma. La proteïna WaaL lliga el polímer d'antigen O modificat al *core*-lípid A. Aquest *core*-lípid A és sintetitzat en el citoplasma i potencialment translocat o transportat per una proteïna homòloga Msb des del citoplasma al periplasma, fent-lo accessible a la proteïna WaaL. El LPS una vegada es troba complet i modificat és transportat a la membrana externa (Korres *et al.*, 2005).

Processos similars s'han observat en bacteris lisògens per a altres bacteriòfags. Particularment, s'han caracteritzat altres mòduls de glicosilació formats pels gens *gtrA-gtrB-gtrC* en nombroses soques de *Salmonella spp.* Per exemple, en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lisogena per a P22 (VanderByl i Kropinski, 2000) o per a ST64T (Mmolawa *et al.*, 2003a).

La conversió serotípica fàgica contribueix a la supervivència i a la patogènia, i pot estar relacionada amb l'augment de la invasivitat i proliferació del bacteri dins de l'hoste (Allison i Verna, 2000).

1.3.5.2. Sistemes d'exclusió de la sobreinfecció de soques lisogenes pel fag P22

El bacteriòfag P22 de *S. typhimurium*, a més de la capacitat de seroconversió, té dos sistemes per interferir en el desenvolupament dels fags sobreinfectius, és a dir, dels fags que intenten infectar una cèl·lula lisogena per un altre fag.

Aquests dos sistemes d'exclusió estan representats pels gens *sieA* i *sieB*, respectivament.

- i. **El mecanisme d'exclusió SieA:** es basa en el bloquejament del DNA de qualsevol partícula vírica que infecti l'hoste, ja siguin fags heteroimmunes, altres fags P22 salvatges o partícules víriques transductants amb DNA bacterià. Aquest procés d'exclusió té lloc en algun moment entre l'adsorció i la injecció del DNA viral a dins de la cèl·lula hoste i l'associació d'aquest amb la maquinària de replicació (Darlington i Levine, 1971). La injecció i entrada del DNA viral és incompleta, el DNA viral és exclòs al periplasma i no passa al citosol a través de la membrana plasmàtica. Reforçant aquest fet, SieA és una proteïna de membrana citoplasmàtica (Hofer *et al.*, 1995) que pot ser un sistema de restricció i/o modificació del DNA sobreinfectat que se satura a elevada

multiplicitat d'infecció (Susskind *et al.*, 1974a). No es coneix cap funció homòloga al sistema SieA en el bacteriòfag lambda.

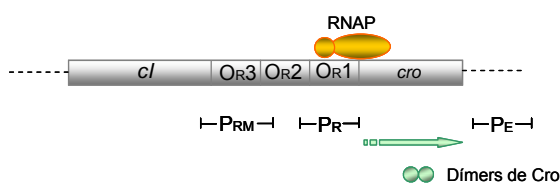
- ii. **El mecanisme d'exclusió SieB:** evita la sobreinfecció per bacteriòfags heteroimmunes; en canvi, no exclou altres bacteriòfags P22. El desenvolupament de les partícules sobreinfectives és normal fins a aproximadament 20 minuts després de l'adsorció; en aquest moment hi ha una aturada de la síntesi de DNA, RNA i proteïnes, és a dir, l'expressió del fag és incompleta perquè la síntesi macromolecular cau. En el mateix sentit, la producció cel·lular es bloqueja, i hi pot haver un fenomen de lisi cel·lular. El sistema SieB no interfereix en la resposta lisogènica, aquestes cèl·lules mostren un patró de síntesi normal. Per tant, no afecta en la decisió entre lisi-lisogènia, hi ha una freqüència normal de lisogènia, però la resposta lítica és absent, no s'allibera progènie fàgica, i consegüentment, no hi ha producció de calves de lisi ni de colònies. Els bacteriòfags P22 poden escapar del sistema SieB d'una soca lisogena per P22 gràcies al producte del gen *esc* (Susskind *et al.*, 1974b). El gen *sieB* se situa a l'esquerra de la regió *immC* del fag P22; aquesta regió és semblant a la del bacteriòfag lambda (Susskind i Botstein, 1978) (figura 1.5). Entre aquestes regions no s'hi pot observar gaire homologia al nivell de seqüència gènica; tanmateix, ambdues tenen seqüències promotores i uns perfils d'hidrofilicitat similars. Aquests perfils mostren que SieB podria ser una proteïna de membrana i això suggeriria que aquesta podria distorsionar la paret cel·lular (Ranade i Poteete, 1993).

El profag Fels-1 present en moltes soques de *S. typhimurium* exclou els mutants del fag P22 defectius en el gen *17*. Fels-1 presenta una funció, similar al mecanisme d'exclusió SieB, que és antagonitzada pel producte *17*. Els bacteriòfags P22 mutants en el gen *17* són insensibles a l'exclusió pel sistema SieB del fag P22, la qual cosa indica que *esc* i *17* són gens diferents (Susskind i Botstein, 1978).

1.3.6. Manteniment de la lisogènia i inducció del cycle lític: regulador o interruptor genètic

El regulador genètic del bacteriòfag lambda que forma part de l'operó d'immunitat permet que la majoria dels gens del fag es mantinguin de manera silent durant el període lisogènic i s'encarrega que el fag passi eficaçment a un estat de creixement lític, en resposta a un senyal inductor (figura 1.8).

A) Manteniment de la lisogènia



B) Inducció de la lisi

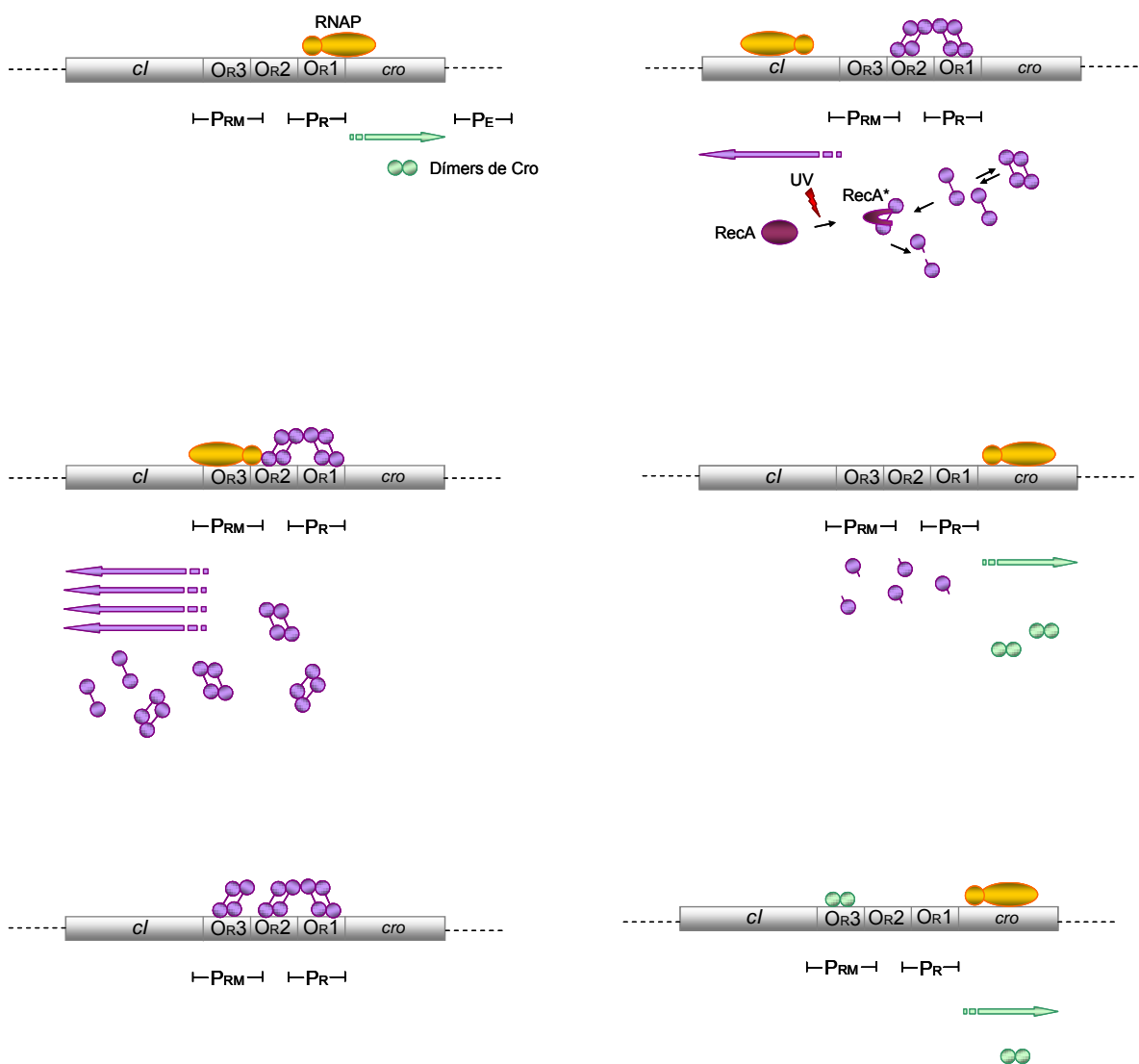


Figura 1.8. Esquema del regulador o interruptor genètic. Els promotors són indicats com P_{RM} (promotor de manteniment), P_R (promotor dret) i P_E (promotor d'establiment). Les fletxes representen els mRNA.

La irradiació ultraviolada dirigida a un lisogen desencadena la inactivació del repressor *cI*. Com a conseqüència, es comença a sintetitzar la proteïna Cro, la segona proteïna reguladora del fag lambda. Cro és essencial per a la promoció i l'establiment del cicle lític. S'uneix al DNA en els mateixos operadors que el repressor però amb efectes fisiològics contraris. Aquestes dues proteïnes reguladores, l'RNAP, els promotors i operadors del DNA, constitueixen els elements bàsics de l'anomenat **regulador genètic**.

El regulador té dues posicions, com un interruptor: en un lisogen, el repressor *cI* està connectat i *cro* desconnectat (figura 1.8.A), i en el cicle lític la situació s'inverteix connectant-se el gen *cro* i desactivant-se el repressor *cI* (figura 1.8.B).

En un lisogen un dels gen fàgics que s'expressen és el que codifica pel repressor *cI*. Aquest repressor, com s'ha comentat anteriorment, és al mateix temps regulador negatiu i positiu de l'expressió gènica ja que desconnecta la resta de gens del fag, alhora que activa la seva pròpia expressió. La proporció de molècules actives de repressor en cada lisogen és variable; cada una d'elles té absoluta llibertat per fixar-se a qualsevol altre cromosoma de lambda que eventualment sigui injectat a la bacteri, i reprimir, per tant, l'expressió del seu genoma. Per això, es diu que un lisogen del fag lambda és immune a la infecció pel mateix fag.

1.3.6.1. Manteniment del cicle lisogènic

Els gens que codifiquen les proteïnes *cI* i Cro es troben en posicions contigües en el genoma, però es transcriuen de manera divergent (figura 1.8). Els punts de partida per a la transcripció d'aquests dos gens es troben separats per 80 pb; en aquesta regió hi ha els promotors, als quals s'hi unirà l'RNAP i els operadors, on s'hi uniran els reguladors *cI* i Cro. El promotor del gen *cI* s'anomena promotor de manteniment (P_{RM}), i orienta l'RNAP cap a l'esquerra. En canvi, el promotor del gen *cro*, P_R , la dirigeix cap a la dreta. L'RNAP es fixa al P_R i pot començar la transcripció sense ajuda de cap altra proteïna reguladora. Tanmateix, l'RNAP només transcriu amb eficàcia des del P_{RM} quan la proteïna activadora *cI* interacciona amb el complex.

L'operador dret està format alhora per tres llocs operadors consecutius de 17 pb anomenats: O_{R1} , O_{R2} i O_{R3} , on s'uneixen *cI* i Cro. Les seqüències d'unió dels operadors

són similars però no idèntiques, i això permet que ambdues proteïnes s'hi uneixen amb diferent afinitat.

La **proteïna cI** està formada per 236 aminoàcids organitzada en dos dominis de grandàries similars, l'N-terminal (NTD) i el C-terminal (CTD), units entre si per un segment connector. En una cèl·lula lisogènica, aproximadament el 95% de les molècules del cI interaccionen pel CTD i constitueixen dímers que s'uneixen al DNA pels seus NTD.

La **proteïna Cro** és una proteïna de 66 aminoàcids que forma un únic domini. Igual que cI, Cro també es troba formant dímers al citoplasma cel·lular (Ptashne, 1992).

La interacció del repressor cI als operadors O_{R1} i O_{R2} impedeix la unió de l'RNAP al promotor P_R , i es reprimeix l'expressió del gen *cro*. Al mateix temps, ajuda que la RNAP, mitjançant una interacció proteïna-proteïna, es fixi i comenci la transcripció del seu propi gen des del P_{RM} , mantenint un estat de lisogènia. Generalment, en un estat de lisogènia, els dímers del repressor es troben pràcticament sempre fixats a l' O_{R1} i O_{R2} , i l' O_{R3} es troba lliure.

La subunitat σ^{70} de l'RNAP contacta amb el DNA, mitjançant els dominis 2 i 4 interacciona amb els elements -10 i -35, respectivament (Busby i Ebright, 1994). El repressor cI interacciona amb la regió -42, sobreposant-se a l'element -35, produint l'activació de l'RNAP. El cI contacta per a una regió de 10 aminoàcids carregats negativament (Hochschild *et al.*, 1983) amb la regió de l'RNAP que es troba adjacent a l'estructura HTH del domini 4 de la subunitat σ^{70} (Li *et al.* 1994). Dos residus bàsics d'aquest domini tenen un paper important en aquesta interacció, el residu K_{593} indueix una conformació al DNA situada just abans de l'element -35, i el residu R_{588} contacta directament amb un residu àcidic del cI (Nickels *et al.*, 2002). La taxa de transcripció s'eleva aproximadament 10 vegades.

En el cas que el repressor cI només estigui unit a l' O_{R1} , bloquejaria la unió de l'RNAP al P_R , però no arribaria a interaccionar amb l'RNAP i provocaria una taxa de transcripció des del P_{RM} molt baixa. Si el repressor estigués unit als tres operadors, arribaria a bloquejar la fixació de la RNAP pel seu promotor P_{RM} , i disminuiria la pròpia transcripció.

Els factors determinants de la interacció dels dímers de cI amb els tres llocs de l'operador O_R són dos: l'afinitat del dímer per cada un i la interacció entre els propis dímers quan es fixen en dos llocs de reconeixement contigus.

Un dímer de cI primerament es fixarà per qüestió d'afinitat a l' O_{R1} . Aquesta unió augmenta immediatament l'afinitat d'un segon dímer per l' O_{R2} , ja que aquest no només contactarà amb aquesta seqüència, sinó que també interaccionarà amb el dímer unit prèviament a l' O_{R1} , per una interacció específica entre aminoàcids de la proteïna (Whipple *et al.*, 1998), efecte que es coneix com **unió cooperativa**. Aquest fet fa que aquests dos llocs de l'operador s'ocupin pràcticament al mateix moment. Per tant, la unió del cI a l' O_{R2} és facilitada pel dímer unit a l' O_{R1} , i la fixació a l' O_{R3} s'ha de fer de manera independent, ja que una vegada el dímer unit a l' O_{R2} interacciona amb el dímer unit a l' O_{R1} , és incapaç d'unir-se al que es fixa a l' O_{R3} . Aquesta interacció entre els dímers de l' O_{R2} i O_{R3} , només té lloc en circumstàncies especials: quan es suprimeix (per mutació) l' O_{R1} . En aquesta situació, els dímers del repressor ocupen els llocs O_{R2} i O_{R3} simultàniament. En conclusió, totes aquestes interaccions proteïna-proteïna són un clar exemple de **cooperativitat alternant i dependent de parella** (Johnson *et al.*, 1981).

A concentracions més elevades de cI, l' O_{R3} acabarà ocupat també per cI. El repressor es fixa més dèbilment en aquest O_{R3} que no pas a l' O_{R2} , tot i que, l'afinitat intrínseca d'ambdós és la mateixa, aproximadament una dècima part de la que té O_{R1} . Quan s'augmenta la concentració del cI, per exemple, en una situació on la divisió cel·lular s'inhibeix temporalment la transcripció del gen *cI*, ja que el repressor cI es fixa també a l' O_{R3} per desconnectar el seu propi gen, per tant, també és capaç de reprimir el seu propi promotor P_{RM} . Quan la cèl·lula es comença a dividir una altra vegada, i la concentració de cI es troba al seu nivell habitual, la proteïna cI torna a activar la seva pròpia transcripció. D'aquesta manera, el nivell de repressor es manté sempre constant, tot i les possibles fluctuacions en la taxa de creixement cel·lular. Tot i així, la unió del repressor cI a l' O_{R3} té poca importància a l'hora d'establir o mantenir l'estat de lisogènia (Johnson *et al.*, 1981).

Aquest mecanisme de cooperativitat permet una gran rapidesa de resposta, quan la concentració del repressor cI sigui dos o tres vegades menor que l'habitual, i així s'evita el canvi en el P_R mantenint l'estat de repressió. Però quan el nivell de concentració del cI disminueix aproximadament 5 vegades, P_R respon dràsticament i funciona al 50% del que ho fa quan no està reprimint. Això permet que se sintetitzi una quantitat suficient de Cro que pot canviar radicalment el patró d'expressió gènica (Johnson *et al.*, 1979).

Dins de la cèl·lula, el repressor s'està contínuament deslligant de l'operador, però només per tornar-se a fixar immediatament a ell o bé, per ser substituït per un altre dímer de cI que es trobi a les rodalies.

1.3.6.3.1. Octamerització del repressor cI

Els repressors cI del bacteriòfag lambda formen dímers en solució a concentracions intracel·lulars normals de 0,1 μM , i poden donar lloc a conformacions de DNA entre dos operadors separats per 5 o 6 voltes d'hèlix de DNA (Hochschild i Ptashne, 1986). Com s'ha dit anteriorment, aquests dímers s'uneixen cooperativament als dos operadors adjacents i formen tetràmers gràcies a les interaccions entre els CTD dels dímers. L'octàmer es forma quan s'uneixen quatre dímers; el tetràmer seria un intermediari en aquest procés, es trobaria a una concentració imperceptible (Senear *et al.*, 1993).

Les proteïnes cI lliures formen octàmers a unes concentracions no fisiològiques, més elevades de 10 μM (Rusinova *et al.*, 1997) (Senear *et al.*, 1993). A aquestes concentracions els octàmers, *in vitro*, s'uneixen específicament als dos operadors O_L i O_R (Pray *et al.*, 1998), l'octàmer no es dissocia a tetràmer per unir-se a un únic lloc operador (Laue *et al.*, 1993).

El repressor cI pot formar octàmers a concentracions molt baixes, i independentment de la longitud de DNA, *in vivo* la conformació de DNA que aquest pren permet que dos tetràmers de repressor cI units a ell (els operadors esquerres O_{R1} i O_{R2} i els operadors drets O_{L1} i O_{L2}) interactuïn formant un octàmer (Revet *et al.*, 1999). La formació d'aquest revolt de DNA juxtaposa l' O_{R3} i l' O_{L3} , de tal manera que podrien ser ocupats cooperativament per un tetràmer de cI, la qual cosa permet una repressió efectiva del promotor P_{RM} (figura 1.9). Aquest mecanisme actuaria per limitar la concentració de cI en un estat de lisogènia i canviar eficientment cap al desenvolupament lític quan fos necessari (Dodd *et al.*, 2001). La interacció entre els dímers de repressors units a l' O_{R3} i a l' O_{L3} es fa mitjançant els CTD, i només té lloc en presència dels altres quatre llocs dels operadors units a l'octàmer (Dodd *et al.*, 2001).

L'oligomertització del cI unit als dos operadors O_L i O_R augmenta la repressió dels dos promotors P_L i P_R , juga un paper important en l'estabilització del manteniment de la lisogènia i augmenta la tolerància al canvi per fluctuacions de la concentració de cI. Per tant, la proteïna cI és un repressor més fort que la proteïna Cro, que té un paper menys

important del postulat prèviament en el canvi de lisogènia a lisi (Svenningsen *et al.*, 2005).

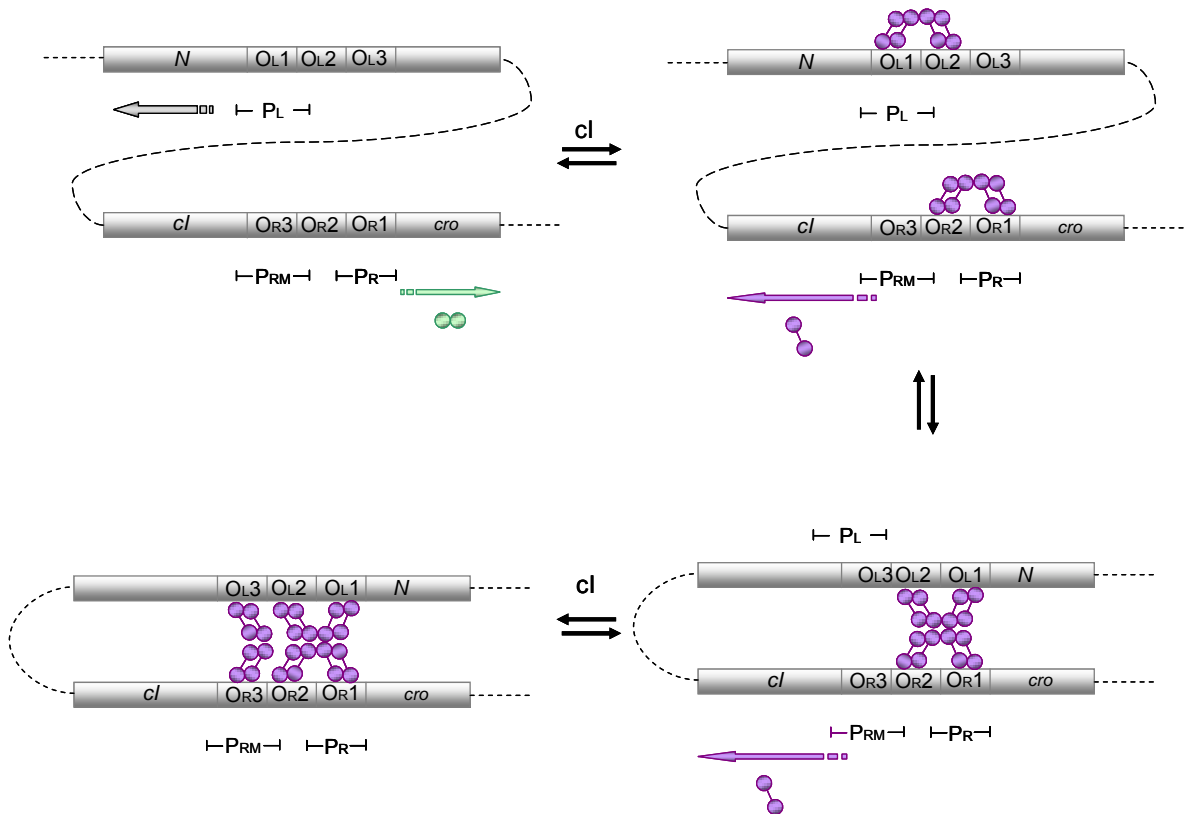


Figura 1.9. Octamerització del repressor del cycle lític cI.

1.3.6.2. Inducció del cycle lític

El repressor cI se sintetitza constantment a mesura que les cèl·lules creixen i es divideixen; en canvi, el gen *cro* es manté silent, fins que és induït (figura 1.8B). Els agents inductors, com la llum ultraviolada, provoquen lesions en el DNA que condueixen a un canvi notable en el comportament d'una proteïna de l'hoste, anomenada RecA. En circumstàncies normals, la proteïna RecA catalitza la recombinació entre molècules de DNA, però quan el DNA està lesionat, adquireix una conformació activa (RecA*) que interactua amb altres proteïnes amb el repressor cI. El RecA* juga un paper d'estimulador indirecte de l'autoproteòlisi del cI, possiblement actua com a efector allostèric, és a dir, com a coproteasa (Little, 1984). L'autoproteòlisi té lloc concretament entre els aminoàcids Ala₁₁₁ i Gly₁₁₂ en el cI del bacteriòfag lambda i als aminoàcids Ala₉₄ i Gly₉₅ del C2 del bacteriòfag P22, ambdós situats al segment connector dels dos dominis del repressor. La separació d'ambdós dominis inactiva el

repressor, ja que els CTD per si mateixos no poden dimeritzar, i l'afinitat de la forma monomèrica per l'operador és massa petita perquè la seva unió sigui eficaç. A concentracions elevades de repressor cI hi ha menys eficiència en la proteòlisi, hi ha més dímers que monòmers, i són aquests últims els que interactuen amb la proteïna RecA* (Phizicky i Roberts, 1980). La proteòlisi necessita que el CTD es mantingui intacte, a diferència de l'NTD; aquest fet afavoreix la idea que els monòmers de cI són els que majoritàriament pateixen la proteòlisi (Sauer *et al.*, 1982).

La inducció dels bacteriòfags només és una vessant de la múltiple activació genètica, anomenada **sistema de reparació d'emergència** o **sistema SOS**, que es desplega com a resposta a lesions en el DNA. La proteïna RecA* dirigeix també la proteòlisi del repressor LexA de l'hoste, aquest és semblant al cI del fag lambda, tant en estructura com en funció, tot i que els dos interaccionen en diferents llocs amb el RecA (Mustard i Little, 2000). El LexA reprimeix un grup de més de 40 gens bacterians, com ara, els gens *recA*, *umuC*, *uvrA*, *uvrB*, *sulA*, etcètera, que una vegada deixen d'estar reprimits, permeten la supervivència del bacteri a la irradiació.

Entre la proteïna LexA i el repressor cI hi ha una certa homologia; aquesta es troba en la seqüència aminoacídica que envolta el lloc de tall, això suggereix que la proteïna RecA reconeix alguns residus aminoacídics i/o algunes estructures secundàries d'aquesta regió. Tanmateix, el cI té una susceptibilitat més baixa a la proteòlisi dirigida per RecA que la proteïna LexA; això serviria per mantenir l'estat de profag el màxim de temps possible (Horii *et al.*, 1981).

El cicle lític es troba altament reprimat durant el creixement cel·lular, en absència de senyal inductor, i s'activa a la fase estacionària causant la lisi de les cèl·lules hostes (Ramírez i Villaverde, 1997). Per tant, l'activació de la proteïna RecA tindria lloc en la fase de descens de la velocitat de creixement cel·lular, on les cèl·lules amb pocs recursos nutricionals són les responsables de la propagació viral (Ramírez *et al.*, 1999).

Quan el repressor es trenca deixa lliures els O_{R1} i O_{R2} , la seva taxa de síntesi disminueix i l'RNAP interacciona amb el P_R per iniciar la transcripció del gen *cro*.

La proteïna Cro s'autoregula, ja que una sobreexpressió seva seria tòxica per a la cèl·lula, i regula l'expressió dels transcrits primerencs esquerre i dret. A diferència del cI, Cro és un regulador exclusivament negatiu, i l'ordre d'afinitat pels tres llocs de l'operador és el contrari del repressor cI. La primera molècula de Cro que se sintetitza, dimeritza i s'uneix a l' O_{R3} . Això, impedeix que l'RNAP s'uneixi al P_{RM} i evita la síntesi de la proteïna cI. Quan funciona el promotor P_R i el gen *cro* es transcriu, els gens de la

drete del gen *cro* també es transcriuen, els productes dels quals són necessaris en l'inici del cicle lític. L'augment de la proteïna Cro fa que s'acabin ocupant els operadors O_{R1} i O_{R2} , en aquest moment l'RNAP deixa de tenir accés al P_R . Per tant, si bé inicialment només es desconnecta la síntesi de *cI*, finalment acaba disminuint la seva pròpia expressió i la de la resta dels gens lítics primerencs que formen part de la mateixa unitat transcripcional. El complex dímer de Cro i operador es forma a concentracions nanomolars de Cro, ja que s'uneix amb una elevada afinitat als operadors (Jana *et al.*, 1998), saturant els tres llocs de l' O_R . La unió del repressor Cro també es fa de manera cooperativa, unint-se primerament a l' O_{R3} , després a l' O_{R1} i més tard a l' O_{R2} (Darling *et al.*, 2000).

El genoma del fag P22 també codifica un regulador i una proteïna Cro; aquests actuen en una regió del seu propi DNA anàloga a la regió O_R del bacteriòfag lambda. La descripció del regulador genètic del fag lambda és aplicable a aquest bacteriòfag. Aquest regulador genètic s'anomena *immC* en el bacteriòfag P22. El CTD del C2 del P22 és homòleg al del bacteriòfag lambda, tot i que aquest grau de similitud no es manté en el seu NTD (Sauer *et al.*, 1981).

La proteïna Cro del P22 és anàloga a la del lambda, tot i que té menys capacitat o força per unir-se a l' O_{R3} (Poteete, 1986). És globalment acceptat en l'evolució de les proteïnes que l'estructura proteica es conserva molt més que la seqüència aminoacídica. L'estructura de la proteïna Cro del bacteriòfag P22 està formada per tres hèlix α a l'extrem C-terminal, a diferència de la del fag lambda, on l'extrem C-terminal està format per una làmina β . El canvi d'estructura de α a β provindria d'un ancessor que seria més semblant al P22 amb una estructura d'hèlix α . Tanmateix, tot i el canvi dramàtic en aquestes estructures secundàries es conserven les mateixes funcions biològiques (Newlove *et al.*, 2004).

1.3.6.3. Interaccions proteïna- DNA

Tots sis operadors, tres de la drete i tres de l'esquerra, presenten seqüències lleugerament diferents, les quals dirigeixen les diferents afinitats dels repressors per ells. Els llocs d'unió són gairebé simètrics encara que no hi ha una simetria perfecta en cap d'ells.

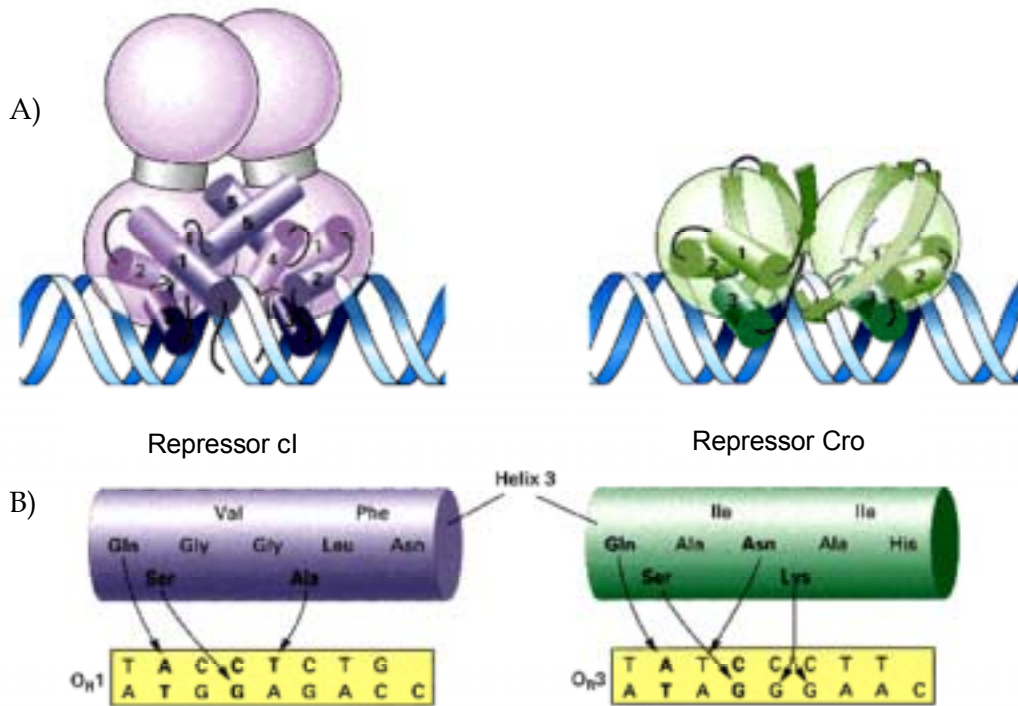


Figura 1.10. A) Interacció dels NTD dels dímers de repressor cI i de Cro amb el DNA. B) Interaccions dels aminoàcids de les hèlixs de reconeixement de cI i de Cro amb les bases de l'operador.

L'NTD de la proteïna cI es plega formant cinc estructures d'hèlix α . L'hèlix α_3 , anomenada també hèlix de reconeixement, es disposa en direcció a la superfície de la molècula de DNA (figura 1.10A). En la forma dimèrica del cI, les hèlixs de reconeixement es troben separades entre sí per la mateixa distància que separa els segments consecutius del solc major en la superfície de DNA, cada hèlix de reconeixement encaixa en el solc major de l'hèlix de DNA. D'aquesta manera, la simetria de la proteïna dimèrica coincideix amb la simetria del DNA, quan el dímer se situa sobre l'operador.

L'hèlix α_2 es troba prop el solc major, però no pròpiament dins seu, en realitat serveix perquè l'hèlix α_3 es disposi sobre el solc major. Moltes proteïnes reguladores utilitzen aquesta estructura de dues hèlixs α , anomenada *helix-gir-helix* o *HTH*, per fixar-se al DNA. Alguns dels aminoàcids, situats en posicions equivalents de les estructures bihelicoidals de cI i de Cro, són idèntics o químicament semblants (figura 1.10B). Tres d'ells se situen en el revolt que connecta les dues hèlixs i els altres dos, un a cada hèlix, serveixen per mantenir constant l'angle format per aquestes estructures.

El repressor Cro consta de tres hèlixs α i tres làmines β . L'orientació espacial de les hèlixs 2 i 3, és virtualment idèntica a la de les seves equivalents en el repressor cI i les

hèlixs de reconeixement de la proteïna dimèrica, també encaixen en segments contigus del solc major (figura 1.10A). És sorprenent trobar dues hèlixs α disposades de manera tant semblant en dues proteïnes tant diferents (Ptashne, 1992).

Les seqüències d'aminoàcids de les hèlixs de reconeixement de cI i de Cro són, majoritàriament, diferents entre si. Tot i així, les superfícies externes de les hèlixs de reconeixement són semblants, encara que no idèntiques, perquè tot i que cI i Cro es fixen als mateixos llocs de l'operador, ho fan amb una afinitat relativa diferent. Ambdues hèlixs de reconeixement comencen amb la seqüència Glu-Ser per establir contacte amb les posicions 2 i 4 invariants dels llocs de l'operador, a partir d'aquestes, les seqüències divergeixen. Hi ha contactes anàlegs entre la base T₅ i l'Ala₂₉ de Cro i la Gly₄₆ de cI. Els contactes amb les posicions 2 i 4 farien que les proteïnes cI i Cro diferenciessin els llocs operadors entre les altres regions del DNA. D'altra banda, la discriminació entre els diferents operadors és més subtil, i s'aconsegueix, principalment a través de diferents forces de Van der Waals en les posicions 3, 5 i 8. Aquest fet demostra que no hi ha un únic codi entre la interacció DNA-proteïna (Albright i Matthews, 1998).

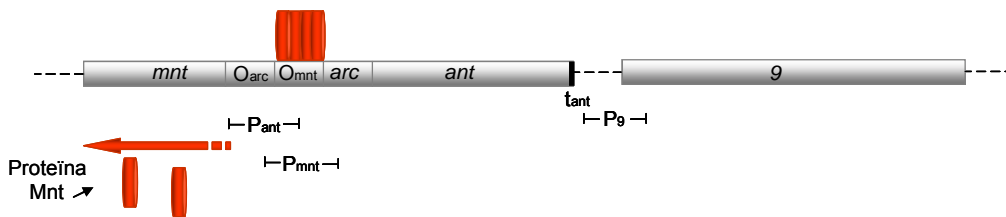
Els motius d'unió comuns al DNA, la proximitat dels gens i la unió cooperativa han suggerit fortament que els gens *cI* i *cro* divergeixen d'un ancessor comú per duplicació genètica. Alguns fags, fins i tot, tenen un 25% d'homologia en els NTD de tots dos gens. També es creu en l'existència de dos llinatges ancestrals per les proteïnes cI i Cro respectivament, ja que les seqüències de la majoria de proteïnes Cro es troben relacionades més estretament entre elles que amb les proteïnes cI i a la inversa (Newlove *et al.*, 2004).

La grandària i el patró de les bases conservades de les seqüències consens dels operadors de diversos bacteriòfags són diferents. En el C2 del bacteriòfag P22 també és el contacte directe entre tres aminoàcids de l'estructura HTH amb l'operador, el que permet uns fonaments perquè la resta d'aminoàcids formin interaccions dèbils amb les bases no conservades (Hilchey *et al.*, 1997).

1.3.6.4. Element regulador *immI* del bacteriòfag P22

El bacteriòfag P22 té un altre element regulador, anomenat *immI*. Aquest es troba absent en el bacteriòfag lambda. La regió *immI* és un mòdul de gens relacionats amb l'expressió gènica i el manteniment de la lisogènia (figura 1.11). Conté un gen anomenat *ant*, que codifica un antirepressor que inhibeix la unió de diversos repressors fàgics com el C2 del bacteriòfag P22 o el cI del bacteriòfag lambda.

A) Estat de lisogènia



B) Estat de lisi

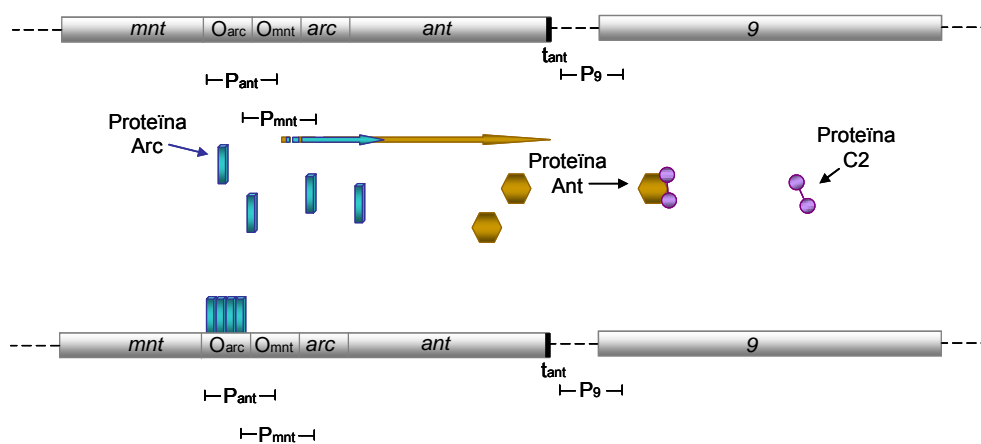


Figura 1.11. Esquema del sistema *immI* del bacteriòfag P22. L'organització genètica de la regió *immI* del bacteriòfag P22 s'assembla a la regió d'immunitat del fag lambda i per tant també, a la regió *immC* del bacteriòfag P22. En tots aquests casos, els gens expressats des del promotor de la dreta (P_R en el lambda; P_{ant} en la *immI*) es troben regulats negativament durant el cicle lític pel producte d'un gen, que es troba immediatament a la dreta del promotor (Cro en el lambda; Arc en la *immI*) i durant l'estat de lisogènia pel producte d'un gen, que es localitza immediatament a l'esquerra del promotor (cI en el lambda; Mnt en la *immI*). El gen *mnt* és transcrit cap a l'esquerra des del promotor P_{mnt} , aquest es solapa amb el promotor P_{ant} (Sauer *et al.*, 1983). El gen *cro* s'expressa a partir del P_R ; anàlogament el gen *arc* s'expressa des del promotor P_{ant} , regulant així la seva pròpia expressió (Youderian *et al.*, 1981).

El sistema regulador *immI* augmenta la probabilitat d'intercanvi modular, ja que quan l'antirepressor del fag P22 s'expressa, s'inactiven diferents repressors d'altres fags, i

així es permet la inducció de profags de l'hoste, que es replicaran, augmentant la possibilitat d'interacció entre diferents genòmes fàgics i, per tant, incrementant la recombinació entre ells (Botstein, 1980).

El gen *ant* només s'expressa quan el seu regulador, el repressor Mnt, és absent o inactiu. Aquesta funció antirepressora de la proteïna Ant no és essencial per al cicle vital del fag P22 (Susskind i Botstein, 1978).

Sota condicions de sobreproducció de l'antirepressor, *in vivo*, aquest protegeix el repressor C2 de la proteòlisi dirigida per RecA. Per tant, la unió C2-Ant és més forta que la de C2- RecA (Prell i Harvey, 1983).

El transcrit on es troba codificat l'antirepressor és d'unes 1,2 kb, comença a partir del promotor P_{ant} i acaba abans que comenci el gen adjacent, el gen *g*, el qual codifica per l'enzim endorhamnosidasa de la cua que es transcriu a partir del seu propi promotor (Susskind i Youderian, 1982).

Les proteïnes Mnt i Arc, homòlogues entre elles, són polipèptids petits i bàsics. A més, mostren similitud amb la proteïna Cro del bacteriòfag lambda.

La proteïna Arc està formada per 53 aminoàcids, és significativament més curta que la proteïna Mnt de 82 aminoàcids. L'homologia entre elles es localitza a l'extrem N-terminal de la proteïna Mnt. Això suggereix que la regió C-terminal podria estar relacionada amb la formació de l'estructura oligomèrica de la proteïna ja que Arc es troba de manera dimèrica en solució i MntR forma tetràmers (Vershon *et al.*, 1985).

La proteïna Mnt s'uneix a la regió de DNA que solapa els dos promotors P_{ant} i P_{mnt} (figura 1.11). Concretament, interacciona entre l'element -35 del P_{mnt} i el punt d'inici de transcripció del P_{ant} , i produeix la inhibició de la transcripció per bloqueig de la unió de l'RNAP al P_{ant} dels gens *arc* i *ant* i s'activa la transcripció del seu propi gen a partir del P_{mnt} per contacte directe amb l'RNAP. Aquesta proteïna està formada per dos dominis estructurals, ambdós necessaris per a la unió d'elevada afinitat a l'operador (Waldburger i Sauer, 1995). La proteïna Mnt en forma de tetràmer utilitza els dímers de l'NTD per contactar amb la meitat de l'operador, concretament en les dues cares de l'hèlix de DNA de l'operador simètric (Vershon *et al.*, 1987a). Una vegada hi interacciona un dímer de Mnt, la unió del segon es facilita establint-se una interacció entre ells i el DNA; aquesta cooperativitat limita l'afinitat per la unió a l'operador i evita unions inespecífiques (Berggrun i Sauer, 2000).

La proteïna Arc inhibeix la transcripció dels gens *arc* i *ant* a partir del P_{ant} (figura 1.11), ja que bloqueja la unió de l'RNAP. Contacta amb una cara de l'hèlix de DNA, concretament a la seqüència operadora parcialment simètrica situada entre les regions -10 i -35 del P_{ant} (Vershon *et al.*, 1987b). Els dímers de la proteïna formen tetràmers quan s'uneixen a l'operador de manera cooperativa (Brown *et al.*, 1990).

L'especificitat d'unió a l'operador, tant d'Mnt com d'Arc, està determinada per un petit grup de residus aminoacídics de l'extrem N-terminal, com demostren experiments amb proteïnes híbrides entre aquestes dues proteïnes. L'especificitat de l'Mnt pot ser canviada per la de l'Arc, substituint només 6 residus de l'NTD de l'Mnt pels 9 corresponents de l'Arc (Knight i Sauer, 1989).

1.3.7. Regulació del cicle lític. Efecte dels antiterminadors

Després de la inducció del cicle lític, els promotors P_L i P_R deixen de ser reprimits pel repressor cI i són susceptibles de ser transcrits, amb la qual cosa es permet així l'expressió del gen *N* a partir del P_L , i del gen *cro* a partir del P_R (figura 1.12).

La proteïna *N* és un antiterminador que suprimeix els terminadors de transcripció i permet que l'RNAP de l'*E. coli* transcrivui després dels terminadors t_{LS} diferents gens, entre ells, els responsables de l'escissió del profag i després dels t_{RS} els gens primerencs *O* i *P*, gens necessaris per a la replicació del DNA viral i el gen *Q*, que codifica per la proteïna antiterminadora *Q*.

La proteïna *Q* evita la terminació de la transcripció tardana des del promotor P_R , i permet que hi hagi una transcripció eficient dels gens relacionats amb la morfogènesi vírica i la lisi cel·lular.

Aquesta cascada de factors antiterminadors regula la durada de la transcripció gènica del bacteriòfag mentre es troba en el cicle lític (Greenblatt *et al.*, 1993).

Aquests dos tipus d'antiterminadors interfereixen en l'elongació de la transcripció. Després de l'inici de la transcripció, el complex d'elongació transcripcional (TEC) perd la subunitat de reconeixement del promotor, el factor σ , i el cor de la polimerasa és capaç d'acabar la transcripció en llocs específics, determinats per dos classes de terminadors:

- i. **Terminador intrínsec:** caracteritzat per un element palindròmic ric en GC, que forma una estructura de llaç, seguit per una repetició d'uridines en l'RNA

transcrit. El factor NusA de l'hoste augmenta l'eficiència de terminació, contactant amb la subunitat α de l'RNAP i afavoreix el plegament del bucle (Nudler i Gottesman, 2002).

- ii. **Terminador dependent de factor:** s'han descrit dos tipus de factors de terminació: el factor Rho, que actua en molts i diferents llocs del cromosoma bacterià i, el factor MFD, el qual és responsable de l'alliberament de l'RNAP en regions del DNA amb lesions per ultraviolats (Nudler i Gottesman, 2002).

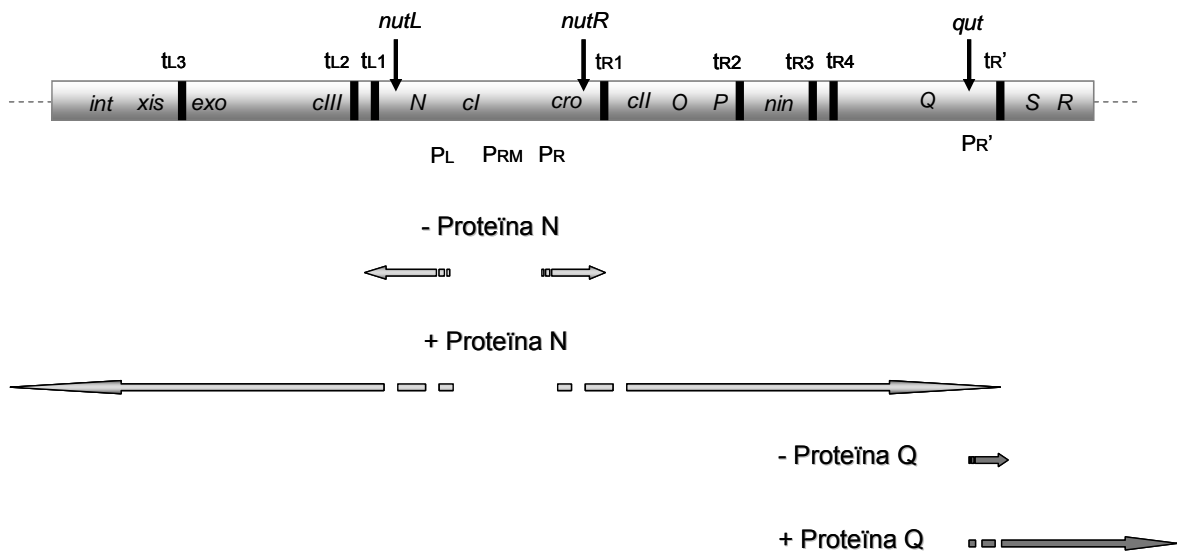


Figura 1.12. Esquema de la regulació gènica per antiterminació. Les fletxes representen els mRNA.

1.3.7.1. La proteïna antiterminadora N

La proteïna N pertany a la família de les proteïnes riques amb arginines (ARM) d'unió a l'RNA, a més de la seva funció antiterminadora, accelera la velocitat d'elongació de l'RNA. EL CTD de la proteïna N, és el responsable de la unió al TEC i de l'acció antiterminadora. D'altra banda, l'NTD, que inclou el motiu ric en Arg, és el responsable de la unió específica al DNA i del seu reclutament al TEC.

El factor NusA i la proteïna N reconeixen dues seqüències, *boxA* i *boxB* de la regió *nut* (*N-utilization site*) i, ambdues, interaccionen alhora amb l'RNAP. La regió *nutL* es troba entre el promotor P_L i el terminador t_{L1} i la regió *nutR* entre el gen *cro* i el terminador t_{R1} (figura 1.12). Les proteïnes NusE i B reconeixen la *boxA* i també interaccionen amb

l'RNAP. Per tant, les proteïnes Nus de l'hoste formen, juntament amb la proteïna N i l'RNAP un complex antiterminador estable que supera els terminadors de transcripció. El mecanisme pel qual la proteïna N suprimeix els terminadors Rho-dependents encara no s'ha determinat (Friedman i Court, 1995).

1.3.7.2. La proteïna antiterminadora Q

La proteïna Q s'uneix al lloc *qut* (*Q-utilization site*), localitzat entre la posició -10 i -35 del promotor pR' (figura 1.12). El seu mecanisme d'antiterminació és diferent del de la proteïna N. La unió de la proteïna Q a *qut* necessita el factor d'iniciació σ^{70} en l'RNAP i que ja s'hagi iniciat la transcripció. L'únic factor de l'hoste necessari és la proteïna NusA, que estimula l'RNAP perquè continuï la transcripció. El complex resultant fa que l'RNAP sigui resistent a la terminació, per interferència directa de la formació del llaç de DNA del terminador (Nudler i Gottesman, 2002).

El bacteriòfag P22 té dues proteïnes, la 23 i la 24, anàlogues a les proteïnes Q i N del bacteriòfag lambda, i que fins i tot poden ser substituïdes en els híbrids P22/lambda (Susskind, i Bostein, 1978).

En el bacteriòfag P22, a partir del promotor P_L, una vegada superats els terminadors t_{1,5}, es transcriuen diferents gens, entre els quals, hi ha els següents:

- i. El *kil*, el producte del qual es desconeix la funció, però se sap que és essencial per al desenvolupament lític en absència de les proteïnes Abc.
- ii. L'*erf*, que codifica per a una proteïna que permet la recombinació homòloga i és essencial en hostes mutants pel gen *recA*.
- iii. L'*arf*, el seu producte és essencial per al desenvolupament del fag P22 en absència de la proteïna Kil.
- iv. El *ral*, que dona lloc a la proteïna Ral, aquesta permet la infecció d'una cèl·lula que posseeixi el sistema de restricció-metilació salvatge per part d'un bacteriòfag modificat o no.
- v. L'*abc1* i l'*abc2*, que modulen l'activitat RecBCD de l'hoste, i són essencials per a la replicació fàgica en cèl·lules hostes salvatges, tot i que no són essencials en cèl·lules mutants pel gen *recB*.

vi. El *xis* i l'*int*, que donen lloc a proteïnes responsables del procés d'escissió del profag.

Entre l'*abc2* i el *xis* hi ha tot un seguit de gens amb funció desconeguda, la deleció dels quals no afecta el desenvolupament del fag P22 (Semerjian *et al.*, 1989).

A partir del promotor P_R i $P_{R'}$, una vegada superats els terminadors t_R i $t_{R'}$, hi trobem, tant al bacteriòfag P22 com al fag lambda, els gens responsables de la replicació, lisi i morfogènesi de la progènie.

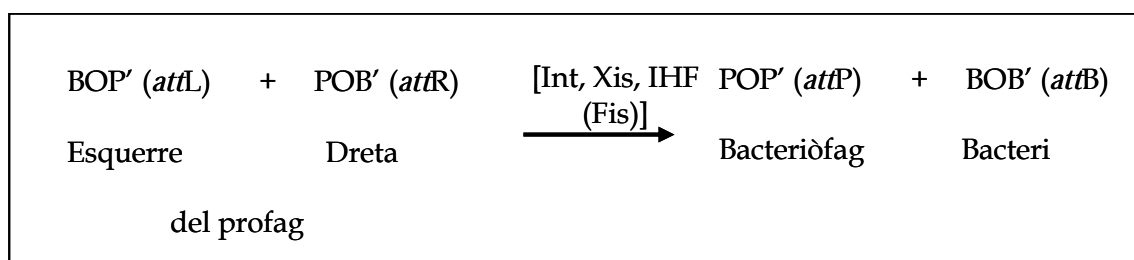
L'organització del regulador del cicle lític i les posicions dels seus elements rellevants, tals com P_L , *nutL*, t_{L1} , *nutR*, t_{R1} , es troben conservades en els diferents fags lambdoides, tot i que les seves seqüències han divergit extensivament (Campbell, 1994).

1.3.8. Escissió del profag

Quan s'inhibeix el cicle lisogènic, el profag s'independitza del cromosoma bacterià per un procés anomenat escissió. L'autoproteòlisi del repressor *ci*, regulada per la proteïna *RecA**, permet la transcripció de diversos gens a partir del promotor P_L , com l'*int* i el *xis*, els productes dels quals són responsables d'aquest procés d'escissió. Les seqüències d'aquests dos gens se solapen en 20 pb. La regió *sib* no es transcriu, ja que s'hauria separat físicament d'aquests dos gens durant la integració.

Tot i que ambdós processos de recombinació específica de lloc els duu a terme la mateixa proteïna integrasa (*Int*), l'escissió no és una simple reversió de la integració. Hi intervenen les proteïnes *Int*, *IHF* i *Xis* (escissionasa). L'escissió és un tipus de recombinació específica de lloc, on el tetràmer de la integrasa intercanvia les cadenes *attL* i *attR*, resultants del procés de integració per restaurar les regions originals *attB* i *attP*. La direcció de la recombinació és determinada per la quantitat de *Xis* present a la cèl·lula.

La reacció d'escissió s'abreuja amb l'equació següent:



La proteïna Xis és un polipèptid petit (72 aminoàcids). El seu extrem N-terminal és necessari per a la unió al DNA, al qual s'uneix de manera dimèrica o tetramèrica quan interacciona cooperativament amb la proteïna Fis de l'hoste. Aquesta és prescindible per a la reacció, però pot estimular-la quan la concentració de proteïna Xis és limitada. Aquests complexos creen una torsió al DNA per unir cooperativament a la proteïna Int i formar el complex nucleoproteic d'escissió al *attR* (Thompson i Landy, 1988). Anàlisis mutacionals indiquen que l'extrem C-terminal de la proteïna Xis és l'encarregat de la interacció directa amb la proteïna Int (Numrych *et al.*, 1992), i és l'NTD d'aquesta proteïna el que interacciona amb la proteïna Xis, a més d'unir-se al DNA (Cho *et al.*, 2000).

La proteïna Xis reconeix dues seqüències imperfectes directament repetides, anomenades X1 i X2, que es troben situades entre el lloc d'unió de la integrasa i el nucli de l'*attR* (Yin *et al.*, 1985). La seqüència X2 se solapa amb la seqüència d'unió de la proteïna Fis, anomenada F. El resultat final de l'escissió és una molècula de DNA fàgic viral.

1.3.9. Replicació del DNA viral

L'escissió allibera una molècula de DNA circular. La replicació del DNA viral és un procés independent de la replicació del cromosoma de l'hoste. Es duu a terme en dues fases: la **fase de replicació primerenca** o en **forma de θ** , per semblança de les estructures intermèdies de replicació a aquesta lletra grega, on la replicació s'inicia a partir d'un únic origen, es realitza de manera bidireccional generant noves molècules de DNA circulars; i la fase tardana, on la replicació segueix la **forma de cercle rodant** (**σ**) i genera múltiples molècules lineals de DNA necessàries per a la progènie vírica (figura 1.13).

L'inici de la replicació és una acció cooperativa, on són necessàries dues proteïnes fàgiques (O i P) i un gran nombre de proteïnes de l'hoste. L'elongació de la replicació segueix el mecanisme establert per l'hoste.

- i. **La replicació primerenca (θ)**. Primerament, la molècula de DNA circular se sobreentrella negativament formant un substrat replicatiu a causa de l'acció de la DNA girasa. La replicació comença en un únic origen i continua bidireccionalment. Les nanses replicatives, on es duu a terme la síntesi de DNA

es mouen de manera divergent al seu origen i progressen a través del cercle a unes velocitats similars. La DNA topoisomerasa separa les dues cadenes circulars noves. Aquest tipus de replicació procedeix de manera exponencial, tot i que es repliquin el 20% de les molècules.

ii. **La replicació tardana o per cercle rodant (σ).** Dóna lloc a concatàmers, molècules que presenten de dos a vuit vegades la longitud del genoma del fag lambda. Una de les cadenes de DNA serveix com a motlle, i l'altre conté un tall. La replicació s'inicia a l'hidroxil 3' del tall, continua a través del cercle diverses vegades, i produeix DNA de cadena senzilla. Aquesta cadena s'utilitzarà com a motlle per a la síntesi de la seva cadena complementària. Els concatàmers resultants són substrat de l'activitat exonucleotídica del complex enzimàtic RecBCD bacterià, però el producte gènic Gam del fag λ (o Abc en el fag P22) inhibeix aquesta activitat. La replicació de cercle rodant pot ser bidireccional, és a dir, pot replicar-se utilitzant les dues cadenes com a motlle. Aproximadament, el 40% de la forma replicativa σ té el mateix origen, i coincideix amb el de la forma θ .

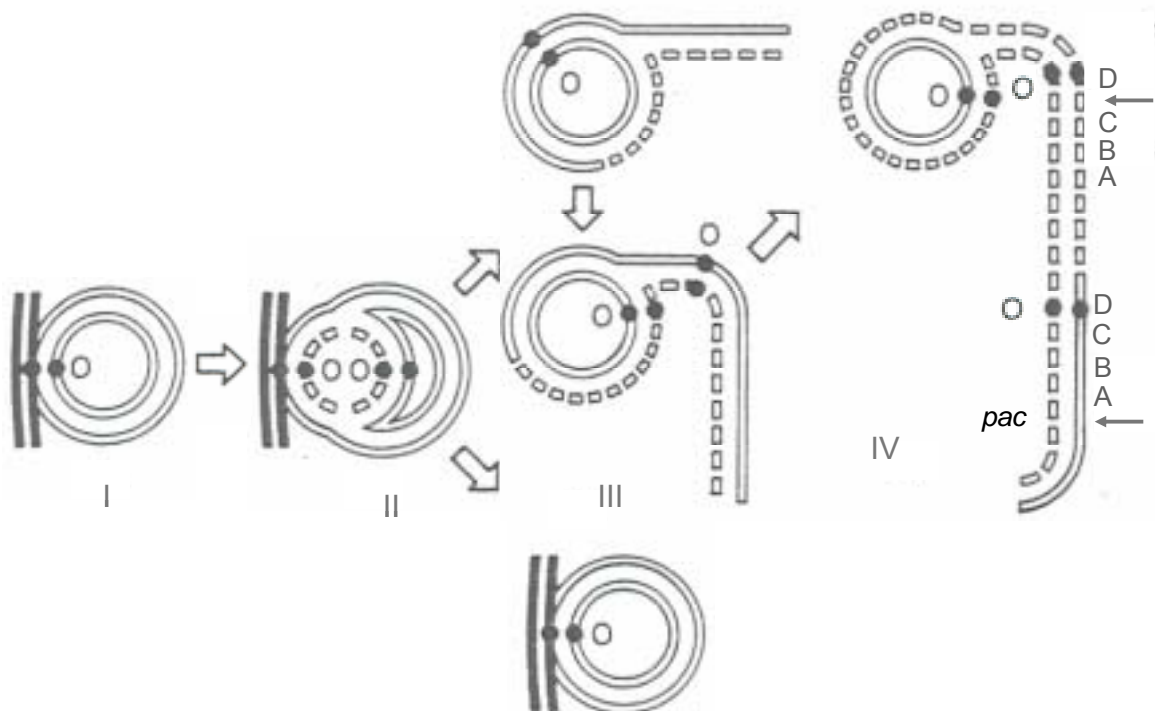


Figura 1.13. Replicació del DNA del bacteriòfag P22. A i B, fase primerenca, replicació en forma de θ . C i D, fase tardana, replicació en cercle rodant i llocs per on talla el complex terminasa el DNA madur, generant extrems amb redundància terminal.

L'origen de replicació es troba a dins del gen *O*, és un segment de 63pb, presenta quatre caixes repetides i inverses molt semblants de 19 pb i separades per poques bases. Les seqüències de la dreta d'aquestes caixes és rica en parelles AT, i exposen una distribució asimètrica de purines i pirimidines, amb la finalitat de facilitar la desnaturalització de la doble hèlix. La proteïna *O*, anàloga a la DnaA de l'hoste, actua de manera dimèrica. L'NTD és essencial per al reconeixement i la unió a una regió que conté les quatre caixes de l'origen de replicació, produint una torsió al DNA que ajudarà a l'entrada de l'helicasa (DnaB). D'altra banda, el seu CTD interacciona amb la proteïna *P* (Zylicz *et al.*, 1984). La proteïna *P*, anàloga a la DnaC de l'hoste que interacciona també amb diverses proteïnes de l'hoste, entre les quals hi ha la DnaB. L'associació de la proteïna *P* amb la DnaB, i la consegüent modificació de la seva activitat permet la seva entrada al complex replicatiu. Les proteïnes DnaA i RNAP intervindrien en aquest estadi. Tanmateix, perquè s'iniciï la replicació, la proteïna *P* ha de sortir del complex ternari *O-P-DnaB* que inhibeix l'acció de la DnaB (Biswas i Biswas, 1987). Les xaperones de l'hoste Ssb/DnaJ/DnaK s'associen a la proteïna *P*, i per hidròlisi d'ATP, deixen l'helicasa DnaB lliure i activa (Dodson *et al.*, 1989). Així, la DnaB podrà interaccionar amb la primasa DnaG i juntament amb la DNA polimerasa formarà el complex de replicació (Liberek *et al.*, 1990).

L'inici de la replicació del genoma del fag lambda té lloc en íntima associació a la membrana cel·lular (figura 1.13), ja que les proteïnes de l'hoste DnaK i J es troben unides a la membrana (Zylicz *et al.*, 1983).

La DnaA podria actuar unint-se a unes caixes properes al promotor P_R , afavorint la producció de les proteïnes *O* i *P* (Wegrzyn *et al.*, 1995). En cèl·lules salvatges, el consum de la DnaA per la ràpida replicació del DNA viral és el responsable del canvi de replicació θ bidireccional a unidireccional i, posteriorment, a la replicació de cercle rodant (σ) (Taylor i Wegrzyn, 1995).

Els diversos fags lambdoides tenen una organització similar dels elements relacionats amb la replicació, els seus gens *O* són homòlegs, i en alguns casos intercanviables (Campbell, 1994). En el cas del bacteriòfag P22 els gens implicats en la replicació són el *18* (anàleg al gen *O* del lambda) i el *12* (anàleg al gen *P* del lambda) (Susskind i Botstein, 1978).

1.3.10. Ensamblatge de les partícules víriques

L'ensamblatge de la partícula viral és degut a un equilibri entre les diferents proteïnes del cap i la cua. Els gens estructurals no es troben disposats a l'atzar en el genoma víric sinó que es troben agrupats en dues regions que no se solapen. A més, els productes dels gens que interactuen durant la morfogènesi es troben codificats en gens adjacents. Els polipèptids dels precursors, tot i ser transcrits a partir d'un únic promotor (P_R'), són sintetitzats seqüencialment en unes quantitats apropiades pel seu ensamblatge. L'expressió diferencial de les proteïnes és producte d'una traducció diferencial dels cistrons. L'ADN concatamèric, producte de la replicació en forma σ , i els precursors de la càpside interactuen per formar les partícules víriques de la progènie. En el cas del bacteriòfag lambda, l'enzim terminasa és l'encarregat d'empaquetar i tallar el DNA viral per la regió *cos* (Capmbell, 1994).

El bacteriòfag P22 no posseeix les seqüències *cos* en el seu genoma. Aquest és una molècula de dsDNA amb una redundància terminal aproximadament del 3,8% (figura 1. 13) (Casjens i Hayden, 1988). En aquest cas, l'empaquetament del DNA es duu a terme a partir d'un concatàmer, fins que el cap de la càpside està ple de DNA; d'aquesta manera s'obté una progènie amb seqüències circularment permutades.

El virió P22 és una partícula icosaèdrica amb una placa basal i una cua petites, i està format per una quantitat equimolar de DNA i proteïna. El cap està constituït, principalment, pel producte del gen 5, i l'única proteïna que forma la petita cua és el producte del gen 9.

Primerament es forma la procàpside, composta per diversos tipus de proteïnes:

- i. La proteïna Gp8, que serveix de cadafal per a l'ensamblatge de la carcassa externa formada per la proteïna major de la càpside.
- ii. La proteïna Gp5, que forma la carcassa del cap icosaèdric del virió.
- iii. La proteïna Gp1 o proteïna portal, que forma un anell dodecamèric en un vèrtex del cap, per on entra el DNA i on s'uneix la cua.
- iv. Les proteïnes menors (Gp7, Gp16 i Gp20), que estan presents a la procàpside, però que no participen en la incorporació de l'anell portal ni en l'empaquetament del DNA.

L'ensamblatge de la procàpside es duu a terme únicament per les proteïnes Gp5 i Gp8; tanmateix, un complex de subunitats del cadafal, juntament amb algun factor cel·lular,

serveix, probablement, d'iniciador de l'ensamblatge de la procàpside i d'organitzador de l'anell portal en un vèrtex concret de la carcassa (Bazinet i King, 1988). La proteïna portal, que forma l'anell, interacciona amb la procàpside durant el procés de polimerització (Moore i Prevelige, 2002).

Després de la formació de la procàpside comença l'empaquetament del DNA viral. Aquest és reconegut una única vegada al començament de cada concatàmer pel complex enzimàtic anomenat terminasa, format per les proteïnes virals Gp2 i Gp3. La proteïna Gp3 s'uneix específicament a una seqüència asimètrica de 22 pb anomenada *pac*, propera al mig del gen 3 (Wu *et al.*, 2002), i talla el DNA per formar el primer extrem que encapsidarà. La terminasa es manté unida al DNA després de tallar-lo, així el complex DNA-terminasa cerca una procàpside buida per unir-se al vèrtex portal. L'empaquetament de la procàpside té lloc fins que aquesta queda plena de DNA. Durant aquesta inserció el complex terminasa es manté associat al complex d'empaquetament formant part de la maquinària de transport. La proteïna Gp2 del complex actua com a ATPasa, i permet la condensació del DNA i la seva entrada/compactació dins de la càpside (Poteete i Botstein, 1979). Quan la càpside està plena, el complex terminasa fa un segon tall per separar el DNA empaquetat del concatàmer. És la proteïna portal la que regula la longitud i la densitat del DNA que s'empaqueta (Casjens *et al.*, 1992). Posteriorment, la terminasa s'uneix al DNA no empaquetat per formar un nou complex DNA-terminasa que buscarà una nova procàpside buida per repetir el procés (Hendrix, 1998). El següent empaquetament començarà per l'extrem final creat pel tall anterior, per tant, un únic reconeixement dirigeix l'encapsidació de molts genomes vírics.

L'encapsidació del DNA provoca la maduració de la procàpside. En aquest moment, les proteïnes estructurals pateixen un canvi conformacional, del qual resulta un augment del 10-40% de la grandària de la procàpside; aquesta dilatació implica el desplegament de l'estructura terciària de les subunitats Gp5 de la procàpside per formar uns contactes quaternaris més estables en la càpside madura i la sortida de les proteïnes Gp8 que formaven el cadafal. Aquest procés, durant l'encapsidament del DNA, està governat per un augment de l'energia d'activació, i és dependent d'ATP. L'estructura de les subunitats Gp5 de la procàpside és un pas intermedi entre el plegament de les proteïnes/ensamblatge i la formació de la càpside madura (Tuma *et al.*, 1998). Durant la dilatació, l'estructura secundària de les proteïnes Gp5 varia modestament, hi ha un augment del 2-3% en el contingut de làmines β , però

L'estructura terciària queda alterada radicalment a causa de la reorganització dels seus dominis (Tuma *et al.*, 2001).

Una vegada s'ha encapsidat el DNA, la càpside madura i s'estabilitza per l'addició, primerament de la proteïna Gp4, i, posteriorment, de les proteïnes Gp10, Gp26 i Gp14 (Strauss i King, 1984). Finalment, els trímers, formats per les interaccions hidrofòbiques entre les regions carboxiterminals de la proteïna Gp9, s'addicionen a la càpside madura per formar la cua i, per tant, formar les partícules víriques del bacteriòfag P22 (Gage i Robinson, 2003).

1.3.11. Lisi cel·lular

Una vegada s'han format les partícules víriques, aquestes han de sortir de la cèl·lula i dispersar-se per poder començar novament el cicle infectiu. Una de les principals barreres per a la sortida de les partícules és la malla continua de peptidoglicans de la paret cel·lular bacteriana.

L'estratègia que segueixen la majoria de bacteriòfags, entre els quals, el bacteriòfag lambdoïdes, és produir una endolisina que degrada els components de la paret cel·lular.

L'endolisina del bacteriòfag lambda és una transglicosilasa, que trenca els enllaços N-acetilglucosamins del peptidglicà de la capa de mureïna per transglicosilació. Altres fags com el P22 presenten endosisines que hidrolitzen aquests enllaços (Campbell, 1994).

L'endolisina es comença a sintetitzar al mateix temps que les proteïnes de la procàpside, acumulant-se plegada i totalment activa al citosol fins que es duu a terme la maduració vírica. Aquesta proteïna no té cap senyal amino terminal de secreció, necessita d'un altre factor lític del bacteriòfag per accedir a la paret cel·lular, aquest s'anomena **holina**. Aquesta proteïna genera una sèrie de porus a la membrana, es col·lapsa el potencial i causa lesions irreversibles a la membrana cel·lular, on s'estriona la respiració i la síntesi macromolecular. D'aquesta manera es permet el lliure accés de l'endolisina a la paret cel·lular.

Els gens de l'holina, l'endolisina i d'una lipoproteïna de la membrana externa (*S*, *R* i *Rz* en el fag lambda; *13*, *19* i *15* en el fag P22) es troben formant un mòdul a l'inici de la

unitat transcripcional tardana, sota el control del P_R' , i s'expressen de manera constitutiva.

El gen que codifica per a una lipoproteïna de membrana externa és el més conservat entre els fags lambdoides. Se'n desconeix la seva funció, se sap que no afecta la cèl·lula a concentracions de cations bivalents inferiors a 5-10 mM, a concentracions superiors, les cèl·lules es tornen fràgils i perden el seu contingut citoplasmàtic. Es creu que podria tenir una activitat endopeptídica dels oligopèptids del pèptidglicà i/o entre el peptidglicà i la membrana externa.

1.3.11.1. Regulació de l'holina

El gen *S* o *I3* codifica dos pèptids de diferent llargària a l'extrem amino terminal, són traduïts a partir de diferents regions Shine Dalgarno, a causa de l'estructura secundària que es forma anomenada regió *sdi*. L'eficiència de traducció varia inversament amb l'estabilitat de l'estructura formada en aquesta regió. En el cas del fag lambda, els dos polipèptids difereixen en dos aminoàcids; en el cas del P22, la diferència és de tres. El polipèptid més curt és l'holina activa i el més llarg és una proteïna inhibidora o antiholina. El cronometratge de la lisi depèn de la proporció d'ambdues proteïnes (Nam *et al.*, 1990).

L'holina requereix tres regions transmembranals per inserir-se a la membrana i formar el porus; per això és necessària la penetració de l'extrem amino terminal a través de la membrana bilipídica. La proteïna més llarga presenta una Lys com a segon aminoàcid en el lambda, i com a segon i tercer en el fag P22. La interacció, entre la càrrega negativa de la membrana interna i la càrrega positiva aportada per la Lys de l'extrem amino terminal de la proteïna més llarga, evita la participació d'aquesta proteïna en la formació dels porus, disminuint el col·lapse del potencial de membrana o compensant-lo en els heteroagregats formats per totes dues proteïnes. L'acumulació d'aquests agregats mixtes a la membrana té lloc durant el període de formació de les partícules víriques. Finalment, quan ja s'han format els agregats, aquests causen una desestabilització protònica de la membrana, que arriba a ser insuportable. El resultat és un col·lapse membranar i la consegüent formació dels forats. Per tant, el metabolisme molecular de la cèl·lula continua fins al moment just anterior de la lisi (Young, 1992) (Young i Bläsi, 1995 i Bläsi i Young, 1996).

1.3.12. Bacteriòfags com agents transductors

La transducció de gens bacterians des d'una cèl·lula a una altra utilitzant com a vehicle els bacteriòfags ha estat extensament utilitzada per construir els mapes genètics de molts cromosomes bacterians. Per les tècniques de manipulació genètica es poden diferenciar en dos tipus de transducció: l'especialitzada o restringida i la generalitzada.

1.3.12.1. Transducció especialitzada

La transducció especialitzada només permet la transferència d'un grup de gens bacterians que es localitzen propers al profag. Els gens que es transdueixen són incorporats al genoma fàgic per una escissió anormal del profag. Aquesta escissió té lloc en ambdós genomes, el bacterià i el fàgic, on la recombinació es dona en petites regions d'homologia (5-14 pb), per això es coneix també com un tipus de recombinació il·legítima. Algunes d'aquestes seqüències són semblants a la seqüència consens per la DNA girasa i a les seqüències palindròmiques repetitives extragèniques. Per tant, seria possible que la DNA girasa estigués relacionada amb aquest procés (Kumagai i Ikeda, 1991).

La majoria de partícules transductants del fag lambda són defectives i no donen lloc a un cicle infectiu per elles mateixes, ja que per compensar la incorporació dels gens bacterians pateixen una pèrdua del DNA víric, i una alteració de les seqüències *cos*. Tanmateix, es poden replicar en infeccions mixtes amb un fag lambda salvatge com a *helper* per complementar les funcions perdudes.

En el bacteriòfag P22 s'han caracteritzat 12 maneres diferents de transducció especialitzada, basant-se en l'estructura del genoma víric (lineal o circular) després de la infecció d'una nova cèl·lula hoste i en els requeriments del procés de transducció, com per exemple: les funcions de recombinació de l'hoste, les funcions d'integració fàgica o la presència d'un profag.

Més del 99% de les partícules amb transducció especialitzada contenen un genoma lineal que no pot recircularitzar a causa de la carència de la redundància terminal i necessita de la presència d'un profag integrat per poder recombinar. Només un 0,1%

de les partícules tenen redundància terminal i transdueixen per integració (Kwoh i Kemper, 1978a i 1978b).

La transducció especialitzada suggereix una relació evolutiva entre fags i bacteris molt estreta, basada en intercanvis entre els seus DNAs.

1.3.12.2. Transducció generalitzada

La transducció generalitzada és l'encapsidació de DNA bacterià en la procàpside fàgica pel mecanisme d'ompliment fins que estigui plena, com és el cas del fag P22 i P1, i injecció d'aquest DNA a una nova cèl·lula hoste. Aparentment, qualsevol marcador genètic del bacteri donador pot ser transduït amb una freqüència de 10^{-5} a 10^{-8} per cèl·lula. Tanmateix, la transducció generalitzada del fag P22 es duu a terme per seqüències semblants a la *pac*, que es troben en el cromosoma de *Salmonella*. Aquestes regions són utilitzades pel complex terminasa del fag per iniciar les sèries d'empaquetament del DNA de l'hoste. Després de l'anàlisi de les freqüències de transducció s'ha observat que, majoritàriament, hi ha 10 seqüències semblants a les *pac* en el cromosoma de *Salmonella*. Un bacteriòfag P22 salvatge produeix un 2% de partícules de transducció generalitzada (Wu *et al.*, 2002).

La molècula de DNA transduïda quan entra a la cèl·lula receptora si s'incorpora al DNA de la cèl·lula hoste ho fa per recombinació amb un doble entrecruament, produint un intercanvi de gens bacterians. Aquesta recombinació homòloga està controlada pel sistema *rec* de l'hoste. Només marcadors genètics propers poden ser cotransduïts per una mateixa partícula fàgica, ja que el DNA bacterià que pot encapsidar un virió correspon a un 1-2% del DNA bacterià total.

A la natura, el potencial per transferir gens bacterians mitjançant bacteriòfags, com a mínim pel que fa al gènere de *Salmonella*, és molt més elevat del que s'esperava. Tot i que el rang d'hoste és més restringit que la dels plasmidis conjugatius, hi ha diversos bacteriòfags que infecten diferents espècies o, fins i tot, infecten diferents gèneres, com és el cas del fags P22 i P1 (Schicklmaier i Schmieger, 1995). Tenint en compte aquesta premissa, l'estabilitat dels virions durant anys i, considerant que el DNA encapsulat pels bacteriòfags es troba protegit de les nucleases, de dissolvents orgànics, dels antibiòtics i d'altres compostos químics, la transducció generalitzada pot ser un factor

important per a l'intercanvi genètic entre diferents bacteris durant el seu procés evolutiu.

1.3.13. Bacteriòfag SE1

El bacteriòfag SE1 es va aïllar, al nostre laboratori, a partir d'una soca de *Salmonella enterica* serovarietat Enteritidis d'un pacient hospitalari. Aquest nou fag és capaç d'infectar *Salmonella enterica* serovarietat Typhimurium. Els virions de SE1 presenten una càpside hexaèdrica de 60 nm de ϕ i la longitud de la seva cua és de 12 nm. Pertany a la família *Podoviridae* i morfològicament és semblant al bacteriòfag P22 (figura 1.14) (Llagostera *et al.*, 1986).

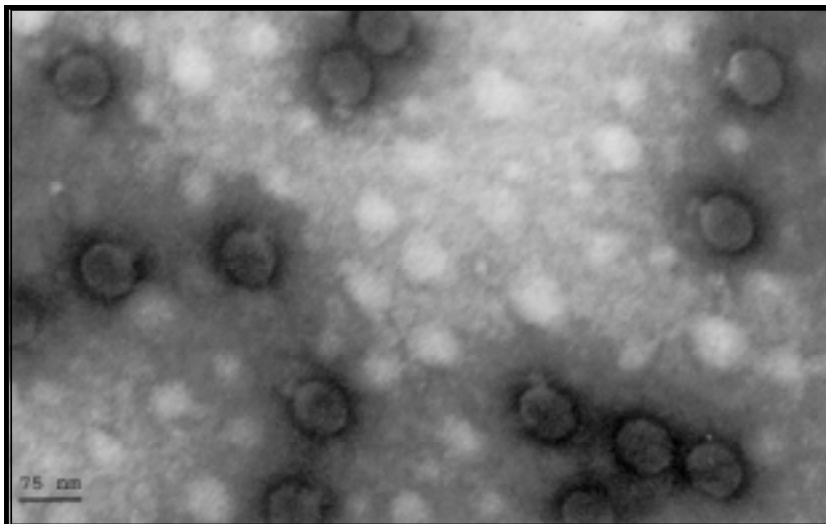


Figura 1.14. Fotografia del fag SE1 al microscopi electrònic (Llagostera *et al.*, 1986)

Aquest fag és capaç de fer transducció generalitzada amb una freqüència similar a la dels mutants d'elevada freqüència de transducció del fag P22. Aquest fet podria ser conseqüència que el cromosoma de *Salmonella* tingués més seqüències semblants a les seqüències *pac* del fag SE1 que a les del fag P22.

A diferència del bacteriòfag P22 salvatge, el fag SE1 pot transduir marcadors genètics sobre soques lisogenes per SE1, la qual cosa indica que no presenta un sistema d'exclusió semblant al SieA del fag P22, i pot ser utilitzat com a vector de transducció en la construcció de soques multiautòtrofes de *Salmonella* mitjançant transduccions successives.

L'eficiència de transducció sobre soques lisogenes disminueix com a conseqüència de la conversió lisogènica feta pel profag; per tant, disminueix l'eficiència d'adsorció del fag SE1. D'altra banda, els fags P22 i SE1 s'adsorbeixen pel lipopolisacàrid (LPS) de la paret bacteriana; tanmateix, la conversió lisogènica feta pel profag SE1 no afecta a l'adsorció per P22, suggerint que els fags P22 i SE1 tenen diferents mecanismes de seroconversió.

En conclusió, el bacteriòfag SE1 és millor vector que el fag P22 per a l'estudi genètic, tant de *Salmonella enterica* serovarietat *enteritidis* com de *Salmonella enterica* serovarietat Typhimurium (Llagostera *et al.*, 1986).

1.4. Objectius

El present treball pretén caracteritzar el bacteriòfag SE1 a nivell molecular. Per fer-ho se n'analitzarà el genoma a través de la seva seqüència, a més, de les diferents funcions del fag SE1 en estat de lisogènia, tals com la conversió lisogènica, la integració dins el cromosoma bacterià i el regulador o interruptor genètic, caracteritzant el repressor cI d'aquest fag, així com els tres operadors (O_{R1} , O_{R2} i O_{R3}) als quals s'uneix en comparació amb d'altres bacteriòfags lambdoides de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Tot aquest estudi es durà a terme tant mitjançant tècniques experimentals com biocomputacionals.

2. Material i mètodes

2.1. Soques, plasmidis i oligonucleòtids

Les soques bacterianes i plasmidis utilitzats, les seves característiques més importants i la seva procedència es resumeixen a la taula 2.1 i taula 2.2, respectivament. La llista d'oligonucleòtids (Roche Diagnostics S.L.) utilitzats s'indica a la taula 2.3.

Taula 2.1. Taula de soques utilitzades.

Soques	Característiques	Procedència
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>supE4</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>relA1</i>	Clontech
MC1061 λ pir	Δ <i>lacX74 hsdR2 mcrB araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU galK rpsL</i> <i>thi</i>	Casadaban i Cohen, 1979
S17 λ pir	<i>recA- RP4 Tc::Mu Km::Tn7</i> λ pir	de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B,m_B-)</i> <i>dcm gal</i> λ (DE3)	Clontech
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
ATCC14028	salvatge	ATCC
UA1770	ATCC14028, Rif ^r	Campoy <i>et al.</i> , 2002
UA1820	ATCC14028, Rif ^r , lisogena per a SE1	Aquest estudi
UA1821	ATCC14028, Rif ^r , lisogena per a SE1 <i>orf23::Cm</i>	Aquest estudi
UA1822	ATCC14028, Rif ^r , lisogena per a SE1 <i>orf23</i>	Aquest estudi

Taula 2.2. Taula de plasmidis utilitzats.

Plasmidis	Característiques	Procedència
pBluescript SK(+)	Ap ^{r*}	Stratagene
pGEM-T [®]	Vector de clonació dels productes de PCR, Ap ^{r*}	Promega
pET15b(+)	Vector de sobreexpressió de proteïnes recombinants, Ap ^{r*}	Novagen
pKD46	Ap ^{r*} , Ts ^{**}	Datsenko i Wanner, 2000
pKD3	Cm ^{r*} , Ap ^{r*}	Datsenko i Wanner, 2000
pCP20	Cm ^{r*} , Ap ^{r*} , Ts ^{**}	Datsenko i Wanner, 2000
pGP704	Mob ^{***} , Ap ^{r*}	de Lorenzo, <i>et al.</i> , 1990
pUA1066	Derivat del pGEM-T [®] amb el gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 amb les dianes <i>NdeI-BamHI</i> als extrems	Aquest estudi
pUA1067	Derivat del pET15b(+) que conté el gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 clonat per les dianes <i>NdeI-BamHI</i>	Aquest estudi
pUA1068	Derivat del pGEM-T [®] que presenta el promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1	Aquest estudi

* Ap^r i Cm^r fan referència als cassets de resistència a ampicil·lina i a cloramfenicol respectivament.

** Ts fa referència a la sensibilitat del plasmidi a 42°C.

*** Mob fa referència a la possessió de la regió que permet la mobilització del plasmidi en la conjugació.

Taula 2.3. Taula d'oligonucleòtids utilitzats en el present treball.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
Direct	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	+2964 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T [®] , utilitzat per a la comprovació de fragments clonats.
Reverse	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	+175 ^b	Oligonucleòtid <i>reverse</i> o M13 del vector pGEM-T [®] , utilitzat per a la comprovació de fragments clonats.
Direct-Dig	5'-dig-GTAAAACGACGGCCAGT-3'	+2964 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T [®] marcat amb digoxigenina a l'extrem 5', utilitzat per a l'obtenció dels fragments per als assaigs EMSA.
Reverse-Dig	5'-dig-GGAAACAGCTATGACCATG-3'	+175 ^b	Oligonucleòtid <i>reverse</i> del vector pGEM-T [®] marcat amb digoxigenina a l'extrem 5', utilitzat per obtenir els fragments pels assaigs EMSA.
Direct-Cy5	5'-Cy5-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'	+2957 ^b	Oligonucleòtid universal del vector pGEM-T [®] marcat amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
Reverse-Cy5	5'-Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	+177 ^b	Oligonucleòtid <i>reverse</i> del vector pGEM-T [®] marcat amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
T7 prom-Cy5	5'-Cy5-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	+2987 ^b	Oligonucleòtid T7 promotor amb Cy5 a l'extrem 5', utilitzat per seqüenciació.
139SE1(+) ^a	5'- TAACACCTCTGACCACATCC-3'	+139 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
705SE1(-) ^a	5'- TAGCACGATCTTGAATGGCG-3'	+705 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
1581SE1(-) ^a	5'- TCTGTTCTTTTCTGGGTGG-3'	+1581 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
2165SE1(-) ^a	5'- AAGAACCTGCTCTTTTCGCG-3'	+2165 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
2833SE1(+) ^a	5'- AAAGTTATTGTTTTCGCG-3'	+2833 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
3008SE1(-) ^a	5'- AGTCAACAACATACCGCGTC-3'	+3008 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
3607SE1(+) ^a	5'- CTTAAGCCAGTAGAAAGCGC-3'	+3607 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
3719SE1(+) ^a	5'- GCTGAGGAACCTTGTATGATC-3'	+3719 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
3926SE1(-) ^a	5'- AAGATGACTAATCGGCGG-3'	+3926 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
4431SE1(+) ^a	5'- TTGAGAAATGCACAGCCTC-3'	+4431 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
4698SE1(-) ^a	5'- GCAGCAATAACAAACCTCGC-3'	+4698 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5156SE1(+) ^a	5'- GCCCGTTTTCAAGCGGATTT-3'	+5156 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5395SE1(-) ^a	5'- ATCAATCGTTCGACCAGGAG-3'	+5395 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5421SE1(-) ^a	5'- AAGGAGAGTGATATGGACGG-3'	+5421 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5497SE1(-) ^a	5'- GCAACCTTATCAGGCACAGA-3'	+5497 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5714SE1(+) ^a	5'- ATTCTCTGCGGATTCCAG-3'	+5714 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
5856SE1(+) ^a	5'- TCGTTATCAGCTAAGTGGCG-3'	+5856 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
6361SE1(+) ^a	5'- ATCATCCTGGCAATATCCGC-3'	+6361 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
7148SE1(+) ^a	5'- TTCGGAATGGTCGGATTG-3'	+7148 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
7198SE1(+) ^a	5'- TCTGCGAGTTGTATATCGCG-3'	+7198 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
7732SE1(+) ^a	5'- TGAACGCATTTTGTCTGCGC-3'	+7732 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
7851SE1(+) ^a	5'- GATTTGTTTCGAGTCAACCG-3'	+7851 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
8657SE1(+) ^a	5'- TGAACTCCCTGTTTCCTTGC-3'	+8657 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
8709SE1(-) ^a	5'- CATTACGCCTGTAAACGG-3'	+8709 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
8981SE1(+) ^a	5'- TCGTCCTCGTTTGGTTACGA-3'	+8981 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
9083SE1(-) ^a	5'- CGCAACACGAAAGTCTTACC-3'	+9083 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
9163SE1(+) ^a	5'- TATTTCCATCACTCCTCCCC-3'	+9163 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
9305SE1(-) ^a	5'- AATCTGATAGCAGCAGTTCC-3'	+9305 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
9419SE1(+) ^a	5'- TTGTCCACCATTTCATGGG-3'	+9419 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
10273SE1(-) ^a	5'- AGCTGATTATTGGCGGCTAC-3'	+10273 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
10500SE1(+) ^a	5'- TTACCTCGCTGTTATTTGTT-3'	+10500 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
10824SE1(+) ^a	5'- GGCTTTGGTGTTCAGATAG-3'	+10824 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
10843SE1(-) ^a	5'- CTATCTGCAACACCAAAGCC-3'	+10843 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
11715SE1(-) ^a	5'- ATGTGTTGGCACCAGCATTG-3'	+11715 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
12072SE1(+) ^a	5'- AAGTTACCTGGAAGGTTGCG-3'	+12072 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
12332SE1(+) ^a	5'- ATACCCTAGAACCATGCC-3'	+12332 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
12593SE1(-) ^a	5'- TTTTCCGGTGATAGTGAGCC-3'	+12593 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
12626SE1(+) ^a	5'- TTACCCGAAGAAACAGCAAT-3'	+12626 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
12967SE1(-) ^a	5'- ATGGCGTTTACTGACCTIGA-3'	+12967 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
13008SE1(-) ^a	5'- CGGGTGATGATGGATAATGG-3'	+13008 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
13579SE1(+) ^a	5'- TCTTTGTTGACCCACGAG-3'	+13579 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
13876SE1(-) ^a	5'- TTCCCTGCAATGGCAACAGC-3'	+13876 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
14703SE1(-) ^a	5'- ATCAAGGCAAACCCCTTACC-3'	+14703 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
15139SE1(+) ^a	5'- CGTATTAGAGAGTACCGC-3'	+15139 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
15313SE1(-) ^a	5'- TATCACTCCGGCTTTGCG-3'	+15313 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
15409SE1(-) ^a	5'- ACGCTCTTCGAACATCCATC-3'	+15409 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
15668SE1(+) ^a	5'- AATAACCAGAATGCACCGGG-3'	+15668 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
16360SE1(+) ^a	5'- ACGATGGTGA CTCAACAGG-3'	+16360 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
16928SE1(-) ^a	5'- TTTCTTCTTGGAGTGCGG-3'	+16928 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
17095SE1(+) ^a	5'- TACTGTCTGTCTTATGCCCG-3'	+17095 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
17935SE1(+) ^a	5'- TTTGGCATGGTCAACGACTG-3'	+17935 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
18690SE1(+) ^a	5'-AATGATCCGAGTGCCTCATG-3'	+18690 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
18828SE1(+) ^a	5'- TTTTCATGATGCAGGACGC-3'	+18828 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
19608SE1(-) ^a	5'- CTGTCACGCAGGTCTTAAAG-3'	+19608 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
19773SE1(-) ^a	5'- AACGGCTTTCTCTTCGTTGC-3'	+19773 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
20211SE1(-) ^a	5'- AATTCATGCAGCATCGCC-3'	+20211 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
20753SE1(-) ^a	5'- TGATTTCTTCCTGTCCAGCG-3'	+20753 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
21310SE1(-) ^a	5'- TGTCGTGACCGATAATGCAC-3'	+21310 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
22093SE1(-) ^a	5'-ATCTGCTCATTGCTTACCCC-3'	+22093 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
22904SE1(-) ^a	5'- ACACAAAAACTGGCTTGGGC-3'	+22904 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
23243SE1(+) ^a	5'- ACGTGAGAGAGCAGCAAATG-3'	+23243 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
24222SE1(-) ^a	5'- AGCGCAGACACATATACACC-3'	+24222 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
24899SE1(+) ^a	5'- GATCTTCTCAACGCTAACATC-3'	+24899 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
25018SE1(-) ^a	5'- TAGCTCCTTGATACGAGAGC-3'	+25018 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
25385SE1(+) ^a	5'- CAAAACGACTCAACGCATCC-3'	+25385 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
26270SE1(-) ^a	5'- TGA CTCTACTGAGTTACCGC-3'	+26270 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
26479SE1(+) ^a	5'- AAAAGAAAATCCCCGCACCG-3'	+26479 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
27388SE1(+) ^a	5'- AGACAAGCAGCTCATTGCTG-3'	+27388 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
27698SE1(+) ^a	5'- TACGAAAACCCTGAGGTACC-3'	+27698 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
28443SE1(+) ^a	5'- AAGCGCAGAACCAGCTTAAC-3'	+28443 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
29610SE1(-) ^a	5'- GTTTTGCCTTTAGCTTGCGG-3'	+29610 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
29678SE1(-) ^a	5'- CAATAATCTCATCCACCGCC-3'	+29678 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
29833SE1(+) ^a	5'- GTTACTGGAGCTTAACGTCG-3'	+29833 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
30363SE1(-) ^a	5'- TCGTTATCCAGTTGCCATGC-3'	+30363 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
31141SE1(-) ^a	5'- ATGCTTTCTTGACCACGCC-3'	+31141 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
31363SE1(+) ^a	5'- GCACGGAAATTGAGTTTGGC-3'	+31363 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
31487SE1(+) ^a	5'- TAAGGCGGAAAGCGATGC-3'	+31487 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
32062SE1(+) ^a	5'- AGAAGTCCTCAACTCATCGG-3'	+32062 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
33817SE1(+) ^a	5'- AACTGCTTCTCAATCGCTGG-3'	+33817 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
34628SE1(+) ^a	5'- AAGCGCAAAGTATGCAGCAG-3'	+34628 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
35452SE1(+) ^a	5'- CAACAGAAAGCGCTAAACGC-3'	+35452 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
36080SE1(+) ^a	5'- AGAAGGCTGAAATAGCTCGC-3'	+36080 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
36889SE1(+) ^a	5'- TTTCTATGCTGCGTATCCGG-3'	+36889 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
37209SE1(-) ^a	5'- TTAGTTGCTTTGCTTCTGGC-3'	+37209 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
37341SE1(+) ^a	5'- AGAGCAGAGCAATACGCTAC-3'	+37341 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
37520SE1(+) ^a	5'- CTCTAACACGATGAATGCGC-3'	+37520 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
37966SE1(+) ^a	5'- ACGTGAAACGCATATGGAGC-3'	+37966 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
38118SE1(-) ^a	5'- AAATCTCACCTCCTGATTGC-3'	+38118 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
38588SE1(+) ^a	5'- ATTTCCCACCTTAGCCAGTGC-3'	+38588 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
39220SE1(+) ^a	5'- TTTTGTGTCTGGAGTTTCGC-3'	+39220 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
39834SE1(-) ^a	5'- ATGCGTCATTAAGACCACGG-3'	+39834 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
40321SE1(-) ^a	5'- GATAAGAAGGCCATCAACCG-3'	+40321 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
40474SE1(-) ^a	5'- GCTTTCATAAAAACCCCGG-3'	+40474 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
40974SE1(-) ^a	5'- GTTTTAACACCACTCTCCCC-3'	+40974 ^c	Oligonucleòtid utilitzat en la seqüenciació del bacteriòfag SE1.
cISE1upNdeI	5'-CATATGAAAAAAGAAACT CTCTCTIG-3'	+1 ^d	Oligonucleòtid per la clonació del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1.
cISE1dwBamHI	5'- GGATCCCTAACCGIGCTICCTATA- 3'	+690 ^d	Oligonucleòtid per la clonació del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1.
pcISE1up	5'- TTGCTGCCACATACTTAGC-3'	-249 ^d	Oligonucleòtid per a la clonació del promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 i la identificació de l'O _R 3 per EMSA.
pcISE1dw	5'-TACCAGCTAGTTCCATTGCC-3'	+55 ^d	Oligonucleòtid per a la clonació del promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1.
pcISE1up-42	5'- CGTGTTTTGACCATTAATACGC-3'	-42 ^d	Oligonucleòtid per a la identificació de l'O _R 3 del promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 per EMSA.
pcISE1up-32	5'- CCATTAATACGCAAGCGTA TAAATT-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per a la identificació de l'O _R 3 del promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 per EMSA.
pcISE1up-27	5'- TAATACGCAAGCGTATAA ATTGAATATT-3'	-27 ^d	Oligonucleòtid per la identificació de l'O _R 3 del promotor del gen <i>cI</i> del bacteriòfag SE1 per EMSA.
Mut1pcISE1	5'- CGTGTTTTGAGGCCCAATACGCAA-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut2pcISE1	5'- CCATCCATACGCAAGCGTAT-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
Mut3pcISE1	5'-CCATTACCACGCAAGCGTAT-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut4pcISE1	5'-CCATTAATCGGCAAGCGTAT-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut5pcISE1	5'-CCATTAATACCGAAGCGTATAA-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut6pcISE1	5'-CCATTAATACGCCCGGTATAAAT-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut7pcISE1	5'-CCATTAATACGCAACGGTATAAATTG-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut8pcISE1	5'-CCATTAATACGCAAGCCATAAATTGAA-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut9pcISE1	5'- CCATTAATACGCAAGCGTCCAAATTGAATA-3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut10pcISE1	5'- CCATTAATACGCAAGCGTACAAATTGAATAT- 3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
Mut11pcISE1	5'- CCATTAATACGCAAGCGTATCCATTGAATATT- 3'	-32 ^d	Oligonucleòtid per obtenir mutants del promotor del gen <i>cI</i> per EMSA.
cISE1up	5'-ATACCGCACATGTTAAGCGG-3'	+13203 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
cISE1dw	5'-GGATCCCTAACCGTGCTTCCTATA-3'	+13034 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
Orf24SE1up	5'-ATGGCGTTTACTGACCTTGA-3'	+12967 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
Orf24SE1dw	5'-TTACCCGAAGAAACAGCAAT-3'	+12626 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
Orf23SE1up	5'-ATGCCGAAGTCAATCTGC-3'	+12487 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
Orf23SE1dw	5'-TTAAGCTGTAAGCATTAAAA-3'	+11414 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.
24SE1dw	5'-TTACCTCGCTGTTATTTGTT-3'	+10500 ^c	Oligonucleòtid per a la realització de RT-PCR.

Taula 2.3. Continuació.

Oligonucleòtid	Seqüència	Posició	Aplicació
Orf23SE1P1up	5'- ATGTGCGAAGAAAACAATCTGGGTGAAAAACCAATG CCGAAGTCAATCTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'	+1 ^d	Oligonucleòtid per a l'amplificació del cassette Cm ^r i els FRT del plasmidi pKD3, amb una cua de 50 nucleòtids amb homologia amb l' <i>orf23</i> .
Orf23SE1P2dw	5'- TTAAGCTGTAAGCATTAAAACTCGCTGACATAGTCTTT CGAACTGCTGGACATATGAATATCCTCCTTATG-3'	+1107 ^d	Oligonucleòtid per a l'amplificació del cassette Cm ^r i els FRT del plasmidi pKD3, amb una cua de 50 nucleòtids amb homologia amb l' <i>orf23</i> .
C1	5'-ATCTTCCGTCACAGGTAGG-3'	974 ^b	Oligonucleòtid per a la comprovació de la inserció del cassette Cm ^r i els FRT a l' <i>orf23</i> .
C2	5'-TTTTACCCATGGGCAAATAT-3'	245 ^b	Oligonucleòtid per a la comprovació de la inserció del cassette Cm ^r i els FRT a l' <i>orf23</i> .
Uporf23SE1	5'-ATGTTGGCCTGGTCAATAAC-3'	-50 ^d	Oligonucleòtid per a la comprovació de la inserció del cassette Cm ^r i els FRT a l' <i>orf23</i> .
Dworf23SE1	5'-CGAACGGAACATCAAAGGG-3'	+1233 ^d	Oligonucleòtid per a la comprovació de la inserció del cassette Cm ^r i els FRT a l' <i>orf23</i> .
IntSE1up	5'-ACAGGCAACACGTAAGACC-3'	4385 ^c	Oligonucleòtid per a la determinació dels <i>attB</i> i <i>attP</i> .
Thrup	5'-AACATGGTACTCAGCACTCC-3'	368429 ^e	Oligonucleòtid per a la determinació dels <i>attB</i> i <i>attP</i> .
Thrdw	5'-AATGTATCCACGGAGAGGAC-3'	369282 ^e	Oligonucleòtid per a la determinació dels <i>attB</i> i <i>attP</i> .

- (+) Es refereix al fet que el sentit 5'-3' del oligonucleòtid correspon al mateix sentit en el qual està anotada la seqüència del bacteriòfag SE1. (-) Es refereix al fet que el sentit 5'-3' de l'oligonucleòtid correspon a la reversa complementària de la seqüència del bacteriòfag SE1.
- La posició correspon a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte del punt d'inici de la seqüència del plasmidi.
- La posició correspon a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte del punt d'inici de la seqüència del bacteriòfag SE1.
- La posició correspon a l'extrem 5' de l'oligonucleòtid respecte del punt d'inici de traducció del gen esmentat.
- La posició correspon a la posició en el cromosoma d'*S. enterica* serovar Typhimurium de l'extrem 5' de l'oligonucleòtid.

2.2. Mètodes de cultiu i conservació de soques

Per al creixement de les diferents soques bacterianes d'*E. coli* o d'*S. typhimurium* s'han utilitzat el medi ric Luria-Bertani (LB) (Miller, 1992), el medi altament ric Terrific Broth (TB), (Tartof i Hobbs, 1987), suplementats sempre amb els antibiòtics adequats per a cada microorganisme i cada cas (taula 2.4.). Per a l'expressió fenotípica dels cultius electrotransformats s'ha utilitzat el medi líquid BHI. Les sèmres en medi sòlid s'han fet en plaques de Petri (Sterilin), amb medi LB amb un 17% d'agar. La temperatura d'incubació de les soques és de 37 °C. Per a les sèmres amb doble capa s'han utilitzat les plaques amb agar LB i agar LB tou fos a 45 °C.

Per dur a terme els cultius de nit, es parteix de colònies aïllades dels microorganismes i s'inoculen a 10 ml de medi de cultiu amb els complements necessaris i s'incuben a 37°C en agitació de 110 rpm. Els cultius d'*E. coli* i d'*S. typhimurium* a partir d'una colònia tardan a arribar a la fase estacionària unes 16 hores en medi LB líquid. Per obtenir cultius en la fase exponencial es fa una ressembla 1:100 del cultiu en medi fresc i s'incuba en les mateixes condicions fins a arribar a la concentració esperada. El creixement del cultiu és controlat mitjançant la mesura de la densitat òptica (DO) a un espectrofotòmetre. En les corbes de creixement, es mesura la DO a una longitud d'ona de 550 nm si el cultiu es troba en medi LB líquid, i a una longitud d'ona de 420 nm si és en medi AB líquid.

La conservació de les soques d'*E. coli* i d'*S. typhimurium* s'ha fet en plaques de LB complementades adequadament, que es mantenen a 4°C i es ressemblen cada mes, i es mantenen congelades a -20 °C, en forma de vials de cultius glicerinars amb glicerol (Scharlau) al 50% com a agent crioprotector. Per a l'emmagatzemament perllongat s'utilitza el sistema crioconservació de bacteris amb les perles poroses (Protect), que es mantenen a -70 °C.

2.2.1. Medis i solucions de cultiu

Els medis i solucions utilitzats en aquest treball han estat els següents:

Medi LB líquid (Luria Bertani) (Miller, 1992)

- A 950 ml d'aigua destil·lada s'hi afegeixen:

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracte de llevat (DIFCO)	5 g
Clorur sòdic (NaCl) (Panreac)	10 g

- Es barregen els components fins a una total dissolució i s'ajusta el pH a 7 amb NaOH 5 N.
- S'arrasa a un volum final de 1 L amb aigua destil·lada.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Medi Agar LB

- S'afegeixen a 950 ml d'aigua destil·lada:

Bacto-triptona (DIFCO)	10 g
Extracte de llevat (DIFCO)	5 g
Clorur de sodi (NaCl) (Panreac)	10 g
Agar (DIFCO)	17 g

- Es barregen els components fins a una total dissolució i s'ajusta el pH a 7 amb NaOH 5 N.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua destil·lada.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixar refredar i es reparteix en plaques de Petri.

Medi LB agar tou

Bacto-triptona (DIFCO)	1 g
Extracte de llevat (DIFCO)	0.5 g
Agar (DIFCO)	0.7 g

- Es barregen els components fins a una total dissolució.
- S'arrasa a un volum final de 100 ml amb aigua destil·lada.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es conserva a 4°C.

Medi TB (Terrific Broth) (Tartof i Hobbs, 1987)

- S'afegeixen a 900 ml d'aigua destil·lada:

Bacto-triptona (DIFCO)	12 g
Extracte de llevat (DIFCO)	24 g
Glicerol (Scharlau)	4 ml

- Es barregen els components fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixa refredar fins a 50-60 °C.
- S'hi afegeixen 100 ml de solució salina estèril KH_2PO_4 0.17 M i K_2HPO_4 0.72 M.

Solució salina

(KH_2PO_4) (Panreac)	2.312 g
$(\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$ (Merck)	16.432 g
aigua destil·lada fins a 100 ml	

- Es barregen els components fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es deixa refredar fins a 50-60 °C.
- S'afegeix al medi líquid TB preparat anteriorment.

BHI (*Brain heart infusion*) (OXOID)

- S'afegeix a 1.000 ml d'aigua destil·lada:

BHI (OXOID)	37 g
-------------	------
- Es barreja fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Medi SOB líquid

Bacto-triptona (DIFCO)	20 g
Extracte de llevat (DIFCO)	5 g
NaCl (Panreac)	0,5 g
KCl 250 mM (18,64 g/L)(Panreac)	5 ml
aigua destil·lada fins a 1000 ml	

- Es barreja fins a una total dissolució.
- S'ajusta el pH a 7 amb NaOH 10 N.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

NaCl (solució salina 0,9%) o "solució Ringer"

NaCl (Panreac)	9 g
aigua destil·lada fins a 1.000 ml	

- Es barreja fins a una total dissolució.

- Es reparteix en ampolles de 100 ml.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

MgSO₄ 10 mM

MgSO₄ (Panreac) 1.56 g
 aigua destil·lada fins a 1.000 ml

- S'agita fins a una total dissolució.
- Repartir en ampolles de 100 ml.
- Esterilitzar a l'autoclau (121°C 15 min).

5-Brom-4-clor-3-indolil-β-D-galactopiranosid (X-gal) (Apollo)

La solució X-gal s'ha utilitzat per complementar plaques de LB agar, a una concentració de 40 mg/l, dissolt en *N,N* dimetil formamida.

2.2.2. Antibiòtics utilitzats

Taula 2.4. Concentracions dels antibiòtics utilitzats en aquest treball.

Antibiòtic	Conc. stock (mg/ml)	Concentració final (µg/ml)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>
Ampicil·lina (Ap) (Roche Diagnostics SL)	50	50	100
Cloramfenicol (Cm) (Sigma)	34	34	34
Rifampicina (Rif) (Roig Farma)	15	75	75

2.3. Mètodes microbiològics

2.3.1. Càlcul del nombre de viables

- Es fan dilucions seriades d'un cultiu cel·lular, utilitzant NaCl al 0,9%.
- Se sembra 100 µl de la dilució desitjada en plaques de medi agar LB.

- iii. Els resultats s'expressen en cfu/ml, on les cfu són les unitats formadores de colònies.

2.3.2. Test de la gota

- i. Es prepara un cultiu de nit la soca infectable pel fag, en medi LB líquid, s'incuba a 37°C i en agitació a 110 rpm.
- ii. S'afegeixen 100 µl del cultiu a un tub de 2,5 ml de LB tou fos i mantingut a 45°C.
- iii. Es barreja el contingut del tub per inversió suaument, sense formar bombolles, i s'aboca a una placa d'LB agar, repartint-ho uniformement per tota la placa.
- iv. Cal esperar que solidifiqui l'LB tou a temperatura ambient, aproximadament uns 5-10 min.
- v. Es col·loca una gota del lisat fàgic.
- vi. S'incuben les plaques a 37°C durant 12-16 hores.

Després de la incubació es pot observar un halo d'inhibició del creixement del confluent bacterià.

2.3.3. Sembrada en doble capa

- i. Es barreja el tub de LB agar tou fos amb la mostra, per inversió suaument sense formar bombolles, i abocar el contingut del tub a una placa de LB, repartir uniformement per tota la placa.
- ii. Esperar a que se solidifiqui el LB tou a temperatura ambient, aproximadament uns 5 - 10 min.
- iii. Incubar les plaques a 37°C durant 12 - 16 hores.

2.3.4. Preparació de llisats fàgics

Per obtenir un llisat fàgic a partir d'una calva s'han seguit els passos següents:

- i. Cal recuperar la calva amb una pipeta Pasteur de vidre estèril i ressuspènre-la en 1 ml de MgSO_4 (10 mM) dins un tub d'Eppendorf.
- ii. S'agita breument al vòrtex.
- iii. S'hi afegixen 50 μl de cloroform i agitar-ho per inversió.
- iv. Es deixa 30 min a 4°C o bé se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min.
- v. Es fa una titulació del lisat fàgic obtingut (apartat 2.3.5).

2.3.5. Titulació de lisats fàgics

- i. Es prepara un cultiu de nit la soca indicadora pel fag, en medi LB líquid i s'incuba a 37°C i en agitació a 110 rpm.
- ii. S'afegeix a un tub de 2,5 ml de LB tou fos i mantingut a 45°C:
 - 100 μl del cultiu
 - 100 μl de dilucions seriades del lisat fàgic en MgSO_4 (10 mM)
- iii. Cal fer sembra en doble capa (apartat 2.3.3).
- iv. Els resultats s'expressen en pfu/ml, on pfu indica les unitats formadores de calves.

2.3.6. Augment del títol d'un llisat fàgic

Per augmentar el títol d'un lisat fàgic s'han seguit els passos següents:

- i. Es prepara un cultiu de nit la soca infectable pel fag, en medi LB líquid a 37°C i en agitació de 110 rpm.
- ii. S'afegeix a un tub de 2,5 ml de LB tou fos, mantingut a 45°C:
 - 100 μl del cultiu de nit de la soca infectable pel fag
 - 100 μl del lisat fàgic obtingut a partir d'una calva
- iii. Cal fer sembra en doble capa (apartat 2.3.3).
- iv. S'afegeixen 3 ml de MgSO_4 (10 mM) a cada placa, i es deixen 30 min en agitació suau a 4°C, perquè els fags quedin en suspensió.
- v. Es recupera el MgSO_4 (10 mM) i l'LB agar tou amb l'ajuda d'una micropipeta i d'una nansa de Digrafsky, i es posa tot en un tub.

- vi. Se centrifuga a 8.000 rpm durant 10 min per pelletejar les cèl·lules.
- vii. Es recupera el sobrenedant, posant-lo a un altre tub.
- viii. S'hi afegeixen 500 µl de cloroform per 10 ml de lisat fàgic i s'agita vigorosament per inversió.
- ix. Es deixa 30 min a 4°C o bé se centrifuga a 8.000 rpm durant 10 min.
- x. Es fa una titulació del lisat fàgic obtingut.

En funció del volum de lisat que es vulgui obtenir, es repeteix el procés amb el nombre de plaques necessàries.

2.3.7. Obtenció de mutants de calva clara

- i. Es prepara un cultiu de nit de la soca infectable pel fag, en medi LB líquid, i s'incuba a 37°C i en agitació a 110 rpm.
- ii. S'afegeix a un tub de 2,5 ml d'LB agar tou fos i mantingut a 45 °C:
 - 100 µl del cultiu de nit
 - 100 µl de la dilució del lisat fàgic per generar entre 100 i 200 calves per placa.
- iii. Cal fer sembra en doble capa (apartat 2.3.3) en 20 plaques aproximadament.
- iv. S'han de cercar els mutants espontanis de calva clara, que són aquells que no presenten colònia lisogena central.
- v. S'aïllen els mutants picant la calva.

2.3.8. Obtenció de soques lisogenes

- i. Primerament cal fer un test de la gota (apartat 2.3.2).
- ii. Es fa una sembra en escocès a partir de la terbolesa del interior de la calva.
- iii. A partir de diverses colònies aïllades, cal repetir l'escocès dues vegades més, per evitar la presència de possibles fags.
- iv. Es comprova si les colònies aïllades són realment lisogenes o bé són resistents al fag, ja que ambdues no s'infecten pel fag testat, recuperant bacteriòfags a partir de les possibles soques lisogenes (apartat 2.3.9).

2.3.9. Recuperació de bacteriòfags a partir d'una soca lisogena

- i. Es preparen cultius de nit de la soca lisogena i de la soca infectable pel fag.
- ii. Se centrifuga el cultiu de nit de la soca lisogena a 8.000 rpm durant 10 min.
- iii. Es recupera el sobrenedant, posant-lo a un altre tub, tot eliminant-ne el pellet format per les cèl·lules.
- iv. S'hi afegeixen 500 µl de cloroform per 10 ml de sobrenedant i s'agita per inversió.
- v. Es deixa 30 min a 4°C o bé se centrifuga a 8.000 rpm durant 10 min.
- vi. Es fa una titulació del sobrenedant obtingut per comprovar que la colònia aïllada és capaç de produir fags; per tant, és lisogena.

2.3.10. Tècnica de *One Step Growth*

La tècnica *One Step Growth* permet determinar el període de latència i la mida d'explosió, que es defineix com el nombre de fags produïts per cada cèl·lula infectada.

- i. Es prepara un cultiu de nit de la soca susceptible al fag en medi LB líquid, i s'incuba a 37°C en agitació de 110 rpm.
- ii. Es fa una ressebra 1:100 en 20 ml de medi LB líquid.
- iii. S'incuba a 37°C en agitació de 110 rpm fins que arribi a una $DO_{550\text{nm}}$ de 0,4.
- iv. S'hi afegeix 100 µl de KCN 1 M, per tal de que totes les cèl·lules estiguin en el mateix estat replicatiu.
- v. S'incuba a 37°C en agitació de 110 rpm durant 10 min.
- vi. S'hi afegeix una quantitat adequada d'un llistat fàgic per aconseguir una MOI de 10.
- vii. S'incuben els tubs de les dilucions a 37°C durant 25 min (temps d'adsorció), sense agitació.
- viii. Cal fer les dilucions -5 i -7 de la barreja, per tal de diluir el KCN.
- ix. S'incuben els tubs de les dilucions a 37°C sense agitació.
- x. Es prenen 100 µl de mostra a temps 10, 30, 40 i 50 min de la dilució -5 i els temps 60, 80 i 100 min de la dilució -7.
- xi. Es posa aquesta mostra dins un tub de 2,5 ml d'LB agar tou fos i mantingut a 45°C.

- xii. S'hi afegeixen 100 µl d'un cultiu de nit de la soca susceptible al fag.
- xiii. Cal fer sembra en doble capa (apartat 2.3.3).

2.3.11. Experiment de Doerman

L'objectiu d'aquest experiment és determinar el temps necessari per trobar partícules fàgiques actives en el citoplasma de la cèl·lula infectada, és a dir, el temps d'eclipsi. S'ha utilitzat una modificació del mètode de *One Sep Growth*:

- Després de seguir els passos i-ix de l'apartat 2.3.10 es prenen mostres d'1 ml dels tubs de les dilucions de les barreges als temps desitjats en un tub d'Eppendorf que contingui 100 µl de cloroform, amb la finalitat que el cloroform lisi les cèl·lules i s'alliberin les partícules fàgiques que estiguin al seu interior.

2.3.12. Eficiència d'inducció profàgica espontània

L'eficiència d'inducció profàgica espontània s'ha estimat com va descriure Wegryn *et al.*, 1992.

- i. Es prepara un cultiu de nit de la soca lisogena per al fag i un altre d'una soca sensible al fag, en medi LB líquid a 37°C i en agitació de 120 rpm.
- ii. Es fa una ressebra 1/100 dels cultius de nit en medi LB i es deixa créixer en agitació constant de 120 rpm/min a 37 °C.
- iii. Es prenen 1 ml de mostra a diferents temps.
- iv. Es fa un recompte de viables i de calves per sembra en doble capa.
- v. L'eficiència d'inducció espontània del profag es calcula com la relació entre el nombre de fags produïts espontàniament per la soca lisogena i el nombre de cèl·lules viables.

2.3.13. Eficiència de lisogenització

El test de l'eficiència de lisogenització permet determinar la freqüència de la decisió entre lisi o lisogènia d'un bacteriòfag temperat en el moment en què el fag infecta la cèl·lula (Tokuno i Gough, 1975).

- i. Es prepara un cultiu de nit de la soca sensible al fag en medi LB líquid, i s'incuba a 37°C en agitació de 110 rpm.
- ii. Es fa una ressebra 1:100 en 10 ml de medi LB líquid.
- iii. S'incuba el cultiu a 37°C en agitació de 110 rpm, fins a arribar a una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,4.
- iv. Amb la finalitat de determinar el nombre de cèl·lules viables abans de la infecció, se sembren les dilucions -5 i -6.
- v. Es divideix el cultiu en dos i s'hi afegeix la quantitat adequada de llistat fàgic per obtenir una MOI 1 i una MOI 10.
- vi. S'incuben tots dos tubs a 37°C sense agitació durant 25 min (temps d'adsorció).
- vii. Cal fer recompte de viables després de la infecció sembrant la dilució -5 i diverses plaques de la dilució -6.
- viii. S'incuben les plaques i un cultiu de nit de la soca sensible al fag en medi LB líquid i en agitació de 110 rpm, a 37°C durant tota la nit.
- ix. S'afegeixen 100 µl del cultiu a un tub de 2,5 ml d'LB agar tou fos i mantingut a 45°C.
- x. Es barreja el tub per inversió suaument, sense formar bombolles, i s'aboca el contingut del tub a una placa de LB agar, repartint-ho uniformement per tota la placa.
- xi. Cal esperar que se solidifiqui l'LB agar tou a temperatura ambient, uns 5-10 min aproximadament.
- xii. Es piquen un mínim de 100 colònies obtingudes, tot fent una estria a la placa de doble capa d'LB on hi ha la soca sensible al fag.
- xiii. S'incuben les plaques a 37°C durant tota la nit.
- xiv. Cal comptar el nombre de colònies que produeixen un halo de lisi sobre el confluent de la soca indicadora, respecte del total de les colònies testades.

L'eficiència de lisogenització es defineix com:

$$\text{Eficiència de lisogenització} = \text{lisògens} / \text{CFU} \times B_0/B$$

On B_0/B és la relació entre les cfu abans i després de la infecció, corregeix els bacteris infectats que s'han lisat i no han estat comptats en les cfu, és a dir, en les que el fag s'ha decidit pel cicle lític, i no pel cicle lisogènic.

2.4. Mètodes genètics

2.4.1. Transformació

2.4.1.1. Transformació amb clorur càlcic

El mètode que s'utilitza és el descrit per Hanahan (1988), amb unes lleugeres modificacions. Aquest mètode es basa en l'exposició del cultiu bacterià en fase exponencial a una solució hipotònica de clorur càlcic 100 mM a una temperatura de 0°C, això provoca la formació de cèl·lules competents, capaces de captar DNA exogen. Aquest mètode s'ha utilitzat per transformar la soca d'*E. coli* BL21 Codon Plus.

2.4.1.1.1. Preparació de cèl·lules competents

- i. Cal fer una ressebra 1:50, a partir d'un cultiu de nit de la soca *E. coli* BL21 Codon Plus, en 100 ml de medi LB.
- ii. S'incuba a 37°C en agitació (110 rpm) fins a arribar a una $DO_{550 \text{ nm}}$ de 0,4, corresponent a la meitat de la fase exponencial del cicle de creixement cel·lular.
- iii. Se centrifuga el cultiu en un tub de propilè estèril, a 5.000 rpm durant 10 min a una temperatura de 4 °C.
- iv. S'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es resuspèn el pellet en 100 ml de CaCl_2 100 mM fred (apartat 2.8).
- v. Es manté el tub en gel durant 15 min.

- vi. Se centrifuga el tub a 5.000 rpm durant 10 min a 4 °C.
- vii. Es resuspèn el sediment suaument en 5 ml de CaCl₂ 100 mM fred.
- viii. Es mantè el tub en gel durant 1 hora.
- ix. S'hi afegeixen 0,6 ml de glicerol estèril al 100%.
- x. Cal fer alíquotes de 200 µl i congelar-les a -80°C.

2.4.1.1.2. Transformació per xoc tèrmic

- i. Es barreja en un tub de vidre 200 µl de cèl·lules competents amb 10-100 ng de DNA plasmídic i es manté en gel durant 30 min, permetent d'adhesió del DNA a la superfície de les cèl·lules competents.
- ii. Per introduir el DNA a les cèl·lules, s'incuba el tub a 42°C durant 90 seg.
- iii. Es manté el tub en gel durant 5 min.
- iv. S'hi afegeixen 0,8 ml d'LB al tub i s'incuba en agitació a 37°C durant 45-60 min, per permetre l'expressió fenotípica.
- v. Se sembra el cultiu del tub en les plaques selectives adequades, i s'incuba a 37°C durant 12-18 hores.

2.4.1.2. Electrotransformació

El mètode que s'utilitza és el descrit per Dower *et al.* (1988) amb unes lleugeres modificacions. S'ha utilitzat el *Gene Pulser II* i el *Pulse Controller Electroporation System* de BIORAD i els protocols recomanats pel fabricant. És més eficaç que la transformació amb clorur càlcic, però és necessari que les cèl·lules i el DNA que es transforma presentin un baix contingut en sals. El mètode es basa en l'aplicació d'un pols elèctric d'alt voltatge que despolaritza la membrana cel·lular, amb la qual cosa es formen canals transitoris, a través dels quals pot entrar el DNA a l'interior cel·lular (Shigekawa i Dower, 1988).

Els cultius es preparen en medi LB amb una concentració del 0,5% de NaCl. Aquest procés s'ha utilitzat per transformar les soques d'*E.coli* DH5α.

2.4.1.2.1. Preparació de les cèl·lules competents

- i. Es fa un cultiu de nit en 10 ml d'LB preparat amb NaCl al 0.5%.
- ii. Cal fer una ressebra 1:100 en 1 L d'LB (0.5% de NaCl).
- iii. S'incuba a 37°C, a 110 rpm d'agitació, fins a arribar a una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,4 (per a soques *recA*⁺) o de 0,6 (per a soques *recA*⁻).
- iv. Es manté el cultiu en gel durant 15 min. A partir d'aquest pas, tot el material i les solucions que s'utilitzen estan temperades a 4 °C.
- v. Se centrifuga el cultiu, en tubs de propilè de 250 ml estèrils, a 6.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- vi. Se n'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es resuspèn el sediment en un 1 L d'aigua ultrapura estèril.
- vii. Es torna a centrifugar en les mateixes condicions i es repeteix el rentat amb aigua ultrapura.
- viii. Es resuspenen les cèl·lules en 20 ml de glicerol 10% (apartat 2.8) fred i estèril.
- ix. Se centrifuga en un tub de polipropilè de 30 ml estèril, a 6.000 rpm durant 15 min a 4°C.
- x. Se n'elimina el sobrenedant en condicions d'esterilitat i es resuspèn el sediment en 1 ml de glicerol al 10% (apartat 2.8) fred.
- xi. Es fan alíquotes de 50 µl del cultiu de competents en tubs eppendorf, i es congelen en neu carbònica.
- xii. Cal conservar les alíquotes a -80°C.

2.4.1.2.2. Electrotansformació

- i. Es descongelen en gel les cèl·lules competents.
- ii. S'hi afegeix el DNA.
- iii. S'ajusten les condicions del el *Gene Pulser II* i del *Pulse Controller Electroporation System* a 125 µFD de capacitància i a 200 Ω de resistència en paral·lel.
- iv. Es transfereix la barreja de cèl·lules i DNA a una cubeta d'electrotansformació de 2 mm de pas, refredada prèviament i estèril.
- v. Es col·loca en la càmera del *Gene Pulser*.
- vi. S'aplica un pols elèctric de 2,0 kV/cm² de potencial elèctric.

- vii. Es treu ràpidament la cubeta i s'hi afegeix 1 ml de medi BHI fred. Seguidament, es barreja suaument i es passa tot el contingut de la cubeta a un tub estèril de vidre.
- viii. S'incuba el tub a 37°C en agitació durant 45 min (temps d'expressió fenotípica).
- ix. Se sembra en plaques selectives adequades i s'incuba a 37°C durant 12-18 hores.

2.4.2. Obtenció de mutants o inactivació de gens utilitzant productes de PCR

Per a la construcció d'un mutant a partir d'un producte de PCR, s'ha seguit el mètode descrit per Datsenko i Wanner (2000). Aquest mètode es basa en el sistema de recombinació Red del fag lambda. Una de les raons per les quals *E. coli* o *Salmonella* no són transformables per DNA lineal, és la presència d'exonucleases intracel·lulars que el degraden. El sistema Red del fag lambda inclou els gens γ , β i *exo* que codifiquen les proteïnes Gam, Bet i Exo, respectivament. La proteïna Gam inhibeix l'exonucleasa V de l'hoste i permet l'accés de Bet i Exo als extrems del DNA per promoure'n la recombinació. L'estratègia bàsica consisteix a substituir una seqüència cromosòmica per un gen de resistència a un antibiòtic seleccionable, que és generat per PCR utilitzant uns oligonucleòtids que contenen 50 nucleòtids (nt) d'homologia amb la seqüència que volem substituir. La recombinació es duu a terme pel sistema Red del fag lambda, expressat a partir d'un promotor induïble per arabinosa en un plasmidi de baix nombre de còpies i termosensible (pKD46). Després de la selecció, el gen de resistència es pot eliminar utilitzant un altre plasmidi (pCP20), també termosensible, que expressa la recombinasa FLP del plasmidi 2 μ de *Saccharomyces cerevisiae*, sota control d'un promotor induïble per temperatura. El sistema FLP actua en les repeticions directes FRT ("*FLP recognition target*") que flanquegen la casset de resistència introduïda.

2.4.2.1. Preparació del DNA per a la substitució

- i. S'amplifica la resistència antibiòtica per PCR, utilitzant el plasmidi pKD3 (Cm^r) com a DNA motlle i els oligonucleòtids amb 50 nt d'homologia amb el gen que

es vol inactivar i 20 nt d'homologia amb el pKD3, seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.1. Les condicions de PCR utilitzades són les següents:

- 0,625 de l'oligonucleòtid *up* (10 pmol/ μ l) (Roche Diagnostics SL)
- 0,625 de l'oligonucleòtid *down* (10 pmol/ μ l) (Roche Diagnostics SL)
- 2.5 μ l de tampó de PCR 10 \times (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics SL)
- 5 μ l d'una barreja de dNTP (2 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics SL)
- 200 ng de DNA motlle
- 0.2 μ l de l'enzim (3.5 unitats/ μ l) (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics SL)
- Aigua ultrapura fins arribar a un volum final de 25 μ l.

La reacció de PCR es duu a terme seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.1, amb una temperatura d'hibridació de 55°C i a un temps de 2 min d'elongació a 72°C.

- ii. Electroforesi del producte de la PCR en un gel d'agarosa seguint el protocol de l'apartat 2.5.5.
- iii. Purificació de la banda per columnes *Wizard*[®] (Promega) seguint el protocol de l'apartat 2.5.7.1.
- iv. Se sotmet el DNA obtingut a una restricció per *DpnI*, seguint el protocol 2.5.4, a fi de degradar les restes del DNA motlle, ja que aquest enzim reconeix específicament el DNA metilat.
- v. Electroforesi i purificació del DNA digerit seguint els protocols de l'apartat 2.5.5 i 2.5.7.1, respectivament.
- vi. Quantificació del DNA purificat seguint l'apartat 2.5.6.

2.4.2.2. Transformació de la soca receptora

Es preparen cèl·lules electrocompetents de la soca receptora (en aquest cas de la ATCC14028 Rif^r lisogena per al bacteriòfag SE1), pel mètode descrit a l'apartat 2.4.1.2, i es transforma el plasmidi pKD46 (termosensible i Ap^r). Es preparen cèl·lules electrocompetents de la soca receptora/pKD46 obtinguda anteriorment i s'electrotransforma el DNA utilitzat per la substitució, seguint el protocol següent:

- i. Es fa una ressembrança 1:100, del cultiu de nit fet amb medi LB líquid complementat amb ampil·lina (50 mg/ml), en 50 ml de medi SOB amb arabinosa 1 mM (50 μ l de l'estoc arabinosa 1M) (apartat 2.8).

- ii. S'incuba a 37°C amb agitació de 110 rpm, fins que el cultiu arribi a una DO_{600} nm de 0,5.
- iii. Se centrifuga el cultiu a 4000 rpm a 4°C durant 15 min.
- iv. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment amb 20 ml de glicerol 10%.
- v. Se centrifuga el cultiu a 4000 rpm a 4°C durant 15 min.
- vi. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment amb 10 ml de glicerol 10%.
- vii. Se centrifuga el cultiu a 4000 rpm a 4°C durant 15 min.
- viii. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment amb 5 ml de glicerol 10%.
- ix. Se centrifuga el cultiu a 4000 rpm a 4°C durant 15 min.
- x. S'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment amb 500 µl de glicerol al 10%.
- xi. S'elimina el sobrenedant i es fan alíquotes de 100 µl.
- xii. S'electrotransformen 10 µl del DNA obtingut en el 2.5.3.1, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.1.2.2.
- xiii. S'afegeix 1 ml de medi LB líquid i es transfereix a un tub.
- xiv. S'incuba a 37°C durant 1,5 hores.
- xv. Se sembra la meitat del cultiu en medi selectiu Agar LB complementat amb cloramfenicol (34 mg/ml) a 37°C, l'altra meitat del cultiu se sembra després de 16 hores d'incubació a temperatura ambient.
- xvi. Cal fer cultius de diferents clons de la transformació amb medi LB líquid i incubar a 42°C fins que arribin a una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,2.
- xvii. Se sembren les dilucions -5 i -6 dels diferents cultius.
- xviii. Es fan rèpliques dels clons obtinguts, en medi agar LB amb Ap i LB amb Cm a 42 °C, a fi d'assegurar que el plasmidi pKD46 es perd i que s'hagi substituït el gen desitjat per la resistència Cm flanquejada pels FRT.
- xix. Cal comprovar els transformants resistents al Cm per PCR, utilitzant oligonucleòtids encebadors externs a la regió substituïda i els oligonucleòtids interns de la casset de resistència Cm^r.

2.4.2.3. Escissió del gen de resistència

El gen de resistència s'escindeix seguint els passos següents:

- i. Fer electrocompetents del mutant obtingut seguint el protocol de l'apartat 2.4.1.2.1.
- ii. Electrotransformació del plasmidi pCP20 (termosensible i Ap^r) seguint l'apartat 2.4.1.2.2.
- iii. Incubar a 30°C durant 1 hora.
- iv. Sembrar en plaques agar LB amb Ap i incubar a 30 °C.
- v. Fer cultius de diferents clons de la transformació amb medi LB líquid i incubar a 42°C fins que arribin a una DO_{550 nm} de 0,2.
- vi. Sembrar les dilucions -5 i -6 dels diferents cultius.
- vii. Fer rèpliques dels clons obtinguts, en medi agar LB amb Ap i LB amb Cm a 42°C, per tal d'assegurar que el plasmidi pCP20 es perd i que s'hagi escindit la resistència Cm flanquejada pels FRTs. A aquesta temperatura es produeix l'expressió de la recombinasa que porta el plasmidi.
- viii. Comprovar els transformants sensibles al Cm per PCR, utilitzant oligonucleòtids encebadors externs a la regió substituïda.

2.5. Mètodes de manipulació del DNA

La majoria de tècniques utilitzades es basen en les descrites als protocols de *Molecular cloning: a laboratory manual* (Sambrook *et al.*, 1989) i *Current protocols in molecular biology* (Ausubel *et al.*, 1995) amb unes lleugeres modificacions.

2.5.1. Extracció de DNA fàgic

Per obtenir el DNA d'un bacteriòfag és necessari partir d'un lisat amb gran nombre de fags. Els fags s'han concentrat per centrifugació o per obtenció llistat amb un títol fàgic elevat, les càpsides es destrueixen amb el fenol i el DNA fàgic és precipitat amb etanol.

- i. S'afegeixen 10 µl d'una solució *stock* de DNasaI 10 u/µl (*RNase-free DNaseI* de Roche Diagnostics S L) i 10 µl de la solució de RNasaI (apartat 2.8) a un lisat fàgic de 10 ml a una titulació aproximadament de 10¹⁰ pfu/ml. O bé, s'afegeixen 0,5 µl de DNasaI i 0,5 µl de RNasaI a un lisat fàgic de 0,5 ml a una titulació

- aproximadament de 10^{11} pfu/ml. S'incuba a 37°C durant 1 hora. Aquest tractament degradarà el DNA i RNA bacterials alliberats durant la lisi cel·lular. La viscositat de la barreja hauria de disminuir.
- ii. Se centrifuga a 27.000 rpm durant 1 hora i mitja a 4°C amb un rotor Ti 80 a la ultracentrífuga Beckmann.
 - iii. Passat aquest temps, se'n descarta totalment el sobrenedant. Es ressuspèn el petit sediment translúcid que apareix en 500 μl de Tris-Cl 0.05 M a pH 8 (Applichem). (Aquests dos passos tenen lloc si es parteix d'un volum de 10 ml de lisat amb un títol de 10^{10} pfu/ml; així, les partícules fàgiques es concentren per ultracentrifugació.)
 - iv. Es transfereix la solució a un tub d'Eppendorf i s'hi afegeixen 500 μl de solució fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8).
 - v. S'agita el tub al vòrtex durant 20 min. La solució fenol/cloroform/isoamílic desnatura les càpsides fàgiques i allibera el DNA viral. Les càpsides desnaturades apareixen com un precipitat blanc a la interfase. L'agitació vigorosa és necessària en el cas que les partícules fàgiques provenguin de la ultracentrifugació, ja que el sediment és difícil de ressuspèndre.
 - vi. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min i es recupera la fase aquosa, tenint en compte de no agafar la interfase per fer un altre tractament amb la solució fenol/cloroform/isoamílic. En aquest segon tractament, el precipitat blanc hauria de disminuir. Si encara hi ha força interfase, cal fer un tercer tractament amb la solució fenol/cloroform/isoamílic.
 - vii. Es recupera la fase superior i s'hi afegeixen 200 μl de cloroform isoamílic (apartat 2.8) (Carlo Erba Reagenti), s'agita vigorosament per inversió i se centrifuga breument.
 - viii. Es recupera la fase aquosa i es repeteix aquest pas.
 - ix. S'afegeixen 20 μl d'acetat sòdic 3 M a pH 4.8 i es precipita el DNA amb 2 volums d'etanol absolut a temperatura ambient.
 - x. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm durant 10 min.
 - xi. Eliminar el sobrenedant i rentar el sediment amb 1 ml d'etanol 70%.
 - xii. Centrifugar el tub a 12000 rpm durant 5 min.
 - xiii. S'elimina el sobrenedant i s'asseca el sediment al *Speed Vac*[®].
 - xiv. Cal ressuspèndre el DNA fàgic amb tampó TE a pH 8 (apartat 2.8).

2.5.2. Extracció de DNA cromosòmic

Durant aquest procés es duu a terme una lisi cel·lular suau utilitzant un detergent, seguida d'un tractament amb proteïnasa K. Les restes cel·lulars, proteïnes i polisacàrids són segrestats i precipitats amb un tractament amb CTAB (hexadecil trimetil bromur d'amoni de SIGMA). S'extrauen amb fenol/cloroform/isoamílic i, finalment, es recupera el DNA cromosòmic per precipitació amb 2-isopropanol (Panreac).

- i. Es comença l'extracció de DNA cromosòmic a partir d'un cultiu de nit, realitzat a les condicions òptimes per la soca.
- ii. Se centrifuga 1,5 ml del cultiu en un tub eppendorf a 12.000 rpm durant 1-2 min.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant i es ressuspèn el sediment en 567 µl d'aigua ultrapura.
- iv. S'hi afegeixen 30 µl de SDS 10% (sal sòdica de dodecilsulfat de Merck) i 3 µl de proteïnasa K a una concentració de 20 mg/ml (Roche Diagnostics SL).
- v. Es barreja per inversió el tub i s'incuba a 37°C durant 1 hora o fins que es produeixi la lisi cel·lular.
- vi. S'hi afegeixen 100 µl de NaCl 5M (AppliChem), es barreja per inversió vigorosament, i s'afegeixen 80 µl de solució CTAB/NaCl (apartat 2.8) preescalfada a 65°C.
- vii. Es barreja i s'incuba a 65°C durant 10 min.
- viii. S'afegeix 1 volum de solució cloroform/isoamílic (apartat 2.8), es barreja vigorosament per inversió i se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min.
- ix. Es transfereix la fase aquosa (normalment la superior) a un altre tub eppendorf, utilitzant puntes de micropipeta prèviament tallades, evitant així la ruptura mecànica del DNA).
- x. S'agrega un volum de fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8) i es barreja vigorosament.
- xi. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min i se'n recupera el sobrenedant en un altre tub d'Eppendorf.
- xii. Cal repetir des del pas viii fins que la fase superior desaparegui la interfase.
- xiii. S'afegeix un volum de cloroform/isoamílic (apartat 2.8) a la fase recuperada a fi d'eliminar les restes de fenol.

- xiv. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 1 min i se'n recupera el sobrenedant en un altre tub eppendorf.
- xv. S'afegeixen 0.6 volums de 2-isopropanol (Panreac) absolut i es barreja per inversió. S'observa la formació de filaments de DNA cromosòmic precipitat.
- xvi. Se centrifuga a 12000 rpm durant 10 min.
- xvii. Se n'elimina el sobrenedant i es renta el precipitat amb 1 ml d'etanol 70% (apartat 2.8) fred.
- xviii. Se centrifuga durant 5 minuts a 12.000 rpm.
- xix. Se n'elimina el sobrenedant i s'asseca el precipitat al *Sepeed Vac*[®] (Savant).
- xx. Afegir de 50 a 100 µl de tampó TE+RNAsa i es deixa resuspenent a 37°C.
- xxi. Una vegada resuspès pot conservar-se a 4°C o a -20°C.

2.5.3. Extracció de DNA plasmídic

2.5.3.1. Miniextracció de DNA plasmídic

Aquesta tècnica es basa en el protocol de lisi alcalina (Birnboim i Doly, 1979), que utilitza SDS i NaOH. Es neutralitza amb acetat potàssic, es desproteïnitza amb fenol i es precipita el DNA plasmídic amb etanol.

- i. Es comença l'extracció de DNA plasmídic a partir d'un cultiu de nit, realitzat a les condicions òptimes per la soca.
- ii. Se centrifugen 1,5 ml de cultiu en un d'Eppendorf a 12.000 rpm durant 1-2 min.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant i es resuspèn el pellet en 100 µl de solució I freda (apartat 2.8).
- iv. Afegir 200 µl de solució II (apartat 2.8) i es barreja per inversió fins obtenir una solució viscosa resultat de la lisi cel·lular.
- v. Es manté el tub en gel durant 5 min.
- vi. Afegir 150 µl de solució III (apartat 2.8) i es barreja per inversió vigorosament fins que es forma un precipitat blanquinós.
- vii. Es manté el tub de 5 a 10 min en gel.
- viii. Se centrifuga 5 min a 12.000 rpm.
- ix. Es transfereix la fase aquosa a un altre tub amb cura de no arrossegar-ne la interfase.

- x. Shi afegeix 1 volum de fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8) i es barreja fins que s'obté una emulsió homogènia.
- xi. Se centrifuga durant 5 min a 12.000 rpm.
- xii. Es tornar a rentar amb fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8) i a transferir la fase aquosa a un altre tub.
- xiii. S'afegeix un volum de cloroform/isoamílic (apartat 2.8) i s'agita enèrgicament.
- xiv. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm durant 3 min.
- xv. Es transfereix la fase superior aquosa a un altre tub i s'hi afegeixen 2 volums d'etanol absolut fred, es barreja per inversió i es deixa precipitant a -80°C durant 20-30 min.
- xvi. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 10 min.
- xvii. Se n'elimina el sobrenedant i es fa un rentat amb etanol 70% (apartat 2.8) fred.
- xviii. Se n'elimina el sobrenedant i s'asseca a l'*Speed Vac*[®] (Savant).
- xix. Es ressuspèn el DNA plasmídic obtingut en 20-30 µl de tampó TE amb RNasal (apartat 2.8), en funció de la concentració esperada i es deixa incubant a 37°C durant 45 min.
- xx. Un cop ressuspès es conserva a -20°C.

2.5.3.2. Maxiextracció de DNA plasmídic

Quan es van necessitar quantitats majors de DNA plasmídic, es van realitzar extraccions a partir de volums de cultiu més grans, adaptant les proporcions de les solucions utilitzades. L'extracció es va purificar utilitzant un sistema de columna (Wizard[®] Promega).

- i. Se segueix el mateix procediment que en la miniextracció de l'apartat 2.5.3.1, però augmentant els volums de les solucions I, II i III proporcionalment al volum del cultiu fins al punt vii.
- ii. Es posa tota la barreja en un tub de vidre de 30 ml.
- iii. Se centrifuga el tub a 8.000 rpm durant 15 min.
- iv. Es transfereix la fase aquosa a un altre tub amb cura a fi de no arrossegar-ne la interfase.

- v. S'afegeixen 0,6 volums de 2-isopropanol absolut (Panreac), es barreja per inversió i es deixa el tub 15 min a temperatura ambient. S'observa la formació d'un precipitat blanquinós.
- vi. Se centrifuga el tub durant 15 min a 8.000 rpm.
- vii. Se n'elimina el sobrenedant i es deixa que s'evapori totalment el 2-isopropanol.
- viii. Es ressuspèn el precipitat de DNA plasmídic en el tampó TE amb RNasa, incubant a 37°C.
- ix. Es reparteixen 500 µl de solució de DNA plasmídic en diversos tubs d'Eppendorf.
- x. S'afegeix 1 ml de terra de diatomees (apartat 2.8) a cada tub, es barreja per inversió i s'esperen 5 min, fins que s'observen dues fases.
- xi. Es barrejar i es transfereix tot el contingut a una xeringa, col·locada sobre una columna de purificació *Wizard Minicolumn* (Promega).
- xii. Es passa la solució a través del filtre de la columna mitjançant la pressió exercida per l'èmbol de la xeringa.
- xiii. S'extrau la xeringa de la columna, se'n separa l'èmbol. Es torna a connectar la xeringa a la columna i es fan passar 2 ml d'etanol al 70% (apartat 2.8).
- xiv. Se centrifuga la columna, a 12.000 rpm durant 5 min, per tal d'eliminar els restes d'etanol.
- xv. S'hi afegeixen 50 µl d'aigua ultrapura calenta a la columna i s'esperen 5 min per eluir el DNA fins que l'aigua mulla tot el filtre de la columna.
- xvi. Se centrifuga la columna, en el volum eluït es trobarà el DNA plasmídic purificat.

2.5.4. Digestió amb enzims de restricció i tampons

Els enzims utilitzats en el treball de recerca que es descriu en la present tesis doctoral es van adquirir a Roche Diagnostics S L, i per fer-los servir es van seguir les recomanacions del fabricant.

2.5.5. Electroforesi de DNA

L'electroforesi de DNA s'utilitza per a la separació i la identificació de fragments de DNA d'origens diversos. També permet l'aïllament d'un fragment dins d'una barreja heterogènia de fragments de diverses grandàries. Es basa en el fet que la càrrega negativa que presenta del DNA a pH neutre li permet migrar cap al pol positiu quan es troba dins d'un camp elèctric. La concentració d'agarosa dels gels permet intervals de discriminació dels fragments de DNA en funció de la seva grandària i conformació. Gràcies a l'addició d'agents intercalants com el bromur d'etidi (BrEt) (Roche Diagnostics S L) és possible la visualització de la migració del DNA per exposició a la llum ultraviolada, ja que aquesta provoca la seva fluorescència.

2.5.5.1. Preparació dels gels d'agarosa

- i. Cal pesar la quantitat d'agarosa en pols i afegir-hi el volum de tampó d'electroforesis (1× TAE) (apartat 2.8). La concentració recomanada d'agarosa segons el rang de resolució dels fragments lineals de DNA (kb) és la següent:

% Agarosa	kb del fragment de DNA
0,3	60 - 5
0,5	30 - 1
0,7	12 - 0,8
1,0	10 - 0,5
1,2	7 - 0,4
1,5	3 - 0,2
2	3 - 0,1

- ii. S'escalfa l'agarosa fins a dissoldre-la, evitant que la solució arribi a l'ebullició.
- iii. Cal temperar la solució a 50°C i s'afegeix BrEt (Roche Diagnostics S. L.), a una concentració final de 0,5 µg/ml, partint d'una solució concentrada de 10 mg/ml.
- iv. Es diposita la solució a un suport del gel, amb els extrems segellats.

- v. Es col·loca una o més pintes segons la quantitat de pous que s'hagin de carregar, i esperar que se solidifiquin.
- vi. Es treuen les pintes i es col·loca el suport en una cubeta d'electroforesi, plena de tampó $1 \times$ TAE (apartat 2.8).
- vii. Es carreguen les mostres de DNA als pous del gel. Per carregar les mostres s'utilitza una solució transportadora $6 \times$ (apartat 2.8) en una relació 1:5 respecte del volum final de la mostra de DNA.
- viii. S'aplica un voltatge constant de 100 V. El temps i el voltatge de l'electroforesi dependrà de la grandària dels fragments de DNA que es volen visualitzar.
- ix. S'observa el gel amb un transil·luminador de llum ultraviolada (302 nm).
- x. Una vegada acabada l'electroforesi, es pot fotografiar el gel utilitzant un digitalitzador d'imatges.

2.5.5.2. Marcadors

Els marcadors utilitzats són DNA fàgic (λ o ϕ) tallat amb algun enzim:

Marcador	Llargària de les bandes que presenta
$\lambda \perp HindIII$	23,13, 9,416, 6,557, 4,361, 2,322, 2,027, 0,564, 0,125
$\lambda \perp BstEII$	8,543, 7,242, 6,369, 5,687, 4,822, 4,234, 3,675, 2,323, 1,929, 1,371, 1,264, 0,702, 0,224, 0,117
$\phi \perp HinfI$	0,726, 0,713, 0,553, 0,500, 0,427, 0,417, 0,413, 0,311, 0,249, 0,200, 0,151, 0,140, 0,118, 0,100, 0,082, 0,066, 0,048, 0,042, 0,040, 0,024

2.5.6. Quantificació del DNA

Es van utilitzar dos mètodes de quantificació:

- **Fluorescència dels gels d'agarosa.** Mètode basat en el fet que la intensitat de la fluorescència deguda l'agent intercalant (BrEt) utilitzat per tenyir el gel d'electroforesi és proporcional a la concentració de DNA. El mètode consisteix a carregar diferents dilucions de la solució problema de DNA en un gel

d'agarosa. Paral·lelament, es carrega un patró de concentració coneguda i es compara amb la mostra.

- ***Espectrofotometria***. La quantificació de la concentració de DNA, amb l'espectrofotòmetre *GeneQuant*, s'ha fet seguint les instruccions del fabricant Amersham Bioscience. Aquest instrument està controlat per un microprocessador que utilitza equacions i factors emmagatzemats (*Ultrospec 1100 pro*) per quantificar els àcids nucleics.

2.5.7. Clonació en vectors plasmídics

2.5.7.1. Purificació de fragments de DNA

Aquesta tècnica va ser utilitzada per recuperar fragments de DNA, com per exemple: productes de PCR, fragments de restriccions, etcètera. Aquests es carreguen en un gel d'agarosa i se separen mitjançant electroforesi. Una vegada s'aïllen les bandes de DNA, es retallen del gel, es fonen i l'agarosa es retira mitjançant la utilització de resines *Wizard PCR Preps DNA Purification Resin* (Promega) o terra de diatomees, segons la grandària del fragment, i columnes *Wizard*[®].

- i. Es retalla la regió del gel d'agarosa que conté el fragment de DNA desitjat, es pesa i s'introdueix en un tub eppendorf, prèviament taxat.
- ii. S'afegeixen de 2 a 3 volums de solució de NaI 6 M (Panreac) (apartat 2.8) respecte del pes de la banda.
- iii. S'incuba el tub en un bany d'aigua a 55-65°C, fins que l'agarosa estigui completament fosa.
- iv. Es reparteix el contingut en tubs d'Eppendorf (màxim 500 µl/tub).
- v. S'afegeix 1 ml de resina a cada Eppendorf, i es barreja per inversió.
- vi. Passats 5 min, es transfereix el contingut d'Eppendorf a una xeringa muntada sobre una columna de purificació de DNA *Wizard*[®] (Promega). Amb l'ajut de l'èmbol es passa el contingut a través de la columna.
- vii. Es passen 3 ml de 2-isopropanol (Panreac) 80%, per la columna que conté el complex DNA-resina.
- viii. Se centrifuga durant 5 min en un tub d'Eppendorf.
- ix. S'afegeixen de 15 a 40 µl d'aigua ultrapura escalfada a 55°C.

- x. Passats 5 min es centrifuga 5 min per eluir el DNA.

2.5.7.2. Preparació dels vectors i dels inserts

Els vectors i els inserts que s'utilitzen es digereixen prèviament amb un o més enzims de restricció. Segons la compatibilitat de les dianes entre el vector i el insert, pot caldre el reompliment d'extrems cohesius. D'altra banda, a fi tal d'evitar possibles recircularitzacions del vector, abans de realitzar la lligació amb l'insert, es poden eliminar els grups fosfat de l'extrem 5' del vector.

2.5.7.2.1. Reompliment d'extrems

L'aplicació d'aquesta tècnica permet obtenir de fragments de DNA amb extrems roms.

- i. En un tub eppendorf s'hi afegeixen:
 - 50 µl de DNA en solució o del producte de la restricció de DNA
 - 20 µl del tampó 5 × de la DNA polimerasa del fag T4 (Roche Diagnostics SL)
 - 20 µl d'una barreja de dNTP 5 × (Roche Diagnostics SL)
 - 5 µl de la DNA polimerasa del fag T4 (1 unitat/µl) (Roche Diagnostics SL)
 - 5 µl d'aigua ultrapura
- ii. S'incuba el tub a 37°C durant 15 min.
- iii. S'inactiva la reacció per calor, incubant a 70°C durant 10 min.
- iv. Es precipita el DNA (apartat 2.5.7.2.3).

2.5.7.2.2. Defosforilació de l'extrem 5'

- i. S'afegeixen en un tub Eppendorf:
 - 100 µl del producte que caldrà defosforilar
 - 20 µl del tampó 10 × de la fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics S L)
 - 79 µl d'aigua ultrapura
 - 1 µl de fosfatasa alcalina (1 unitat/µl) (Roche Diagnostics S L)
- ii. Es barreja bé i es fa un pols de microcentrífuga.
- iii. S'incuba a 37°C durant 30 min.
- iv. S'hi afegeix 1 µl d'enzim i es torna a incubar a 37°C durant 30 min més.
- v. S'atura la reacció, tot i incubant el tub a 70°C durant 10 min.

- vi. Es precipitar el DNA (apartat 2.5.7.2.3).

2.5.7.2.3. Precipitació del DNA

Aquesta tècnica permet obtenir DNA purificat, després que aquest hagi estat defosforilat o els seus extrems reomplerts.

- i. S'augmenta el volum de la reacció de reompliment o de defosforilació amb aigua ultrapura fins a 400 µl.
- ii. Es realitza un tractament amb 400 µl de la solució fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8).
- iii. Es barreja per inversió i es centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min.
- iv. Es recupera la fase aquosa i afegir 400 µl de la solució cloroform/isoamílic (apartat 2.8).
- v. Es barreja per inversió i se centrifuga a 12.000 rpm durant 3 min.
- vi. Es recupera la fase aquosa i s'afegeixen 2,5 volums d'etanol absolut i 0,1 volums d'acetat sòdic 3 M (Merck) (apartat 2.8).
- vii. Es deixa precipitant el DNA a -80°C de 1-12 hores.
- viii. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 10 min.
- ix. S'elimina el sobrenedant i es renta el sediment de DNA afegint-hi 1 ml d'etanol 70%.
- x. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm a 4°C durant 5 min.
- xi. S'asseca el sediment de DNA amb el *Speed Vac*[®] (Savant).
- xii. Es ressuspèn el DNA en 20 µl d'aigua ultrapura.

2.5.7.2.4. Reacció de lligació

Les diferents reaccions de lligament es van fer utilitzant la DNA ligasa del fag T4 (Promega).

La reacció de lligament permet unir fragments que tinguin extrems compatibles. Aquesta reacció depèn de la concentració relativa d'extrems de vector i d'insert. Quan es tracta d'una reacció entre fragments amb extrems cohesius, la relació d'extrems vector-insert van ser 1:2, mentre que si eren extrems roms era d'1:1.

Per calcular les quantitats de vector i d'insert necessaris s'utilitza la següent fórmula:

$$\text{ng d'insert} = [(\text{ng de vector} \times \text{kb d'insert}) / \text{kb de vector}] \times \text{relació insert/vector}$$

- i. S'afegeixen en un tub Eppendorf:
 - 2,5 µl de tampó 2 × de la lligasa (Promega)
 - Els volums de vector i d'insert necessaris
 - 0,5 µl de DNA lligasa del fag T4 (Promega)
 - Aigua ultrapura necessària fins a un volum final de 5 µl
- ii. S'incuba la barreja de reacció un mínim de 2 hores o més a temperatura ambient.
- iii. S'inactiva la reacció, incubant a 70°C durant 10 min.

2.5.8. Amplificació del DNA

2.5.8.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Per fer les PCR dutes a terme en aquest treball es va utilitzar la Taq *Expand High Fidelity* (Roche Diagnostics SL).

El protocol utilitzat per a un volum final de 25 µl de reacció de PCR és el següent:

- i. S'irradia el material amb llum ultraviolada durant 15 min, en una càmera de flux vertical per PCR (FLV60 Euro Aire).
- ii. Es barregen en un tub de 0,5 ml de capacitat:
 - 2,5 µl de tampó 10 × de PCR (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics SL)
 - 2,5 µl d'una barreja de dNTPs (2 mM c/dNTP) (Roche Diagnostics SL)
 - 1,25 µl de cada un dels oligonucleòtids (10 pmol/µl)
 - 0,2 µl de l'enzim (3.5 unitats/µl) (*Expand High Fidelity*) (Roche Diagnostics SL)
 - 200 ng de DNA motlle
 - Aigua ultrapura fins arribar a un volum final de 25 µl.
- iii. Es barreja i es fa un pols de centrífuga.
- iv. Es programar el termociclador segons la reacció de PCR que es vol realitzar.

- v. Es col·loquen els tubs en el termociclador i es posa en marxa el programa.

2.5.8.2. Seqüenciació

El mètode seguit per seqüenciar els fragments de DNA va ser el de Sanger (1977), utilitzant el seqüenciador *ALFexpress™DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech), el protocol es va modificar seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar dos kits de marcatge amb fluorescència diferents: el *fmol®DNA Sequencing System* de Promega, amb oligonucleòtids marcats amb Cy5 (Roche Diagnostics SL) i el *thermo sequenase Cy5 Dye terminator cycle sequencing System* (Amersham Biosciences), amb els didesoxinucleòtids (ddNTP) marcats amb Cy5.

Per obtenir la seqüència d'un fragment de DNA per aquest mètode són necessaris diferents components:

- El DNA motlle que s'ha de seqüenciar; aquest pot ser DNA genòmic o un segment de DNA clonat en un vector apropiat.
- Un oligonucleòtid, aproximadament de 20 pb de longitud que hibridi amb el DNA motlle que es vol seqüenciar.
- Els quatre nucleòtids trifosfat (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) utilitzats en la PCR.
- Quatre didesoxinucleòtids (ddATP, ddTTP, ddCTP i ddGTP). Aquests són nucleòtids modificats que no presenten el grup hidroxil en la posició 3' de la desoxiribosa, de manera que poden ser incorporats per la DNA polimerasa a la cadena de DNA naixent, però no permeten la prolongació de la cadena. Per tant, una vegada s'incorpora un didesoxinucleòtid s'acaba la síntesi de la cadena de DNA.
- La DNA polimerasa, que té la capacitat de polimeritzar el DNA, a partir de l'extrem 3' del oligonucleòtid, fins que s'incorpora un ddNTP.

S'utilitzen quatre tubs diferents, que contenen quatre barreges de reacció. Cada una d'aquestes conté els quatre nucleòtids trifosfat, la DNA polimerasa, l'oligonucleòtid i un tipus de dideoxinucleòtid, a una concentració limitant, que produeix la terminació de la síntesi en el moment i lloc on s'incorpora.

Amb aquest sistema, en cada barreja de reacció hi ha una sèrie de molècules de DNA de nova síntesi de diferent llargària, que acaben totes amb el mateix nucleòtid. Per tant,

L'oligonucleòtid que s'obté acaba selectivament en una G, A, T o C segons el dideoxi anàleg que hi ha a la reacció.

Els fragments de DNA de nova síntesi obtinguts en cada barreja de reacció se separen per grandària mitjançant electroforesi en gels verticals d'acrilamida (0,5 mm de gruix i de 50 cm de longitud) que permeten discriminar entre fragments de DNA que es diferencien tan sols en un nucleòtid. Els productes de cada una de les quatre barreges de reacció s'insereixen en quatre carrils diferents del gel.

Tenint en compte que el DNA de nova síntesi creix en la direcció 5' → 3', si es comença a llegir el gel pels fragments de grandària més petita (extrem 5') i s'avança augmentant la grandària dels fragments (cap a l'extrem 3'), s'obté la seqüència de DNA de nova síntesi en la direcció 5' → 3'.

La incorporació de la marca fluorescent dels oligonucleòtids amb Cy5 permet la visualitzar la seqüència del DNA en el gel d'acrilamida desnaturalitzant mitjançant el *ALFexpress Sequencer*.

2.5.8.2.1. Marcatge amb el kit *fmol*[®]DNA Sequencing System

Aquesta tècnica aprofita l'avantatge de les propietats intrínseques de la DNA polimerasa aïllada de *Thermus aquaticus* (Taq). El protocol utilitzat és una modificació del protocol descrit per Heiner (1988) i els encebadors o oligonucleòtids utilitzats per aquest treball van ser el *direct*, el *reverse* i el *T7 promoter* (Roche Diagnostics SL), marcats no radioactivament amb Cy5 en el seu extrem 5'.

Les reaccions de PCR de marcatge amb aquest kit, es van fer seguint les instruccions del fabricant:

- i. Primerament, s'hi afegeixen 2 µl de la barreja d/ddNTPs al tub corresponent per a cada reacció.
- ii. Es barregen:
 - 5 µl del tampó 5 × (Promega)
 - 1,5 µl d'un primer marcat amb Cy5 (Roche Diagnostics SL)
 - 0,5-1 µg de DNA
 - Aigua ultrapura fins a un volum final de 16 µl
 - 1 µl de *Taq* polimerasa (Promega)
- iii. Es reparteixen els 4 µl de la barreja a cada Eppendorf on hi ha els d/ddNTP.

- iv. S'agiten els tubs, fer un pols a la microcentrífuga i es col·loquen al termociclador.
- v. Les reaccions d'amplificació utilitzades per aquest tipus de marcatge són les següents:
 - 95°C 30 s
 - 42°C 30 s
 - 72°C 1 min
 - Aquest cicle es repeteix 30 vegades.
- vi. Una vegada han finalitzat les reaccions de polimerització en cadena, s'afegeixen a cada tub Eppendorf 3 µl d'una solució desnaturalitzant, anomenada STOP, que permet la conservació de les mostres a -20°C i evita la formació d'estructures secundàries entre els diferents fragments.
- vii. Cal desnaturalitzar les mostres amb calor a 95°C durant 2 min 30 s abans de carregar-les al gel d'acrilamida; en aquest punt la formamida de la solució STOP (apartat 2.8) manté separades les cadenes de ssDNA obtingudes en l'amplificació desnaturalitzada.

2.5.8.2.2. Marcatge amb el kit *thermo sequenase Cy5 Dye terminator cycle sequencing System*

Aquest kit utilitza dideoxinucleòtids marcats amb Cy5, per això també rep el nom de seqüenciació per terminadors, ja que el marcatge es troba a l'extrem 3' del producte amplificat. Utilitza com a DNA polimerasa la *thermo sequenase I*. La DNA polimerasa *thermo sequenase I* és estable a 90°C com a mínim durant 1 hora, i genera pics de senyals molt uniformes.

Les reaccions de PCR de marcatge amb aquest kit es van fer segons les instruccions del fabricant, es van preparar les barreges per quatre mostres diferents alhora d'un DNA motlle comú, ja que la mesura dels diversos components de la reacció per a una única mostra va ser imprecisa.

- i. Primerament, cal preparar les barreges de dNTP, i per a cada nucleòtid s'han d'afegir els components següents:
 - 1,6 µl de dNTP (Amersham Biosciences)
 - 0,8 µl de Cy5-ddNTP (Amersham Biosciences)
 - 6,4 µl d'aigua ultrapura
- ii. Cal barrejar bé i repartir 2 µl al tub de reacció.

- iii. Seguidament per a cada mostra, s'han de preparar les barreges de reacció següents en un tub eppendorf:
 - 300 ng de DNA
 - 0,4 µl d'oligonucleòtid (Roche Diagnostics SL)
 - 3,5 µl de tampó (Amersham Biosciences)
 - 1 µl de *thermo sequenase* (Amersham Biosciences)
 - Aigua ultrapura fins a un volum final de 27 µl
- iv. Es barreja i es reparteixen 6 µl de reacció a cada tub.
- v. Es col·loquen les reaccions al termociclador. Les condicions d'amplificació utilitzades van ser les següents:
 - 95°C 30 s
 - T_m de l'oligonucleòtid 30 s
 - 72°C 80 s
 - Aquest cicle es repeteix 30 vegades.
- vi. Una vegada han finalitzat les reaccions de polimerització en cadena, s'afegeixen a cada tub Eppendorf:
 - 2 µl d'acetat d'amoni 7,5 M
 - 2 µl de la solució de glicogen (10 mg/ml)
 - 30 µl d'etanol absolut (Carlo Erba)
- vii. Cal barrejar i fer un pols de centrifuga, i deixar que el DNA amplificat precipiti a -20°C durant un mínim de 20 min.
- viii. Se centrifuguen els tubs a 12.000 rpm durant 30 min a temperatura ambient o a 4 °C.
- ix. Se n'elimina acuradament sobrenedant amb una micropipeta.
- x. Es rentar acuradament petit sediment amb 200 µl d'etanol 70% (apartat 2.8) fred.
- xi. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 5 min a temperatura ambient o a 4°C.
- xii. Se n'elimina acuradament el sobrenedant amb una micropipeta.
- xiii. S'assequen suaument els sediments al *Speed Vac*[®].
- xiv. Es ressuspèn el sediment en 6 µl de solució STOP. Aquesta solució permet conservar les mostres a -20°C.
- xv. Es desnaturalitzen les mostres per calor a 72°C durant 3 min abans de ser carregades al gel d'acrilamida.

2.5.8.2.4. Preparació del gel de seqüenciació

- i. Es netegen els vidres i les pintes acuradament, en primer lloc amb una espàtula, aigua i sabó, per treure les restes del gel anterior, i seguidament, es netegen amb aigua destil·lada, ultrapura i etanol absolut.
- ii. S'assequen els vidres acuradament amb papers *kimwipes* (Amersham Bioscience).
- iii. S'humiteja la part superior dels 2 vidres, on aniran les pintes, amb una solució de bind-silà.
- iv. Es tornen a netejar els vidres amb aigua ultrapura i etanol absolut.
- v. Es munten els vidres.
- vi. Es prepara el tampó TBE (0,5 ×) a partir d'un estoc (10 ×) (Amersham Bioscience).
- vii. Preparar l'acrilamida ReproGel™ tal com indica el fabricant Amersham Bioscience.
- viii. S'aboca acuradament l'acrilamida per evitar la formació de bombolles.
- ix. Es col·loca la pinta al gel.
- x. Es polimeritza el gel irradiant amb llum ultraviolada durant 15 min.
- xi. Es col·loquen els vidres i el tampó d'electroforesi.
- xii. Es carreguen les mostres que s'han de seqüenciar.

La lectura del pas de les bandes marcades amb Cy5 es fa gràcies al làser del seqüenciador *ALFexpress™DNA Sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech), que excita les bandes fluorescents. La llum emesa és detectada per uns fotodetectors. Els senyals recollits són digitalitzats i processats pel programari *ALFwin* proporcionat pel fabricant.

2.6. Mètodes de manipulació de l'RNA

Tots els mètodes de manipulació d'RNA impliquen una sèrie de mesures per evitar la seva degradació. Tot el material i les solucions que es van utilitzar estaven lliures de

RNases. El material de vidre va ser tractat a 150°C durant un mínim de 3 h. El material fungible és lliure de RNases.

2.6.1. Extracció d'RNA

L'extracció de l'RNA bacterià implica un primer pas de lisi cel·lular, seguit per la separació de l'RNA de les proteïnes i del DNA. Es va fer una extracció orgànica i finalment, una precipitació de l'RNA amb alcohols i sals.

2.6.1.1. Extracció d'RNA utilitzant el kit *RNeasy[®]Mini* (QUIAGEN)

Les extraccions d'RNA d'aquest treball es van fer utilitzant el kit d'extracció d'RNA de QUIAGEN, que permet l'extracció partint de petites quantitats de cultiu.

- i. Se centrifuguen 10 ml d'un cultiu en fase exponencial, és a dir, a una $DO_{550\text{ nm}}$ de 0,6, a 8.000 rpm durant 10 min.
- ii. Se n'elimina el sobrenedant i s'hi afegeixen 300 µl d'una solució de lisozim (100 mg/ml) dissolt en aigua amb DEPC (apartat 2.8).
- iii. Es ressuspenden al vòrtex.
- iv. Es deixa el tub 10 min a temperatura ambient.
- v. S'afegeixen 350 µl de la solució RLT.
- vi. S'agita al vòrtex. (Si apareix un precipitat, se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min, i es continua treballant amb el sobrenedant).
- vii. S'afegeixen 250 µl d'etanol absolut i barrejar amb la micropipeta.
- viii. Es col·loca el contingut del tub a una columna del kit.
- ix. Se centrifuga la columna a 10000 rpm durant 15 s i se'n descarta el líquid sobrant.
- x. S'afegeixen 700 µl de la solució RW1.
- xi. Se centrifuga la columna a 10.000 rpm durant 15 s.
- xii. S'elimina el tub que suporta la columna i se'n posa un de nou.
- xiii. S'afegeixen 500 µl de la solució RPE.
- xiv. Se centrifuga la columna a 10.000 rpm durant 15 s i se'n descarta el líquid sobrant.

- xv. S'afegeixen 500 µl de la solució RPE.
- xvi. Se centrifuga la columna a 10.000 rpm durant 2 min.
- xvii. S'elimina el tub i es col·loca la columna a un tub Eppendorf.
- xviii. Se centrifuga la columna a 10.000 rpm durant 1 min per acabar de netejar la columna, i es col·loca un nou tub eppendorf.
- xix. S'afegeixen 50 µl d'aigua ultrapura lliure de RNases.
- xx. Se centrifuga la columna a 12.000 rpm durant 1 min, a fi d'obtenir l'RNA en solució.

2.6.2. Tractament amb DNAsaI

Per eliminar les possibles restes de DNA que hi pugui haver, es fa un tractament amb DNAsaI.

- i. Al tub Eppendorf on hi ha l'RNA s'hi afegeixen:
 - 10 µl de tampó Ace (10 ×) (apartat 2.8)
 - 38 µl d'aigua ultrapura amb DEPC
 - 2 µl de DNAsaI lliure de RNases (Roche Diagnostics SL)
- ii. S'incuba a 37°C durant 30 min-1 hora.

2.6.3. Precipitació del RNA

- i. Al tub on s'ha fet el tractament amb DNAsaI s'hi afegeixen:
 - 300 µl d'aigua ultrapura lliure de RNases
 - 400 µl de solució fenol/cloroform/isoamílic (apartat 2.8)
- ii. Es barreja per agitació i centrifuga a 12000 rpm durant 3 min.
- iii. Se'n recupera la fase aquosa i s'hi afegeix 1 ml d'etanol absolut.
- iv. Es deixa precipitar l'RNA a -80°C durant tota la nit.
- v. Se centrifuga el tub, a 12.000 rpm durant 10 min, per pel·letejar l'RNA precipitat.
- vi. S'elimina l'etanol i s'hi afegeix 1 ml d'etanol 70% (apartat 2.8).
- vii. Se centrifuga el tub a 12.000 rpm durant 5 min.
- viii. S'elimina l'etanol i s'hi afegeixen 30 µl d'aigua ultrapura lliure de RNases.

2.6.4. Quantificació de RNA

- **Espectrofotometria.** Es mesura la $DO_{260\text{ nm}}$ de la mostra o d'una dilució seva utilitzant l'espectrofotòmetre. Per a aquest treball de la tesi doctoral, s'ha utilitzat l'espectrofotòmetre *Gene Quant* (Amersham Biosciences). Les mesures de $DO_{230\text{ nm}}$ o $DO_{280\text{ nm}}$ permeten determinar la puresa d'una mostra. S'estableixen com a paràmetres de puresa vàlids les proporcions:

$$DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}} \geq 1.8$$

$$DO_{260\text{ nm}}/DO_{230\text{ nm}} > 2$$

Per comprovar que no hi ha contaminació de DNA, es fa una PCR utilitzant oligonucleòtids propis del microorganisme del qual s'ha extret l'RNA. Si apareix producte d'amplificació es deu a la presència de DNA contaminant i s'ha de tornar a sotmetre l'RNA a un tractament amb DNasaI.

2.6.5. Amplificació del RNA

2.6.5.1. RT-PCR

Per fer els experiments de *retrotranscriptase-PCR* (RT-PCR) es va fer servir el kit *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche Diagnostics SL) que permet la realització de les reaccions de retrotranscripció i PCR en un únic pas.

Aquest mètode permet una anàlisi ràpida, sensible i reproducible de l'RNA, utilitzant una barreja d'enzims de l'*Expand High Fidelity PCR System* (Roche Diagnostics SL) i l'*AMV Reverse Transcriptase*. La reacció produeix la transcripció inversa de l'RNA generant cDNA i la posterior amplificació del cDNA per PCR.

Per fer les RT-PCR s'han seguit les instruccions i recomanacions del fabricant i s'han utilitzat oligonucleòtids interns de la regió codificant de diferents gens (taula 2.3).

El protocol habitual utilitzat per a un volum final de 50 µl de reacció de RT-PCR és el següent:

- i. Cal irradiar, prèviament, tot el material que s'utilitzarà mantingut en gel, amb llum ultraviolada, en una càmera de flux vertical per PCR (FLV60 Euro Aire).
- ii. S'han de preparar per separat 2 barreges mare.

La barreja 1, per a un volum final de 25µl, es fa en un tub de 0,5 ml de capacitat:

- 5 µl de dNTP (10 mM c/dNTP)
- 2 µl oligonucleòtid *up* (10 pmol/µl)
- 2 µl oligonucleòtid *down* (10 pmol/µl)
- 2.5 µl solució DTT (100 mM)
- 13,5 µl d'aigua ultrapura tractada amb DEPC

La barreja 2, per un volum final de 25µl, es fa en un tub de 0,5 ml de capacitat:

- 10 µl del tampó 5 x RT-PCR amb Mg²⁺
 - 1 µl de la barreja d'enzims (*AMV+Expand High Fidelity PCR-System*)
 - 14 µl d'aigua ultrapura tractada amb DEPC
- iii. Cal unir els 25 µl de cada una de les barreges mare.
- iv. S'hi afegeix l'RNA (100 ng).
- v. Es barreja i es fa un pols de centrífuga.
- vi. Es programa el termociclador segons la reacció de PCR que es vol fer. El programa ha de tenir un pas previ d'incubació a 50°C durant 30 min, durant el qual tindrà lloc la retrotranscripció. Posteriorment s'utilitza un programa normal de PCR:
- 1 cicle: 95°C 2 min
 - 30 cicles: 95°C 40 s min
 - T_m de l'oligonucleòtid 40 s
 - 72°C 2 min
 - 1 cicle: 72°C 7 min
 - Cal mantenir els tubs a 4°C indefinidament.
- vii. Es col·loquen els tubs al termociclador i es posa en marxa el programa.

2.7. Mètodes de manipulació de proteïnes

2.7.1. Clonació i sobreexpressió de proteïnes

Aquest sistema s'utilitza per clonar i expressar proteïnes recombinants en *E. coli* seguint les intruccions del fabricant. Els gens que interessin van ser clonats en el plasmidi pET-15b (Novagene) sota el control d'un promotor reconegut per la RNAP del fag T7 i sota un *Ribosome Binding Site* (RBS) molt eficient de la proteïna majoritària de la càpside del fag T7. L'hoste escollit per a l'expressió i producció de la proteïna

desitjada ha estat la soca d'*E. coli* BL21 DE3, lisogènica per al bacteriòfag DE3. Aquest bacteriòfag conté un fragment de DNA amb el gen *lacI* i el gen de l'RNAP del T7 sota el control del promotor *lacUV5*. En una soca lisogènica per DE3, l'únic promotor capaç de produir la transcripció de l'RNA polimerasa del T7 és el *lacUV5* induïble per IPTG. D'aquesta manera, quan s'afegeix IPTG al cultiu, s'indueix l'RNA polimerasa del T7, aquesta transcriurà el DNA clonat al vector pET-15b i la seva traducció serà massiva a causa de l'eficiència del seu RBS. A més, aquesta soca es caracteritza, a més, per ser deficient en la proteasa Lon i en la proteasa de membrana OmpT; d'aquesta manera s'evita la degradació de la proteïna.

D'altra banda, el vector pET15b té altres característiques avantatjoses: permet la clonació en fase del gens que codifiquen per les proteïnes que es volen sobreexpressar per una diana. També permet la inserció d'una cua de sis histidines "His•Tag" a l'extrem amino terminal de la proteïna sobreexpressada, que facilita la purificació de la proteïna i, finalment, presenta codons STOP de traducció en els tres possibles marcs de lectura a continuació de la regió de clonació i un terminador de la transcripció del fag T7.

2.7.1.1. Clonació en el vector pET15b

2.7.1.1.1. Preparació del DNA que codifica per la proteïna que es desitja sobreexpressar

- i. S'ha d'amplificar del fragment utilitzant els oligonucleòtids adients que a més continguin a la seva seqüència les dianes de restricció *NdeI* i *BamHI*, per a una posterior clonació, seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.1.
- ii. Cal lligar el producte de la PCR al vector plasmídic pGEMT[®], seguint el protocol de l'apartat 2.5.7.2.4.
- iii. S'electrotransforma el lligament a les cèl·lules competents DH5 α , seguint el protocol de l'apartat 2.4.1.2.
- iv. Es procedeix a fer una miniextracció plasmídica de diversos clons obtinguts de la transformació, seguint el protocol de l'apartat 2.5.3.1.
- v. Es comprova la clonació dels plàsmids mitjançant restricció o PCR seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.1.

- vi. Es fa la seqüenciació del fragment clonat amb el kit *fmol*[®] *DNA Sequencing System*, seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.2.2.
- vii. S'extrau el fragment clonat en el vector plasmídic pGEMT[®] mitjançant la restricció amb els enzims *NdeI* i *BamHI*, seguint el protocol de l'apartat 2.5.4.

2.7.1.1.2. Preparació del vector plasmídic de sobreexpressió pET15b

- i. S'electrotransforma el vector a cèl·lules competents DH5 α , seguint el protocol de l'apartat 2.4.1.2.
- ii. Es fa una maxiextracció del vector, seguint el protocol de l'apartat 2.5.3.2.
- iii. Es fa una restricció del vector pels enzims *NdeI* i *BamHI*, seguint el protocol de l'apartat 2.5.4.
- iv. Finalment, es procedeix a fer la defosforilació del vector, seguint el protocol de l'apartat 2.5.7.2.2.

2.7.1.2. Sobreexpressió de proteïnes

Primerament, es comprova la sobreexpressió a petita escala.

- i. Es fa ressebra 1/100, de 4 cultius de nit del transformants de BL21CodonPlus[®]/pET15b problema, en 20 ml de medi LBDifco amb ampicilina (50 μ g/ml).
- ii. S'incuba en agitació constant de 110 rpm a 37°C fins a una DO_{550 nm} de 0,8.
- iii. Es divideixen els cultius i a un d'ells s'hi afegixen 15 μ l de IPTG 1 M (apartat 2.8).
- iv. Es mantenen tots dos cultius 3 hores en agitació a 37°C.
- v. Se centrifuga 9 ml dels diferents cultius a 8.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- vi. Se'n descarta el sobrenadant i es congelen els pellets a -20°C.
- vii. Se centrifuga 1 ml dels diferents cultius a 12000 rpm durant 3 min.
- viii. S'extrauen les proteïnes totals del pellet d'1 ml, resuspès en 90 μ l d'aigua ultrapura i 5 μ l de tampó de càrrega de proteïnes 4 \times (apartat 2.8), per diversos tractaments de congelació (-80°C) /descongelació (95°C) i per l'efecte de l'SDS del tampó de càrrega de proteïnes.
- ix. L'extracte obtingut es visualitza en un gel de electroforesi de proteïnes (apartat 2.7.4) per saber si la proteïna s'ha sobreexpressat i en quin clon.

Una vegada s'ha comprovat que la proteïna es pot sobreexpressar quan es tracta amb IPTG, es fa una sobreexpressió a gran escala del clon adequat, utilitzant 1 L de medi LB líquid, i seguint el protocol anterior, mantenint les proporcions i les condicions per purificar la proteïna desitjada.

2.7.2. Extractes crus de proteïnes

En determinades ocasions va ser necessària l'obtenció d'extractes crus de cèl·lules que sobreexpressen una determinada proteïna. Aquests es van fer a partir d'una sobreexpressió a petita escala, lisant les cèl·lules per sonicació i aconseguint un homogeneïtzat cel·lular que conté diferents proteïnes citoplasmàtiques solubles.

- i. Se centrifuga un cultiu sobreexpressat de 10 ml a 10.000 rpm durant 10 min a 4°C.
- ii. Se n'elimina el sobrenedant i es resuspenen tots els sediments en 2 ml de tampó de sonicació (apartat 2.8).
- iii. Se sonica utilitzant l'homogeneïtzador ultrasònic LABSONIC U (B. Braun), amb una sonda mitjana de titani (12T). Se selecciona la font d'energia en la posició *low* i s'hi aplica una potència màxima de 50 W, en cicles de sonicació de 0,8 s i 0,2 s de descans, durant el temps necessari fins a aconseguir la lisi cel·lular. Durant la sonicació és important mantenir la mostra a temperatura baixa (en un recipient amb gel).
- iv. Per observar l'eficiència de sonicació es carreguen 30 µl de l'homogeneïtzat cel·lular obtingut en un gel d'electroforesi de proteïnes.
- v. Se centrifuga el llistat a 12.000 rpm a 4°C durant 20 min.
- vi. Es recupera el sobrenedant i se centrifuga a 12.000 rpm a 4°C durant 30 min a fi d'eliminar-ne tots les restes cel·lulars.
- vii. Es carreguen 30 µl del sobrenedant en un gel d'electroforesi de proteïnes per observar la solubilitat de la proteïna sobreexpressada.
- viii. Es preparen alíquotes de 0,2 ml del sobrenedant obtingut i conservar-les a -20°C.

2.7.3. Purificació de proteïnes

La purificació de proteïnes es va fer amb el kit *Talon™ Metal Affinity Resins* (Clontech) seguint les instruccions del fabricant. Aquesta tècnica es basa en la interacció reversible entre la cua d'histidines inserida a la proteïna clonada en el vector pET15b i l'ió Co^{+2} immobilitzat en la resina *Talon™*. La proteïna purificada s'elueix mitjançant columnes de flux gravitatori amb una lleugera disminució del pH. Per a la purificació de la proteïna cI del fag SE1 va ser necessària l'addició d'EDTA 100 mM a pH 8 a la columna i la posterior eliminació d'aquest compost i de Co^{+2} per osmosi.

- i. Es neteja la resina *Talon™* afegint 750 μl de resina a un tub eppendorf, per obtenir 500 μl de resina (*beds*).
- ii. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min per pelletejar la resina.
- iii. Se n'elimina el sobrenedant.
- iv. S'afegeixen 10 vegades el volum de *beds* de *Extraction/Wash buffer* i es barreja.
- v. Se centrifuga a 12.000 rpm durant 2 min.
- vi. Se n'elimina el sobrenedant.
- vii. Es repeteix des del pas iv per netejar la resina *Talon™* i es tampona al pH adient.
- viii. Se centrifuga 1 L de cultiu sobreexpressat (apartat 2.7.1.2), i es reparteix en 4 tubs, a 8.000 rpm durant 10 min.
- ix. Se n'elimina el sobrenedant.
- x. Es resuspenen les cèl·lules de cada pellet en 6 ml d'*Extraction buffer*.
- xi. Se soniquen els quatre tubs fins a obtenir la lisi cel·lular.
- xii. Se centrifuga a 8.000 rpm durant 10 min a 4 °C.
- xiii. Se'n recupera el sobrenedant i s'afegeixen 500 μl de resina *Talon™* neta.
- xiv. Deixar la barreja en agitació suau a 4°C durant tota la nit.
- xv. Es compacta la resina unida a la proteïna en una columna de flux gravitatori a 4°C.
- xvi. Es neteja la resina de la columna amb 15 ml d'*Extraction/Wash buffer*.
- xvii. S'elueix la proteïna amb 500 μl d'*Elution buffer* amb EDTA 100 mM a pH8 (apartat 2.8), i es recull el tampó amb la proteïna eluïda en diferents alíquotes.
- xviii. Dialitzar el volum, eluït de les diferents alíquotes, dins d'unes bosses de diàlisi en 2 L d'*Elution buffer* en una columna amb agitació suau, a fi d'eliminar-ne el cobalt i l'EDTA eluïts i obtenir així la proteïna pura.
- xix. Es repeteix el pas xviii.

- xx. Es carreguen les diferents fraccions de l'elució en un gel SDS-PAGE per poder determinar el grau de purificació.

2.7.4. Gels d'electroforesis de proteïnes SDS-PAGE

Es van fer minigels desnaturalizants d' SDS-poliacrilamida (15% d'acrilamida), (Sambrook *et al.*, 1989). L'aparell d'electroforesi utilitzat és l'*Hoefler MINIVE Complete (Vertical electrophoresis system)* i els vidres, suports, pintes, etc., són d'Amersham Pharmacia, utilitzant com a font d'electroforesi el model APELEX ST304 (*Electrophoresis power supply*).

Primerament es prepara el gel d'acrilamida i les mostres que s'han de carregar:

- i. Es neteja l'aparell d'electroforesi.
- ii. Es munten correctament els vidres amb els espaiadors en el suport on es farà el gel.
- iii. Es polimeritza la part inferior (gel separador) del gel de proteïnes.
 - Barreja del gel separador 15% (volum final 15 ml):

▪ 30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1 (Biorad)	7,5 ml
▪ Tampó separador 4 x (apartat 2.8)	3,75 ml
▪ APS (<i>Ammonium persulphate</i>) 10% (AMRESCO)	50 µl
▪ Temed (AMRESCO)	10 µl
▪ Aigua ultrapura	3,75 ml
- iv. Es transfereix la barreja del gel separador al suport del vidre fins a arribar a omplir-lo aproximadament $\frac{3}{4}$ parts de la longitud dels vidres.
- v. Es posen algunes gotes d' SDS a l'1% en la superfície del gel per definir nítidament el límit de la superfície del gel, i es deixa polimeritzar durant 30 min aproximadament.
- vi. Se n'eliminen les gotes d' SDS.
- vii. Es polimeritza el gel compressor.
 - Barreja del gel compressor (volum final 6 ml):

▪ 30% <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1 (Biorad)	0,78 ml
▪ Tampó compressor 4x (apartat 2.8)	1,5 ml

- APS (*Ammonium persulphate*) 10%
(AMRESCO) 30 µl
 - Temed (AMRESCO) 6 µl
 - Aigua ultrapura 3.66 ml
- viii. Es posa la pinta dels pous a la part superior.
- ix. Es deixa polimeritzant durant 30 min.
- x. Es preparen les mostres de proteïnes que s'han de carregar i els marcadors de pes molecular (*SDS-PAGE Molecular Weight Standard Low Range* BIO-RAD) (0,5 µl/10 µl). Les mostres es carreguen utilitzant el tampó de càrrega de proteïnes (transportador Laemmli 4 ×) i es preparen segons el volum de mostra que s'ha de carregar. Generalment, el volum de càrrega és de 15 a 20 µl.
- xi. Es desnaturalitzen les mostres a 95°C durant 5 min.
- xii. Es col·loca el suport a la cubeta d'electroforesi, i s'hi afegeix el tampó d'electroforesi TGS 1 × (apartat 2.8).
- xiii. L'electroforesi es fa a 20 mA i 200 V per un gel.
- xiv. Una vegada ha finalitzat l'electroforesi, es treu el suport de la cubeta, i es treu el gel del suport acuradament.
- xv. Es col·loca el gel en la solució de tinció de proteïnes en agitació lenta durant 10 min.
- xvi. S'elimina la solució de tinció i es destenyeix el gel amb solució d'àcid acètic glacial 10%, canviant-la quan estigui blavosa.
- xvii. Una vegada destenyit el gel se n'elimina l'àcid acètic i s'hi afegeix aigua destil·lada.

El marcador de pes molecular *SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range* BIO-RAD permet veure les bandes següents:

Proteïnes	Pes molecular (Da)
Fosforilasa b	97 400
Albúmina del sèrum	66 200
Ovoalbúmina	45 000
Anhidrasa carbònica	31 000
Inhibidor de tripsina	21 500
Lisozim	14 400

2.7.5. Assaig de mobilitat electroforètica (EMSA)

L'assaig de mobilitat electroforètica (*Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)) en gels de poliacrilamida (PAGE) és un mètode ràpid, simple i extremament sensible per detectar la unió de les proteïnes a unes seqüències específiques de DNA. Permet determinar l'afinitat, la quantitat i l'especificitat de la unió entre la proteïna i el DNA.

El protocol es divideix en diferents fases, que inclouen: la preparació dels fragments de DNA, la preparació de la barreja de la proteïna amb el DNA marcat, la preparació del gel d'acrilamida, l'electroforesi, la transferència i, finalment, el revelat, on es veurà la unió.

El protocol que s'utilitza és el descrit en el *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1995), amb algunes modificacions.

2.7.5.1. Marcatge de fragments de DNA

- i. S'amplifica per PCR el fragment de DNA utilitzat en l'estudi de mobilitat (apartat 2.5.8.1), prèviament clonat en el vector pGEMT (apartat 2.5.7) i seqüenciat (2.5.8.2.2), utilitzant l'oligonucleòtid *directe* o *reverse* marcat amb digoxigenina.
- ii. Es realitza una electroforesi del producte de la PCR en un gel d'agarosa, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.5.
- iii. Es recupera la banda de DNA utilitzant el mètode que utilitza les columnes *Wizard* (Promega), seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.7.1.
- iv. Es quantifica el fragment de DNA marcat, seguint el protocol descrit a l'apartat 2.5.6.

2.7.5.2. Reacció d'unió proteïna-DNA

- i. Es preparen les barreges de reacció:

Les barreges de reacció d'unió de la proteïna al fragment de DNA es fan a 4°C, i contenen els components següents:

- Aigua ultrapura 12 µl

▪ Fragment de DNA marcat (20 ng/ μ l)	1 μ l
▪ Tampó d'unió (apartat 2.8)	4 μ l
▪ DNA inespecífic (Herring Testes Carrier DNA (10 mg/ml) (Beckton & Dickinson)	2 μ l
▪ Proteïna	1 μ l

Quan es fan assaigs amb competidors s'afegeix a la barreja els diferents fragments específics o inespecífics a la concentració necessària, mantenint les proporcions dels altres components i el volum final de 20 μ l.

- ii. E fa un pols de centrífuga.
- iii. S'incuba els tubs a 30°C durant 30 min. A aquesta temperatura disminueix l'acció de les DNases i proteases, i és suficient per a la unió proteïna-DNA.

2.7.5.3. Preparació del gel de poliacrilamida i electroforesi

Els gels de poliacrilamida utilitzats en els EMSA es van fer utilitzant vidres, suports, espaiadors, pintes i cubetes d'electroforesi BIO-RAD. La font d'electroforesi és de *GROC Instruments G-201* i la concentració de poliacrilamida a la qual es va treballar va ser del 6%.

- i. Es neteja l'aparell d'electroforesi.
- ii. Es col·loquen correctament els vidres i els espaiadors al suport.
- iii. Es prepara el gel de poliacrilamida al 6%:

▪ <i>Acrylamide/Bis solution</i> 37.5:1(BIO-RAD)	3 ml
▪ Tampó glicina 5×	3 ml
▪ Aigua ultrapura	9 ml
▪ APS (<i>Ammonium persulphate</i> 10%) (AMRESCO)	69 μ l (o doble)
▪ Temed (AMRESCO)	19 μ l (o doble)
- iv. Es transfereix la barreja del gel al suport de vidre i es col·loca la pinta a la part superior.
- v. Es deixa que polimeritzi durant 30 min.
- vi. Es col·loca el suport amb el gel fet a l'aparell d'electroforesi.
- vii. S'afegeix a la cubeta el tampó glicina 1 × (apartat 2.8).
- viii. Es fa una pre-carrera per estabilitzar l'amperatge de la font, connectant la font a 150 V durant 15 min sense carregar cap mostra.
- ix. Es carreguen les barreges de reacció.

- x. Es fa córrer el gel a una potència molt baixa, a 10 mA, fins que les mostres han sortit dels pous durant 10 min aproximadament.
- xi. S'incrementa el voltatge fins a 150 V, sense que l'amperatge superi els 20 mA.
- xii. Una vegada realitzada l'electroforesi, es treu el suport i es prepara el gel per a la transferència.

2.7.5.4. Transferència

Per poder fer el revelat i la detecció es van transferir les bandes del DNA marcat corregudes en el gel d'electroforesi a una membrana de biodina (Pall).

El procediment de transferència és el següent:

- i. Es retalla una membrana de biodina carregada positivament (*Biodyne®B Membrane*, 0.45 µm de PALL Gelman Laboratories) de manera que tingui la mateixa grandària del gel.
- ii. Es treu un dels vidres del suport del gel, de manera que quedi exposada tota la superfície del gel.
- iii. Es col·loca la membrana sobre el gel d'acrilamida, evitant la formació de bombolles d'aire entre la membrana i el gel. La membrana ha de contactar perfectament amb tota la superfície del gel.
- iv. Es col·loquen tres trossos de paper 3MM de la mateixa grandària que el filtre sobre la membrana.
- v. Es col·loca el vidre que s'havia enretirat anteriorment, i es posa un pes damunt perquè es pugui produir la transferència del DNA des del gel a la membrana.
- vi. Passats 30 min, se n'extreu la membrana acuradament, i es fixa el DNA utilitzant l'equip *UV Stratalinker 2400* (Stratagene).
- vii. Es pot conservar la membrana a 4°C si el revelat és posterior.

2.7.5.5. Revelat i detecció

Els fragments de DNA marcats amb digoxigenina es detecten amb una reacció colorimètrica, utilitzant els reactius del kit *DIG DNA Labeling and Detection kit Nnradiactive* (Roche Diagnostics S. L.) i seguint el protocol descrit pel fabricant.

- i. S'equilibra la membrana amb 50 ml de tampó 1 (apartat 2.8) durant 1 min.
- ii. Es bloqueja la membrana amb 30 ml de tampó 2 (apartat 2.8), durant 30-60 min a agitació lenta.
- iii. Es prepara la solució d'anticòs, diluint l'anticòs (*Antidigoxigenina-AP Fab Fragment*) 1:5.000 (2 µl d'anticòs/ 10 ml de tampó 2 (apartat 2.8)).
- iv. S'elimina el tampó 2 i mantenir en agitació lenta la membrana durant 30 min amb la solució d'anticòs.
- v. S'elimina la solució d'anticòs i es fan tres rentats de 10 min amb tampó 1 a agitació ràpida, per eliminar l'anticòs no unit.
- vi. Es prepara la solució colorimètrica.
- vii. S'elimina el Tampó 1 (apartat 2.8) i equilibrar el pH de la membrana amb el tampó 3 durant 5 min a agitació ràpida.
- viii. S'elimina el tampó 3 (apartat 2.8) i cobrir la membrana amb solució colorimètrica (apartat 2.8).
- ix. Es mantè a la foscor sense agitació fins que es visualitzin les bandes.
- x. Rentar la membrana amb aigua destil·lada per aturar la reacció.
- xi. S'asseca la membrana i es desa.

2.7.6. Assaigs de protecció contra la DNAsaI o de *footprinting*

Aquesta tècnica permet detectar la regió d'unió d'una proteïna a un fragment de DNA, basant-se en la protecció que aquesta interacció confereix al fragment de DNA, fent-lo inaccessible a l'acció de la DNAsaI, enzim que talla inespecíficament el DNA (Galas *et al.*, 1978). El fragment de DNA que s'estudia es marca per un extrem amb fluorescència, de manera que la digestió amb la DNAsaI resultarà en diferents talls per tota la llargària del fragment. Tanmateix, si hi ha una regió protegida, no hi haurà fragments d'una llargària concreta, corresponent a la zona protegida. En un gel vertical aquest fet es visualitza com una regió sense bandes.

Els assaigs de protecció davant de l'acció de la DNAsaI s'han dut a terme utilitzant el sequenciador *ALF* (Pharmacia Biotech), de manera similar a la descrita en treballs anteriors (Patzer i Hantke, 2000 i Mazon *et al.*, 2004).

- i. S'amplifica mitjançant PCR un fragment de 100 a 400 pb. L'assaig es duu a terme sobre totes dues cadenes de DNA, la codificant i la no codificant, per tant,

s'amplifiquen dos fragments, cada un d'ells marcat a l'extrem 5'. Aquest marcatge s'aconsegueix utilitzant els oligonucleòtids universals marcats amb Cy5, a partir del plasmidi pGEMT[®] on hi ha clonat el promotor del gen d'estudi (taula 2.2).

- ii. Cal fer la reacció d'unió següent, en un volum final de 20 µl:
 - 100 ng del fragment de DNA marcat
 - 4 µl del tampó d'unió de *footprinting* 5 × (apartat 2.8)
 - 1 µl de DNA inespecífic (Herring Testes Carrier DNA) (10 mg/ml) (Beckton & Dickinson)
 - 10 µl de proteïna (quantitat suficient perquè tot el fragment de DNA marcat estigui unit a la proteïna, això es calcula a partir dels EMSA fets anteriorment amb el tampó d'unió de *footprinting* 5 ×), o bé 10 µl d'aigua ultrapura per tenir un control negatiu de la reacció.
 - Aigua ultrapura fins a 18 µl
- iii. S'incuba a 30°C durant 20 min.
- iv. S'hi afegeixen 2 µl de glicerol (concentració final de 5%).
- v. S'incuba a 30°C durant 10 min.
- vi. S'hi afegeixen 2 µl d'una dilució 1/1.000 de la DNAsa I 10.000 u/µl (Roche) (concentració final de 0,5 u/µl) (apartat 2.8).
- vii. S'incuba a 30°C durant 3 min.
- viii. S'atura la reacció afegint-hi:
 - 180 µl de tampó Tris 10 mM amb EDTA 40 mM (apartat 2.8)
 - 200 µl d'aigua ultrapura
- ix. Es tracta amb 450 µl de solució fenol/cloroform/isoamílic.
- x. Es tracta amb 450 µl de solució cloroform/isoamílic.
- xi. Es precipita el DNA amb 1 ml d'etanol absolut i 40 µl d'acetat sòdic 3 M a pH 8.
- xii. Afegir 2 µl d'aigua ultrapura i 4 µl de solució STOP (apartat 2.8).
- xiii. Es carreguen les reaccions de *footprinting*, amb proteïna i sense, i una reacció de seqüenciació del fragment de DNA desitjat, clonat al vector pGEM-T[®], en un gel d'acrilamida d'electroforesi vertical anàleg a l'utilitzat per seqüenciar, seguint el protocol de l'apartat 2.5.8.2.4.
- xiv. Comparant els fluorogrames obtinguts de les mostres amb proteïna i sense, es pot detectar l'absència de fragments de restricció en la regió de DNA protegida per la unió proteica. Aquesta regió es tradueix en la seqüència identificant-la amb la seqüència del fragment clonat al pGEM-T[®].

2.8. Tampons i solucions

Solució de CaCl₂ 100 mM

- A 90 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

CaCl ₂ (Merck)	1,47 g
---------------------------	--------
- Es barreja fins a la seva total dissolució i s'arrasa a un volum final de 100 ml.
- S'esterilitza a l'autoclau.

Solució de glicerol al 10%

Glicerol (Scharlau)	10 ml
Aigua destil·lada fins a 100 ml	

- S'agita fins a una total dissolució.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).
- Es conserva a 4°C.

Solució d'arabinosa 1 M

- A 10 ml cal afegir-hi:

DL-Arabinosa (SIGMA)	1,5 g
----------------------	-------
- Es barreja fins a la total dissolució.
- S'esterilitza per filtració.

RNasaI

- A 987 µl d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

RNasa (Roche Diagnostics S.L.)	0,01 g
Solució de Tris-Cl 1 M pH 7.4 (AppliChem)	10 µl
Solució NaCl 5M (AppliChem)	3 µl
- Es barreja fins a la total dissolució i s'escalfa durant 15 min a 100°C, per activar l'enzim.
- Es deixa refredar i es fan alíquotes de 25 µl que es conserven a -20°C. Aquestes alíquotes s'utilitzen resuspeses amb 500 µl de TE.

Tampó TE

- A 97 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Solució d'EDTA 0.5M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)	2 ml
---	------

Solució de Tris-Cl 1 M pH 7,4 (Applichem) 1 ml

- Es barreja i s'esterilitza a l'autoclau (121°C, 15 min).

Solució cloroform/isoamílic

Cloroform (Carlo Erba Reagenti) 480 ml

3-metil-1-butanol (Etanol isoamílic) (Panreac) 20 ml

Fenol bidestil·lat

Per preparar el fenol bidestil·lat, aquest ha d'estar equilibrat a un pH superior a 7,8. S'escalfa el fenol amb la 8-hidroxiquinoleïna fins que es liquï, s'hi afegeix un volum de tampó tris-HCl 0.5 M (pH 8); es deixen separar les dues fases, se n'elimina la fase aquosa superior i es fan rentats afegint-hi un volum de tampó tris-HCl 0,1 M (pH 8) fins a arribar a un pH més elevat de 7.8. Es conserva el fenol amb 0.1 volums de tampó Tris-HCl 0,1 M (pH 8), que contingui 0.2% de β -mercaptoetanol, a 4°C a una ampolla de vidre fosca.

Solució fenol/cloroform/isoamílic

Solució cloroform isoamílic 250 ml

Fenol (Panreac) bidestil·lat 250 ml

Primerament es mesura el fenol, es deixa que se separin dues fases i s'aspira la fase superior, seguidament s'afegeix la solució cloroform isoamílic i es deixa a 37°C durant 12-18 hores perquè s'homogeneïtzi la barreja. Es conserva a 4°C a una ampolla de vidre fosca.

Acetat sòdic 3 M

Acetat sòdic $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$ 40,81 g

- S'arrasa fins a un volum de 100 ml amb aigua ultrapura i s'ajusta el pH a 5,2 amb àcid acètic glacial. Finalment, cal esterilitzar-ho a l'autoclau (121°C 15 min).

Etanol 70%

Etanol absolut (Carlo Erba Reagenti) 70 ml

Aigua destil·lada 30 ml

Proteinasa K

- A 1ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Proteinasa K (Roche)	20 mg
----------------------	-------
- Es barreja fins a la total dissolució. Es reparteix en alíquotes de 50 µl i es conserven a -20°C.

Solució CTAB/NaCl

- A 80 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

NaCl (Panreac)	4,1g
CTAB (hexadecil trimetil bromur d'amoni) (SIGMA)	10g
- Es barreja i si és necessari, s'escalfa a 65°C fins a la seva total dissolució.
- S'arrasa a 100 ml amb aigua ultrapura.
- Es conserva a temperatura ambient.

Solució I

La solució I de treball es prepara a partir d'una solució 2× per dilució a la meitat amb aigua ultrapura.

Per preparar la solució 2×, que es manté a temperatura ambient:

- A 910 ml d'aigua ultrapura, s'hi afegeixen:

Solució de tris-Cl 1 M pH 8 (AppliChem)	50 ml
Solució de EDTA 0.5 M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)	40 ml
- Es barregen els components i s'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Solució II

- A 44 ml d'aigua ultrapura, s'hi afegeixen:

SDS 10% (Merck)	5 ml
NaOH 10 N (40 g/ 100 ml) (Panreac)	1 ml

Solució III

- A 200 ml d'aigua ultrapura, s'hi afegeixen:

Acetat potàssic 5 M (294.4 g/600 ml) (Panreac)	600 ml
Àcid acètic glacial (Panreac)	115 ml
- Es barregen els components i s'ajusta el pH a 4,8.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua ultrapura.

Terra de diatomees

Terra de diatomees (SIGMA)	3,5 g
Hidroclorur de guanidina (SIGMA)	100 g
Solució de tris-Cl 1M a pH 7,4 (Applichem)	8,75 ml
Solució de EDTA 0,5 M a pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)	14 ml

- Cal diluir la terra de diatomees en 50 ml d'aigua ultrapura, i es deixa precipitant durant 3 hores com a mínim. Una vegada la terra de diatomees ha sedimentat completament, se n'elimina el sobrenedant.
- S'afegeixen a 50 ml d'aigua ultrapura, l'hidroclorur de guanidina, la solució d'EDTA i la solució de tris-Cl. Es dissol completament i s'arrasa a un volum final de 175 ml amb aigua ultrapura.
- S'afegeix aquesta solució al sediment de la terra de diatomees i es barreja.
- Es desa el contingut resultant en una ampolla protegida de la llum i a temperatura ambient.
- Abans d'utilitzar la resina s'ha d'agitar vigorosament, a fi que la suspensió sigui el més homogènia possible.

Tampó 50× TAE

- A 750 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Trizma Base (SIGMA)	242 g
Solució de EDTA 0,5 M a pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)	100 ml
Àcid acètic glacial (Panreac)	57 ml

- Es barreja fins a una completa dissolució.
- S'arrasa amb aigua ultrapura fins a un volum final d'1 L.

Solució transportadora 6×

- A 90 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Glicerol (Scahlau)	30 g
Xilencianol (Clontech)	0,25 g
Blau de bromofenol (Panreac)	0,25 g

- Es dissol el glicerol i els colorants.
- Afegir la solució d'EDTA

Solució EDTA 0,5 M a pH 8

(18,6125 g/100 ml) (SIGMA)

2 ml

- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

NaI 6 M (Panreac)

NaI 8,9 g

- S'arrasa a 10 ml amb aigua destil·lada.
- S'agita fins a la total dissolució.

Solució STOP desnaturalitzant.

- S'afegeix a un tub :

Formamida (Roche Diagnostics S. L.) 10 ml

Blau Dextrà 2000 (Pharmacia Biothec) 50 mg

- Es dissol per agitació, es preparen alíquotes i es conserven a -20°C.

Solució del liozím (Roche Diagnostics SL)

- Es prepara la solució de liozím a una concentració de 100 mg/ml en aigua ultrapura lliure d'RNases.

Tampó Ace (10×)

Per preparar 1 ml de tampó Ace (10×) s'afegeixen:

400 µl de tris-Cl 1 M a pH 7,5 (Aplichem)

120 µl de MgCl₂ 500 mM (Merck)

480 µl d'aigua ultrapura lliure d'RNases

IPTG 1M

- A 10 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeix:

IPTG (isopropil β-D-tiogalatopiranòsid) (Roche Diagnostics SL) 2,38 g

- Es barreja fins a aconseguir a una total dissolució i s'esterilitza per filtració.

Tampó de càrrega de proteïnes (Tampó transportador Laemmli 4×)

- Es prepara la barreja següent:

Tampó compressor 4x 25 ml

Glicerol (Scharlau) 20 ml

SDS (Merck) 4 g

Blau de bromofenol (Panreac) 0.2 g

- S'arrasa fins a 50 ml amb aigua ultrapura.
- Es fan alíquotes de 900 µl i es conserven a 4°C.
- En el moment d'utilització, s'afegeixen 36 µl de 2-mercaptoetanol (Merck) i 64 µl de la solució DTT (6,25 M) (9,64 g/10 ml aigua ultrapura) (Roche Diagnostics SL).

Tampó de Sonicació

- A 70 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Solució tris-HCl 1 M pH 7,4 (AppliChem) 5 ml

Glicerol (Scharlau) 5 ml

Solució NaCl 5 M (AppliChem) 2 ml

- Es barregen els components i s'ajusta el pH a 7,5.
- S'arrasa a 100 ml amb aigua ultrapura i s'esterilitza per filtració.
- S'afegeix, en el moment del seu ús, una comprimit *Complete® Mini, protease inhibitor cocktail* (Roche Diagnostics S.L.) per cada 10 ml de solució i DTT a una concentració final 1 mM.

Solució DTT 1 M

1,4 *Dithiothreitol* (Roche Diagnostics S.L.) 0,1543 g

- Es dilueix en 1 ml de aigua ultrapura estèril.

Elution buffer EDTA 100 mM a pH8

- S'afegeix en un Eppendorf:

Elution buffer (Clontech) 800 µl

EDTA 0,5 M a pH8

(18,6125 g/100 ml) (SIGMA) 200 µl

- S'agita per inversió per homogeneïtzar.

Tampó separador 4x

- A 300 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeix:

Tris Base (SIGMA) 91 g

- Es barreja fins que es dissolgui completament i s'ajusta el pH a 8,8 amb HCl 37% (Panreac).

- S'arrasa a 500 ml amb aigua ultrapura.
- S'esterilitza per filtració.
- S'hi afegeixen 2 g de SDS (Merck).
- Es barreja i es conserva a 4°C.

Tampó compressor 4×

- A 40 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeix:

Tris Base (SIGMA)	6.05 g
-------------------	--------
- Es barreja fins que es dissolgui completament i s'ajusta el pH a 6,8 amb HCl 37% (Panreac).
- S'arrasa fins a un volum final de 100 ml amb aigua ultrapura.
- S'esterilitza per filtració.
- S'hi afegeixen 0,4 g d' SDS (Merck).
- Es barreja i es conserva a 4°C.

Tampó d'electroforesi TGS 1×

Es dilueix 1:10 el tampó TGS 10x (tris glicina SDS, pH 8,3 de BIO-RAD) amb aigua ultrapura.

Solució de tinció

- A 180 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

<i>Comassie Brilliant Blue</i> (BIO-RAD)	0,5 g
Àcid acètic glacial (Panreac)	50 ml
Metanol (Panreac)	250 ml
- Es barregen els components i s'arrasa a un volum final de 500 ml amb aigua ultrapura.

Solució àcid acètic glacial 10% (solució per destenyir)

- A 450 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeix:

Àcid acètic glacial (Panreac)	50 ml
-------------------------------	-------
- Es barreja fins a obtenir una solució completament homogènia.

Tampó d'unió

- Cal afegir per 100 ml de tampó els components següents:

Agua ultrapura	30 ml
HEPES 1 M (4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-etan-sulfonàcid 238,3 g/l aigua ultrapura) (Roche Diagnostics SL)	10 ml
Solució tris HCl 1 M pH 7,4 (AppliChem)	10 ml
Glicerol (Scharlau)	25 ml
Solució KCl 1 M (74,56 g/l aigua ultrapura) (Panreac)	25 ml
Solució EDTA 0.5 M pH 8 (18,6125 g/100 ml) (SIGMA)	0.2 ml

- S'ajusta el pH a 7,5 i es conserva a 4°C.
- En el moment en què s'utilitzi, cal afegir per cada 500 µl de tampó els components següents:

DTT 0.5 M (1,4 <i>Dithiothreitol</i> 0,0765g/ml) (Roche Diagnostics SL)	1 µl
BSA (6 mg/ml) (<i>Bovine Serum Albumine</i>) (SIGMA)	4,16 µl

Tampó glicina 5×

- A 500 ml de aigua ultrapura s'hi afegeixen:

Glicina (Roche Diagnostics S.L.)	192.7 g
Tris Base (SIGMA)	30.28 g
EDTA (SIGMA)	3.92 g

- Es dissolen tots els components i s'ajusta a pH 8,5.
- S'arrasa a un volum final d'1 L amb aigua ultrapura.
- La solució de treball és 1 ×.

Tampó 1

- A 1.500 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

NaCl (Panreac)	17,5 g
Àcid malèic (Merk)	23,2 g
NaOH (Panreac)	16,0 g

- Es barreja fins a dissoldre completament i s'ajusta a pH 7,5.
- S'arrasa fins a 2 L amb aigua ultrapura.
- S'esterilitza a l'autoclau (121°C 15 min).

Tampó 2

- A 100 ml de Tampó 1 s'hi afegeix:

Agent bloquejant (llet en pols Nestlé)	1 g
--	-----
- S'ha de dissoldre totalment.

Tampó 3

- A 1.500 ml d'aigua ultrapura s'hi afegeixen:

NaCl (Panreac)	11,68 g
Trizma HCl (SIGMA)	1,60 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Merck)	20 g
Tris-Base (SIGMA)	23,16 g
- S'ha de dissoldre totalment tots els components i ajustar-ho a pH 9,5.
- S'arrasa fins a 2 L amb aigua ultrapura.

Solució colorimètrica

- A 10 ml de tampó 3 s'hi afegeixen:

Solució NBT	45 µl
Solució BCIP (5-brom-4-clor-3-indolfosofat)	35 µl
- Aquesta solució es prepara just al moment d'utilitzar-la, i només la quantitat necessària, ja que és fotosensible.

NBT

- Per preparar 1 ml de solució cal afegir a un tub Eppendorf:

NBT (<i>4-nitroblue tetrazolium chloride crystals</i>) (Roche Diagnostics S.L.)	75 mg
N, N dimetilformamida (Panreac)	700 µl
Aigua ultrapura	300 µl
- Es barreja per agitació al vòrtex i conservar a -20 °C.

BCIP

- Per preparar 1 ml de solució cal afegir a un tub Eppendorf:

BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 4-toluidine salt powder) (Roche Diagnostics S.L.)	50 mg
N, N-dimetilformamida (Panreac)	1 ml

- Barrejar per agitació al vòrtex i conservar a -20 °C.

Tampó d'unió de *footprinting* 5×

- A un volum final de 5 ml s'hi afegeixen:
 - 250 µl de tris 1 M pH 7,4 (Applichem)
 - 500 µl de MgCl₂ 0,5 M (Merck)
 - 250 µl de CaCl₂ 0,1 M (Merck)
 - 1 ml de KCl 2,5 M (Panreac)
- Es filtra la solució i es conserva a 4°C.
- En el moment de fer la barreja de la reacció, cal afegir-hi DTT 1 M (1,4 *dithiothreitol* 0.0765 g/ml) (Roche Diagnostics SL) a 500 µl de tampó a una concentració final de 2 mM.

Tampó de dilució de la DNAsal

- Per un volum final de 25 ml, s'han afegir:
 - 500 µl de tris 1 M pH 7,6 (Applichem)
 - 250 µl de NaCl 5 M (Panreac)
 - 2,5 ml de Glicerol
 - Aigua ultrapura fins a un volum final de 25 ml.
- Cal esterilitzar-ho a l'autoclau (121°C 15 min).
- En el moment de fer les dilucions s'han d'afegir DTT 1 M (1,4 *dithiothreitol* 0,0765 g/ml) (Roche Diagnostics SL) i BSA (*Bovine Serum Albumine*) (SIGMA) a unes concentracions finals d'1 mM i 10 µg/ml, respectivament.

Tampó tris 1 M amb EDTA 40 mM

- Cal afegir a una ampolla de 100 ml:
 - 1 ml de tris 1 M
 - 8 ml de EDTA (0,5 M)
 - 99 ml d'aigua ultrapura
- Es barreja fins a una total dissolució.

3. Resultats i discussió

3.1. Seqüenciació completa i caracterització gènica del genoma del bacteriòfag SE1

3.1.1. Seqüència completa del genoma del bacteriòfag SE1

El genoma del bacteriòfag SE1 es va seqüenciar completament mitjançant les dues tècniques de marcatge descrites a l'apartat 2.5.8.2. Es va seqüenciar amb el kit *fmol[®] DNA Sequencing System* utilitzant com a motlle els plasmidis de la genoteca del fag, prèviament construïda, i amb el kit *Thermo Sequenase[®] Cy5 Dye terminator cycle sequencing System* directament a partir del DNA fàgic.

3.1.1.1. Construcció de la genoteca fàgica

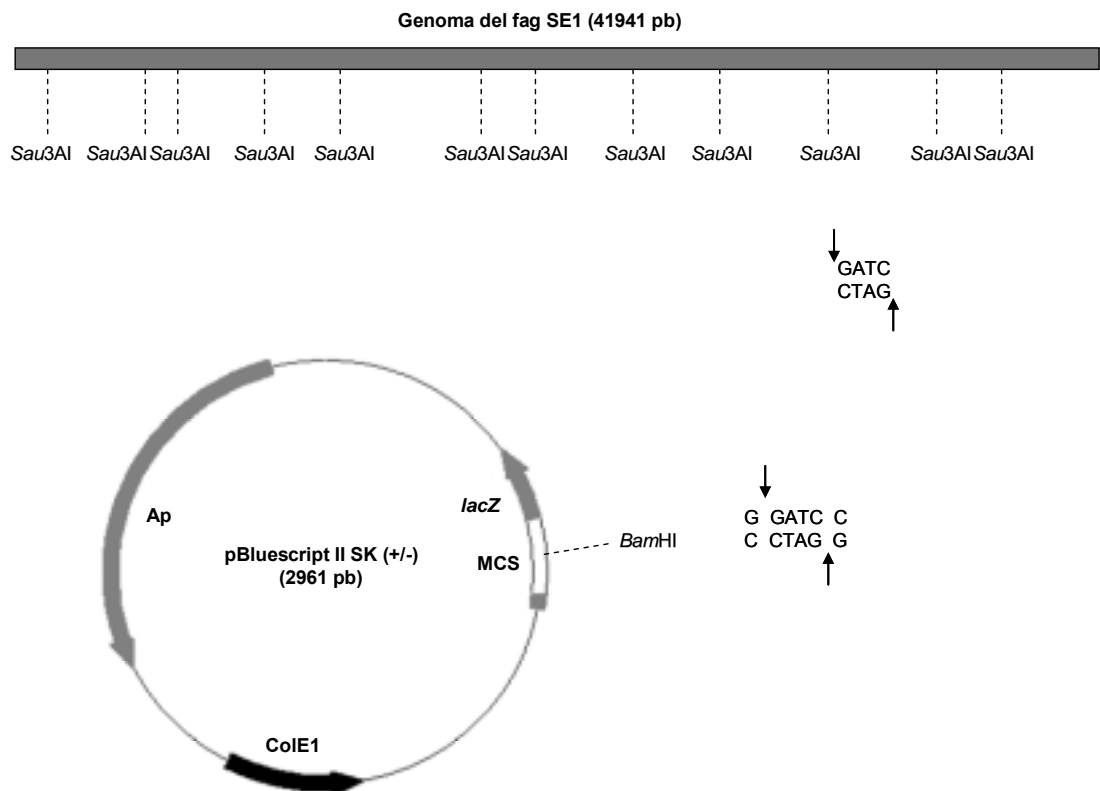


Figura 3.1. Esquema de la construcció de la genoteca del fag SE1. Representació de la restricció parcial del genoma del fag SE1 amb *Sau3A* i la compatibilitat amb la diana *Bam*HI del vector plasmídic pBluescript II SK.

Primerament es va extreure el DNA viral a partir d'un lisat fàgic. El DNA obtingut es va digerir parcialment amb l'enzim *Sau3A*, enzim que reconeix la diana de 4 bases GATC, altament representada al DNA, i es van obtenir fragments de diverses longituds. La restricció es dugué a terme fins a obtenir la majoria de fragments dins d'un interval entre 0,5 i 1 kb. Paral·lelament, es va fer una restricció del vector plasmídic pBluescript-II SK® (taula 2.2) amb l'enzim *BamHI*. Aquest reconeix la diana de 6 bases GGATCC i permet la linearització d'aquest plasmidi; d'aquesta manera s'obtenen extrems cohesius i compatibles als dels fragments del DNA fàgic digerit anteriorment amb l'enzim *Sau3A* (figura 3.1). Finalment, es va lligar el DNA viral al vector plasmídic i es va electrotransformar a la soca DH5α d'*E. coli* per aconseguir la genoteca del fag SE1.

3.1.1.2. Seqüenciació i alineament de les seqüències obtingudes

Es van seqüenciar els fragments de DNA de 235 clons blancs de la genoteca fàgica, prèviament comprovats per PCR amb els oligonucleòtids *direct* i *reverse* (taula 2.3) obtinguts de les electrotransformacions. Se seqüenciaren utilitzant el marcatge amb el kit *fmol*® *DNA Sequencing System*, sense obtenir una cobertura total de la seqüència genòmica viral. Per aquest motiu, al llarg del treball es va posar a punt la seqüenciació directa a partir del DNA fàgic amb el kit de marcatge *Thermo Sequenase Cy5*® *Dye terminator cycle sequencing System*, seqüenciant per *primer walking*. Els oligonucleòtids utilitzats amb aquest kit de seqüenciació es van dissenyar a partir de les seqüències obtingudes de la seqüenciació de la genoteca i de les obtingudes directament del marcatge del DNA fàgic.

Es va seqüenciar el genoma complet en tots dos sentits, utilitzant el marcatge per terminadors, i es van repetir diversos marcatges fins a la total dilucidació i confirmació de totes les indeterminacions nucleotídiques obtingudes en els marcatges.

Les seqüències obtingudes es van alinear utilitzant el programa Seqman II (DNASTAR Inc.) fins a obtenir un únic *contig*, una única seqüència consens del genoma complet del bacteriòfag SE1, amb una cobertura de marcatge mitjana de 3,71.

La seqüència del genoma del bacteriòfag SE1 està formada per 41.941 pb i el seu número d'accés en el GenBank és el DQ003260.

El fag SE1 té un contingut total de GC de 46,99%, lleugerament més baix que el 52%, que presenta el seu hoste *Salmonella enterica* (Lawrence i Ochman, 1997).

3.1.2. Anàlisi de la seqüència genòmica del bacteriòfag SE1

3.1.2.1. Comparació de la seqüència genòmica del fag SE1 amb la base de dades GeneBank

L'anàlisi dels possibles ORF i la seva traducció a seqüències aminoacídiques es van fer utilitzant el programa EdiSeq (DNASTAR Inc.). Les seqüències nucleotídiques dels gens del fag SE1 es van establir després de la cerca dels ORF amb EdiSeq, i la comparació amb la base de dades utilitzant el programa BlastX (NCBI). Les proteïnes obtingudes es van analitzar, per similitud amb les del banc de dades, utilitzant el programa BlastP (NCBI) (taula 3.1).

El genoma del bacteriòfag SE1 està format per 67 Orf. Es va designar *orf1* el gen que per homologia correspon al primer gen caracteritzat en el bacteriòfag P22 (Vander Byl i Kropinski, 2000).

La seqüència que s'obtingué del marcatge de l'esquerra del gen *orf1* correspon a la seqüència provinent del marcatge de la dreta del gen *orf67*; aquest fet mostraria la redundància terminal dels extrems del genoma del fag SE1, característic dels fags similars al P22.

El genoma del bacteriòfag SE1 és dsDNA i els seus gens es distribueixen en les dues cadenes. S'ha anomenat cadena directa o (+) la qual correspon a la seqüència anotada a la base de dades del GenBank i reversa o (-), la cadena complementària.

Es va fer una cerca dels possibles tRNA amb el programa tRNAscan-SE (Lowe i Eddy, 1997), però no es va trobar cap seqüència corresponent a tRNA en tota la seqüència del bacteriòfag SE1.

Taula 3.1. Caracterització dels orfs i proteïnes del bacteriòfag SE1.

Gen	Producte gènic ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf1</i>	GtrC	-	1457	387	356	Conversió lisogènica de l'antigen O. Glucosil transferasa	AAL15475; GtrC [Bacteriòfag ST64T]	e ⁻¹⁷⁰
<i>orf2</i>	GtrB	-	2424	1447	325	Conversió lisogènica de l'antigen O. Bactoprenol glucosil transferasa	AAL15476.1; GtrB [Bacteriòfag ST64T]	0.0
<i>orf3</i>	GtrA	-	2738	2376	120	Conversió lisogènica de l'antigen O. Translosasa: Glucosil undecaprenil fosfat flipasa	DAA00984.1; GtrA [Enterobacteriòfag P22]	3e ⁻⁵²
<i>orf4</i>	Int	-	4250	3087	387	Integrasa	BAD15167; Int [Bacteriòfag ST104]	0.0
<i>orf5</i>	Xis	-	4477	4127	116	Escissionasa	BAD15168.1; Xis [Bacteriòfag ST104]	6e ⁻⁶¹
<i>orf6</i>		-	5216	4689	175	Desconeguda	AK28853.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag HK620]	e ⁻⁶³
<i>orf7</i>		-	5409	5218	63	Desconeguda	AK28854.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag HK620]	3e ⁻²⁷
<i>orf8</i>		-	5638	5411	75	Desconeguda	CAB38709.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag H19]	e ⁻³⁵
<i>orf9</i>		+	5424	5777	117	Desconeguda	CAB38708.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag H19]	7e ⁻³⁷
<i>orf10</i>		-	6249	5866	127	Desconeguda	AAK28855.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag HK620]	2e ⁻⁴⁸
<i>orf11</i>		-	6887	6246	213	Desconeguda	AAK28856.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag HK620]	6e ⁻²¹
<i>orf12</i>		-	7054	6884	56	Desconeguda	BAD15173.1; ORF10 [Bacteriòfag ST104]	6e ⁻²⁶

Taula 3.1. Continuació.

Gen	Producte gènic ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf13</i>	Abc2	-	7358	7065	97	Anti-RecBCD	BAD15174.1; Abc2 [Bacteriòfag ST104]	4e ⁻⁵⁰
<i>orf14</i>	Abc1	-	7689	7405	94	Anti-RecBCD	BAD15175.1; Abc1 [Bacteriòfag ST104]	8e ⁻⁴⁷
<i>orf15</i>	Erf	-	8396	7689	235	Proteïna de recombinació	BAD15176.1; ORF13 [Bacteriòfag ST104]	e ⁻¹³⁸
<i>orf16</i>	Arf	-	8536	8393	47	Proteïna de recombinació estimulada per Erf	DAA01012.1; Arf [Enterobacteriòfag P22]	9e ⁻¹⁹
<i>orf17</i>	kil	-	8714	8526	62	Inhibidor de la formació del septel·lular	BAD15177.1; Kil [Bacteriòfag ST104]	5e ⁻³⁰
<i>orf18</i>	cIII	-	8847	8695	50	Proteïna reguladora	AAK28863.1; cIII [Bacteriòfag HK620]	3e ⁻¹⁵
<i>orf19</i>		-	9455	9171	94	Desconeguda	BAD15180.1; ORF18 [Bacteriòfag ST104]	8e ⁻⁰⁴
<i>orf20</i>	Ral	-	9686	9492	64	Proteïna d'antirestricció	DAA01018.1; Ral [Enterobacteriòfag P22]	5e ⁻³¹
<i>orf21</i>	SieB	+	9900	10487	195	Proteïna d'exclusió de la sobreinfecció	DAA01019.1; SieB [Enterobacteriòfag P22]	5e ⁻⁹¹
<i>orf22</i>	24	-	10802	10500	100	Proteïna antiterminadora	BAD15184.1; 24 [Bacteriòfag ST104]	5e ⁻⁴⁹
<i>orf23</i>		-	12487	11414	353	Desconeguda	AAQ94677; Possible proteïna reguladora [<i>Pseudomonas</i> fag Pf1]	2e ⁻³¹
<i>orf24</i>		-	12967	12626	113	Desconeguda	AAD25429.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag 933W]	5e ⁻⁵⁴
<i>orf25</i>	cI	-	13723	13034	229	Proteïna repressora	BAD15186.1; CI [Bacteriòfag ST104]	e ⁻¹²⁶

Taula 3.1. Continuació.

Gen	Producte gènic ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf26</i>	Cro	+	13834	14049	71	Proteïna antirepressora	BAD15187.1; Cro [Bacteriòfag ST104]	3e ⁻³³
<i>orf27</i>	cII	+	14160	14441	93	Activador transcripcional	AAL15499.1; C1 [Bacteriòfag ST64T]	6e ⁻⁴⁵
<i>orf28</i>		+	14476	14622	48	Desconeguda	DAA01024.1 Proteïna hipotètica [Enterobacteriòfag P22]	2e ⁻²⁰
<i>orf29</i>	Gp18	+	14615	15514	299	Proteïna de replicació. Primasa	AAL15500.1; gp18 [Bacteriòfag ST64T]	e ⁻¹⁶²
<i>orf30</i>	Gp12	+	15504	16940	478	Proteïna de replicació. Helicasa	BAA84310.1; similar a la proteïna P del bacteriòfag HK022 [Bacteriòfag VT2-Sa]	0.0
<i>orf31</i>	NinA	+	16940	17017	25	Desconeguda	CAB39286.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag 933W]	0.003
<i>orf32</i>		+	17211	17501	96	Desconeguda	AAL15504.1; Orf-86 [Bacteriòfag ST64T]	7e ⁻⁰⁹
<i>orf33</i>		+	17504	17800	98	Desconeguda	AAL15505.1; Orf-98 [Bacteriòfag ST64T]	7e ⁻⁴⁸
<i>orf34</i>	NinB	+	17898	18203	101	Desconeguda	AAL15506.1; NinB [Bacteriòfag ST64T]	8e ⁻⁵²
<i>orf35</i>	NinD	+	18200	18373	57	Desconeguda	DAA01029.1; NinD [Enterobacteriòfag P22]	4e ⁻³²
<i>orf36</i>	NinE	+	18340	18516	58	Desconeguda	AAL15508.1; NinE [Bacteriòfag ST64T]	2e ⁻²⁸
<i>orf37</i>	NinX	+	18513	18860	115	Desconeguda	AAL15509.1; NinX [Bacteriòfag ST64T]	5e ⁻⁶⁵
<i>orf38</i>	NinF	+	18853	19029	58	Desconeguda	DAA01032.1; NinF [Enterobacteriòfag P22]	e ⁻²⁶

Taula 3.1. Continuació.

Gen	Producte gènica ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf39</i>	NinG	+	19022	19627	201	Desconeguda	AAD25442.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag 933W]	5e ⁻⁹⁸
<i>orf40</i>	NinY	+	19624	19848	74	Desconeguda	BAD15199.1; NinY [Bacteriòfag ST104]	7e ⁻³⁸
<i>orf41</i>	NinH	+	19845	20048	67	Desconeguda	BAD15200.1; NinH [Bacteriòfag ST104]	2e ⁻³³
<i>orf42</i>	NinZ	+	20029	20208	59	Desconeguda	BAD15201.1; NinZ [Bacteriòfag ST104]	2e ⁻²⁶
<i>orf43</i>	23	+	20205	20978	257	Proteïna antiterminadora	BAD15202.1; 23 [Bacteriòfag ST104]	e ⁻¹⁴⁶
<i>orf44</i>	Gp13	+	21409	21612	67	Holina	CAA09709.1; gp13 [Bacteriòfag PS119]	4e ⁻³⁴
<i>orf45</i>	Gp19	+	21584	22087	167	Endolisina	CAA09710.1; gp19 [Bacteriòfag PS119]	5e ⁻⁸⁷
<i>orf46</i>	Gp15	+	22084	22551	155	Endopeptidasa	CAA09711.1; gp15 [Bacteriòfag PS119]	5e ⁻⁷⁶
<i>orf47</i>		+	22764	23294	176	Desconeguda	BAD15207.1; ORF45 [Bacteriòfag ST104 de <i>Salmonella typhimurium</i>]	7e ⁻⁹⁵
<i>orf48</i>		+	23403	23759	118	Desconeguda	AAL15520.1; Orf-118 [Bacteriòfag ST64T de <i>Salmonella typhimurium</i>]	2e ⁻⁴⁸
<i>orf49</i>		+	23763	24152	129	Desconeguda	AAL15521.1; Orf-129 [Bacteriòfag ST64T]	5e ⁻⁷⁵
<i>orf50</i>		+	24152	24556	134	Desconeguda	AAL15522.1; Orf-134 [Bacteriòfag ST64T]	6e ⁻⁷¹

Taula 3.1. Continuació.

Gen	Producte gènic ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf51</i>	Gp3	+	24560	25048	162	Subunitat petita del complex terminasa d'empaquetament del DNA. Reconeixement del lloc <i>pac</i>	BAD15211.1; Gp3 [Bacteriòfag ST104]	2e ⁻⁸³
<i>orf52</i>	Gp2	+	25026	26525	499	Subunitat gran del complex terminasa d'empaquetament del DNA	BAD15212.1; Gp2 [Bacteriòfag ST104]	0.0
<i>orf53</i>	Gp1	+	26525	28702	725	Proteïna portal	AAL15525.1; 1 [Bacteriòfag ST64T]	0.0
<i>orf54</i>	Gp8	+	28716	29627	303	Proteïna cadafal	DAA00986.1; Proteïna cadafal [Bacteriòfag P22]	e ⁻¹⁵⁸
<i>orf55</i>	Gp5	+	29627	30919	430	Proteïna de la carcassa de la càpside	AAL15527.1; 5 [Bacteriòfag ST64T]	0.0
<i>orf56</i>		+	30957	31517	186	Desconeguda	BAD15216.1; ORF54 [Bacteriòfag ST104]	2e ⁻⁹⁶
<i>orf57</i>	Gp4	+	31501	32001	166	Proteïna estabilitzadora del DNA en l'empaquetament	BAD15217.1; Gp4 [Bacteriòfag ST104]	e ⁻⁹⁰
<i>orf58</i>	Gp10	+	31961	33379	472	Proteïna estabilitzadora del DNA en l'empaquetament	AAL15530.1; 10 [Bacteriòfag ST64T]	0.0
<i>orf59</i>	Gp26	+	33383	34084	233	Proteïna estabilitzadora en l'empaquetament del DNA	BAD15220.1; 26 [Bacteriòfag ST104]	e ⁻¹⁰⁶
<i>orf60</i>	Gp14	+	34084	34539	151	Proteïna d'ensamblatge de la càpside	AAL15532.1; 14 [Bacteriòfag ST64T]	5e ⁻⁸⁵
<i>orf61</i>	Gp7	+	34542	35231	229	Proteïna d'injecció del DNA	DAA00993.1; injection protein [Bacteriòfag P22]	6e ⁻⁶⁵

Taula 3.1. Continuació.

Gen	Producte gènic ^a	Direcció ^b	Posició d'inici ^c	Posició final ^c	Longitud de la proteïna (aa)	Funció de la proteïna ^d	Seqüències amb més similitud ^e	Valor e ^f
<i>orf62</i>	Gp20	+	35242	36546	434	Proteïna d'injecció del DNA	AAQ12202.1; Proteïna 12 [Enterobacteriòfag Sf6]	e ⁻¹⁵³
<i>orf63</i>	Gp16	+	36546	38462	638	Proteïna d'injecció del DNA	AAF75055.1; Proteïna de transferència de DNA Gp16 [Enterobacteriòfag P22]	0.0
<i>orf64</i>		+	38836	39201	121	Desconeguda	AAK28904.1; Proteïna hipotètica [Bacteriòfag HK620]	4e ⁻⁶⁶
<i>orf65</i>		-	39394	39215	59	Desconeguda	DAA00997.1; Proteïna hipotètica [Enterobacteriòfag P22]	8e ⁻²⁹
<i>orf66</i>	Mnt	-	39745	39494	83	Repressor transcripcional. Manteniment de la lisogènia	DAA00998.1; Mnt [EnterobacteriòfagP22]	4e ⁻³⁰
<i>orf67</i>	Gp9	+	39881	41883	667	Proteïna de la cua. Endorhamnosidasa	BAD15227.1; 9 [Bacteriòfag ST104]	0.0

^a Estan anotats els productes gènics amb els quals es va trobar homologia i se'n coneix la possible funció.

^b La cadena codificant dels gens és anotada com a (+) si correspon a la seqüència dipositada al GenBank (5'-3') o bé com a (-) si correspon a la cadena complementària.

^c Coordenades de l'inici i final dels codons de traducció, respectivament.

^d Funció de la proteïna inferida per similitud.

^e Número d'accés i nom de la seqüència del bacteriòfag amb major similitud en les recerques amb el programa BlastX.

^f Valor de similitud entre el gen del bacteriòfag SE1 i la seqüència més semblant donada pel programa BlastX.

La seqüència nucleotídica i les seqüències aminoacídiques del bacteriòfag SE1 són similars a la d'altres fags lambdoides. Per aquesta similitud i ja que comparteix un important grup de gens amb ells (Clark *et al.*, 2001), considerem que el fag SE1 pertany al grup dels fags lambdoides.

3.1.2.2. Possibles terminadors de transcripció en el genoma del fag SE1

Les seqüències nucleotídiques primàries dels terminadors són generalment semblants en els genomes de procariotes i bacteriofàgs. També ho són les seves estructures secundàries característiques de *stem-loops*, formades generalment per un *stem* de 5 a 8 nucleòtids de longitud ric en GC, 4 bases de *loop* i, finalment, seguida per diverses bases de timina, que a vegades es troben interrompudes per 1 o 2 bases que sovint són adenines. La forta conservació d'aquestes estructures, incloent-hi la seva localització intergènica, indica que els terminadors transcripcionals es troben sota una selecció positiva en tota evolució genòmica.

Per detectar els possibles terminadors transcripcionals del genoma del bacteriòfag SE1 (taula 3.2) es va utilitzar el programa TransTerm (Ermolaeva *et al.*, 2000), es va detectar la presència de 14 terminadors. Els cinc primers correspondrien als terminadors t_L que serien suprimits pel producte gènic antiterminador 24 en la transcripció durant el cicle lític. El sisè formaria part del transcrit que codifica el producte gènic SieB. El setè es troba adjacent al gen *orf23*. Els quatre terminadors següents correspondrien als terminadors t_R que serien suprimits pel producte gènic antiterminador 23 en el cicle lític. I, finalment, els tres últims terminadors se situen entre els gens responsables de la morfogènesi del cap de la càpside i el de la cua.

Taula 3.2. Terminadors Rho independents inferits en el genoma del fag SE1.

Gen 5' ^a	Gen 3' ^b	Cadena ^c	Inici ^d	Final ^e	Seqüència ^f
<i>orf5</i>	<i>orf6</i>	-	4468	4436	CACAGCCTCACA <u>CTCGATGAGGCCTGT</u> GCATTT
<i>orf5</i>	<i>orf6</i>	-	4684	4661	CCTCGCACTCGCGGGGATTTTTTT
<i>orf14</i>	<i>orf15</i>	-	7670	7647	CTCCAGCTGAGATGGAGTCAGTTT
<i>orf18</i>	<i>orf19</i>	-	8936	8910	GCCGCTCTCAGTCAGGGCGGCTTTTTT
<i>orf20</i>	<i>orf21</i>	-	9684	9645	GACTACGACTATTGATACAAATCAATG GTGTAGTCGTTTT
<i>orf21</i>	<i>orf22</i>	+	10735	10757	CGCCGCTCATGACGGCGAGTTTT
<i>orf22</i>	<i>orf23</i>	-	11403	11383	GCCCGGCCACCGAGGCGTTTT
<i>orf30</i>	<i>orf31</i>	+	16969	16996	AGGCCIGCTGGTAATCGCAGGCCTTTTT
<i>orf43</i>	<i>orf44</i>	+	21082	21107	GGCCCTGCAATGATGCGGGGCTTTTT
<i>orf43</i>	<i>orf44</i>	+	21170	21205	CCCTTGCTCATTCTGTGGCGACTGGGTAG GGCGTTTT
<i>orf43</i>	<i>orf44</i>	+	21251	21286	GGGCAAGAGGTTGCGCTAACAACTCC TGCCGTTTT
<i>orf63</i>	<i>orf64</i>	+	38515	38536	TCCTGATGTTTCAGGAGATTTT
<i>orf65</i>	<i>orf66</i>	+	39487	39500	CCCACCGTCAGGIGGTTTTTTTT
<i>orf66</i>	<i>orf67</i>	+	39678	39693	CGCTGTTTCAGCTTTTT

^a Gen que limita amb el terminador a l'extrem 5' de la seqüència anotada.

^b Gen que limita amb el terminador a l'extrem 3' de la seqüència anotada.

^c Cadena on es troba la seqüència del terminador respecte de la seqüència dipositada al GenBank (5'-3').

^d Posició del punt d'inici de la seqüència del terminador.

^e Posició del punt final de la seqüència del terminador.

^f Seqüència del terminador *stem-loop-stem-poly(U)*.

3.1.2.3. Control traduccional: *Ribosome Binding Sites (RBS)*

L'adjudicació dels possibles llocs d'inici dels gens va ser clara en la major part dels ORF del fag SE1, gràcies a la presència del codó d'inici de traducció ATG, present en tots els gens, excepte en dos casos, en l'*orf1* i l'*orf52*, on el codó d'inici és el GTG. Els codons STOP més utilitzats són el TAA i el TGA amb un ús d'un 55,22% i un 44,77%, respectivament.

Es va utilitzar el programa TransTerm (Ermolaeva *et al.*, 2000) per detectar els millors RBS (*Ribosome Binding Site*) del genoma del bacteriòfag SE1. L'alineament d'aquests RBS en el Weblogo (Crooks *et al.*, 2004) va permetre la representació dels RBS del fag SE1 (figura 3.2).

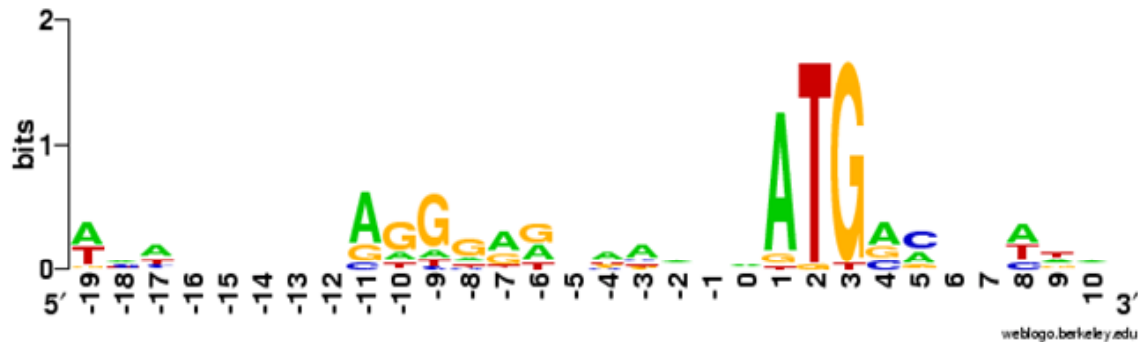


Figura 3.2. Logo dels RBS del fag SE1 respecte del codó d'inici dels gens.

La distància en bases entre la seqüència de l'RBS i el codó ATG és variable en els diferents gens, només conserven clarament dues posicions: la A i la G (figura 3.2). Aquesta variabilitat en la distància indica una diferència en les eficiències de traducció dels diferents gens del bacteriòfag SE1.

3.1.2.4. Ús de codó

La comparació de l'ús de codó dels ORF del fag SE1 i del seu hoste es mostra a la taula 3.3. Les dades de l'ús de codó de l'hoste i del fag SE1 van ser elaborades utilitzant el programa *countcodon output* de la pàgina web: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>.

Comparant el percentatge de GC en els triplets pel que fa a les posicions d'aquests nucleòtids (taules 3.3 i 3.4), es va observar que hi ha una disminució del percentatge de GC en totes tres posicions del triplet. Això no obstant, la que es veu més afectada per aquesta disminució és la tercera posició. Aquesta dada seria una de les explicacions per les quals el fag SE1 té un percentatge de GC lleugerament inferior al del seu hoste.

Taula 3.3. Ús de codó del fag SE1 i el seu hoste^a.

	U		C		A		G		
U	Phe	17,9 21,5	Ser	11,2 8,4	Tyr	16,6 16,4	Cys	4,8 4,7	U
	Phe	18,6 15,3	Ser	7,2 10,7	Tyr	15,5 11,7	Cys	8,5 6,2	C
	Leu	12,4 13,2	Ser	16,8 8,0	Stop	2,8 1,8	Stop	1,9 1,2	A
	Leu	9,6 12,1	Ser	6,5 9,5	Stop	0,6 0,3	Trp	15,9 14,3	G
C	Leu	17,6 12,2	Pro	10,6 8,0	His	9,8 12,1	Arg	12,1 18,1	U
	Leu	8,7 11,0	Pro	3,1 7,2	His	7,7 9,4	Arg	17 21,2	C
	Leu	7,6 4,7	Pro	13,9 6,6	Gln	15,3 12,6	Arg	8,3 4,3	A
	Leu	22,5 49,3	Pro	11,8 22,6	Gln	29,5 30,5	Arg	4,9 7,9	G
A	Ile	26,6 27,4	Thr	13,5 8,2	Asn	23,1 19,1	Ser	7,6 8,6	U
	Ile	22,7 24,0	Thr	15,1 23,6	Asn	24,7 21,1	Ser	14,7 17,8	C
	Ile	12,1 6,7	Thr	14,3 8,1	Lys	33,6 32,4	Arg	10,1 3,4	A
	Met	28,4 26,0	Thr	10,8 18,5	Lys	27,7 12,8	Arg	6,3 2,5	G
G	Val	22,5 16,4	Ala	26,8 14,6	Asp	34,0 32,6	Gly	21,0 18,0	U
	Val	10,5 17,8	Ala	18,3 27,9	Asp	25,2 21,7	Gly	20,6 32,5	C
	Val	14,7 11,7	Ala	29,1 15,0	Glu	37,3 35,8	Gly	16,1 9,3	A
	Val	11,1 24,2	Ala	17,4 36,4	Glu	25,7 21,2	Gly	11,0 11,8	G

La columna de l'esquerra conté el primer nucleòtid dels codons. El segon nucleòtid es troba a la fila de dalt i el tercer està llistat a la columna de la dreta. Els nombres representen la freqüència per 10^{-3} de cada codó, en negreta per als del fag SE1 i en cursiva per als de *S. typhimurium*. Es troben marcats aquells valors on la disminució de la freqüència de codó és més acusada.

Taula 3.4. Percentatge de GC respecte de les posicions en els codons.

Posició del triplet	% GC Fag SE1	% GC <i>S. typhimurium</i>
1era	54,17	58,47
2ona	40,72	41,49
3era	47,78	57,91

Per tant, la probabilitat que una proteïna contingui els aminoàcids codificats predominantment per triplets rics en GC (Arg, Ala, Gly i Pro) és més baixa respecte de la resta d'aminoàcids, en el bacteriòfag SE1 que en el seu hoste.

3.1.2.5. Organització gènica. Evidència modular

El bacteriòfag SE1 comparteix el mateix ordre i la mateixa organització de les funcions genètiques que els genomes d'altres fags lambdoides, com el lambda i el P22.

El genoma del fag SE1 s'organitza en set mòduls funcionals, formats per diferents gens propers físicament i relacionats amb una funció concreta (figura 3.3).

Es va adoptar el nom dels gens amb funció coneguda del fag P22 pel fag SE1, i es van descriure ordenadament els diferents gens, mòduls i regions gèniques que formen el genoma del fag SE1, segons les seves posicions dins del genoma començant pel principi de la seqüència anotada.

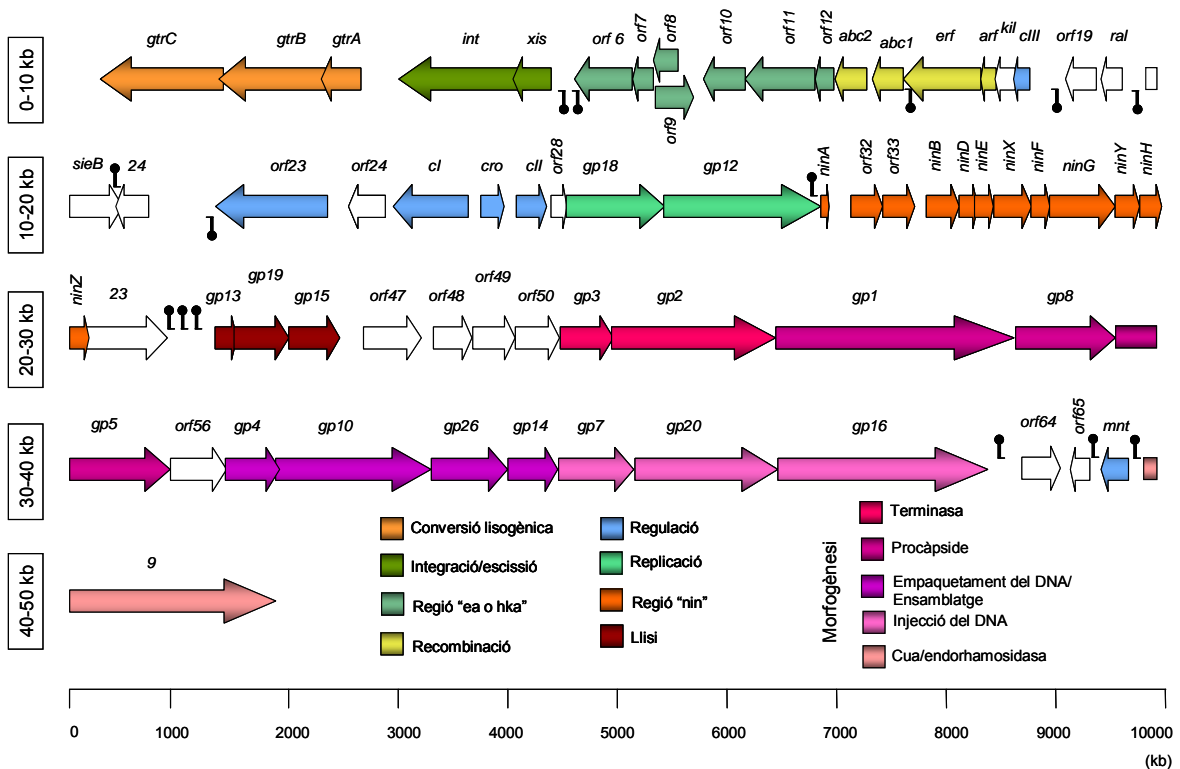


Figura 3.3. Organització gènica i modular del genoma del bacteriòfag SE1. S'ha adoptat el nom dels gens del fag P22 per als gens amb funció coneguda.

L'organització gènica des dels gens de conversió lisogènica fins al gen que codifica l'endorhamosidasa és la següent:

- **Mòdul de conversió lisogènica.** La lisogenització d'una cèl·lula pel fag SE1 fa que hi hagi una transferència d'un residu glicosil al lipopolisacàrid de la paret

de *Salmonella*. D'aquesta manera es permet així, la conversió de l'antigen O i, com a resultat d'això, hi ha un canvi de serotip de l'hoste evitant la unió d'altres fags d'aquest hoste que reconeguin el mateix receptor cel·lular. Aquest fenomen és conegut com a **seroconversió lisogènica**. Els gens encarregats d'aquesta conversió en una infecció per SE1 són els gens *gtrC*, *gtrB* i *gtrA*, molt similars a d'altres fags de *S. typhimurium* com ara P22, ST64T i ST104 (>85% d'homologia). Caldria destacar que el gen *gtrC* del fag SE1 és més curt que el dels altres, sent la regió C-terminal diferent.

- **Mòdul d'integració/escissió.** La integració i l'escissió del fag SE1 tindria lloc mitjançant dues proteïnes: la integrasa (Int) i l'escissionasa (Xis). En aquest estudi s'observà que ambdues proteïnes són molt semblants a les del P22, ST64T i ST104 (>95% d'homologia).
- **Regió "ea" o "hka".** Aquesta regió conté una sèrie de proteïnes hipotètiques amb funció desconeguda que s'assemblen a les de la regió designada com a "ea" en el fag P22 i com a "hka" en el bacteriòfag HK620 (bacteriòfag que infecta *E. coli*). Aquesta regió és altament variable en els fags lambdoides, no es troba present en el bacteriòfag HK97 que infecta *E. coli*, però en altres fags com el P22, 933W (fag que infecta *E. coli*) i HK620 és extensa. En aquesta regió s'acumulen diversos gens implicats en patogènia o en l'aportació d'avantatges selectives per a alguns dels seus hostes (Clark *et al.*, 2001). A causa de la semblança del producte gènic de l'*orf10* del fag SE1 a un orf d'un clon portador de l'enterohemolisina (Beutin *et al.*, 1993), podria ser que aquesta regió també aportés algun benefici a l'hoste del fag SE1. Aquesta regió del fag SE1, a diferència dels fags lambdoides descrits anteriorment, presenta dues proteïnes hipotètiques codificades pels gens *orf8* i *orf9* (situats en la mateixa posició però en sentit invers) que tenen una certa homologia (38 i 67%, respectivament) amb dues proteïnes de funció desconeguda del bacteriòfag H19J, que infecta la soca *E. coli* 0:26H, anomenada *E. coli* H19, la qual és verotoxigènica ja que aquest fag codifica la verotoxina 1 i l'enterohemolisina 2 (Beutin *et al.*, 1990).
- **Mòdul de recombinació.** Aquest mòdul presenta més del 91% d'homologia amb el dels fags ST64T i P22. S'hi agrupen els gens *abc2*, *abc1* (tots dos tenen la funció anti-RecBCD), *erf* i *arf*, els productes dels quals estan relacionats amb la recombinació i la recircularització del DNA de doble cadena quan aquest entra a la cèl·lula hoste.

- El gen ***kil*** del fag SE1 codifica la proteïna Kil, molt similar a la del fag ST64T i P22 (>95% d'homologia), vinculada amb la inhibició de la formació del sept de la cèl·lula hoste.
- El gen ***cIII*** codifica la proteïna cIII, forma part dels gens de regulació de l'expressió gènica, intervé en la decisió entre lisi i lisogènia i s'encarrega d'estabilitzar la proteïna cII. La proteïna cIII del fag SE1 és similar a la proteïna cIII del fag HK620 (73% d'homologia).
- El gen ***ral*** codifica una proteïna que evita la restricció del DNA fàgic quan aquest entra a la cèl·lula. Aquesta proteïna és idèntica a la del fag ST104 o del fag P22.
- El producte del gen ***sieB***, molt semblant a la del fag P22 (84% d'homologia), evita la infecció per altres fags heteroimmunes.
- El gen ***24***, del qual resulta la proteïna antiterminadora 24, gairebé idèntica a la proteïna 24 del fag P22 (97% d'homologia), permet que l'RNA polimerasa continuï transcrivint sense tenir en compte els terminadors específics, fent així més llargs els transcrits des del promotor P_L i P_R .
- **Mòdul de regulació gènica.** Entre la proteïna antiterminadora 24 i el repressor del fag SE1 hi ha dos gens amb funció desconeguda, els *orf23* i *orf24*. L'Orf 23 és similar (57%) a una proteïna anomenada CII del retrofag phi-R73 (profag críptic d'*E. coli* (Inouye *et al.*, 1991), i a una proteïna reguladora del fag Pf1 (que infecta *Pseudomonas putida* (Liu i Day, 1994)) que, a més, té una homologia del 42% amb una família d'ATPases relacionades amb la partició del cromosoma bacterià. L'altre gen, l'*orf24*, s'assembla, amb més d'un 85% d'homologia, a una proteïna hipotètica del fag 933W de funció desconeguda. El mòdul de regulació del fag SE1 conté diversos gens: *cI*, *cro*, *cII*, *cIII* i *mnt*. Els dos darrers es troben en dues posicions llunyanes respecte dels altres gens d'aquest mòdul de regulació. El gen *cI* codifica el regulador genètic cI, aquest és idèntic al del fag ST104 i presenta similitud amb el repressor CI del bacteriòfag HK022 (fag d'*E. coli*) i caldria destacar que és diferent al dels fags P22 i ST64T (per això no s'ha mantingut en aquest cas la nomenclatura del P22 per descriure'l). El gen *cro* es troba en sentit invers al gen *cI* i, igual que aquest, és idèntic al del fag ST104 i s'assembla a la proteïna Cro del bacteriòfag HK022; també és diferent al dels fags P22 i ST64T. Aquestes dues proteïnes formen part del regulador o interruptor genètic. El gen *cII* codifica la proteïna activadora cII, responsable de

la decisió entre lisi i lisogènia, que indueix el promotor d'establiment, activant així, la producció de la proteïna repressora cI.

- L'**orf28** és idèntic al gen del P22 que codifica una proteïna amb funció desconeguda i es troben en la mateixa posició dins del genoma.
- **Mòdul de replicació.** Durant la fase lítica, per dur a terme la replicació del genoma víric són necessàries diverses proteïnes de l'hoste i dues proteïnes del fag. Els dos gens fàgics que constitueixen el mòdul de replicació són: el gen *gp18*, d'elevada homologia amb la primasa del fag ST64T (93%) i similar a la proteïna O del bacteriòfag HK022; i el gen *gp12*, que codifica una helicasa, molt semblant a les proteïnes P del fag HK022 (94% d'homologia).
- **Regió "nin".** Aquesta regió del fag lambda conté 10 gens de funció desconeguda, els quals poden ser eliminats sense produir cap efecte important en el creixement del fag en el laboratori (Sharples *et al.*, 1998). Però, tot i així, es troben sota una clara selecció positiva, ja que es conserven tant els gens com la seqüència aminoacídica d'un fag a un altre. Dels aproximadament 30-50 gens *nin* descrits en el *pool* de gens dels fags lambdoides, cada fag n'escull aproximadament uns 10. Sembla, doncs, que la funció d'aquests podria ser l'adaptació de cada fag al seu nínxol ecològic particular (Juhala *et al.*, 2000). El bacteriòfag SE1 conté 12 gens en aquesta regió amb elevada homologia amb els fags 933W, ST64T, P22 i ST104.
- El gen **23** codifica la proteïna antiterminadora 23. Aquesta regula l'expressió dels gens tardans, que codifiquen les proteïnes estructurals necessàries per construir el bacteriòfag i per lisar la cèl·lula. La proteïna 23 del fag SE1 és idèntica a la del fag ST104.
- **Mòdul de lisi.** Aquest conté els tres gens encarregats de lisar la cèl·lula una vegada s'han format els virions. Els gens *gp13* (holina), *gp19* (endolisina) i *gp15* (proteïna controladora de la lisi), tenen una elevada homologia (>92%) amb els seus homòlegs del bacteriòfag PS119 (bacteriòfag de *S. typhimurium*).
- Entre el mòdul de lisi i el de morfogènesi hi ha una zona que conté quatre gens amb funció desconeguda altament similars als gens dels bacteriòfags ST64T i ST104.
- **Mòdul de morfogènesi.** Aquest mòdul, encarregat de la formació de les partícules víriques, se subdivideix alhora en cinc mòduls diferents. Els quatre

primers s'encarreguen de la formació del "cap" i l'últim de la formació de la "cua" del bacteriòfag SE1.

❖ **Mòdul de la terminasa.** Aquest conté els gens *gp2* i *gp3* que codifiquen les subunitats petita i gran, respectivament, de la terminasa, encarregada d'empaquetar el DNA fàgic. Les seqüències aminoacídiques de la proteïna Gp3 del fag SE1 i les del fag P22 són idèntiques, i segurament també denoten la similitud de les seqüències d'inici d'empaquetament reconegudes específicament per les terminases (Casjens *et al.*, 1992b) (Wu *et al.*, 2002).

❖ **Mòdul de la procàpside.** Aquest conté els gens relacionats amb la formació d'aquesta estructura. El gen *gp1* codifica la proteïna portal, el gen *gp8* codifica la proteïna cadafal de la procàpside i el gen *gp5* codifica la proteïna que forma la carcassa de la càpside madura.

❖ **Mòdul d'empaquetament del DNA/ensamblatge.** Format pels gens *gp4*, *gp10* i *gp26*, que codifiquen les proteïnes que estableixen el DNA viral i el gen *gp14* que permet l'ensamblatge del "cap" de la partícula viral.

Aquests tres mòduls tenen una homologia de més del 87% amb els dels bacteriòfags ST104 i ST64T.

❖ **Mòdul d'injecció del DNA.** Conté els gens que codifiquen les proteïnes d'injecció del DNA víric a la cèl·lula hoste (*gp7*, *gp16* i *gp20*) que són homòlegs a la proteïna d'injecció del DNA del fag P22 i del fag Sf6 (bacteriòfag de *S. flexneri*) amb més d'un 65% d'homologia.

- Entre els mòduls encarregats de la morfogènesi del "cap" i els de la "cua" hi ha tres gens. El primer, l'***orf64***, és gairebé idèntic a un gen del bacteriòfag HK620 que codifica per proteïna de funció desconeguda. El segon, l'***orf65***, és idèntic a un hipotètic gen que hi ha entre els gens *sieA* i *mnt* del P22. Tenint en compte que el fag SE1 no presenta *sieA*, la presència d'aquesta regió intergènica podria ser l'empremta de la presència d'aquest gen en un ancestre seu. El tercer gen, el ***mnt***, codifica el repressor transcripcional que regula l'expressió del gen *ant* i manté la lisogènia, té una homologia del 74% amb el repressor Mnt del fag P22, tot i que no s'ha trobat que hi hagi el gen *ant*, ni tampoc el gen *arc*, els quals formarien la regió *immI*, fet que també podria indicar que aquests dos gens es podrien haver perdut durant l'evolució del fag SE1.

❖ **Mòdul de la cua.** Aquest mòdul conté el gen *gp9* que codifica un homotrímer multifuncional que actua en la fase final d'ensamblatge, en l'absorció del fag SE1 i en la hidròlisi de l'antigen O de l'hoste durant els primers estadis de la infecció del fag. Aquest gen és pràcticament idèntic al del fag ST64T i al del fag P22.

3.1.2.6. El genoma del fag SE1 com a mosaic genètic

L'evolució fàgica pot ser conceptualitzada en termes d'intercanvi recombinacional de mòduls genètics (o unitats funcionals) que agrupa gens amb una funció relacionada (Casjens *et al.*, 1992). L'examinació i comparació de les seqüències aminoacídiques entre les del fag SE1 i els fags més relacionats amb ell (figura 3.4) mostren una clara evidència que l'intercanvi és el responsable de l'evolució del bacteriòfag SE1.

Els genomes fàgics de dsDNA són mosaics amb accés, per intercanvi horitzontal, a un gran *pool* genètic comú que no és uniforme per a tots els fags. Aquests intercanvis podrien ocórrer per sobreinfecció d'una cèl·lula hoste comuna, per dos fags diferents, o a través de recombinacions entre fags infectius i genomes profàgics residents. Aquells fags que tenen l'habilitat d'infectar diferents hostes bacterians podrien passar segments genòmics nous a altres fags per recombinació, i en resultaria que fags no relacionats posseeixen gens homòlegs. Com a conseqüència de la suma de tots aquests processos de recombinació se suggereix que es duen a terme considerables recombinacions entre virus, i entre aquests i els genomes dels seus hostes (Hendrix *et al.*, 1999).

La naturalesa física del mosaic fàgic és complexa, però esdevé més clara com més genomes fàgics són seqüenciats, ja que una gran quantitat de recombinacions i transferències horitzontals han tingut lloc durant la història dels fags lambdoides.

Es va trobar un grau de similitud proteica significatiu entre els productes gènics del fag SE1 i membres de famílies com *Podoviridae* (HK620, 933W, ST64T, ST104, P22, etcètera), *Siphoviridae* (λ , HK022, etcètera), *Myoviridae* (P1) i fins i tot, *Inoviridae* (SfX i Pf1).

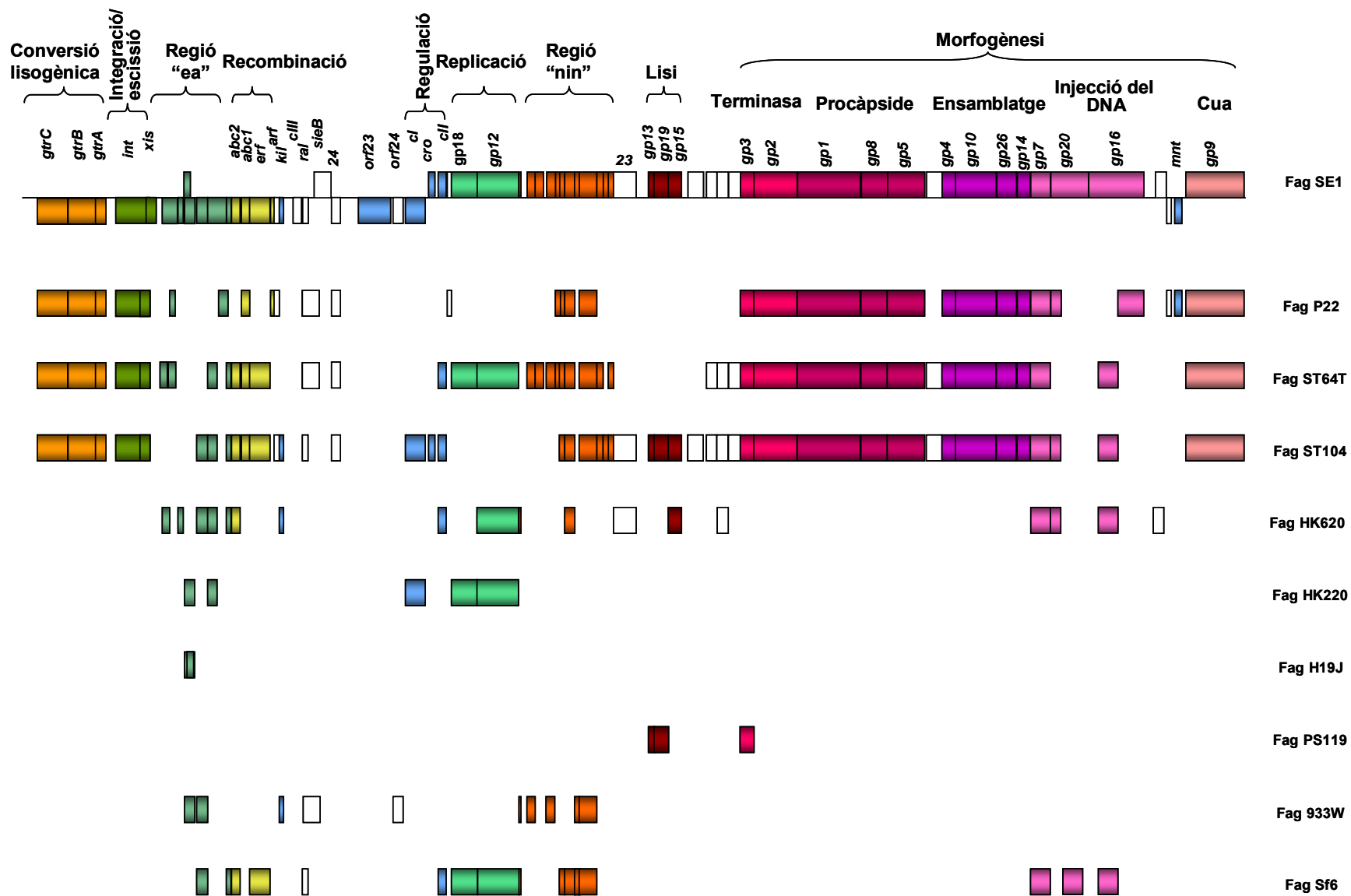


Figura 3.4. Representació esquemàtica de l'organització gènica del fag SE1 en comparació amb els nou fags amb els quals s'ha trobat més similitud.

En l'anàlisi comparativa del bacteriòfag SE1 amb els fags més relacionats amb ell es va poder observar la tendència dels genomes dels fags lambdoides a tenir organitzat el genoma en el mateix ordre. Tanmateix, els gens d'un mòdul concret de dos fags diferents poden ser o no homòlegs. Els genomes mosaics dels fags lambdoides tenen regions alternants d'homologia i no homologia, tant a nivell de seqüència nucleotídica com a nivell aminoacídica. Per tant, el mosaic es refereix a l'homologia en una regió del genoma fàgic entre dos fags i l'absència d'homologia entre ells en una altra regió.

Les regions homòlogues es relacionen de manera divergent ja que les seqüències mantenen suficient similitud per provenir d'un gen ancestral comú. D'altra banda, es considera que les regions no homòlogues són relacionades de manera convergent, ja que en aquests casos, la similitud funcional s'aconsegueix, aparentment, per descendència de proteïnes ancestrals amb orígens evolutius separats, que han convergit fins a arribar a ser funcionalment similars.

El mosaic genòmic del fag SE1 evidencia tres classes de mosaic:

- **Mosaic multigènic.** Aquest tipus de mosaic fa referència als gens agrupats que corresponen per homologia a altres grups de gens d'altres bacteriòfags, com és el cas dels gens dels mòduls de conversió lisogènica, integració/escissió, replicació, terminasa, procàpside, ensamblatge o cua. Caldria destacar que les proteïnes dels mòduls encarregats de l'estructura vírica, exceptuant-ne el mòdul d'injecció del DNA, han coevolució mantenen íntimes interaccions proteïna-proteïna, i això suggereix que no poden ser barrejades aleatòriament. També és remarcable la regularitat i eficiència en què s'empaqueten junts alguns gens de la regió "nin".
- **Mosaic de gens fraccionats.** Es refereix al fet que diferents zones d'un mateix gen tenen diferent homologia, és a dir, s'assemblen a fags diferents. En el fag SE1 es van trobar concretament quatre gens amb aquest tipus de mosaic: l'*orf6*, l'*orf11*, l'*orf62* i l'*orf63*. El producte del gen *orf6* és compost per un extrem carboxi terminal homòleg a la proteïna Eaa2 del fag ST64T i un extrem amino terminal homòleg al fag HK620. El producte del gen *orf11* està format per un extrem carboxi terminal semblant a la proteïna EaE del P22 i l'amino terminal dels fags ST104, HK620 i HK022. Aquest dos gens pertanyen a la regió gènica "ea" o "hka", de funció desconeguda i d'una gran variabilitat genètica. La proteïna codificada per l'*orf62* (Gp20) conté l'extrem carboxi terminal homòleg a

la proteïna corresponent (Gp12) en el fag Sf6 i l'amino terminal a la Gp20 dels fags P22, ST104 i HK620. El pèptid codificat pel *orf63* (Gp16) té l'extrem carboxi terminal homòleg al fag P22 i l'amino terminal als fags Sf6, ST104, ST64T i HK620. Ambdues proteïnes formen part, juntament amb el producte gènic de l'*orf61* (homòleg als fags P22, ST64T, Sf6, HK620 i ST104), del mòdul d'injecció del DNA a la cèl·lula hoste. Es creu que, probablement, aquestes tres proteïnes interaccionen entre elles conforme l'homologia gènica que presenten cada un dels seus dominis (Casjens *et al.*, 2004). Per tant, comparant les homologies del les proteïnes dels fag SE1 amb les respectives del fag P22 i el Sf6, es podria hipotetitzar que les interaccions es duen a terme entre les proteïnes d'injecció del DNA del fag SE1. Així, l'extrem carboxi terminal de la proteïna Gp20 interaccionaria amb l'extrem amino terminal de la proteïna Gp16 i l'extrem amino terminal de la proteïna Gp20 podria interaccionar amb l'extrem carboxi terminal de la proteïna Gp16. Finalment, la proteïna Gp7, amb la finalitat d'injectar el DNA a la cèl·lula hoste, podria interaccionar amb qualsevol domini proteic de les altres dues proteïnes.

- **Mosaic de gens únics.** Es refereix als gens en què cada un d'ells té homologia amb diferents fags. Aquesta homologia semblaria ser atzarosa. Per exemple, hi ha una gran quantitat de reorganitzacions gèniques en la regió "ea", en el mòdul de regulació, en alguns gens de la regió "nin" i en el mòdul de lisi. En aquests mòduls hi ha una gran variabilitat gènica.

La combinació d'aquests tres tipus de mosaic s'englobaria en el que s'anomena **mosaic de mòdul funcional**, pel qual la combinació de les seqüències del genoma del fag SE1 formaria el conjunt de proteïnes fàgiques funcionals.

El mosaic genètic format per un collage de seqüències provinents d'un *pool* de gens comuns és el resultat de la recombinació homòloga i no homòloga o il·legítima. Els llocs de transició entre seqüències es localitzen majoritàriament en els límits gènics. Juhala *et al.* (2000) han postulat que la recombinació no seria específica de lloc. És a dir, els fenòmens de recombinació no serien inicialment restrictius, sinó atzarosos i que els únics fags que sobreviuen a les recombinacions són els que podem analitzar i seqüenciar, aquells en què després de la recombinació no disminueix la funcionalitat de les proteïnes fàgiques, on la selecció natural actua. La selecció natural probablement desafavoriria la majoria de les recombinacions que tenen lloc en les regions codificants

de les proteïnes. Tanmateix, els successos recombinatoris podrien tenir lloc en els límits dels dominis proteics i produir un intercanvi de dominis d'interacció proteica (Juhala *et al.*, 2000). En el genoma del fag SE1 es van trobar quatre proteïnes que haurien patit aquest tipus de recombinació (mosaic de gens fraccionats).

Clark *et al.* (2001) afegiria dos apunts a la teoria anteriorment esmentada. El primer seria que les recombinacions que produeixen deficiències funcionals a les proteïnes podrien sobreviure en els profags necessàriament acomodats al genoma. El segon, que la recombinació il·legítima atzarosa entre fags molt distants pot produir seqüències curtes properes a seqüències nucleotídiques similars que actuarien com a llocs de recombinació homòloga que permetrien l'intercanvi de mòduls i gens. Aquestes seqüències, arriben a ser evidents quan es comparen dos genomes. Són seqüències límit que es troben entre dues regions heteròlogues i entre una d'heteròloga i una d'homòloga (Clark *et al.*, 2001). Aquesta podria ser també l'explicació del mosaic de gen únic i del multigènic del bacteriòfag SE1, on es van poder observar zones intercalades d'homologia i de no-homologia quan es compara amb altres fags lambdoides (figura 3.4)

3.1.2.7. Comparació gènica del fag SE1 en relació amb altres bacteriòfags. Consideracions evolutives

A la figura 3.4 es pot observar que el fag SE1 comparteix un gran nombre de regions similars amb els fags P22 (Vander Byl i Kropinski, 2000), ST64T (Mmolawa *et al.*, 2003a) i ST104 (Takana *et al.*, 2004). Amb la finalitat de fer una anàlisi exhaustiva de la composició gènica de cada un d'aquests quatre bacteriòfags s'han representat esquemàticament els seus genomes (figura 3.5).

Les diferències de longitud que es van observar entre els fags P22 (41.724 pb), SE1 (41.941 pb), ST64T (40.679) i ST104 (41.391) són conseqüència de la seva diferent composició gènica.

El fag SE1 té una longitud genòmica superior a la dels altres bacteriòfags a causa, principalment, de la presència de dos gens (*l'orf23* i *l'orf24*) amb funció desconeguda. Aquests gens no es trobaven en cap dels altres tres fags de *Salmonella* comparats.

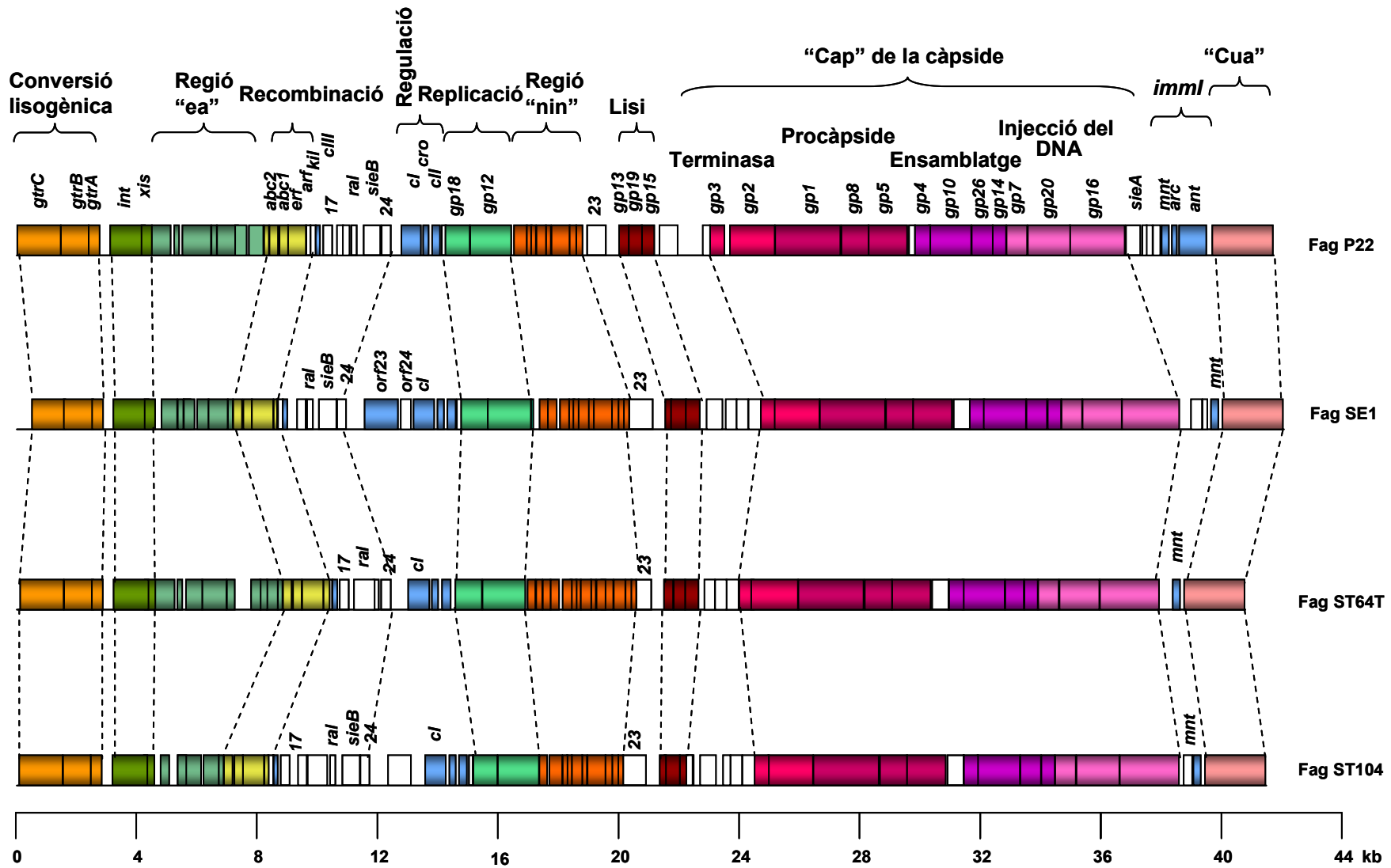


Figura 3.5. Comparació de l'arquitectura gènica dels fags P22, SE1, ST64T i ST104.

Els mòduls més conservats entre aquests quatre fags són els de morfogènesi, recombinació, replicació, integració, lisi i conversió lisogènica. Cal tenir en compte que en aquest últim mòdul el bacteriòfag SE1 difereix del altres, té el gen *gtrC* més curt, que dóna lloc a una proteïna amb l'extrem carboxi terminal reduït.

Els fags SE1, ST64T i ST104 no presenten els gens *arc* i *ant* de la regió *immI*, però conserven el gen *mnt*. Aquest podria haver estat adquirit separatament dels altres dos gens, provinent d'algun altre profag, o directament d'un fag ancestral amb la regió sencera, que durant el procés evolutiu va anar perdent els gens *arc* i *ant* en aquests tres fags. L'absència dels gens *arc* i *ant* en tres fags molt homòlegs al P22 reforça la segona hipòtesi, que aquests tres fags provinguessin d'un ancestre comú que hauria perdut aquests gens prescindibles per al desenvolupament del cicle replicatiu.

Adjacent a aquesta zona *immI* del fag P22 hi ha el gen *sieA*, que està absent en els fags SE1, ST64T i ST104. A més, s'ha demostrat fenotípicament que el fag SE1, a diferència del bacteriòfag P22 salvatge, pot transduir marcadors genètics sobre soques lisogenes per ell mateix, la qual cosa indica que no presenta un sistema d'exclusió semblant al SieA del fag P22 (Llagostera *et al.*, 1986). En el present treball s'ha demostrat genotípicament aquesta absència (figura 3.5), ja que el gen *sieA* es trobaria proper a la regió que s'hauria perdut en un ancestre comú d'aquests tres fags. Així que és factible pensar que hi podria haver hagut una reorganització gènica en aquesta zona i haver perdut aquest gen juntament amb els gens *arc* i *ant* durant l'evolució d'aquests tres fags.

Hi ha una gran variabilitat gènica en les regions "ea" i "nin" dels quatre bacteriòfags comparats, tot i que la funció dels gens d'aquestes dues zones és pràcticament desconeguda, aquestes regions es conserven en els quatre fags. Això indicaria que possiblement aporten diverses funcions avantatjoses per als fags o per als seus hostes. També hi ha una important variació gènica dels gens amb funció desconeguda que es troben situats entre el mòdul de lisi i el mòdul de la terminasa.

El fag SE1 conté el gen *sieB* en el seu genoma com el fag P22, és a dir, pot excloure els fags heteroimmunes respecte del fag SE1, a diferència del fag ST64T. Tanmateix, el fag SE1 no posseeix el gen *17*, per tant, possiblement deu ser susceptible a l'exclusió per part del profag Fels-1, present en moltes soques de *S. enterica* serovar Typhimurium que exclou els mutants del fag P22 defectius en el gen *17*. Fels-1 codifica una funció, similar al mecanisme d'exclusió SieB, que és antagonitzada pel producte 17 (Susskind i Botstein, 1978).

3.1.2.7.1. Comparació filogenètica entre els fags P22, ST64T, ST104 i SE1

Amb la finalitat d'estimar el grau de parentesc i la *ràtio* de les substitucions aminoacídiques entre els fags més relacionats amb el fag SE1 s'ha escollit la comparació filogenètica de la proteïna major de la càpside (figura 3.6), ja que és una de les proteïnes més ben conservades del genoma fàgic i constitueix el gruix de l'estructura del "cap" víric. Fent alineaments amb el programa Clustalw s'han determinat les distàncies filogenètiques mesurades en substitucions aminoacídiques (figura 3.6).

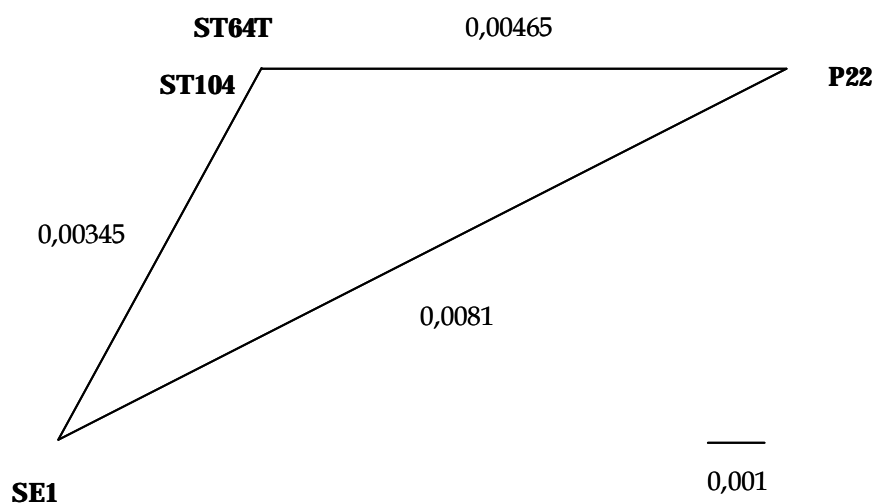


Figura 3.6. Representació gràfica de la distància evolutiva de la proteïna major de la càpside del fag SE1 respecte dels tres fags més relacionats a ell. La distància es troba representada com a substitució per residu aminoacídic.

S'observa que la proteïna major de la càpside és molt semblant entre tots quatre fags, les diferències observades podrien ser degudes a la deriva mutacional. No hi ha diferències entre els fags ST104 i ST64T, i la distància és petita entre el fag SE1 i els dos anteriors, i entre aquests dos fags i el fag P22, però on trobem una distància més gran és entre el fag SE1 i el P22. Aquestes dades indicarien que els fags ST64T i ST104 es podrien trobar en una situació filogenètica intermèdia entre el fag P22 i el fag SE1.

3.2. Conversió lisogènica

Els gens *gtr*, encarregats de la conversió lisogènica es troben en les primeres 3.000 pb del genoma del fag SE1. Si es representa la variació del contingut de GC en funció de la posició en la longitud del genoma del fag SE1 (figura 3.7), s'observa una disminució en el contingut de GC en la regió que comprèn els gens involucrats en la seroconversió respecte de la resta de gens del genoma del fag SE1.

La mitjana del contingut de GC dels gens *gtrA* i *gtrB* és d'un 42%, tanmateix per al gen *gtrC* és inferior al 35%, tal com passa en el bacteriòfag P22 (Vander Byl i Kropinsky, 2000). Aquest baix percentatge juntament amb l'ús de codó són els responsables que el contingut de GC del fag SE1 sigui inferior al del seu hoste.

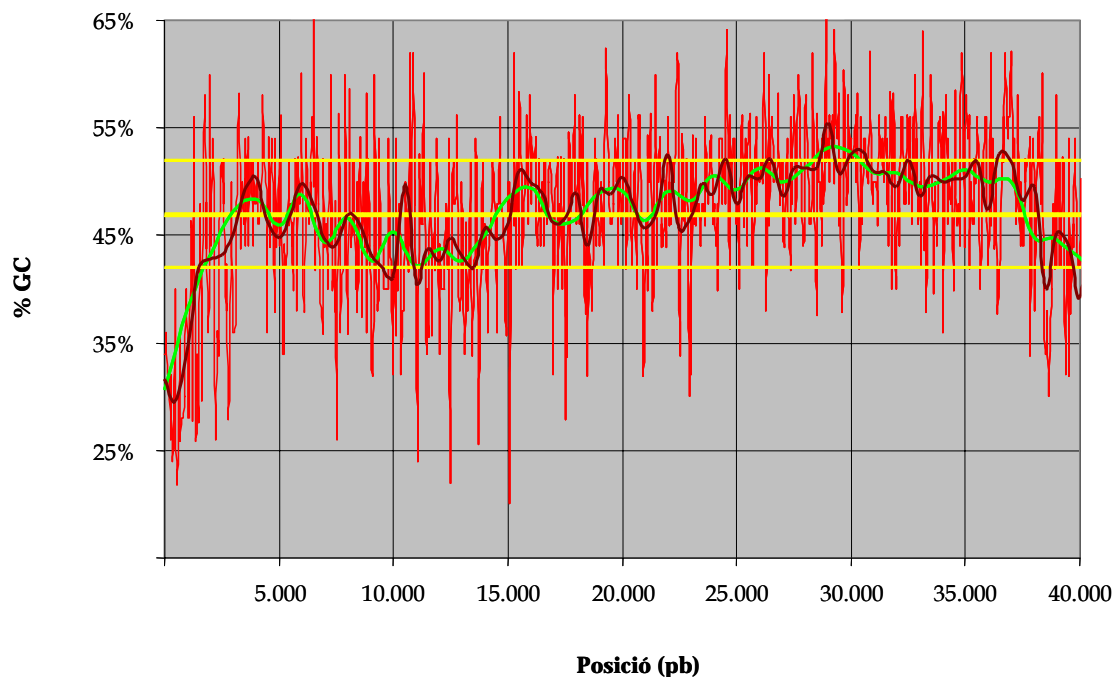


Figura 3.7. Representació gràfica del contingut de GC en funció de la longitud del genoma. La línia groga central correspon a la mitjana del contingut de GC (46,99%).

El contingut atípic de GC d'aquesta regió podria ser un modulador de l'expressió d'aquests gens, i és comparable al d'altres gens relacionats amb la síntesi del lipopolisacàrid (LPS), com els cassets de conversió antigènica de *Shigella* i d'*E. coli* (Allison i Verma, 2000) o el gen de conversió antigènica del bacteriòfag D3 de *P. aeruginosa* (Kropinski, 2000), la qual cosa indica que aquests gens podrien provenir d'una transferència gènica lateral, des d'un altre fag o bacteri evolutivament diferent,

amb un percentatge de GC més baix, i presenta un gran nombre d'aminoàcids hidrofòbics en les respectives proteïnes, que correspondrien a regions o dominis transmembranals.

La proteïna del fag SE1 que intervé en el reconeixement de l'antigen O en el moment d'adsorció, és a dir, el producte gènic Gp9 és idèntic al del P22, per tant, és factible pensar que tots dos fags interaccionarien de la mateixa manera amb el seu hoste.

L'LPS dels bacteris gramnegatius s'estructura en tres segments: el lípid A, un corpolisacàrid i l'antigen O, que correspon a una cadena de sucres característica de cada serovarietat.

S. enterica serovarietat Typhimurium pertany al serogrup B, el qual es caracteritza per tenir una repetició trimèrica de D-manosa- α 1 \rightarrow 2-L-rahamosa- α 1 \rightarrow 3-D-galactosa amb un residu 3,6-dideoxi hexosa abequosa unit per un enllaç α 1 \rightarrow 3 al residu manosil. Aquest tetrasacàrid correspon a l'antigen O4. La lisogenització d'aquesta serovarietat per al fag P22 provoca la modificació del tetrasacàrid per glicosilació α 1 \rightarrow 6 en els residus galactosils (Weintraub *et al.*, 1992) que no permet la infecció de la cèl·lula per part d'un altre fag P22, a causa de la modificació del receptor per l'adsorció. Els gens relacionats amb la conversió antigènica del bacteriòfag SE1 s'organitzen de la mateixa manera que els del P22 i els d'altres fags, l'exemple més estudiat és el bacteriòfag SfV que infecta *S. flexneri* (Korres i Verma, 2004).

S'utilitzà el programa d'anàlisi TMHMM (Hofmann i Stoffel, 1993) per a la determinació biocomputacional de les regions transmembranals dels tres productes gènics de conversió lisogènica del fag SE1.

Les proteïnes GtrA i GtrB del bacteriòfag SE1 corresponen a la mateixa arquitectura que les seves homòlogues en els bacteriòfags P22 i SfV (Vander Byl i Kropinsky, 2000, Allison *et al.*, 2002 i Korres *et al.*, 2005).

- La proteïna **GtrA** consisteix en quatre dominis transmembranals amb els extrems amino i carboxi terminals al citoplasma. Podria formar un complex multimèric i ser capaç de translocar o transportar l'UndP-glucosa des del citoplasma al periplasma.
- La proteïna **GtrB** consisteix en un llarg extrem amino terminal citoplasmàtic ancorat a la membrana per dos dominis transmembranals i un petit extrem carboxi terminal, també situat al citoplasma. L'extrem

N-terminal catalitzaria la transferència de la glucosa des de l'UDP-glucosa al bactoprenol fosfat per formar l'UndP-glucosa.

- El producte gènic de l'*orf1* del bacteriòfag SE1, el **GtrC**, és homòleg al del bacteriòfag P22 exceptuant-ne l'extrem C-terminal (figures 3.5 i 3.8), a causa d'una mutació puntual, concretament la pèrdua d'un nucleòtid, una adenina (A) en la posició 1.057 respecte del punt d'inici del gen, aquesta adenina es troba entre nou timines (T) en el gen *gtrC* del bacteriòfag P22. Aquesta pèrdua seria fàcilment atribuïble a un possible error de la DNA polimerasa en la replicació a causa de l'entorn ric de T, i genera un canvi del marc de lectura que provocaria un codó Stop quatre aminoàcids després de la mutació i alhora l'escurçament del producte gènic resultant.

En aquest treball per observar les diferències aminoacídiques produïdes per aquest escurçament es va fer un alineament entre les dues proteïnes GtrC del fag SE1 i del bacteriòfag P22 (figura 3.8). La proteïna GtrC del fag SE1 està formada per 355 aminoàcids, a diferència de la del P22, formada per 486 amminoàcids.

```

gtrCSE1_ - VKFNSNDRIFISIFLGLAIITYTFPLLTHQSFFVDDLGRSLYGGGLGWSGNRPLSDFIFY 59
gtrCP22_ M VKFNSNDRIFISIFLGLAIITYTFPLLTHQSFFVDDLGRSLYGGGLGWSGNRPLSDFIFY 60

gtrCSE1_ IINFGTPIIDASPLPLMLGIVILALALS CVREKLFGDDYITASLCFMMILANPFFIENLS 119
gtrCP22_ IINFGTPIIDASPLPLMLGIVILALALS CI REKLFGDDYITASLCFMMILANPFFIENLS 120

gtrCSE1_ YRYDSLTMCMSSVAISIISSYVAYQYKPINIIISSILTI AFLSLYQAAALNTY AIFLLAFII 179
gtrCP22_ YRYDSLTMCMSSVAISIISSYVAYQYKPINIIISSILTI AFLSLYQAAALNTY AIFLLAFII 180

gtrCSE1_ SDVVKKNSISNITKNTASSIAGLIVGYFAYSYFI AKRLVTGSYNI EHSKII EINS SLFEG 239
gtrCP22_ SDVVKKNSISNITKNTASSVAGLIVGYFAYSYFI AKRLVTGSYNI EHSKII EINS SLFEG 240

gtrCSE1_ IISNVLSFYRMFSTILNGDNYLIYYSLFFALIISLIVIVLKV I KRDENKKTKE LLVVLIL 299
gtrCP22_ IISNVLSFYRMFSTILNGDNYLIYYSLFFALIISLIVIVLKA I KRDENKKTKE LLVVLIL 300

gtrCSE1_ LASMFFIIGPMIFLKSPIYAPRVLIGMGGFMFFCCLCVFYAFEDKQLISRIFY F LFF - - - 356
gtrCP22_ LASMFFIIGPMIFLKSPIYAPRVLIGMGGFMFFCCLCVFYAFEDKQLISRIFY S FILLIS 360

gtrCSE1_ ..... 356
gtrCP22_ TIFSYGAYNAINAQFQLEESIVNRISQIDYLGFGDRDKNIKFIGTEPYAPINENIVIKH 420

gtrCSE1_ ..... 356
gtrCP22_ PLMRELI PRI I NNDWMWS E VLMQRNVFS RNYRLYDKEVKLENGWKKS GNNVYD I GVVGET 480

gtrCSE1_ ..... 356
gtrCP22_ I V V R F N 486

```

Figura 3.8. Alineament de les proteïnes GtrC dels bacteriòfags SE1 i P22.

Aquesta diferència aminoacídica ha interferit en el nombre de dominis transmembranals i en l'arquitectura de la proteïna GtrC del fag SE1, formada per 10

dominis transmembranals, a diferència dels 11 que presenta la proteïna GtrC del fag P22 (figura 3.9). Ambdues presenten l'extrem N-terminal al citoplasma, però l'extrem C-terminal del fag SE1 es trobaria formant un petit bucle (11) al citoplasma, a diferència de la GtrC del fag P22 que forma un gran bucle hidrofílic (12) al periplasma.

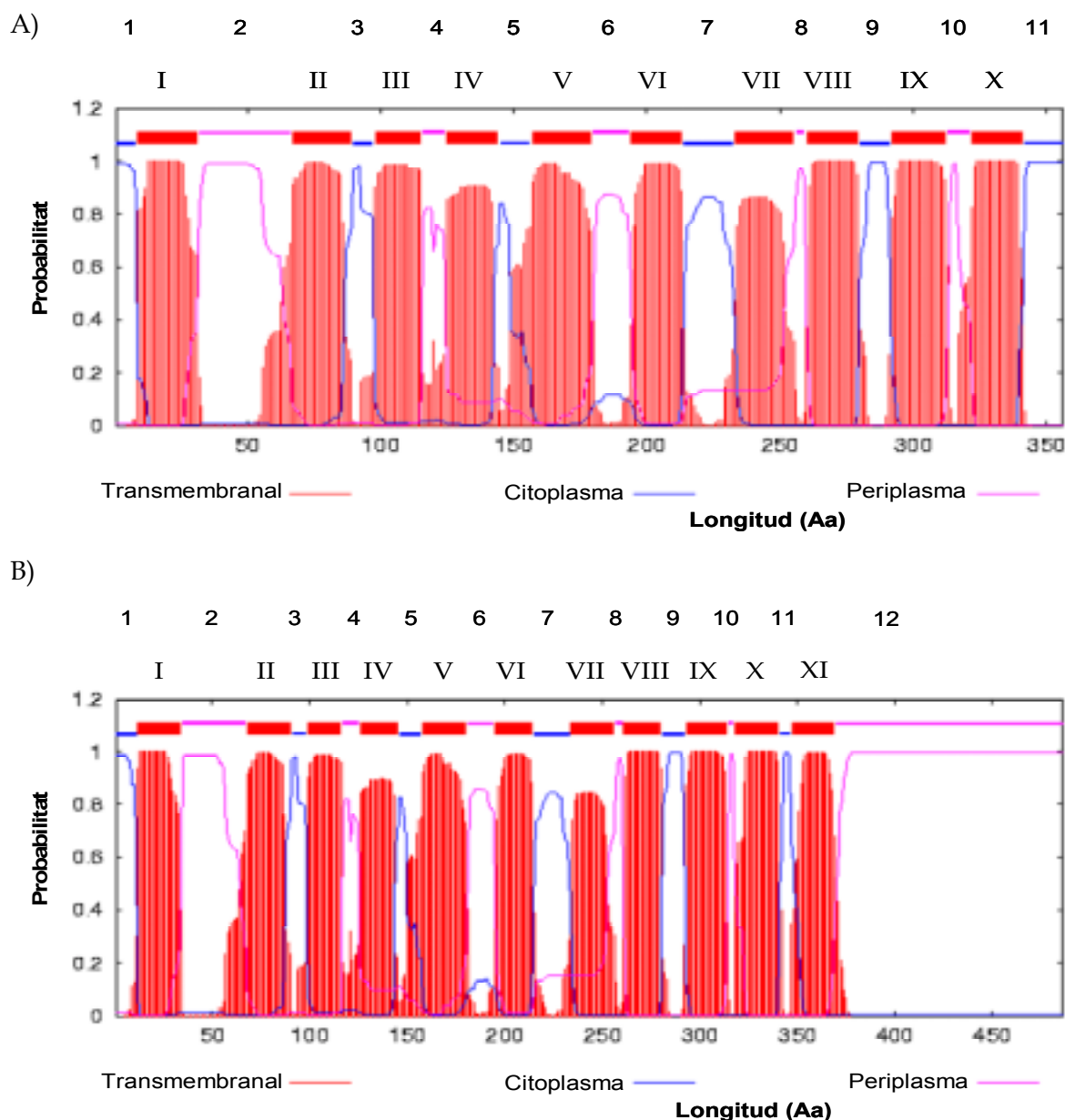


Figura 3.9. A) Representació gràfica dels dominis transmembranals de la proteïna GtrC del fag SE1. B) Representació gràfica dels dominis transmembranals de la proteïna GtrC del fag P22. Els dominis transmembranals estan numerats amb xifres romanes, i els bucles, xifres àrabiques.

El producte gènic GtrC és probablement la glucosiltransferasa relacionada directament amb la seroconversió antigènica, les proteïnes GtrA i GtrB en serien accessòries

(Vander Byl i Kropinsky, 2000). L'últim bucle periplasmàtic de la glucosiltransferasa homòloga a la GtrC corresponent al fag SfV, assumeix un paper significatiu en la glucosilació i, per tant, en la seroconversió, no tan sols per la seva relativa llargària, sinó perquè la modificació de l'antigen O té lloc al periplasma (Korres i Verma, 2004). Per analogia, aquest bucle també deu ser importat en el fag P22, per tant, la seva absència al fag SE1 podria ser la responsable de la diferent conversió antigènica provocada per aquests dos bacteriòfags, deguda a les diferències en l'últim domini transmembranal i, sobretot, en l'últim bucle de les respectives glucosiltransferases. Aquesta suposició es veuria confirmada pel fet que una soca de *S. typhimurium* lisogena per al fag SE1 pot ser infectada pel fag P22 (Llagostera *et al.*, 1986), és a dir, la possible conversió lisogènica provocada pel fag SE1 seria diferent de la del P22 i, per tant, no afectaria el receptor per l'adsorció del fag P22.

3.3. Estudi del regulador o interruptor genètic del bacteriòfag SE1

3.3.1. Establiment de la lisogènia. Activador transcripcional cII del bacteriòfag SE1

La proteïna cII del bacteriòfag SE1 conserva una elevada homologia amb els activadors transcripcionals del bacteriòfags ST104, ST64T i L. Tanmateix, també presenta una certa homologia amb els activadors transcripcionals C1 del fag P22 i cII del fag HK022. Ambdós regulen la transcripció del regulador C2, en el cas del fag P22, unint-se al motiu TTGC(N₆)TTGY (Ho *et al.*, 1992), i cI, en el cas del fag HK022, unint-se a al motiu TTGC(N₆)TTGC (Wulff i Mahoney, 1987).

Es va fer una cerca de les potencials seqüències d'unió de la proteïna cII del fag SE1. La recerca es va fer en el total del seu genoma usant el programa EditSeq (DNASTar Inc.), i utilitzant com a consens la seqüència TTGC(N₆)TTGY, amb la finalitat de trobar la seqüència a la qual s'uniria la proteïna cII per activar la transcripció del repressor C2, és a dir, el promotor d'establiment (P_E) (taula 3.5).

Taula 3.5. Possibles motius d'unió de la proteïna cII.

Inici ^a	Final ^b	Cadena ^c	Seqüència ^d	
2929	2942	+	TTGCATCGGCTTGC	P_aI
2939	2952	+	TTGCAAGGCTTTGC	P_aI
13793	13806	+	TTGCTATTATTTGT	
14109	14122	+	TTGCGTGTATTTGC	
14185	14172	-	TTGCTTTTAGTTGC	P_E
19716	19703	-	TTGCCTGACCTTGC	
20505	20492	-	TTGCGAGCGTTTGC	
23229	23242	+	TTGCTTCATGTTGC	
25694	25681	-	TTGCCCGTATTTGT	
28346	28333	-	TTGCCGGGTCTTGT	
28900	28877	-	TTGCCGGGTCTTGT	
35882	35869	-	TTGCTGCCGATTGT	
41010	40997	-	TTGCGAGAGTTGT	

^a Punt d'inici del motiu d'unió de la proteïna cII.

^b Punt final del motiu d'unió de la proteïna cII.

^c Cadena on es troba el motiu d'unió de la proteïna cII.

^d Seqüència del motiu d'unió de la proteïna cII; marcats amb negreta els nucleòtids repetits directament.

Com calia esperar, el possible P_E es va trobar a la dreta del gen *cro* (taula 3.5). A més, es varen trobar dues seqüències d'unió immediatament després del gen *int* que podrien tenir una funció reguladora de l'expressió de la integrasa, tal com passaria en el fag P22 (Wulff *et al.*, 1993).

Caldria destacar les seqüències d'unió situades entre els gens *cl* i *cro* (13793-13806) i a l'interior del gen *cro* (14109-14122), aquestes podrien tenir algun efecte en el regulador o interruptor genètic. També es desconeix el significat dels altres potencials motius d'unió de la proteïna cII, localitzats en els gens de morfogènesi.

3.3.2. Clonació, sobreexpressió i purificació del repressor cI del fag SE1

El repressor cI del bacteriòfag SE1 és homòleg a altres repressors fàgics involucrats en el regulador o interruptor genètic, és a dir, en el manteniment del cycle lisogènic i en la inducció del cycle lític activat per la proteïna RecA.

El repressor del cycle lític del bacteriòfag SE1 està format per 229 aminoàcids i conserva els residus característics dels repressors com el LexA, l'enllaç Ala-Gly, on es produeix l'autoproteòlisi i els residus Lys i Ser implicats, a una distància similar a la d'altres bacteriòfags (figura 3.10).

ST64B	-----MNIGNRVRQLRRAKNNMK-----IAELAEAGVDAANISRLETGKQKQFTEQTL	49
Fels-1	-----MFVKVGQKIRELRKARKMT-----ITQLAALTDWDVGNISRLEGMQG-YSAQSIQ	50
SE1	-----MKKETLSDRLNKAMELAGMS-----QGALAKASGVAQPTIWRLTSG-NARGSTK-IV	50
ST104	-----MKKETLSDRLNKAMELAGMS-----QGALAKASGVAQPTIWRLTSG-NARGSTK-IV	50
HK220	MVQQKERETFSQRLALACDKAGLPLHGRQADLAVRLKVTPKAISKWFNGESIPRKDK-ME	59
	▼▼	
ST64B	RLADC LGVDIAELFTSDPKGNTVCKHSDMRKDSANVKDLFRIEILDVSA SAGNGLIQGGD	109
Fels-1	KIAEALQVPVSELFSTETDSDTVNKYSVLSLSHQRRNDVYRVDVMDVSA SAGN CNSSR-D	109
SE1	EIANALGVSS EWLSTG---IGPMKKDGTTPINASPSSNTFKIDILDLEVSAGPG-VINRE	106
ST104	EIANALGVNS EWLSTG---IGPMKKDGTTPINASPSSNTFKIDILDLEVSAGPG-VINRE	106
HK220	SLASV LGTTAAYLH-----GYADDDGITVNHLSRSNDYRVDVLDVQA SAGPGTMTVSN	113
	▼	
ST64B	VIDVIHAI EYNKDKALAMFGGRPAAELKV INVRGDSMAPTIEPGDLIFVDIS INQFDGDG	169
Fels-1	FIEV ISSIEYVTEEAKTLFGHRPANQVKL INVRGDSMQGTIEPGDLIFVDIGVNYFDGDG	169
SE1	FVEILRSVEYSQDDARHMF DGRKAENIRI INVRGDSMSGTIEPGDLLFVDVSIKNFDGDG	166
ST104	FVEILRSVEYSQDDARHMF DGRKAENIRI INVRGDSMSGTIEPGDLLFVDVSIKNFDGDG	166
HK220	FIEKIRAI EYTTEQARILFNGRPQESVKVITVRGDSMEGTINPGDEIFVDVSI TCFDGDG	173
	▼	
ST64B	IYVFGFDDKIYVKRLQMPIPKLLV ISDNNTNYREWS-ITKDNECRFGVFGKVLISQTQSLK	228
Fels-1	IYVDFDFSGDLYVKRLQKIKSQLLV LSNPLYKEWQ-ITKEEMEMLVHVC GKVLLSQQQIR	228
SE1	IYAFLYDDTAHVKRLQKMKDKLLV ISDNKSYSAWDP IERDEMNRV FVFGKVI G SMPQTYR	226
ST104	IYAFLYDDTAHVKRLQKMKDKLLV ISDNKSYSAWDP IERDEMNRV FVFGKVI G SMPQTYR	226
HK220	IYVFGYKTMHVVKRLQMQKNRLAV ISDNAA YDRVY-IEEGEEQLHLILAKVLI RQSIDYK	232
ST64B	RHN	231
Fels-1	RHA	231
SE1	KHG	229
ST104	KHG	229
HK220	RFG	235

Figura 3.10. Alineament dels repressors, relacionats per homologia, amb el repressor cI del bacteriòfag SE1. Es troben marcats (▼) els residus Ala, Gly, Ser i Lys implicats en l'autoproteòlisi.

Per amplificar la seqüència del repressor cI per PCR es van utilitzar els primers cISE1upNdeI i cISE1dwBamHI (taula 2.3), i s'obté un fragment de 696 pb que va ser clonat al vector pGEM-T® (taula 2.2), comprovat per seqüenciació (usant els primers Direct-Cy5 i Reverse-Cy5 (taula 2.3). El plasmidi resultant s'anomenà pUA1066 (taula 2.2).

Posteriorment, l'insert de DNA clonat es va alliberar, utilitzant els enzims de restricció *NdeI* i *BamHI*, per ser clonat al vector d'expressió pET15b(+) (taula 2.2) immediatament després del promotor que es troba sota el control de l'RNA polimerasa del fag T7, i en el mateix marc de lectura que la cua de sis His, present en aquest vector. El plasmidi que es va obtenir s'anomenà pUA1067.

Per sobreexpressar el repressor cI del fag SE1 es va transformar el plasmidi pUA1067 en la soca *E. coli* BL21(DE3) (taula 2.1) i es va induir la sobreexpressió de la proteïna cI amb IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) seguint el protocol del fabricant. Posteriorment, es va visualitzar la sobreexpressió en un gel d'electroforesi SDS-PAGE al 15% tenyit amb solució Comassie (0,1%) (figura 3.11).

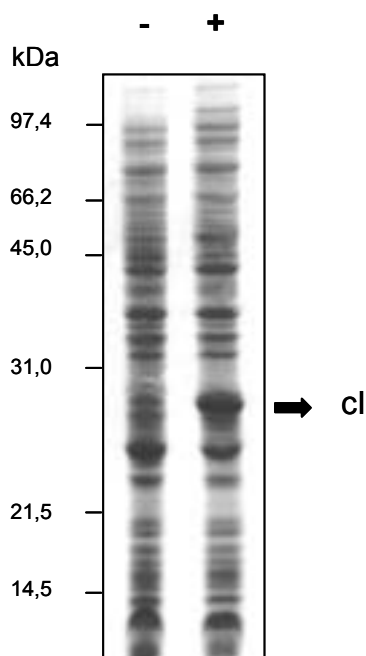


Figura 3.11. Sobreexpressió del repressor cI del fag SE1. Hi són representats l'extracte cru de cèl·lules *E. coli* BL21DE3 que porta el plasmidi pUA1067 en absència (-) o en presència (+) de IPTG, respectivament.

En el gel d'electroforesi s'observa la sobreexpressió del repressor cI (25,2 kDa) en l'extracte cru de la soca crecuda en presència d'IPTG, a diferència d'una soca control sense el plasmidi pUA1067.

La purificació de la proteïna cI es va duu a terme utilitzant l'afinitat de la cua d'histidines del repressor cI sobreexpressat, per l'ió Co^{+2} de la resina *TalonTM*, d'aquesta manera s'obtenen diferents fraccions de proteïna de diferents graus de purificació.

Aquestes fraccions es carregaren en un gel d'electroforesi SDS-PAGE al 15% tenyit amb solució Comassie (figura 3.12).

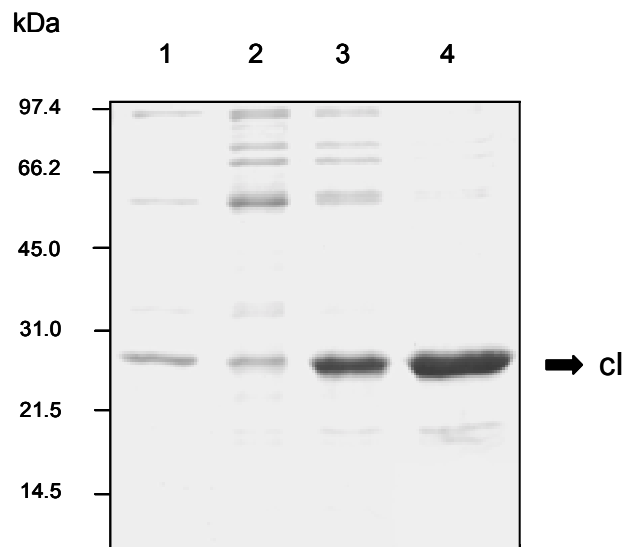


Figura 3.12. Purificació de la proteïna cI. En els diferents carrils es troben carregades les diverses fraccions eluïdes de proteïna. A cada carril s'hi van carregar 5 μ l de cada fracció.

En el quart carril es va poder concentrar fins a 80 mM i purificar la proteïna cI amb un 90% de puresa. Aquesta fracció proteica és la que es va utilitzar posteriorment per fer els EMSA i l'assaig de *footprinting*.

3.3.3. Identificació dels operadors als quals s'uneix la proteïna cI del bacteriòfag SE1

Els gens que codifiquen el cI i el Cro en els bacteriòfags es troben en posicions contigües en el genoma fàgic, però es transcriuen de manera divergent. Els punts de partida per a la transcripció d'aquests dos gens es troben separats per una regió on hi ha els promotors, als quals s'uneix l'RNA polimerasa, i els operadors, on s'uneixen els reguladors cI i Cro. L'operador dret està format per tres llocs d'unió consecutius, O_{R1}, O_{R2} i O_{R3}, que presenten seqüències repetides *en tàndem* amb simetria invertida, similars però no idèntiques, a les quals les proteïnes cI i Cro són capaces d'unir-se amb diferent afinitat.

3.3.3.1. Especificitat de la proteïna cI del fag SE1 per la regió reguladora

Per clonar els operadors O_{R1} , O_{R2} i O_{R3} en el vector pGEM-T® (taula 2.2) es va amplificar la regió reguladora que els conté mitjançant els oligonucleòtids pcISE1up i pcISE1dw (taula 2.3). El resultat de la PCR va clonar-se a pGEMT i va donar lloc al plasmidi pUA1068 (taula 2.2). La seqüència de l'insert va ser confirmada utilitzant el marcatge amb el kit *fmo*® i els oligonucleòtids Direct-Cy5 i Reverse-Cy5 (taula 2.3).

Es va amplificar, per PCR, un fragment marcat amb digoxigenina que contenia la regió reguladora (usant els oligonucleòtids Dig-Direct i pcISE1dw (taula 2.2) i el plasmidi pUA1068 com a DNA motlle). Amb aquest fragment es van fer els assaigs de mobilitat electroforètica (EMSA) per detectar la unió de la proteïna cI a aquesta regió reguladora (figura 3.13). Per definir l'especificitat de la unió es van fer assaigs de competició usant el mateix fragment però sense marcar (utilitzant els oligonucleòtids Direct i pcISE1dw (Taula 2.3). L'addició d'aquest DNA en excés farà que la proteïna s'hi uneixi amb una major probabilitat, evitant-ne la unió amb el fragment marcat, que correrà lliure en el gel d'acrilamida.

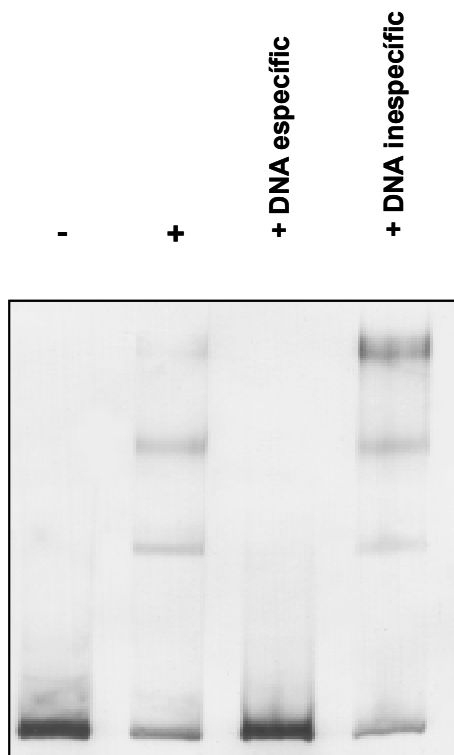


Figura 3.13. EMSA del fragment marcat que conté tota la regió reguladora en presència de proteïna cI. En el primer carril l'assaig es va fer en absència de proteïna (-), en el segon amb presència de proteïna (+), en el tercer carril s'hi va afegir fragment de la regió reguladora sense marcar en excés i, finalment, en el quart carril s'hi va afegir DNA inespecífic (*Herring Testes Carrier DNA*) en excés.

Com a control en els assaigs d'especificitat s'utilitzà també DNA inespecífic (*Herring Testes Carrier DNA*) en excés, al qual no s'hauria d'unir si la unió al promotor és específica; per tant, no competiria amb el DNA marcat.

Els resultats dels EMSA (figura 3.13) evidencien que la proteïna cI s'uneix a aquesta regió reguladora específicament.

3.3.3.2. Unió cooperativa de la proteïna cI a la regió reguladora

Caldria destacar que apareixen tres bandes de retard electroforètic en els assaigs EMSA (figura 3.13); aquestes indiquen que la proteïna s'uneix als tres operadors característics i es dona lloc a tres tipus de conformacions, la que es formaria quan només la proteïna cI es trobaria unida a l'operador O_{R1} , la segona quan es trobaria unida als operadors O_{R1} i O_{R2} i la darrera conformació tindria lloc quan tots tres operadors O_{R1} , O_{R2} i O_{R3} estiguessin ocupats per la proteïna cI.

A fi de veure la unió cooperativa de la proteïna cI es van fer EMSA utilitzant el fragment marcat anteriorment i diferents concentracions de proteïna (figura 3.14).

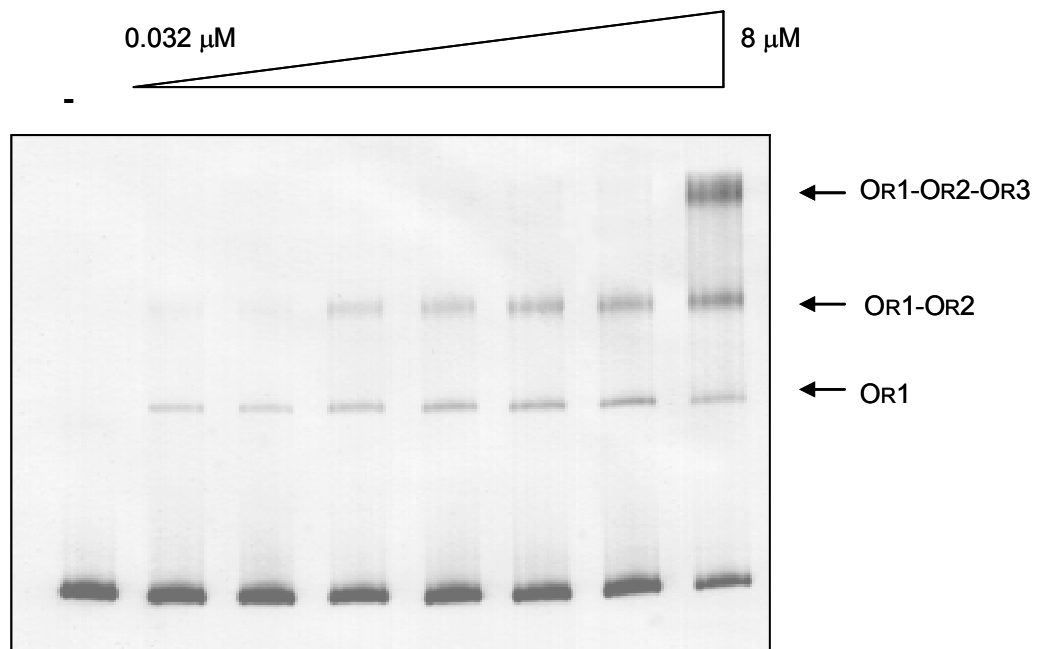


Figura 3.14. EMSA del fragment de la regió reguladora en presència de diferents concentracions de proteïna cI. Com a control en el primer carril no s'hi addiciona proteïna.

Els resultats dels EMSA de la figura 3.14 evidencien la unió cooperativa de la proteïna cI del fag SE1 a tots tres operadors, característica d'aquest tipus de proteïna, sent similar a la unió del repressor cI del bacteriòfag lambda. La unió a un únic operador és difícil; primerament s'uniria a l'O_{R1} i gairebé de manera immediata s'uniria a l'O_{R2}, i només quan s'augmenta molt la concentració s'observa unió a tots tres operadors. Aquest fet concordaria amb la baixa afinitat de la proteïna cI per l'O_{R3}.

3.3.3.3. Acotament de l'operador O_{R3} del bacteriòfag SE1

Amb la finalitat d'acotar l'operador O_{R3}, es van amplificar per PCR els fragments pcl.1, pcl.2 i pcl.3 (figura 3.15). Aquests fragments es van obtenir utilitzant els oligonucleòtids pcISE1up-42, pcISE1up-32 i pcISE1up-27, respectivament, i juntament amb l'oligonucleòtid marcat Dig-Reverse (taula 2.3), utilitzant com a motlle el plasmidi pUA1068. Els fragments, de 166, 156 i 151 pb respectivament, juntament amb el fragment pCl, anteriorment utilitzat (figura 1.14), van ser usats per als assaigs EMSA (figura 3.16).

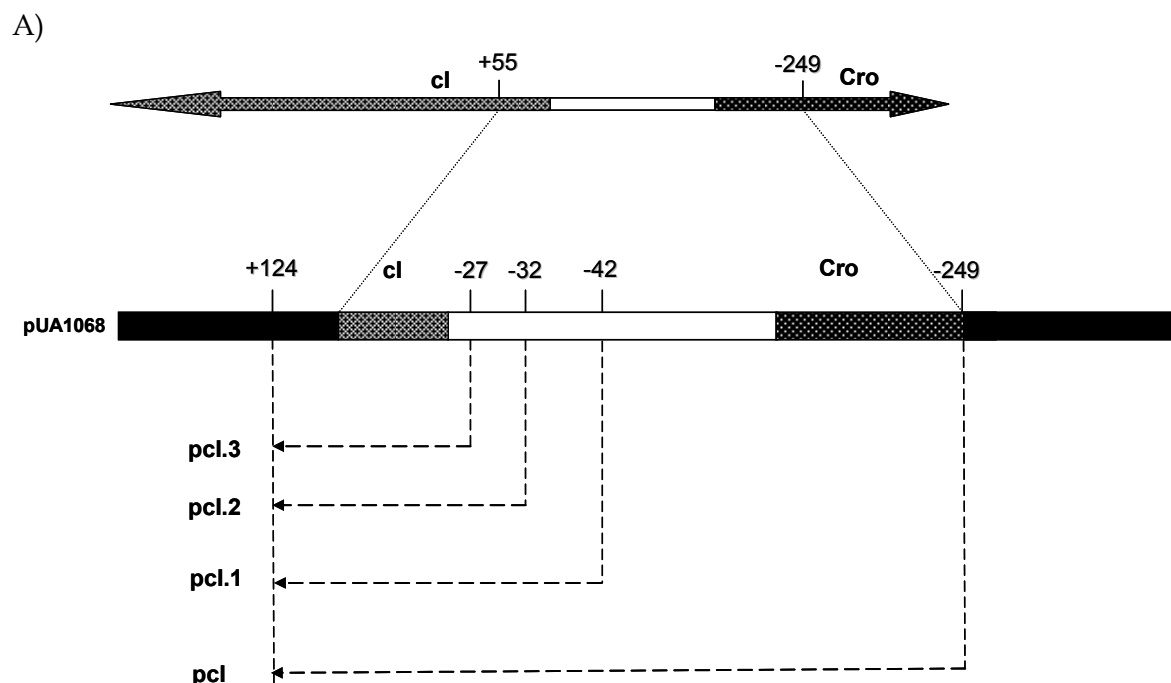


Figura 3.15. Esquema on es representen els diferents fragments amplificats de la regió reguladora utilitzats en els EMSA.

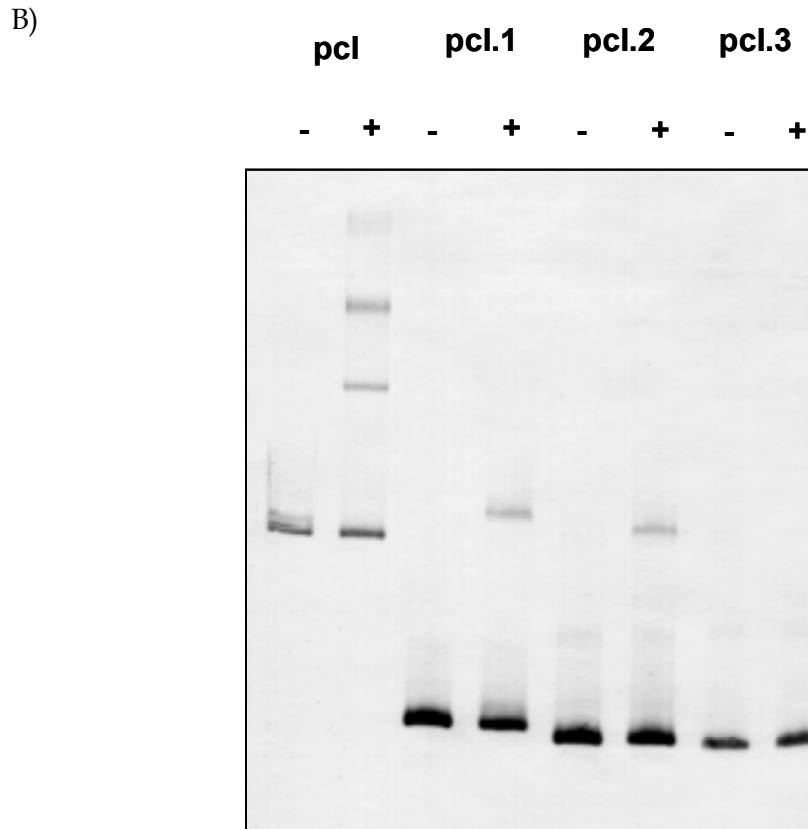


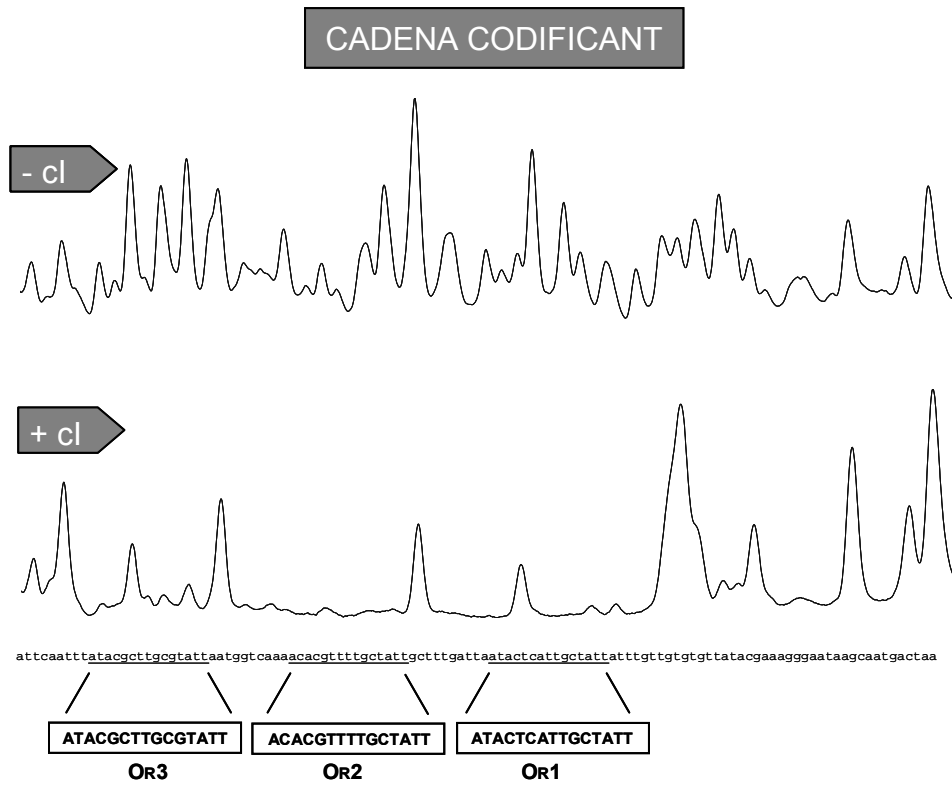
Figura 3.16. EMSA dels fragments pcl, pcl.1, pcl.2 i pcl.3 en presència (+) i en absència (-) de 80 ng de proteïna cI del fag SE1.

Els resultats dels EMSA de la figura 3.16 evidencien que es perdia la unió al fragment pcl.3, és a dir, que és necessària la seqüència compresa entre el fragment pcl.2 i pcl.3. La regió d'unió es troba entre aquests dos fragments.

3.3.3.4. Assaig de protecció de la DNAsaI o *footprinting* de la regió reguladora per part de la proteïna cI del bacteriòfag SE1

A fi d'identificar les seqüències d'unió de la proteïna cI al DNA es van fer els assaigs de protecció de la DNAsaI o *footprinting* utilitzant dos fragments que comprenen la regió reguladora completa i proteïna (800 mM) (figura 3.17). Per obtenir aquests fragments s'utilitzaren els oligonucleòtids Reverse-Cy5 i pclSE1up (taula 2.3) per amplificar la cadena codificant, els oligonucleòtids Direct-Cy5 i Reverse (taula 2.3) per amplificar la cadena no codificant, i el plasmidi pUA1068 (taula 2.2) com a motlle.

A)



B)

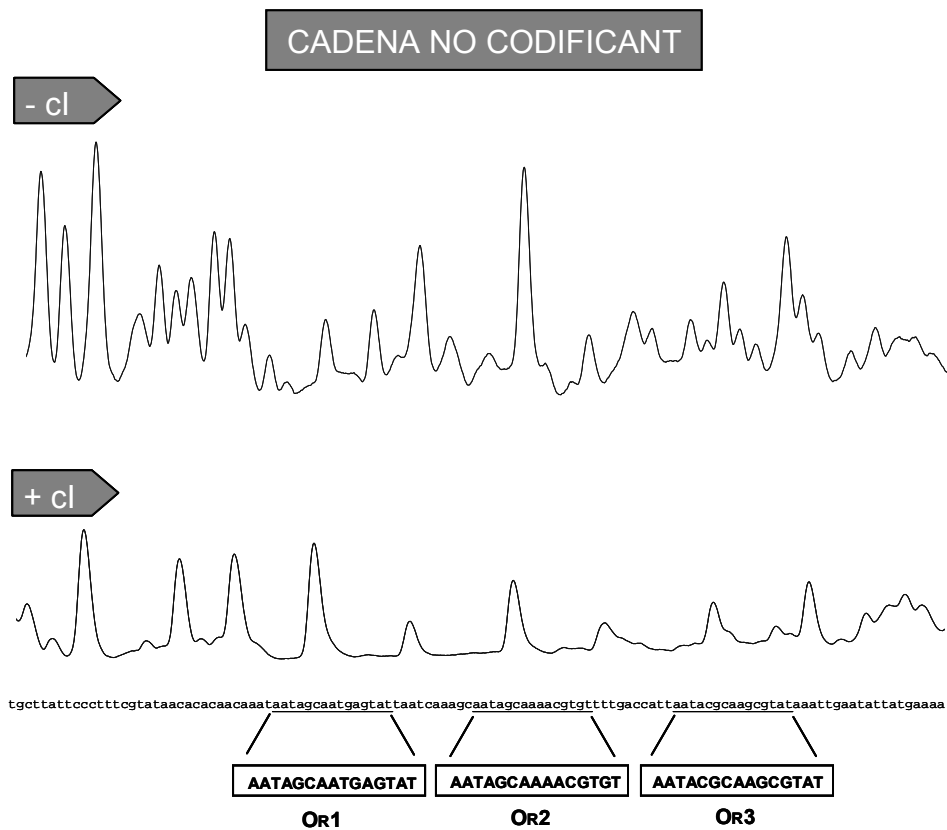


Figura 3.17. Assaigs de protecció enfront de la digestió per la DNaseI o *footprinting*. A) Utilitzant la cadena codificant. B) Utilitzant la cadena no codificant. Ambdós fragments contindrien la regió reguladora de l'interruptor gènic marcat amb Cy5 en absència (-cl) i en presència de proteïna (+cl). Tos tres operadors protegits es troben emmarcats.

En aquests assaigs EMSA es va procedir a determinar amb més precisió les bases importants de la unió amb *cI*, incorporant diferents mutacions als diversos oligonucleotids utilitzats per amplificar els promotors mutants. Les amplificacions es van fer per PCR, utilitzant com a motlle el plasmidi pUA1068 (taula 2.2) i els oligonucleòtids següents: Mut1pcISE1, Mut2pcISE1, Mut3pcISE1, Mut4pcISE1, Mut5pcISE1, Mut6pcISE1, Mut7pcISE1, Mut8pcISE1, Mut9pcISE1, Mut10pcISE1 i Mut11pcISE1 (taula 2.3). Es van mutar tots cinc nucleòtids entre la regió -32 i -27, posteriorment, es varen mutar nucleòtids de 2 en 2 fins a la posició -11 i, finalment, es va fer una mutació puntual en la posició -13 per conèixer el límit concret de la seqüència de l'*O_{R3}*, substituint cada nucleòtid per una guanina i en el cas que la substitució fos d'una guanina es va canviar per una citosina (figura 3.18).

L'operador *O_{R3}* està format per 15 nucleòtids i se situa entre les posicions -13 i -27 respecte el codó d'inici de traducció del gen *cI*. Tot i que les bases localitzades entre la posició -27 i -32 són necessàries per a la interacció DNA-proteïna (figura 3.16), el tipus de nucleòtid present en aquestes bases no seria rellevant per la unió.

3.3.3.6. Caracterització de la seqüència consens dels operadors del interruptor genètic

A partir de les seqüències obtingudes en la regió reguladora de la dreta, es van buscar per homologia els tres possibles operadors de l'esquerra en la seqüència promotora del gen *24*. Només es van trobar dues seqüències operadores similars a les obtingudes en el promotor del gen *24*, l'*O_{L1}* i l'*O_{L2}* estan situats en les posicions -220 i -245 respecte el codó d'inici de traducció del gen *24*. Aquestes seqüències també es troben separades per 10 nucleòtids, tal com vàrem obtenir en els de la dreta.

El bacteriòfag SE1 no seria l'únic que no presenta els tres operadors de l'esquerra, ja que el bacteriòfag 933W (Plunkett *et al.*, 1999) i l'H19B (Neely i Friedman, 1998) només tenen l'*O_{L1}* i el bacteriòfag D3, tal com passaria al fag SE1 li falta l'operador *O_{L3}* (Farinha *et al.*, 1994).

Els operadors de l'esquerra no es troben implicats en cap funció de canvi o *switch* entre dos promotors orientats de manera divergent, com seria el cas dels operadors de la dreta; per tant, semblaria ser un operador ordinari controlant només un promotor, i no seria intrínsecament necessari tenir més d'un lloc operador (Fattah *et al.*, 2000). Així, el fag SE1 tindria dos operadors, i no tres com la majoria dels fags lambdoides. Es podria

produir l'octamerització de la proteïna cI, però no es produiria la interacció entre les proteïnes unides als operadors O_{R3} i O_{L3} . Aquests diferents casos d'absència d'operadors esquerres podrien representar una divergència evolutiva del regulador o interruptor genètic dels bacteriòfags.

Per trobar la seva seqüència consens dels cinc operadors es va fer un alineament entre ells utilitzant el programa Clustalw i, posteriorment, a fi de visualitzar millor la seqüència consens es va fer un esquema representatiu dels operadors utilitzant el programa Weblogo (Crooks *et al.*, 2004) (figura 3.19).

OL2	A	T	A	C	G	T	T	T	G	C	T	A	T	T	15
OR2	A	C	A	C	G	T	T	T	T	G	C	T	A	T	15
OR1	A	T	A	C	T	C	A	T	T	G	C	T	A	T	15
OR3	A	T	A	C	G	C	T	T	G	C	G	T	A	T	15
OL1	A	T	A	G	C	A	T	T	G	A	G	T	A	T	15

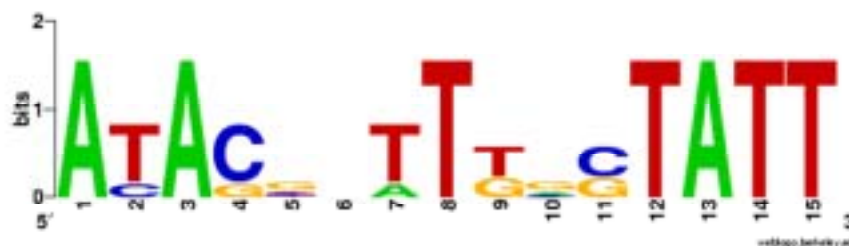


Figura 3.19. Alineament i seqüència consens de les seqüències de tots cinc operadors.

Per poder analitzar la simetria dels llocs d'unió es van alinear les seves seqüències dividint-les en dues parts iguals i, posteriorment, per visualitzar millor la conservació nucleotídica de les posicions dins de les seqüències d'unió es va fer l'esquema utilitzant el programa Weblogo (Crooks *et al.*, 2004) (figura 3.20).

Els llocs d'unió són gairebé simètrics, encara que cap d'ells no presenta un palíndrom amb simetria perfecta (figura 3.20.A). Aquesta simetria seria equivalent a la resultant de la dimerització de les proteïnes cI i Cro. Com s'observa a la figura 3.20B les bases externes i la timina central són les més conservades.

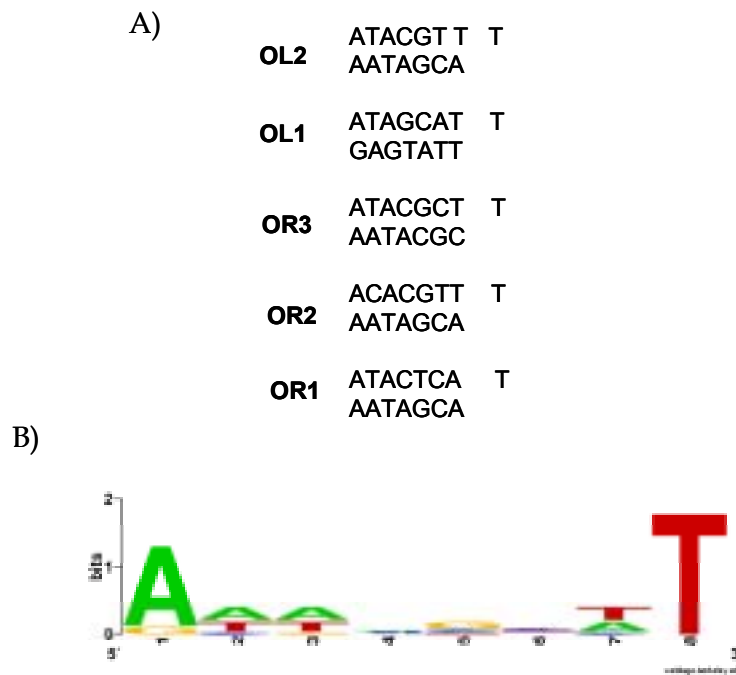


Figura 3.20. A) Esquema on hi ha representada la simetria dels operadors per la proteïna cI del fag SE1. B) Esquema representatiu de la conservació de les posicions i de la simetria de les seqüències d'unió de les seqüències operadores.

3.3.4. Comparació de la proteïna cI del fag SE1 i els seus operadors respecte altres bacteriòfags relacionats

Es va fer un alineament dels repressors de tots els fags relacionats per homologia amb el bacteriòfag SE1 utilitzant el programa ClustalW i es va construir un arbre filogenètic mitjançant el programa Treeview, on es trobaven tots ells representats (figura 3.21).

En l'alineament es va poder observar que el repressor del fag ST104 és idèntic al del bacteriòfag SE1. La proteïna cI del fag SE1 es troba relacionada filogenèticament amb la proteïna repressora de bacteriòfag HK022, amb la del fag ST64B i amb les proteïnes repressores dels fags D3 i D3112. Tanmateix, la proteïna cI del fag SE1 es troba distant, filogenèticament, de les proteïnes reguladores dels fags P22 i ES18, ambdues gairebé idèntiques (Shicklmaier i Schmieger, 1997), i distant també de la del fag ST64T, la qual és idèntica a la del fag L. Caldria destacar la gran distància trobada entre el fag SE1 i els fags P22 i ST64T, ja que aquests últims comparteixen moltes altres proteïnes amb el fag SE1.

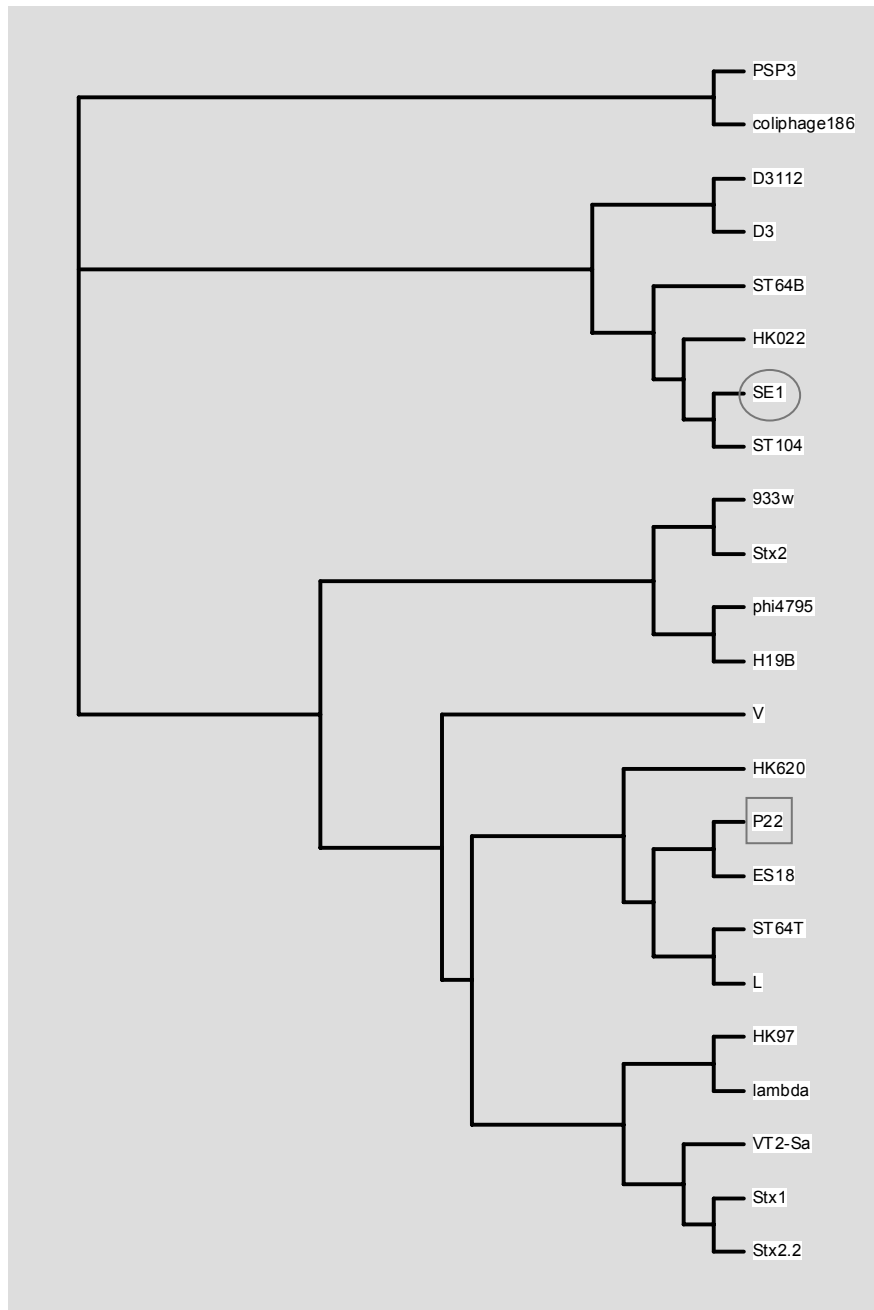


Figura 3.21. Arbre filogenètic on hi ha representades les proteïnes repressores del cicle lític dels bacteriòfags relacionats amb el fag SE1.

Respecte els fags més propers filogenèticament, pel que fa a la proteïna reguladora *cI*, seria destacable la diversitat d'hoste. El bacteriòfag HK022 és un fag que infecta *E. coli*; l'ST64B és un fag defectiu de *Salmonella*, incapaç de produir calves com a conseqüència d'una deficiència en l'expressió de les proteïnes de la cua, i és un clar mosaic genètic que ha adquirit moltes porcions del seu genoma de fora del gènere de *Salmonella* (Mmolawa *et al.*, 2003b). El bacteriòfag D3 és un fag que infecta *Pseudomonas*. És el primer fag fora de la família *Enterobacteriaceae* que clarament mostra una relació

filogenètica amb membres del grup lambdaoide, trobant-se altament relacionat amb el fag HK022. *Escherichia* i *Pseudomonas* ambdós pertanyen a la subdivisió Gamma dels Proteobacteris (Stackebrandt *et al.*, 1988). Des d'una perspectiva ecològica, es van poder aïllar *Pseudomonas* del rumen, tot i ser microorganismes del sòl, aquest fet explicaria que hi hagi un intercanvi potencial de DNA a través de la transformació natural (Kropinski *et al.*, 2000).

La semblança de la proteïna cI del fag SE1 amb fags tan diversos mostra, una vegada més, el mosaïcisme genètic dels bacteriòfags i, concretament, del fag SE1. L'origen d'aquest seria atribuïble a la sobreinfecció de les cèl·lules hostes comunes per fags diferents o per transformació natural de DNA fàgic i posterior recombinació amb genomes profàgics residents, resultant així que fags no relacionats filogenèticament pel seu hoste posseïxin gens homòlegs.

La proteïna cI del fag HK022 presenta un efecte cooperatiu molt elevat d'unió als tres operadors de la dreta (Carlson i Little, 1993). No es va poder observar aquest efecte tan pronunciat en la proteïna cI del fag SE1 (figura 3.14), possiblement a causa de la diferència entre les seqüències nucleotídiques dels operadors i entre les seqüències aminoacídiques de les hèlixs de reconeixement entre tots dos bacteriòfags, o bé simplement, perquè la purificació de la proteïna cI del fag SE1 va provocar que part de la fracció proteica no fos funcional.

Es va fer un alineament dels extrems N-terminal dels repressors més propers filogenèticament a la proteïna cI del fag SE1 per poder observar les semblances i diferències entre les hèlixs de reconeixement d'aquestes proteïnes (figura 3.22)

	Hèlix 2	gir	Hèlix 3	
SE1	Q G A L A K A S	G V A Q P T	I W R L T S	20
ST104	Q G A L A K A S	G V A Q P T	I W R L T S	20
ST64B	I A E L A E A I	G V D A A N	I S R L E T	20
D3	Q A Q L A Q R V	G L D Q T S	I S N L E Q	20
HK022	Q A D L A V R L	K V T P K A	I S K W F N	20

Figura 3.22. Alineament dels extrems N-terminal dels repressors dels fags SE1, ST104, HK022, ST64B i D3. Hi ha representades les dues hèlixs de reconeixement i el gir que hi ha entre elles.

Es va poder observar que les hèlixs de reconeixement del fag SE1 i ST104 són idèntiques i, per tant, com que la seqüència promotora del repressor del fag ST104 és la

mateixa que la del fag SE1, les seqüències de DNA a la qual es deu unir el repressor del fag ST104 haurien de ser les mateixes seqüències operadores del fag SE1. Per tant, els fags SE1 i ST104 tindrien la mateixa immunitat específica i aquesta diferiria amb la dels altres bacteriòfags. D'altra banda, les hèlixs de reconeixement dels altres bacteriòfags són diferents, tot i que es conserven alguns aminoàcids, aquests podrien ser els responsables de la unió a les possibles bases conservades dels operadors dels diferents bacteriòfags.

Per discriminar les bases dels operadors conservades de les que no ho estan, es van fer alineaments entre els operadors del fag SE1 i els descrits per HK022, també de 15 nucleòtids (Oberto *et al.*, 1989) i per D3, de 14 nucleòtids i amb la mateixa distància (10 nucleòtids) de separació entre les seqüències operadores que entre les del fag SE1 i també amb l'absència de l'operador OL1 (Farinha *et al.*, 1994) (figura 3.23).

A)

OR3HK022	TG A ACCA T AA G TTCA	15
OR1HK022	TG A ACCA T AA G TTCA	15
OR2HK022	TG T ACTAT C AGTTCC	15
OL1HK022	TG A ACTT T AA G TACA	15
OL2HK022	TG T ACTAT T GGTACT	15
OL3HK022	TG A GC T TTT T ATACC	15
OL2SE1	AT A CGTT T TGC T ATT	15
OR2SE1	AC A CGTT T TGC T ATT	15
OR1SE1	AT A CTCA T TGC T ATT	15
OL1SE1	AT A GCAT T GAG T ATT	15
OR3SE1	AT A CGCT T GCG T ATT	15

B)

OL2D3	AT G GG G AAACT C AT	- 14
OL1D3	AT G AGCA A TCT C AT	- 14
OR3D3	AT G GG G CACT C CCAT	- 14
OR2D3	AT G AGTA T TCC C AT	- 14
OR1D3	AT G AGTA T TCC C AT	- 14
OL2SE1	AT A CGTT T TGC T ATT	15
OR2SE1	AC A CGTT T TGC T ATT	15
OR1SE1	AT A CTCA T TGC T ATT	15
OL1SE1	AT A GCAT T GAG T ATT	15
OR3SE1	AT A CGCT T GCG T ATT	15

Figura 3.23. A) Comparació dels operadors dels fags SE1 i HK022. B) Comparació dels operadors dels fags SE1 i D3.

Amb les dades obtingudes d'aquests alineaments caldria destacar la conservació de la timina central en la posició 8 i la timina en la posició 12 en els fags SE1 i HK022. Semblaria que aquests dos nucleòtids tindrien importància en aquesta unió proteïna reguladora-operador. Caldria destacar, també, el manteniment de les adenines de les posicions 3 i 13. En l'alineament dels operadors dels fags D3 i SE1 es conserven les adenines de les posicions 1 i 13, i hi ha un cert manteniment de les timines en les posicions 2, 8 i 9, i la guanina de la posició 5. Tanmateix, aquests alineaments mostrarien la divergència evolutiva d'aquests bacteriòfags, tot i mantenir algunes bases conservades.

3.4. Caracterització del gen *orf23* del bacteriòfag SE1

3.4.1. Anàlisi transcripcional del gen *orf23*

El gen *orf23* del bacteriòfag SE1 presenta homologia amb el gen *cII* del retrofag phi R73 (61%) i amb l'*orf317* del bacteriòfag Pf1 de *Pseudomonas* (46%), el producte del qual és una possible proteïna reguladora semblant a les proteïnes Soj i ParA (taula 3.1). Per tant, aquest gen seria un bon candidat per presentar alguna funció reguladora en el bacteriòfag SE1.

Aquest gen es troba, concretament, entre el gen *24*, que codifica per a la proteïna antiterminadora 24, i els gens *orf24*, de funció desconeguda, i *cI*, que codifica la proteïna reguladora cI, repressor del cicle lític. És a dir, es troba proper al regulador o interruptor genètic i als gens que pertanyen al mòdul de regulació.

Es van dissenyar els oligonucleòtids cISE1up, cISE1dw, Orf24SE1up, Orf24SE1dw, Orf23SE1up, Orf23SE1dw i 24SE1dw (taula 2.3) per poder realitzar diverses RT-PCRper analitzar si l'*orf23* forma part de la mateixa unitat transcripcional que el repressor cI (figura 3.24A).

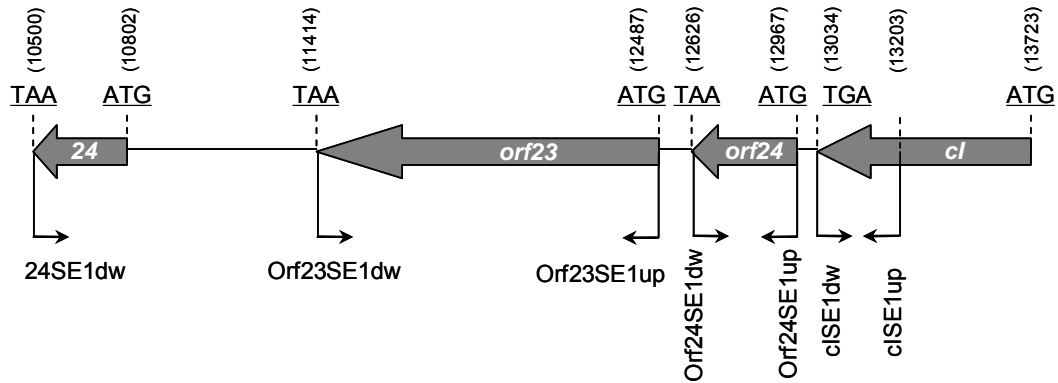
Primerament, es va extraure l'RNA d'un cultiu d'una soca lisogena pel fag SE1 (UA1829) (taula 2.1) en estat exponencial, utilitzant el kit *RNeasy[®]Mini* (QUIAGEN), es quantificà l'RNA obtingut (300 ng/μl) i es va fer un tractament amb DNaseI a fi d'eliminar les restes de DNA. Seguidament, es realitzà una PCR utilitzant els primers cISE1up i cISE1dw (taula 2.3) per comprovar que no hi quedaven restes de DNA a la mostra obtinguda de l'extracció RNA.

Una vegada comprovada la puresa de l'extracció d'RNA es procedí a la realització de les RT-PCR, utilitzant els oligonucleòtids prèviament dissenyats i, com a motlle, l'RNA extret. Com a control, es feren també les PCR corresponents als mateixos fragments amplificats per RT-PCR, utilitzant els mateixos oligonucleòtids i com a motlle el DNA fàgic (figura 3.24B).

Es van poder observar fragments de cDNA amplificats provinents de l'expressió dels gens *orf23*, *orf24* i *cI*. S'observà amplificació a partir dels oligonucleòtids Orf24SE1up i Orf23SE1dw, la qual cosa indica que els gens *orf23* i *orf24* es transcriuen conjuntament,

i també s'observà l'amplificació conjunta dels gens *orf24* i *cl*. Tanmateix, no s'observà amplificació utilitzant els oligonucleòtids Orf23SE1up i 24SE1dw.

A)



B)

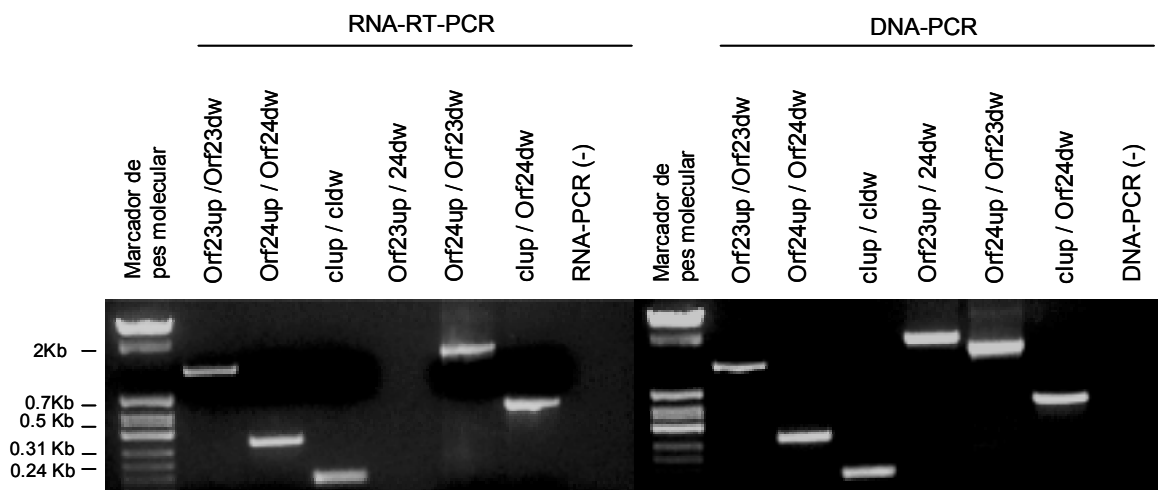


Figura 3.24. A) Esquema on hi ha representats els quatre gens de l'estudi transcripcional, els oligonucleòtids i les seves posicions en la seqüència genòmica del fag SE1. B) RT-PCR i PCR on hi ha marcats els oligonucleòtids utilitzats per a cada una d'elles. En cada cas hi ha un control negatiu (-) on no hi ha motlle. El marcador de pes molecular que es va utilitzar és una barreja de λ digerit amb l'enzim *Hind*III i ϕ X174 digerit amb *Hinf*I.

Amb les dades obtingudes en la figura 3.24B es conclou que el gen *orf23* forma part de la mateixa unitat transcripcional que els gens *cl* i *orf24*. Per tant, el gen *orf23* es transcriu juntament amb el repressor *cl* en l'estat de lisogènia. En aquesta unitat transcripcional no s'inclou el gen *24*; aquest es transcriuria a partir del promotor esquerre (P_1). A més, s'hi havia trobat un terminador transcripcional entre els gens *orf23* i *24* (taula 3.2); aquest seria responsable de la finalització de la transcripció.

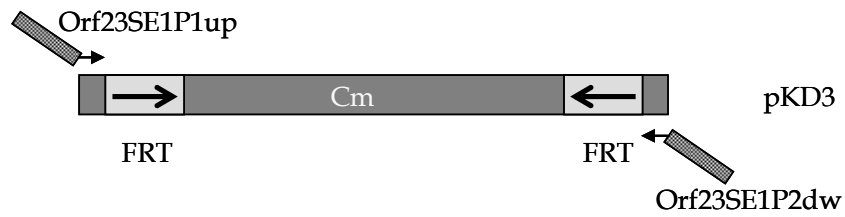
3.4.2. Construcció del mutant *orf23* del bacteriòfag SE1

Per poder observar quin podria ser el paper regulador del producte gènic Orf23 es va construir el mutant *orf23* del bacteriòfag SE1 (figura 3.25). Primerament, es van dissenyar els oligonucleòtids Orf23SE1P1up i Orf23SE1P2dw (taula 2.3) amb una cua de 50 nucleòtids amb homologia amb l'*orf23*, i s'amplificà amb ells la resistència a Cm i els FRT flanquejants del plasmidi pKD3. Es recuperà la banda obtinguda per PCR, i es tractà amb 1 µl l'enzim DpnI per degradar el possible DNA motlle restant. Seguidament, es va transformar el DNA purificat de la restricció a la soca UA1820 de *Salmonella*, prèviament construïda, lisogena per al fag SE1 i que conté el plasmidi pKD46 per electrotransformació (taula 2.1) (taula 2.2). Aquesta soca expressa el sistema de recombinació Red del fag λ per inducció amb arabinosa; sistema que permet la recombinació doble entre les seqüències homòlogues del gen *orf23*, incorporant així la *cassette* de resistència a Cm i els FRT adjacents, tot i substituint el gen *orf23*. Es va sembrar aquesta transformació en plaques d'LB amb Cm i s'incubaren a 37°C. Es feren cultius líquids de diferents clons obtinguts, que s'incubaren a 42°C per curar el plasmidi pKD46. Posteriorment, es van fer rèpliques dels clons resultants, en medi agar LB complementat amb Ap i LB complementat amb Cm a 42°C, a fi d'assegurar que el plasmidi pKD46 s'havia perdut i que se substituïa el gen desitjat per la resistència Cm flanquejada pels FRT.

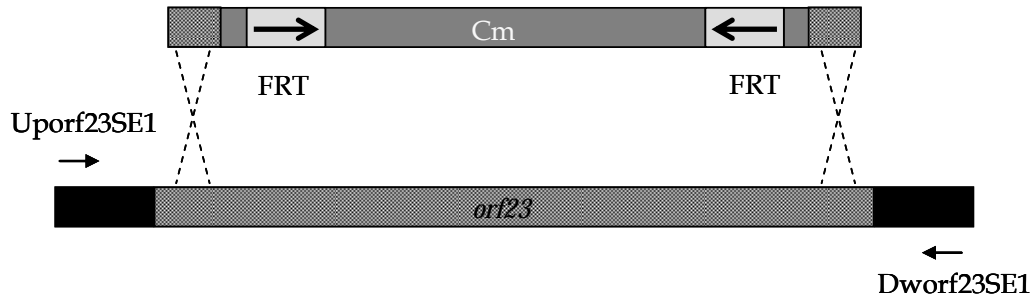
Els possibles mutants es van comprovar per PCR (figura 3.26), utilitzant oligonucleòtids externs a la regió substituïda (Uporf23SE1 i Dworf23SE1) i els oligonucleòtids (C1 i C2) interns de la *cassette* de resistència Cm^r (Taula 2.3).

Una vegada obtingut el mutant UA1821 (*orf23::Cm*) s'hi transformà el plasmidi pCP20 (taula 2.2), que expressa el sistema de recombinació FLP a 42°C, i es va fer créixer a aquesta temperatura per eliminar la *cassette* de resistència a Cm i el plasmidi pCP20, és a dir, curar el plasmidi i obtenir el mutant UA1822 Δ*orf23* (taula 2.3) (figura 3.27A). Aquest mutant es va comprovar per PCR utilitzant els encebadors externs a la regió substituïda (Uporf23SE1 i Dworf23SE1) (figura 3.26).

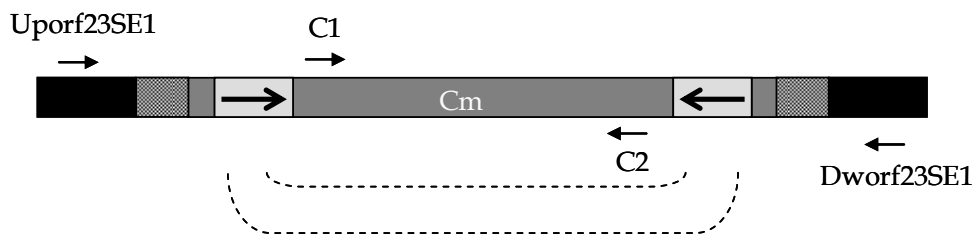
- 1) Amplificació del gen de resistència flanquejat per les seqüències FRT



- 2) Recombinació del sistema Red del λ del plasmidi pKD46 a la soca lisògena per al fag SE1



- 3) Obtenció del mutant lisogen SE1 *orf23::Cm*



- 4) Escissió de la *cassette* Cm per recombinació dels FRT pel sistema FLP contingut en el plasmidi pCP20. Obtenció del mutant lisogen per SE1 *orf23*.

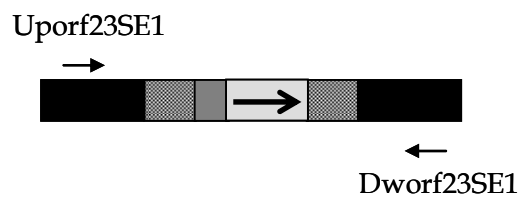


Figura 3.25. Esquema de la construcció del mutant defectiu per al gen *orf23*.

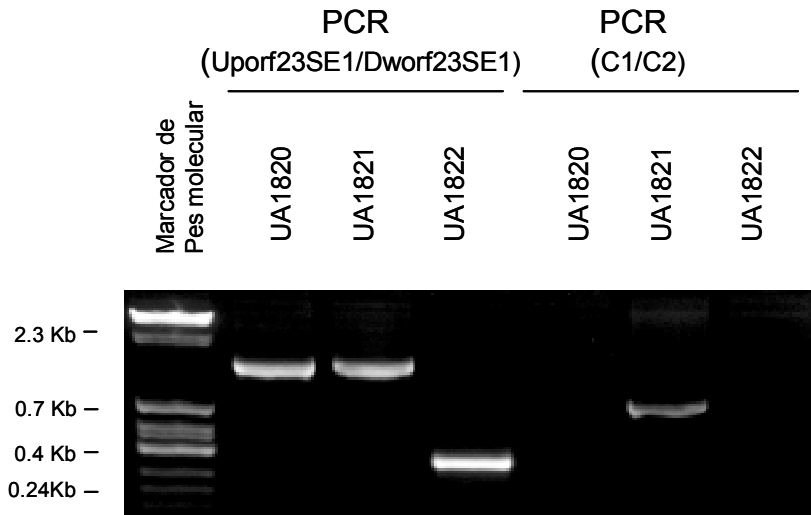


Figura 3.26. PCR de comprovació del mutant lisogen pel fag SE1 amb cassette i sense de resistència al Cm. La soca UA1820 és una soca lisogena per al fag SE1 wt, la soca UA1821 conté el fag SE1 *orf23::Cm* i la soca UA1822 conté el fag mutant $\Delta orf23$ (taula 2.1). El marcador de pes molecular que es va utilitzar és una barreja de λ digerit amb l'enzim *Hind*III i ϕ X174 digerit amb *Hinf*I.

Amb les PCR obtingudes vàrem comprovar que s'havia aconseguit fer el mutant amb cassette de resistència al Cm i sense. Les bandes de PCR obtingudes amb els oligonucleòtids externs (Uporf23SE1 i Dworf23SE1) en la soca lisogena per al fag SE1 wt i pel mutant lisogen SE1 *orf23::Cm* no varien gaire de grandària ja que s'havia realitzat una substitució del gen *orf23* per la *cassette* de resistència al Cm, i ambdós tenen una grandària similar. Tanmateix, es va poder observar la lògica disminució de la banda d'amplificació després de l'escissió de la *cassette*, i es va obtenir el mutant defectiu $\Delta orf23$. A més, tal com calia esperar, només es va poder observar amplificació amb els oligonucleòtids interns de la *cassette* (C1 i C2) en el mutant lisogen SE1 *orf23::Cm*, aquesta PCR confirmava que havíem aconseguit la soca lisogena per al fag SE1 mutant defectiu $\Delta orf23$.

3.4.3. Estudi del cicle lític dels bacteriòfags SE1 salvatge i el SE1 mutant *orf23*

Amb la finalitat de saber si la mutació en l'*orf23* afecta els paràmetres característics del cicle lític del fag SE1 es realitzaren diversos experiments basats en les tècniques de *One Step Growth* i *Doerman*, tant per al bacteriòfag SE1 salvatge com per al SE1 *orf23*, utilitzant mutants de calva clara per a tots dos tipus de bacteriòfag, és a dir, mutants incapaçs de fer cicle lisogènic.

Es feren tres assajos *One Step Growth* i *Doerman* per a dos mutants diferents, els resultats d'ambdós foren equivalents.

Amb els assajos *One Step Growth* es va poder determinar el nombre de fags produïts per cèl·lula (mida d'explosió) i el període de latència dels dos tipus de fags. A la figura 3.27 s'han representat només els resultats obtinguts en un dels assajos *One Step Growth* per un dels mutants.

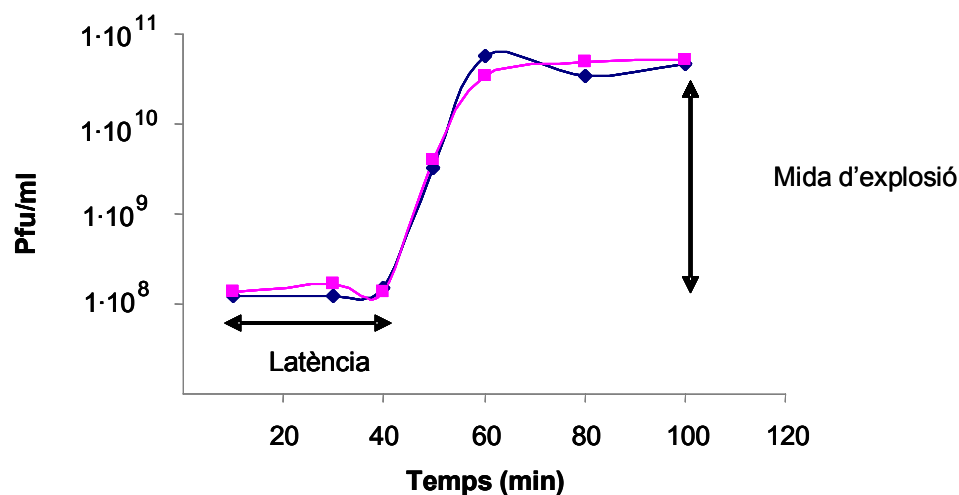


Figura 3.27. Representació gràfica de l'assaig *One Step Growth* de tots dos tipus de fags SE1 wt (—◆—) i SE1 *orf23* (—■—). Els valors de l'eix d'ordenades s'ha representat en escala logarítmica.

Les dades dels assaigs mostraven que la mida d'explosió d'ambdós tipus de fags (wt i *orf23*) era pràcticament idèntica, d'uns 330 bacteriòfags per cèl·lula, i el temps de latència per a ambdós també seria el mateix, 42 min. Per tant, no hi hauria afectació d'aquests paràmetres per part d'una mutació en el gen *orf23*, i es mantindrien com els ja caracteritzats anteriorment per al fag SE1 (Llagostera, 1983).

Els assajos de Doerman van permetre determinar el temps necessari per trobar partícules fàgiques actives al citoplasma de la cèl·lula infectada, és a dir, el temps d'eclipsi (figura 3.28).

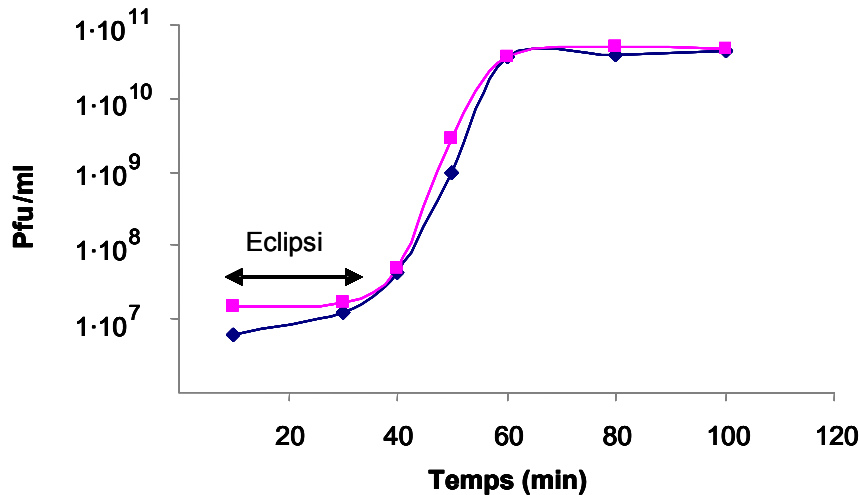


Figura 3.28. Representació gràfica de l'assaig *Doerman* dels dos tipus de fags SE1 wt (—◆—) i SE1 *orf23* (—■—). Els valors de l'eix d'ordenades s'ha representat en escala logarítmica.

Les dades que es varen obtenir dels assajos de *Doerman* mostraren que no hi havia variacions en els temps d'eclipsi entre tots dos tipus de fags, aquest temps es mantenia idèntic entre ells; per tant, la mutació en el gen *orf23* tampoc no afectaria aquest paràmetre.

El temps d'eclipsi era el característic per al fag SE1 (Llagostera, Tesi 1983), de 37 min per ambdós tipus de fag.

3.4.4. Anàlisi de l'efecte del mutant lisogen per SE1 *orf23* en l'establiment de la lisogènia

A causa de l'homologia trobada amb el gen *cII* del retrofag phi R73, profag que s'integra en el tRNA *selC* de *E. coli* (Sun *et al.*, 1991) que conté el retroelement Ec73 (Inouye *et al.*, 1991), es va fer un test de l'eficiència de lisogenització (Tokuno i Gough, 1975) per determinar la possible funcionalitat de proteïna Orf23 com a activador transcripcional (*cII*) del gen *cI* del bacteriòfag SE1.

El test d'eficiència de lisogenització va permetre analitzar la freqüència de la decisió entre lisi o lisogènia del bacteriòfag SE1 mutat *orf23* en el moment en què el fag infecta la cèl·lula (taula 3.6).

El test de lisogenització es repetí tres vegades i es van infectar cèl·lules de la soca salvatge ATCC14028 de *S. typhimurium* (a MOIs 1 i 10 aproximadament) amb dos mutants *orf23* diferents i fent 150 rèpliques en cada test. Els resultats que es varen obtenir dels dos mutants foren equivalents; per aquest motiu només s'han representat les dades d'un dels dos mutants. S'utilitzà com a control el bacteriòfag SE1 salvatge (wt).

Taula 3.6. Eficiència de lisogenització del bacteriòfag SE1 *orf23*.

Bacteriòfag	MOI ^a	Fracció infectada ^b	B ₀ /B ^c	Lisògens/ Colònies ^d	Freqüència de lisogenització ^e
Test 1					
SE1 wt	1,03	0,643	3,571	142/150	0,266
SE1 <i>orf23</i>	1,03	0,643	2,167	146/150	0,451
SE1 wt	10,03	0,999	1,841	147/150	0,530
SE1 <i>orf23</i>	10,03	0,999	2,532	150/150	0,394
Test 2					
SE1 wt	0,65	0,522	5,143	144/150	0,191
SE1 <i>orf23</i>	0,65	0,522	5,812	149/150	0,170
SE1 wt	6,57	0,991	5,051	142/150	0,187
SE1 <i>orf23</i>	6,57	0,991	5,021	148/150	0,196
Test 3					
SE1 wt	1	0,633	4,347	145/150	0,231
SE1 <i>orf23</i>	1	0,633	2,919	150/150	0,342
SE1 wt	10	0,999	3,703	150/150	0,272
SE1 <i>orf23</i>	10	0,999	2,61	147/150	0,383

^a Concentració de fags/ concentració de bacteris.

^b Fracció infectada: $1 - P_0$, on P_0 es la població no infectada a $MOI = m$. $P_0 = e^{-m}$.

^c B₀/B és la relació entre les cfu abans i després de la infecció. Corregeix els bacteris infectats que s'han lisat i no han estat comptats en les cfu, és a dir, en els quals el fag s'ha decidit pel cicle lític, i no pel cicle lisogènic.

^d Determinat com està descrit a Materials i mètodes.

^e L'eficiència de lisogenització es defineix com a lisògens / CFU × B₀/B.

No s'observaren diferències entre les eficiències de lisogenització dels fags SE1 wt i SE1 *orf23*. Per tant, les dades obtingudes en el test de la lisogenització indicarien que el gen *orf23* no afectaria la decisió del bacteriòfag entre lisi i lisogenia i, per tant, no tindria la funció activadora del *cII*. De fet, en l'article on es fa referència al gen *cII* del retrofag phi R73 (Sun *et al.*, 1991) s'indica que la similitud d'aquest a un activador transcripcional *cII* és inferior al 5%, segurament, tot i el nom d'aquest gen en el retrofag phi R73, aquesta no tindria la funció típica d'activador transcripcional. I d'altra banda, el gen *cII* de *Xanthomonas campestris*, al qual es va trobar també homologia amb el gen *orf23* dels fag SE1, possiblement va ser anomenat així per homologia al gen *cII* del retrofag phi R73 en el moment de seqüenciar-lo i anotar-lo (da Silva *et al.*, 2002).

3.4.5. Anàlisi de la integració del bacteriòfag SE1

El gen *orf23* del bacteriòfag SE1 presenta homologia amb una possible proteïna reguladora semblant a les proteïnes Soj i ParA; ambdues pertanyen a la superfamília ATPases involucrades en la partició cromosòmica.

Els gens *parA* i *parB* no es troben en tots els cromosomes; és possible que el seu paper sigui auxiliar i que existeixin camins alternatius per a la partició cromosòmica. La parella de gens *parA* i *parB* són codificats per plasmidis amb un baix nombre de còpies, per alguns bacteriòfags que no s'integren al genoma bacterià i per cromosomes bacterians, a excepció d'alguns bacteris entèrics com *E. coli* i *S. typhimurium*. Les proteïnes codificades per aquests gens treballen en *cis* amb una o més seqüències anomenades *centromere-like* (ParS) per assegurar la bona partició predivisional de la molècula de DNA que els codifica. Les seqüències *centromere-like* uneixen suficient proteïna que permet la seva visualització per microscòpia d'immunofluorescència, normalment es troben en els complexos proteics de l'*oriC* (Bignell i Thomas, 2001).

Fins ara, només s'havia trobat la proteïna ParA, que pertany a aquesta superfamília, en bacteriòfags que no s'integren al cromosoma de la cèl·lula hoste, és a dir, que es mantenen com a profags fora del genoma bacterià durant les successives divisions cel·lulars, replicant-se com els plasmidis. Aquest bacteriòfags tenen l'operó *parAB*, responsable del manteniment dels genomes fàgics mitjançant la polarització d'aquests a la cèl·lula en divisió; així n'eviten la pèrdua (Surtees i Funnell, 2003). A més, la proteïna ParA és un repressor dimèric que s'autoregula, és a dir, inhibeix la

transcripció del seu propi promotor. Són clars exemples d'aquest tipus de fags, el P1 i el P7 d'*E. coli* (Radnedge *et al.*, 1998 i Lobočka *et al.*, 2004) o el fag LE1 que infecta *Leptospira biflexa* (Girons *et al.*, 2000). També ho és el fag N15 d'*E. coli* que es manté de manera lineal, on se suggeriria que el sistema de partició provinent de l'operó *parAB* d'aquest fag podria controlar l'expressió de les funcions lítiques (Grigoriev i Lobočka, 2001).

Per confirmar que el bacteriòfag SE1, que posseeix els gens d'integració i escissió típics dels fags lambdoides, s'integra en el genoma al cromosoma bacterià, es va fer una anàlisi del lloc d'inserció del genoma del bacteriòfag SE1 (*attP*) i del lloc on s'insereix en el genoma de l'hoste (*attB*).

El mòdul d'integració del bacteriòfag SE1 és altament similar al del bacteriòfag P22 (figura 3.4). Es va fer una cerca per similitud utilitzant el programa bl2seq (NCBI) entre aquests dos bacteriòfags i es trobà que el possible lloc *attP* del bacteriòfag SE1 se situaria a l'extrem 3' del gen *int* i contindria el seu codó STOP. S'alineà aquest dos *attP* utilitzant el programa ClustalW i s'assenyalà els llocs d'unió de les proteïnes Int i IHF (figura 3.29).

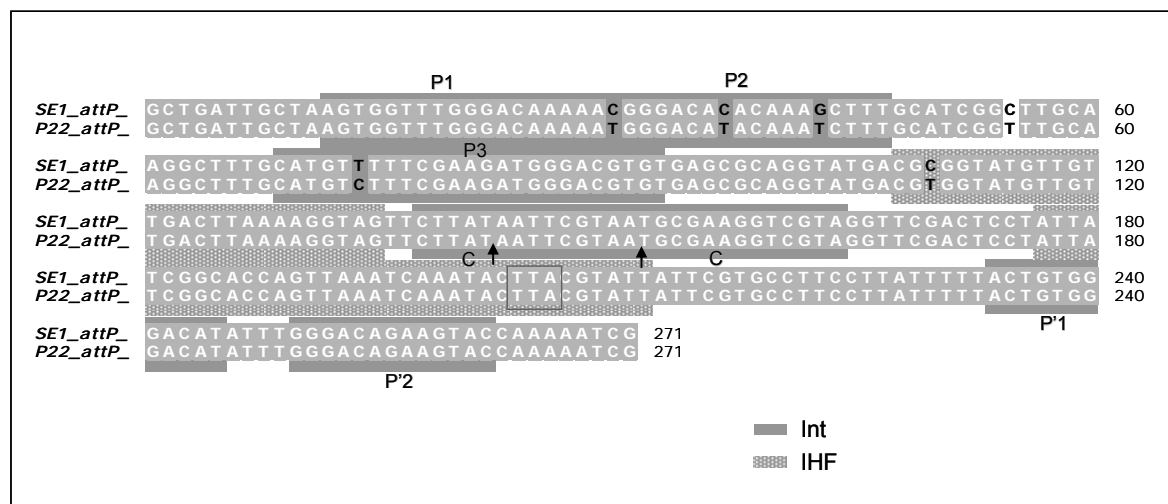


Figura 3.29. Alineament dels *attP* dels bacteriòfags SE1 i P22. Es troben assenyalades per homologia les regions protegides per les proteïnes Int i IHF contra la restricció de la DNAsaI, els llocs d'unió de la integrasa als braços i al cor de la regió s'han anomenat P i C respectivament, i els llocs de tall per part de la integrasa s'han assenyalat amb una fletxa. S'ha emmarcat el codó STOP del gen de la integrasa.

Aquesta comparativa mostra la gran similitud entre l'*attP* del fag P22 i de l'hipotètic *attP* del fag SE1.

En el cas del bacteriòfag P22, la seqüència del lloc d'inserció en el cromosoma bacterià de *S. typhimurium* es troba en el gen molt conservat *thr-w tRNA*, l'anticodó d'aquest tRNA comprèn la major part del nucli de l'*attB* (Smith-Mungo *et al.*, 1994).

Per determinar si el bacteriòfag SE1 s'integra al cromosoma bacterià i si els *attB* i *attP* del bacteriòfag P22 i SE1 són equivalents, es van dissenyar tres oligonucleòtids per amplificar per PCR el lloc d'integració. Dos oligonucleòtids (*thrup* i *thrdw*) (taula 2.3) amb els quals es va amplificar una regió que comprèn el gen *thr-w tRNA*, i un oligonucleòtid intern del gen *int* del bacteriòfag SE1 (*intSE1up*) (taula 2.3), amb el qual es va poder amplificar juntament amb l'oligonucleòtid *thrup* el lloc d'integració del bacteriòfag SE1, utilitzant com a motlle el DNA cromosòmic d'una soca de *S. typhimurium* lisogena per al fag SE1 (UA1770) i com a control negatiu el d'una de no lisogena per al fag SE1 (UA1820) (taula 2.1) (figura 3.30).

Es va poder observar que hi havia banda d'amplificació quan s'utilitzaven els oligonucleòtids que amplifiquen la regió del gen *thr-w tRNA*, tant en la soca salvatge com en la lisogena, tot i que en aquesta la banda fos més tènue. El fet que hi hagués amplificació en la mostra de DNA cromosòmic de la soca salvatge és el control positiu de la PCR, ja que tots dos oligonucleòtids van ser dissenyats per amplificar aquest gen; tanmateix, la banda de menor intensitat que s'observa en la soca lisogena per al fag SE1 seria el resultat de l'amplificació del DNA cromosòmic de les cèl·lules on s'ha escindit el bacteriòfag per donar lloc a cicle lític. Tot i que aquestes cèl·lules es lisen, el seu cromosoma queda intacte i pot ser usat com a motlle i amplificat per PCR. Aquest fet ha estat descrit en altres situacions (Úbeda *et al.*, 2005).

La PCR amb un oligonucleòtid del genoma bacterià i un de pertanyent al fag, va permetre observar una única banda d'amplificació de la grandària esperada, aproximadament d'1,3 kb, en la soca lisogena. L'olionucleòtid de la integrasa vírica és capaç d'hibridar i amplificar juntament amb el de l'hoste, a diferència de la mostra on hi ha el DNA cromosòmic de la soca salvatge que no conté el DNA víric (figura 3.30). Aquestes PCR demostrarien que el fag SE1 s'integra en el cromosoma de *S. typhimurium*, i que, a més, comparteix els mateixos llocs d'inserció que el fag P22, tant en l'hoste (*attB*) com en el fag (*attP*).

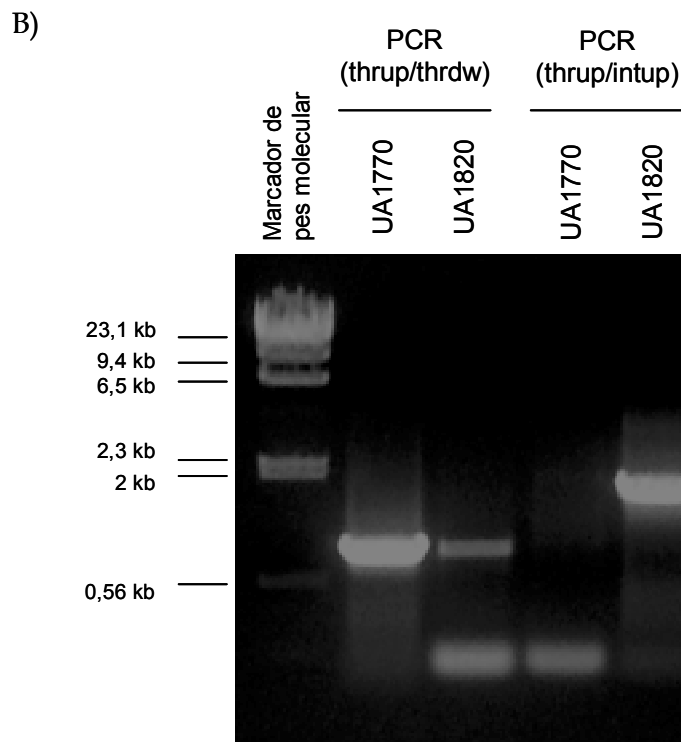
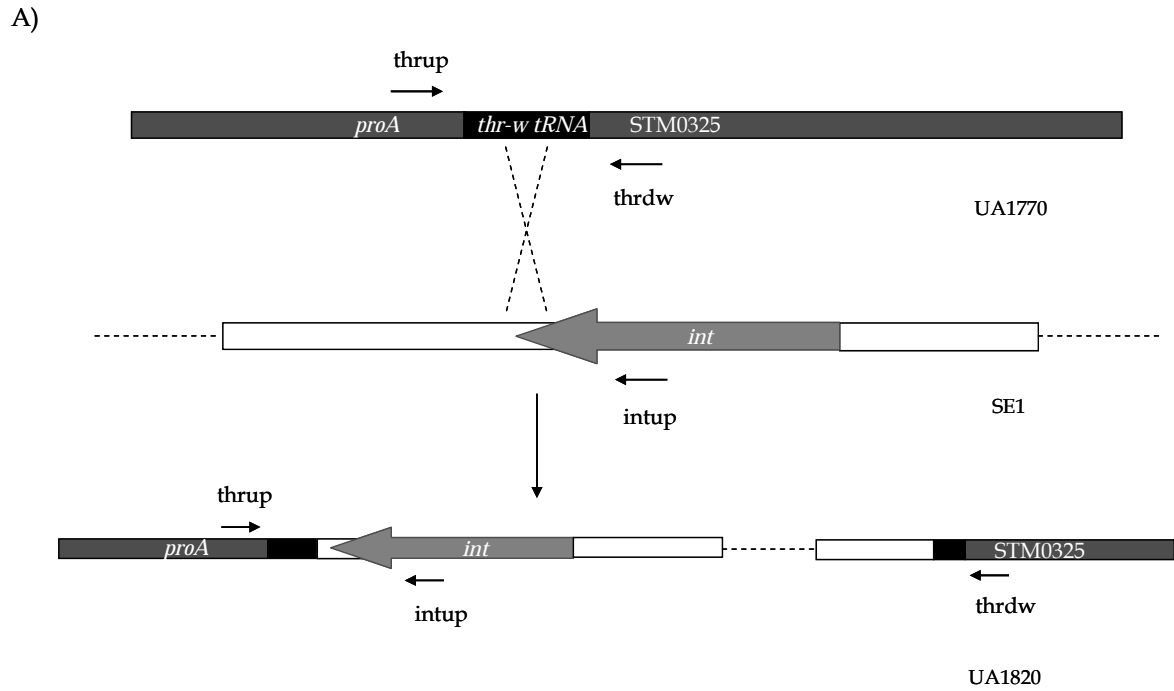


Figura 3.30. A) Esquema del possible *attB* en el gen *thr-w tRNA* del cromosoma de *S. typhimurium* i l'hipotètic *attP* per al bacteriòfag SE1 proper a la seva integrasa i del procés d'integració, on hi han representats els oligonucleòtids que es van utilitzar per les PCR de comprovació de la integració del fag SE1. B) PCR de la comprovació de la integració del fag SE1, com a control es va utilitzar la soca UA1770, soca no lisogena de *S. typhimurium* i com a soca lisogena per al fag SE1 es va utilitzar la soca UA1820 (taula 2.1).

Aquests resultats demostren que el bacteriòfag SE1 seria el primer bacteriòfag temperat caracteritzat que s'integra al genoma del seu hoste, i que posseeix una proteïna similar a les de la família de les ATPases relacionades amb la partició del DNA.

3.4.6. Anàlisi de l'efecte del mutant lisogen per SE1 *orf23* en el manteniment de la lisogènia

Per saber si la proteïna Orf23 intervé en el manteniment del cicle lisogènic del bacteriòfag es van calcular les freqüències d'inducció espontànies, és a dir, el nombre de bacteriòfags produïts per una soca lisogena amb relació al nombre de cèl·lules formadores de colònies, tant de la soca lisogena per al bacteriòfag SE1 salvatge (UA1770) com de la soca lisogena per al bacteriòfag SE1 mutant pel gen *orf23* (UA1820). Es feren recomptes de viables i d'unitats formadores de calves, tot i prenent mostres a diferents temps durant el creixement cel·lular de les soques lisogenes. Aquests experiments d'inducció espontània es van repetir tres vegades per a dos mutants diferents, i ambdós resultats foren equivalents. Només s'han representat els resultants d'un dels dos mutants (figura 3.31).

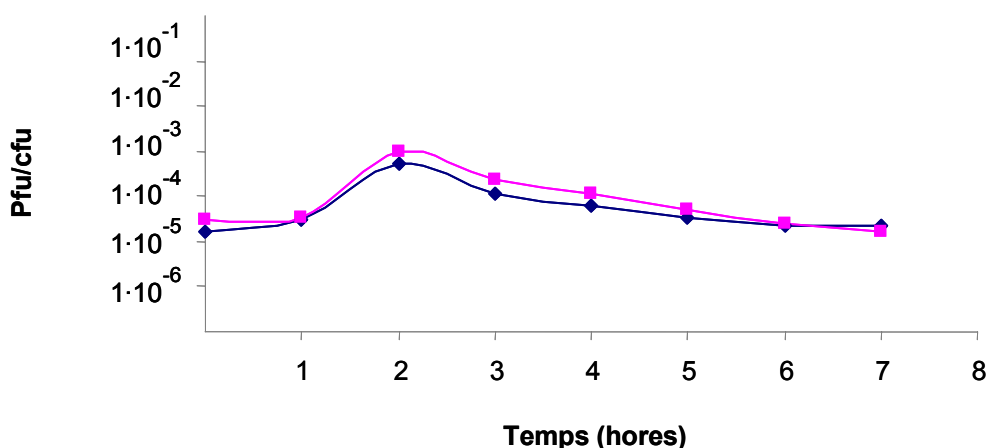


Figura 3.31. Representació gràfica de les freqüències d'inducció espontànies dels bacteriòfags SE1 wt (—◆—) i SE1 *orf23* (—■—). Els valors de l'eix d'ordenades s'han representat en escala logarítmica.

Amb les dades obtingudes es pot afirmar que les freqüències d'inducció espontànies per a ambdós tipus de bacteriòfag són iguals, i es troba un punt màxim d'inducció espontània per a tots dos després de dues hores que es fes la ressembla, per tant, al principi de la fase exponencial, caracteritzat ja per aquest bacteriòfag (Llagostera, 1983).

3.4.7. Anàlisi dels dominis de la proteïna Orf23 i de la proteïna cI del bacteriòfag SE1

3.4.7.1. Anàlisi comparatiu dels dominis de la proteïna Orf23

El programa blastP (NCBI) vincula l'Orf23, concretament el seu el domini amino terminal amb la superfamília *ATPases involved in chromosome partitioning (Cell division and chromosome partitioning)* s'engloben proteïnes com ParA o Soj (figura 3.32).

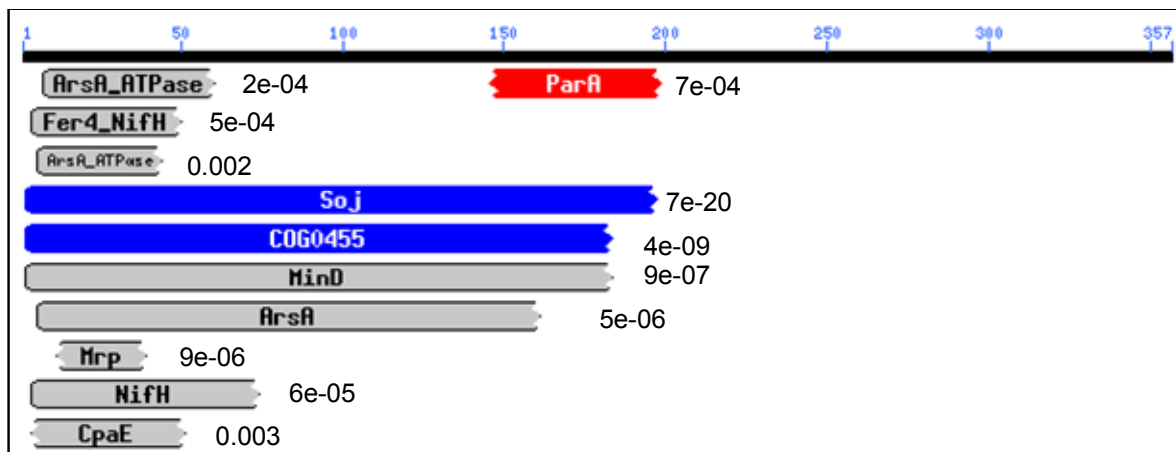


Figura 3.32. Esquema de l'alineament de la proteïna Orf23 amb la base de dades de les proteïnes utilitzant el programa blastP. S'hi ha especificat el valor E per a cada un dels alineaments.

Les proteïnes ParA formen un subgrup de la superfamília d'ATPases. Els membres d'aquesta família contenen una variant del motiu A trobat en tots els enzims involucrats en la hidròlisi d'NTP. Aquest motiu, que també es coneix com a caixa Walker o *P loop* (bucle d'unió a fosfat), és el següent: XXXKGGXXK(TS), on la X és qualsevol aminoàcid i entre parèntesis hi ha aminoàcids alternatius (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1990 i Koonin, 1993). Hi ha dos motius més identificats de les

seqüències aminoacídiques de les proteïnes ParA: l'A' i el B. Aquests tres motius s'han identificat en proteïnes que no formen part de la família de partició, algunes no tenen una òbvia relació funcional com els productes dels gens *nif* (fixació de nitrogen), els gens *vir* (virulència) i els gens *ars* (bombes d'anions ATP dependents) en bacteris. Altres són les proteïnes involucrades en la selecció del lloc septal (de Boer *et al.*, 1989), les quals tenen un clàssic motiu A.

Anàlisis filogenètics han mostrat que les proteïnes ParA poden ser definides per la presència o absència d'una seqüència aminoacídica N-terminal anterior al motiu A. N'hi ha excepcions, però, en general, aquelles amb una regió extensora amino terminal són proteïnes plasmídiques o proteïnes de bacteriòfags que no s'integren, i, aquelles sense aquesta regió són cromosòmiques. En aquesta regió N-terminal plasmídica o fàgica s'hi pot identificar un motiu d'unió HTH (Bignell i Thomas, 2001), no identificable en el cas de les proteïnes cromosòmiques, tot i que, per exemple, la proteïna Soj de *B. subtilis* ha de tenir un motiu d'unió ja que reprimeix els promotors dels gens d'esporelació activats per SpoOA (McLeod i Spiegelman, 2005). L'associació a la membrana és, a més, una propietat de moltes proteïnes ParA (Lin i Mallavia, 1998), característica compartida per la proteïna MinD d'*E. coli* (de Boer *et al.*, 1991). Les proteïnes ParA i ParB cromosomals només són necessàries sota circumstàncies especials, com per exemple, en la transició de la fase exponencial a l'estacionària en medi mínim, en *P. putida* (Lewis *et al.*, 2002) o bé en situacions d'estrès, durant l'esporelació, en *B. subtilis* (Quisel *et al.*, 1999).

Un quart motiu (C), concretament una regió hidrofòbica, s'ha identificat a la proteïna ParA del plasmidi pCI2000 (Kearney *et al.*, 2000). L'associació a la membrana de les proteïnes ParA (Soj) és promoguda pel complex ATP-ParA; en canvi, el complex ParA-ADP es dissocia de la membrana i interacciona amb el DNA, ParB (SpoOJ) podria afavorir l'intercanvi nucleotídic, és a dir, la dissociació de l'ADP i la unió a ATP (Sullivan i Maddock, 2000) (Surtees i Funnell, 2003).

Es va fer l'alineament de les seqüències aminoacídiques de la proteïna Orf23 del fag SE1 i aquelles seqüències de la família ParA (Soj) relacionades en l'article de Bignell i Thomas (2001); això va confirmar que la proteïna Orf23 conservava els motius aminoacídics característics d'aquesta superfamília d'ATPases (figura 3.33).

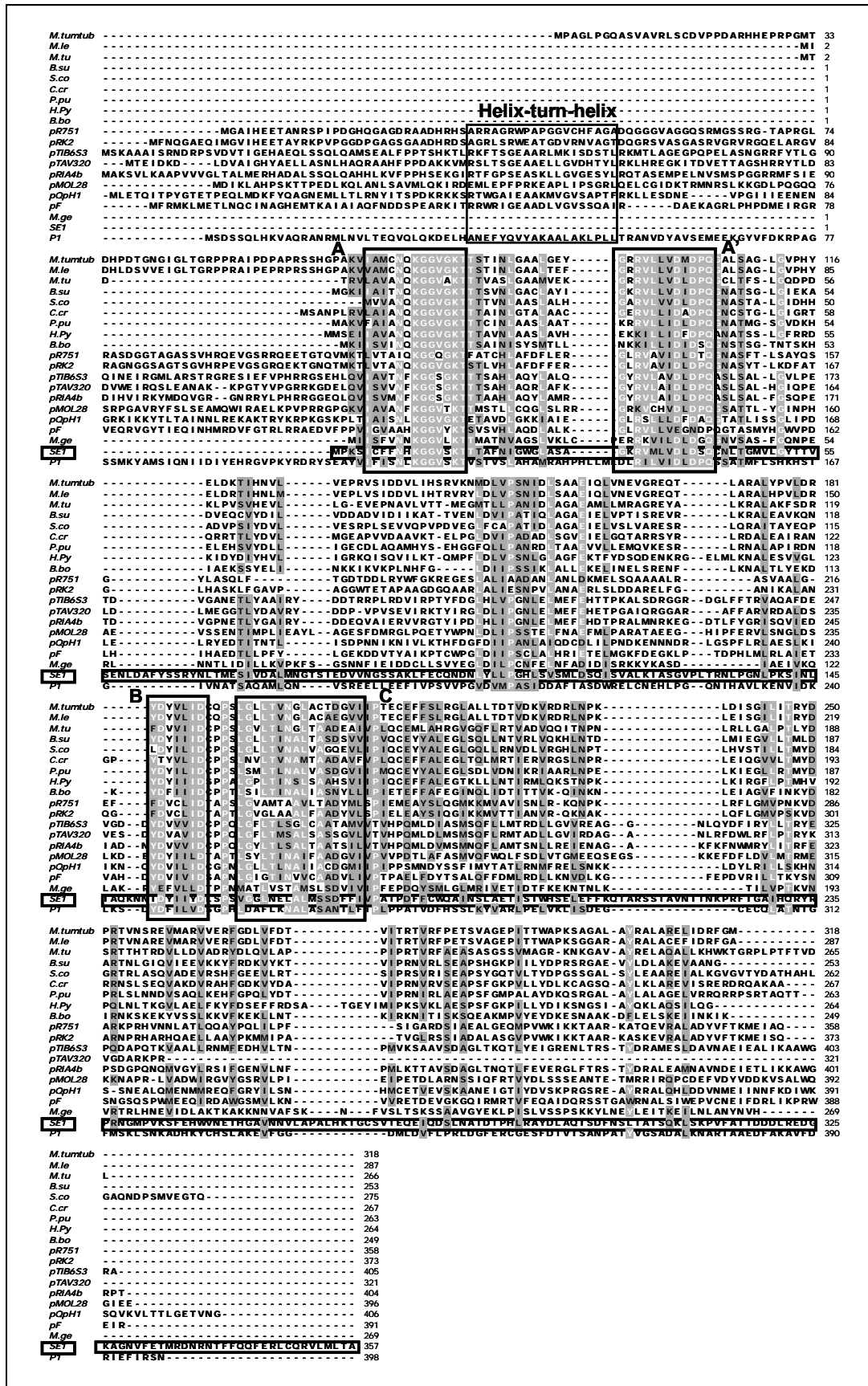


Figura 3.33. Alineament de la proteïna Orf23 amb diverses proteïnes Par i Soj plasmídiques, fàgiques i cromosòmiques. S'hi troben emmarcats els dominis H-T-H, A, A', B, C i la seqüència del fag SE1.

La proteïna Orf23 del bacteriòfag SE1 conserva tots quatre motius típics: l'A, l'A', el B i, finalment el C (figura 3.33). Tot i que la proteïna Orf23 no conserva homologia en els aminoàcids de l'extrem carboxi terminal, tots quatre motius típics confirmarien que la proteïna Orf23 pertany a la superfamília d'ATPases.

Caldria destacar que el producte gènic Orf23 del bacteriòfag SE1 no té l'extrem amino terminal, hèlix-gir-hèlix, característic de les proteïnes ParA dels plasmidis i de bacteriòfags que no s'integren al cromosoma del seu hoste; en aquest aspecte s'assemblaria a les proteïnes ParA (Soj) cromosòmiques. Per tant, la proteïna Orf23 del bacteriòfag SE1 seria la primera proteïna d'aquesta superfamília d'ATPases caracteritzada en un bacteriòfag temperat que s'integra en el cromosoma del seu hoste.

Posteriorment, es van cercar totes les proteïnes ParA (Soj) citades en l'article de Bignell i Thomas (2001) i en l'article de Yamaichi i Niki (2000) en el banc de dades (www.tgr.org i www.ncbi.nlm.nih.gov), i s'alineà amb la proteïna Orf23 i les proteïnes homòlogues a ella per BlastX (NCBI). Seguidament, per poder saber on se situarien evolutivament la proteïna Orf23 i les relacionades amb ella respecte de les proteïnes ParA descrites anteriorment, es va fer un arbre filogenètic amb totes elles utilitzant el programa ClustalW (figura 3.34).

L'arbre mostra clarament una separació entre les proteïnes plasmídiques, fàgiques, les cromosòmiques i les proteïnes MinD, tal com s'havia reportat (Yamaichi i Niki, 2000), i es pot observar com l'Orf23 se separa d'aquests grups formant un *cluster* independent. Juntament amb l'Orf23 s'agrupen les proteïnes de dos bacteriòfags que també s'integren al cromosoma de l'hoste, el retrofag phi-R73 i el profag Pf1 i algunes proteïnes cromosòmiques.

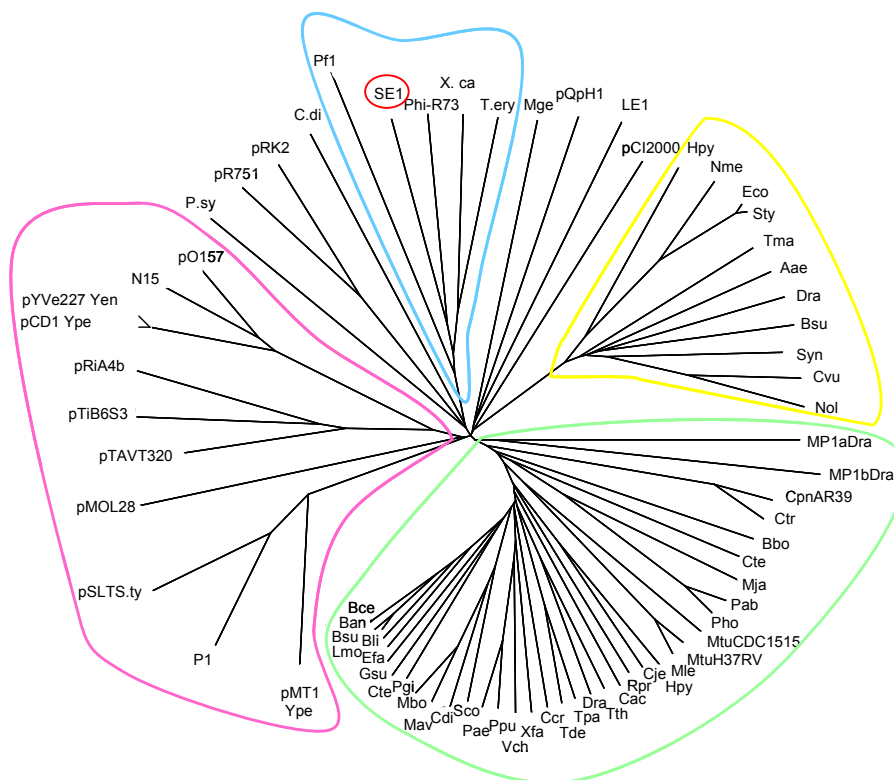


Figura 3.34. Arbre filogenètic de diferents membres de la família ParA i MinD. Les proteïnes homòlogues que pertanyen al grup cromosomal estan indicades amb verd i aquelles que corresponen al grup extracromosomal, amb rosa. Els membres de la família MinD estan senyalats amb groc. La proteïna Orf23 del fag SE1, encerclada amb vermell, i les similars amb ella per BlastX es troben senyalades amb blau.

3.4.7.2. Anàlisi comparatiu del domini amino-terminal de la proteïna ci

A *B. subtilis* el parell de gens *soj-spoOJ*, equivalents als gens *parA-parB* respectivament, tenen dues funcions diferenciades: la segregació plasmídica o cromosomal i la regulació transcripcional. La proteïna Soj inhibeix els gens d' esporulació activats per la proteïna SpoOA (McLeod i Spiegelman, 2005) i permet l'agregació del complex SpoOJ-ParS als pols. La proteïna SpoOJ és necessària per al moviment helicoidal de pol a pol de la proteïna Soj i la inhibeix; d'aquesta manera permet l' esporulació. La unió d'ATP a la proteïna Soj és activada per SpoOJ i determina la localització polar. Tanmateix, la unió d'ADP a la proteïna Soj fa que s'uneixi als promotors dels gens d' esporulació (Sullivan i Maddock, 2000 i Ogura *et al.*, 2003). Un mutant defectiu pel gen *soj* en *B. subtilis* no sembla que tingui cap efecte significatiu en la segregació cromosòmica, a diferència d'un mutant *spoOJ*; tanmateix, afecta la segregació plasmídica i, molt lleugerament, l' esporulació. Una possibilitat seria que el *bulk* del cromosoma dirigiria

l'origen de replicació per un camí per on el plasmidi no podria (Wu i Errington, 2002 i Wu i Errington, 2003). Un mutant deficient en el gen *spoOJ* fa que hi hagi una inhibició de l'esperulació, ja que deixa d'inhibir la proteïna inhibidora Soj, però un mutant deficient en tots dos gens no afectaria l'esperulació per raó de l'eliminació de tots dos inhibidors (Sullivan i Maddock, 2000).

A *Thermus thermophilus* la proteïna SpoOJ és una proteïna d'unió al DNA amb una estructura similar al motiu HTH del domini d'unió al DNA del repressor cI del fag lambda i el seu domini carboxi terminal és el domini responsable de la dimerització de la proteïna (Leonard *et al.*, 2004). L'activitat ATPàsica de la proteïna Soj és estimulada per la proteïna SpoOJ o per un pèptid de l'extrem N-terminal de la proteïna SpoOJ. La dimerització de la proteïna Soj i l'activació involucra un motiu Lys/Arg conservat en Soj, ParA i MinD i els seus moduladors SpoOJ, ParB i MinE, respectivament. Per homologia a les GTPases Ffh/FtsY, s'ha suggerit que la dimerització de Soj i la seva regulació representa un interruptor biològic conservat (Leonard *et al.*, 2005).

Es va buscar si el motiu Lys/Arg (K/R) es trobava en la seqüència aminoacídica de la proteïna repressora cI del fag SE1 i s'alineà amb l'extrem amino terminal de les proteïnes SpoOJ comparades pel Leonard en el seu article (figura 3.35).

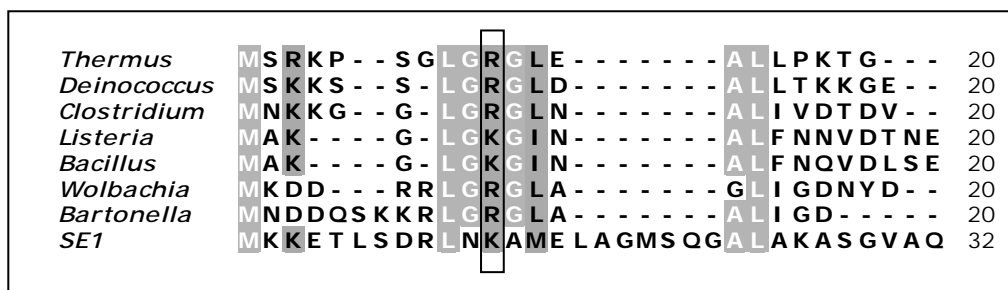


Figura 3.35. Alineament dels extrems amino terminals de diverses proteïnes SpoOJ i la proteïna cI del bacteriòfag SE1. S'hi troben enmarcats els residus Lys/Arg (KR) conservats.

En l'alineament es va poder observar que la proteïna cI conservaria el motiu catalític i bàsic Lys (K), en el seu extrem amino terminal, tal com és el cas de les proteïnes SpoOJ, MinE i FtsA. S'especula que SpoJ, FtsA i MinE podrien compartir un mecanisme conservat d'activació de la hidròlisi o d'intercanvi de nucleòtid a les seves respectives parelles Soj, FtsY i MinD. El fet que la proteïna cI conservi el residu de la Lys en el seu extrem amino terminal i que el bacteriòfag SE1 tingui la proteïna Orf23 que pertany a

la família d'ATPases involucrades en la partició cromosomal podria suggerir una relació entre aquests tipus de proteïnes i, per paral·lelisme, podria ser que la proteïna *ci* interaccionés amb la proteïna *Orf23* del bacteriòfag SE1 i activés, d'aquesta manera, l'activitat ATPàsica o l'intercanvi de nucleòid.

Aquest parentiu entre proteïnes tan distants podria afavorir la teoria evolutiva entre la inducció profàgica i l'esperulació (Lewis *et al.*, 1998).

3.4.8. Assaigs d'inducció del bacteriòfag SE1 salvatge i del bacteriòfag SE1 mutant pel gen *orf23* amb mitomicina C

Per analitzar el possible efecte de la mutació en el gen *orf23* en una situació d'estrès, es realitzaren assaigs amb mitomicina C (40 µg/ml) i sense (Wing, 1968), producte inductor del sistema de reparació SOS. En aquests experiments es va fer un tractament continu de les soques lisogenes per al fag SE1 salvatge i per al mutant *orf23*. Es comptabilitzaren, tant la concentració cel·lular (cfu) com la fàgica (pfu) a diferents temps (cada mitja hora i fins a les dues hores) després de l'addició de la mitomicina C. Es repetiren tres vegades aquests experiments per dos mutants diferents, on s'obtingueren resultats equivalents, i dels quals només s'ha representat un cas (figura 3.36).

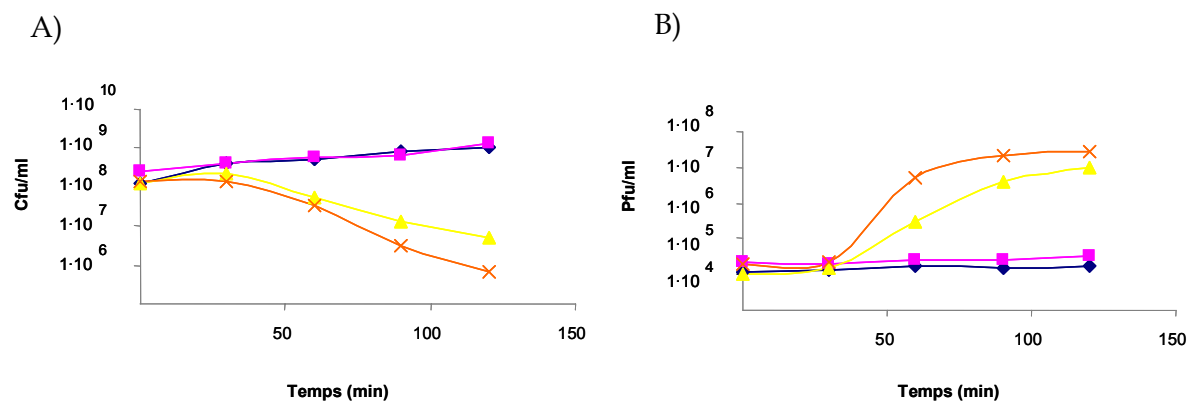


Figura 3.36. A) Representació gràfica del creixement cel·lular (cfu). B) Representació gràfica de la inducció fàgica (pfu). Hi són representades les soques lisogenes per al bacteriòfag SE1 salvatge amb tractament amb mitomicina C (▲) i sense (◆) i, per al bacteriòfag SE1 *orf23*, també amb tractament amb mitomicina C (△) i sense (×). Els valors de l'eix d'ordenades s'ha representat en escala logarítmica.

Tal com ja s'havia caracteritzat anteriorment (Llagostera, 1983), les dades obtingudes amb del tractament mostren que la inducció fàgica deguda al dany generat per aquest agent té lloc entre els minuts 40 i 60 després de l'addició de l'agent inductor.

En el cas de la soca lisogena per al fag SE1 *orf23* es va observar que hi havia un augment de més d'un ordre de magnitud de bacteriòfags formadors de calves respecte de la soca lisogena per al fag SE1 wt i, com a conseqüència, una major disminució de les cfu en el mutant. És a dir, en la inducció fàgica per un mutagen, el fag SE1 mutant s'indueix més fàcilment que un de salvatge per al gen *orf23*, és a dir, es desestabilitzaria el fag.

Es va calcular la freqüència d'inducció en cada temps on s'havia pres mostra per poder analitzar millor totes aquestes dades i veure directament com afecta la mitomicina C a la freqüència d'inducció en tots dos bacteriòfags (figura 3.37).

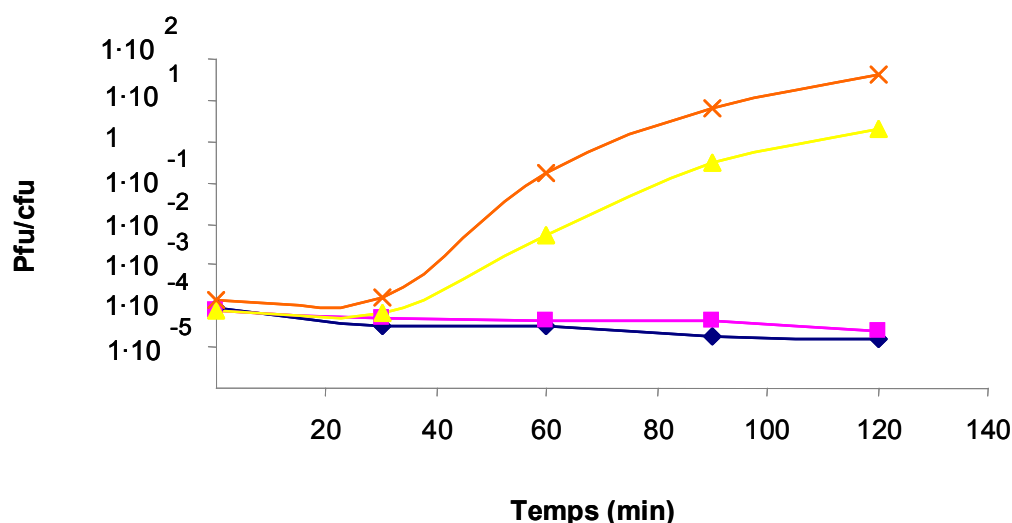


Figura 3.37. Representació gràfica de la freqüència d'inducció espontània. Hi són representades les soques lisogenes per al bacteriòfag SE1 salvatge amb tractament amb mitomicina C (—▲—) i sense (—◆—) i per al bacteriòfag SE1 *orf23* també amb tractament amb mitomicina C (—×—) i sense (—■—). Els valors de l'eix d'ordenades s'ha representat en escala logarítmica.

El tractament amb un agent mutagènic com la mitomicina C va permetre observar un augment de més d'un ordre de magnitud en la freqüència d'inducció del cicle lític en la soca lisogena per al fag mutant per al gen *orf23* respecte d'una soca lisogena per un fag salvatge després del minuts 40-60 del tractament. Semblaria que en el mutant augmenta la inestabilitat fàgica, és a dir, és més fàcil la seva inducció. Aquest fet indicaria que la proteïna Orf23 afavoriria el manteniment de la lisogènia davant una

situació d'estrès. L'efecte d'aquesta proteïna produiria una inhibició del cicle lític i actuaria de modulador de l'interruptor genètic, afavorint o activant el gen *cI*, o bé, inhibint o reprimint el gen *cro*.

De tota manera, no s'havien apreciat diferències en les freqüències d'inducció espontànies entre el fag SE1 salvatge i el mutant *orf23*, així que podria ser que la diferència observada amb el tractament amb mitomicina C fos un efecte col·lateral de la interacció entre aquesta proteïna i la proteïna *cI* i no un efecte de la funció específica de la proteïna *Orf23* en el regulador genètic. Així, en el cas de la inducció amb mitomicina C la interacció entre ambdues proteïnes podria fer que una fracció de la proteïna *cI* no fos tan fàcilment accessible a la coproteasa *RecA** activa en la resposta SOS i, per tant, disminuiria l'autoproteòlisi de la proteïna *cI*. Com a conseqüència, disminuiria la inducció profàgica. Per això s'observà que en el mutant SE1 *orf23* augmentava la inducció per la possible absència d'interacció i, per tant, podria haver-hi una facilitació de l'accés de la proteïna *RecA** al repressor *cI*; s'induiria d'aquesta manera el cicle lític (figura 3.37). Aquest fet afavoriria la hipòtesi exposada anteriorment d'una possible interacció entre la proteïna *cI* i *Orf23*.

4. Conclusions

1. La seqüència completa del genoma del bacteriòfag SE1 és de 41.941 pb i codifica 67 possibles polipèptids.
2. El genoma del bacteriòfag SE1 presenta una distribució modular agrupant els seus gens en 7 unitats funcionals o mòduls implicats en conversió lisogènica, integració/escissió, recombinació, regulació gènica, replicació, lisi cel·lular i morfogènesi.
3. El genoma del bacteriòfag SE1 presenta una estructura de mosaic on els orf s'assemblen als gens homòlegs d'altres fags membres de famílies com *Podoviridae*, *Siphoviridae*, *Myoviridae* i, fins i tot, *Inoviridae*. La similitud a nivell d'organització genètica i de productes gènics permet definir el fag SE1 com a membre del grup dels fags lambdoides.
4. El bacteriòfag SE1, a diferència del bacteriòfag P22, no presenta una regió *immI* completa, conserva tan sols el gen *mnt*. Els gens *arc* i *ant*, i el gen *sieA*, adjacent a aquesta regió, són absents en aquest fag, i mostren la pèrdua d'aquests gens per reorganització gènica durant el procés evolutiu.
5. El genoma del fag SE1 presenta una disminució del percentatge de GC a la regió que comprèn els gens involucrats en la seroconversió, i s'evidencia que aquests gens podrien provenir d'una transferència gènica lateral, des d'un altre fag o bacteri.
6. L'absència de l'últim domini transmembranal i, sobretot, de l'últim bucle periplasmàtic de la glucosiltransferasa GtrC del bacteriòfag SE1 seria la responsable que una soca de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lisogena per al fag SE1 pugui ser infectada pel fag P22.
7. L'operador de l'esquerra del bacteriòfag SE1 és format tan sols per dos operadors (O_{L1} i O_{L2}), a diferència dels tres operadors que presenten altres fags

- lambdoides. Aquesta degeneració mostraria una divergència evolutiva en aquests operadors que tan sols controlen un únic promotor.
8. La seqüència consens dels motius d'unió de la proteïna cI del fag SE1 és: AtAN₃tTN₃TATT.
 9. El gen *orf23*, que està inclòs en la unitat transcripcional on hi ha presents els gens *cI* i *orf24* codifica un possible regulador que conserva els motius aminoacídics característics de la família de les ATPases involucrades en la partició cromosòmica.
 10. La proteïna Orf23 del fag SE1 juntament amb altres proteïnes homòlogues presents en altres bacteriòfags o en cromosomes bacterians formen un *cluster* diferenciat dins de la família de les ATPases involucrades en la partició cromosòmica.
 11. Una soca de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lisogena pel bacteriòfag SE1 mutant en el gen *orf23* presenta un augment de l'eficiència d'inducció profàgica en presència de mitomicina C, possiblement com a conseqüència de la modulació que exerceix l'Orf23 sobre cI o d'una absència d'interacció entre la proteïna cI i la proteïna Orf23.

5. Bibliografia

Adelman, K., E. N. Brody i M Buckle. 1998. Stimulation of bacteriophage T4 middle transcription by the T4 proteins MotA and AsiA occurs at two distinct steps in the transcription cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95:15247-15252.

Akiyama, Y., A. Kihara, H. Mori, T. Ogura i K. Ito. 1998. Roles of the periplasmic domain of *Escherichia coli* FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation. *J Biol Chem.* 273: 22326-22333.

Akiyama, Y., T. Yoshihisa i K. Ito. 1995. FtsH, a membrane-bound ATPase, forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:23485-23490.

Albright, R. A. i B.W. Matthews. 1998. How Cro and lambda-repressor distinguish between operators: the structural basis underlying a genetic switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 3431-4336.

Allison, G. E. i N.K. Verma. 2000. Serotype-converting bacteriophages and O-antigen modification in *Shigella flexneri*. *Trends Microbiol.* 8: 17-23.

Ashelford, K. E., M.J. Day i J.C. Fry. 2003. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol.* 69: 285-289.

Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith i K. Struhl. 1995. *Current Protocols in Molecular Biology*. Eds. John Wiley & Sons Inc. Cambridge. Massachusetts. USA.

Baron, S. 1996. *Medical and Microbiology*. 4a edició. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch.

Bazinet, C. i J. King. 1988. Initiation of P22 procapsid assembly in vivo. *J. Mol. Biol.* 202: 77-86.

Berggrun, A. i R.T. Sauer. 2000. Interactions of Arg2 in the Mnt N-terminal arm with the central and flanking regions of the Mnt operator. *J. Mol. Biol.* 301: 959-973.

Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak i M. Haldal. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* 340: 467-468.

Berrier, C., M. Bonhivers, L. Letellier i A. Ghazi. 2000. High-conductance channel induced by the interaction of phage lambda with its receptor maltoporin. *FEBS Lett.* 476: 129-133.

Beutin, L., L. Bode, M. Ozel i R. Stephan. 1990. Enterohemolysin production is associated with a temperate bacteriophage in *Escherichia coli* serogroup O26 strains. *J. Bacteriol.* 172: 6469-6475.

Bignell, C. i C. M. Thomas. 2001. The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* 91: 1-34.

Birnboim, H. C. i J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

Biswas, S. B. i E. E. Biswas. 1987. Regulation of *dnaB* function in DNA replication in *Escherichia coli* by *dnaC* and lambda P gene products. *J. Biol. Chem.* 262: 7831-7838.

Blasi, U. i R. Young. 1996. Two beginnings for a single purpose: the dual-start holins in the regulation of phage lysis. *Mol. Microbiol.* 21: 6756-82. Review.

de Boer, P. A., R. E. Crossley, A. R. Hand i L. I. Rothfield. 1991. The MinD protein is a membrane ATPase required for the correct placement of the *Escherichia coli* division site. *EMBO J.* 10: 4371-4380.

de Boer, P. A., R. E. Crossley i L. I. Rothfield. 1989. A division inhibitor and a topological specificity factor coded for by the minicell locus determine proper placement of the division septum in *Escherichia coli*. *Cell.* 56: 641-649.

- Botstein D.** 1980. A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann. NY Acad. Sci.* 354: 484-490.
- Botstein, D. i I. Herskowitz.** 1974. Properties of hybrids between *Salmonella* phage P22 and coliphage lambda. *Nature.* 251: 584-589.
- Brown, B. M., J. U. Bowie i R. T. Sauer.** 1990. Arc repressor is tetrameric when bound to operator DNA. *Biochemistry.* 29: 11189-11195.
- Busby, S. i R. H. Ebright.** 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell.* 79: 743-746. Review.
- Camerini-Otero, R. D. i R. M. Franklin RM.** 1975. Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. The molecular weight and other physical properties of bacteriophage PM2. *Eur. J. Biochem.* 53: 343-348.
- Campbell, A.** 1994. Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu. Rev. Microbiol.* 48: 193-222.
- Campbell, A. M.** *Fundamental Virology.* 3a edició. 1996.
- Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. de Rozas, I. Badiola i J. Barbé.** 2002. Intracellular cyclic AMP concentration is decreased in *Salmonella typhimurium fur* mutants. *Microbiology.* 148: 1039-1048.
- Carlson, N. G. i J. W. Little.** 1993. Highly cooperative DNA binding by the coliphage HK022 repressor. *J Mol Biol.* 230: 1108-1130.
- Casadaban, M. J. i S. N. Cohen.** 1979. Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76: 4530-4533.
- Casjens, S., G. Hatfull i R. Hendrix.** 1992. Evolution of dsDNA tailed-bacteriophage genomes. *Semin. Virol.* 3: 383-.397

Casjens, S. i M. Hayden. 1988. Analysis in vivo of the bacteriophage P22 headful nuclease. *J. Mol. Biol.* 199: 467-474.

Casjens, S. i J. King. 1975. Virus assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 555-611.

Casjens, S., L. Sampson, S. Randall, K. Eppler, H. Wu, J. B. Petri i H. Schmieger. 1992b. Molecular genetic analysis of bacteriophage P22 gene 3 product, a protein involved in the initiation of headful DNA packaging. *J. Mol. Biol.* 227: 1086-1099.

Casjens, S., E. Wyckoff, M. Hayden, L. Sampson, K. Eppler, S. Randall, E. T. Moreno, P. Serwer. 1992. Bacteriophage P22 portal protein is part of the gauge that regulates packing density of intravirion DNA. *J. Mol. Biol.* 224:1055-1074.

Cho, E. H., R. Jr. Alcaraz, R. I. Gumport i J. F. Gardner. 2000. Characterization of bacteriophage lambda excisionase mutants defective in DNA binding. *J. Bacteriol.* 182: 5807-5812.

Cho, E. H., C. E. Nam, R. Jr. Alcaraz i J. F. Gardner. 1999. Site-specific recombination of bacteriophage P22 does not require integration host factor. *J. Bacteriol.* 181: 4245-4249.

Clark, A. J., W. Inwood, T. Cloutier i T. S. Dhillon. 2001. Nucleotide sequence of coliphage HK620 and the evolution of lambdoid phages. *J. Mol. Biol.* 311: 657-679.

Darling, P.J., J. M. Holt i G. K. Ackers. 2000. Coupled energetics of lambda cro repressor self-assembly and site-specific DNA operator binding II: cooperative interactions of cro dimers. *J. Mol. Biol.* 302: 625-638.

Darlington, O. F. i M. Levine. 1971. Superinfection exclusion by P22 prophage and the replication complex. *J. Virol.* 8: 347-348.

Datsenko, K. A. i B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6640-6645.

Dodd, I. B., A. J. Perkins, D. Tsemitsidis i J. B. Egan. 2001. Octamerization of lambda CI repressor is needed for effective repression of P(RM) and efficient switching from lysogeny. *Genes Dev.* 15: 3013-3022.

Dodson, M., R. McMacken i H. Echols. 1989. Specialized nucleoprotein structures at the origin of replication of bacteriophage lambda. Protein association and disassociation reactions responsible for localized initiation of replication. *J. Biol. Chem.* 264: 10719-10725.

Dorgai, L., S. Sloan i R. A. Weisberg. 1998. Recognition of core binding sites by bacteriophage integrases. *J. Mol. Biol.* 277: 1059-1070.

Dower, W. J., J. F. Miller i C. W. Ragsdale. 1988. High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.

Dreiseikermann, B. 1994. Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev.* 58: 293-316.

Ermolaeva, M.D., H. G. Khalak, O. White, H.O. Smith i S. L. Salzberg. 2000. Prediction of transcription terminators in bacterial genomes. *J. Mol. Biol.* 301: 27-33.

Farinha, M.A., B. J. Allan, E. M. Gertman, S. L. Ronald i A. M. Kropinski. 1994. Cloning of the early promoters of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3: sequence of the immunity region of D3. *J Bacteriol.* 176: 4809-4815.

Fattah, K. R., S. Mizutani, F. J. Fattah, A. Matsushiro i Y. Sugino. 2000. A comparative study of the immunity region of lambdoid phages including Shiga-toxin-converting phages: molecular basis for cross immunity. *Genes Genet. Syst.* 75: 223-232.

Franklin, N.C. 1974. Altered reading of genetic signals fused to the N operon of bacteriophage lambda: genetic evidence for modification of polymerase by the protein product of the N gene. *J. Mol. Biol.* 89: 33-48.

Friedman, D. I. i D. L. Court. 1995. Transcription antitermination: the lambda paradigm updated. *Mol. Microbiol.* 18: 191-200. Review.

Gage, M. J. i A. S. Robinson. 2003. C-terminal hydrophobic interactions play a critical role in oligomeric assembly of the P22 tailspike trimer. *Protein Sci.* 12: 2732-2747.

Galas, D. J. i A. Schmitz. 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 5: 3157-3170.

Girons, I. S., P. Bourhy, C. Ottone, M. Picardeau, D. Yelton, R. W. Hendrix, P. Glaser i N. Charon. 2000. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J. Bacteriol.* 182: 5700-5705.

Goldenberg, D.P., P. B. Berget i J. King. 1982. Maturation of the tail spike endorhamnosidase of *Salmonella* phage P22. *J. Biol. Chem.* 257: 7864-7871.

Goldenberg, D. i J. King. 1982. Trimeric intermediate in the in vivo folding and subunit assembly of the tail spike endorhamnosidase of bacteriophage P22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3403-3407.

Greenblatt, J., J. R. Nodwell i S. W. Mason. 1993. Transcriptional antitermination. *Nature.* 364: 401-406.

Grigoriev, P. S. i M. B. Lobočka. 2001. Determinants of segregational stability of the linear plasmid-prophage N15 of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 42: 355-368.

Grodzicker, T., R. R. Arditti i H. Eisen. 1972. Establishment of repression by lambdaoid phage in catabolite activator protein and adenylate cyclase mutants of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 366-370.

Groth, A. C i M. P. Calos. 2004. Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol.* 335: 667-678.

- Hanahan, D.** 1988. Dissecting multistep tumorigenesis in transgenic mice. *Annu. Rev. Genet.* 22: 479-519.
- Heiner, C. R., K. L. Hunkapiller, S. M. Chen, J. I. Glass i E. Y. Chen.** 1998. Sequencing multimegabase-template DNA with BigDye terminator chemistry. *Genome Res.* 8: 557-561.
- Hendrix, R. W.** 1998. Bacteriophage DNA packaging: RNA gears in a DNA transport machine. *Cell.* 94: 147-150.
- Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford i G. F. Hatfull.** 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2192-2197.
- Herman, C., D. Thevenet, R. D'Ari i P. Bouloc.** 1997. The HflB protease of *Escherichia coli* degrades its inhibitor lambda cIII. *J. Bacteriol.* 179: 358-363.
- Hilchey, S. P., L. Wu i G. B. Koudelka.** 1997. Recognition of nonconserved bases in the P22 operator by P22 repressor requires specific interactions between repressor and conserved bases. *J. Biol. Chem.* 272: 19898-19905.
- Ho, Y, Lewis M i M. Rosenberg.** 1982. Purification and properties of a transcriptional activator. The cII protein of phage lambda. *J. Biol. Chem.* 257: 9128-9134.
- Ho, Y. S., D. Pfarr, J. Strickler i M. Rosenberg.** 1992. Characterization of the transcription activator protein C1 of bacteriophage P22. *J. Biol. Chem.* 267: 14388-14397.
- Ho, Y. S. i M. Rosenberg.** 1985. Characterization of a third, cII-dependent, coordinately activated promoter on phage lambda involved in lysogenic development. *J. Biol. Chem.* 260: 11838-11844.
- Hochschild, A., N. Irwin i M. Ptashne.** 1983. Repressor structure and the mechanism of positive control. *Cell.* 32: 319-325.

Hochschild, A. i M. Ptashne. 1986. Cooperative binding of lambda repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix. *Cell*. 44: 681-687.

Hofer B, M. Ruge i B. Dreiseikelmann. 1995. The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. *J. Bacteriol.* 177: 3080-3086.

Hoffman, B. i M. Levine. 1975a. Bacteriophage P22 virion protein which performs an essential early function. II. Characterization of the gene 16 function. *J. Virol.* 16: 1547-1559.

Hoffman, B. i M. Levine. 1975b. Bacteriophage P22 virion protein which performs an essential early function. I. Analysis of 16-ts mutants. *J. Virol.* 16: 1536-1546.

Hoffman, K. i W. Stoffel. 1993. TMbase A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hopper-Seyler.* 347, 166.

Hoopes, B. C. i W. R. McClure. 1985. A cII-dependent promoter is located within the Q gene of bacteriophage lambda. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82: 3134-3138.

Horii, T. T. Ogawa, T. Nakatani, T. Hase, H. Matsubara i H. Ogawa. 1981. Regulation of SOS functions: purification of *Escherichia coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. *Cell.* 27: 515-522.

Huan, P. T., B. L. Whittle, D. A. Bastin, A. A. Lindberg i N. K. Verma. 1997. *Shigella flexneri* type-specific antigen V: cloning, sequencing and characterization of the glucosyl transferase gene of temperate bacteriophage SfV. *Gene.* 195: 207-216.

Inouye, S., M. G. Sunshine, E. W. Six i M. Inouye. 1991. Retronphage phi R73: an *Escherichia coli* phage that contains a retroelement and integrates into a tRNA gene. *Science.* 252: 969-971.

Israel, V. 1978. A model for the adsorption of phage P22 to *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Virol.* 40: 669-673.

Jana, R., T. R. Hazbun, J. D. Fields i M. C. Mossing. 1998. Single-chain lambda Cro repressors confirm high intrinsic dimer-DNA affinity. *Biochemistry*. 37: 6446-6455.

Jessop, L., T. Bankhead, D. Wong i A. M. Segall. 2000. The amino terminus of bacteriophage lambda integrase is involved in protein-protein interactions during recombination. *J. Bacteriol.* 182: 1024-1034.

Johnson, A. D., B. J. Meyer i M. Ptashne. 1979. Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 5061-5065.

Johnson, A. D., A. R. Poteete, G. Lauer, R. T. Sauer, G. K. Ackers i M. Ptashne. 1981. lambda Repressor and cro-components of an efficient molecular switch. *Nature.* 294: 217-223. Review.

Joung, J. K., D. M. Koepp i A. Hochschild. 1994. Synergistic activation of transcription by bacteriophage lambda cI protein and *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Science.* 265: 1863-1866.

Juhala, R. J., M. E. Ford, R. L. Duda, A. Youlton, G. F. Hatfull i R. W. Hendrix. 2000. Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages. *J. Mol. Biol.* 299: 27-51.

Kao, S. H. i W. H. McClain. 1980a. Baseplate protein of bacteriophage T4 with both structural and lytic functions. *J. Virol.* 34: 95-103.

Kao, S. H. i W. H. McClain. 1980b. Roles of bacteriophage T4 gene 5 and gene s products in cell lysis. *J. Virol.* 34: 104-107.

Kassavetis, G. A. i E. P. Geiduschek. 1984. Defining a bacteriophage T4 late promoter: bacteriophage T4 gene 55 protein suffices for directing late promoter recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5101-5105.

Kearney, K., G. F. Fitzgerald i J. F. Seegers. 2002. Identification and characterization of an active plasmid partition mechanism for the novel *Lactococcus lactis* plasmid pCI2000. J. Bacteriol. 182: 30-37.

Kedzierska, B., D. J. Lee, G. Wegrzyn, S. J. Busby i M. S. Thomas. 2004. Role of the RNA polymerase alpha subunits in CII-dependent activation of the bacteriophage lambda pE promoter: identification of important residues and positioning of the alpha C-terminal domains. Nucleic Acids Res. 32: 834-841.

Kihara, A., Y. Akiyama i K. Ito. 1997. Host regulation of lysogenic decision in bacteriophage lambda: transmembrane modulation of FtsH (HflB), the cII degrading protease, by HflKC (HflA). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5544-5549.

Kihara, A., Y. Akiyama i K. Ito. 2001. Revisiting the lysogenization control of bacteriophage lambda. Identification and characterization of a new host component, HflD. J. Biol. Chem. 276: 13695-13700.

Kivela, H. M., N. Kalkkinen i D. H. Bamford. 2002. Bacteriophage PM2 has a protein capsid surrounding a spherical proteinaceous lipid core. J. Virol. 76: 8169-8178.

Knight, K. L. i R. T. Sauer. 1989. DNA binding specificity of the Arc and Mnt repressors is determined by a short region of N-terminal residues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 797-801.

Kobiler, O., S. Koby, D. Teff, D. Court i A. B. Oppenheim. 2002. The phage lambda CII transcriptional activator carries a C-terminal domain signaling for rapid proteolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 14964-14969.

Kochetkov, S. N., E. E. Rusakova i V. L. Tunitskaya. 1998. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. FEBS Lett. 440: 264-267.

Koonin, E.V. 1993. A common set of conserved motifs in a vast variety of putative nucleic acid-dependent ATPases including MCM proteins involved in the initiation of eukaryotic DNA replication. Nucleic Acids Res. 21: 2541-2557.

- Korres, H., M. Mavris, R. Morona, P. A. Manning i N. K. Verma.** 2005. Topological analysis of GtrA and GtrB proteins encoded by the serotype-converting cassette of *Shigella flexneri*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328: 1252-1260.
- Korres, H. i N. K. Verma.** 2004. Topological analysis of glucosyltransferase GtrV of *Shigella flexneri* by a dual reporter system and identification of a unique reentrant loop. *J. Biol. Chem.* 279: 22469-22476.
- Kropinski, A. M.** 2000. Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *J. Bacteriol.* 182: 6066-6074.
- Kumagai, M. i H. Ikeda.** 1991. Molecular analysis of the recombination junctions of lambda bio transducing phages. *Mol. Gen. Genet.* 230: 60-64.
- Kwoh, D.Y. i J. Kemper.** 1978a. Bacteriophage P22-mediated specialized transduction in *Salmonella typhimurium*: identification of different types of specialized transducing particles. *J. Virol.* 27: 535-550.
- Kwoh, D.Y. i J. Kemper.** 1978b. Bacteriophage P22-mediated specialized transduction in *Salmonella typhimurium*: high frequency of aberrant prophage excision. *J. Virol.* 27: 519-534.
- Latala, B., M. Obuchowski i G. Wgrzyn.** 2001. Bacteriophage lambda cIII gene product has an additional function apart from inhibition of cII degradation. *Virus Genes.* 22: 127-132.
- Laue, T. M., D. F. Senear, S. Eaton i J. B. Ross.** 1993. 5-hydroxytryptophan as a new intrinsic probe for investigating protein-DNA interactions by analytical ultracentrifugation. Study of the effect of DNA on self-assembly of the bacteriophage lambda cI repressor. *Biochemistry.* 32: 2469-2472.
- Laurinavicius, S., R. Kakela, D. H. Bamford i P. Somerharju.** 2004. The origin of phospholipids of the enveloped bacteriophage phi6. *Virology.* 326: 182-190.

Lawrence, J. G., G. F. Hatfull i R. W. Hendrix. 2002. Imbroglis of viral taxonomy: genetic exchange and failings of phenetic approaches. *J. Bacteriol.* 184: 4891-4905.

Lawrence, J. G., i H. Ochman. 1997. Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol.* 44: 383-397.

Lee, E. C., R. I. Gumpert i J. F. Gardner. 1990. Genetic analysis of bacteriophage lambda integrase interactions with arm-type attachment site sequences. *J. Bacteriol.* 172: 1529-1538.

Lee, S. Y., i A. Landy. 2004. The efficiency of mispaired ligations by lambda integrase is extremely sensitive to context. *J. Mol. Biol.* 342: 1647-1658.

Leiman, P. G., S. Kanamaru, V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka i M. G. Rossmann. 2003. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 2356-2370.

Leonard, T. A., P. J. Butler i J. Lowe. 2004. Structural analysis of the chromosome segregation protein Spo0J from *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.* 53: 419-432.

Leonard, T. A., P. J. Butler i J. Lowe. 2005. Bacterial chromosome segregation: structure and DNA binding of the Soj dimer- a conserved biological switch. *EMBO J.* 24: 270-282.

Leong, J. M., S. E. Nunes-Duby, A. B. Oser, C. F. Lesser, P. Youderian, M. M. Susskind i A Landy. 1986. Structural and regulatory divergence among site-specific recombination genes of lambdoid phage. *J. Mol. Biol.* 189: 603-616.

Lewis, R. A, C. R. Bignell, W. Zeng, A. C. Jones i C. M. Thomas. 2002. Chromosome loss from par mutants of *Pseudomonas putida* depends on growth medium and phase of growth. *Microbiology.* 148: 537-548.

- Lewis, R. J., J. A. Brannigan, W. A. Offen, I. Smith i A. J. Wilkinson.** 1998. An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *J. Mol. Biol.* 283: 907-912.
- Li, M., H. Moyle i M. M. Susskind.** 1994. Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science.* 263: 75-77.
- Liberek, K., J. Osipiuk, M. Zylicz, D. Ang, J. Skorko i C. Georgopoulos.** 1990. Physical interactions between bacteriophage and *Escherichia coli* proteins required for initiation of lambda DNA replication. *J. Biol. Chem.* 265: 3022-3029.
- Lin, Z. i L. P. Mallavia.** 1998. Membrane association of active plasmid partitioning protein A in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273: 11302-11312.
- Lindberg, A. A.** 1973. Bacteriophage receptors. *Annu Rev Microbiol.* 27:205-241.
- Little, J. W.** 1984. Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1375-1379.
- Liu, D. J. i L. A. Day.** 1994. Pf1 virus structure: helical coat protein and DNA with paraxial phosphates. *Science.* 265: 671-674.
- Llagostera, M.** 1983. Tesi: Caracterización estructural y genética de bacteriòfagos transductores *Salmonella typhimurium*. U.A.B.
- Llagostera, M., J. Barbe i R. Guerrero.** 1986. Characterization of SE1, a new general transducing phage of *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 1035-1041.
- Lobočka, M. B., D. J. Rose, G 3rd. Plunkett, M. Rusin, A. Samojedny, H. Lehnerr, M. B. Yarmolinsky i F. R. Blattner.** 2004. Genome of bacteriophage P1. *J. Bacteriol.* 186: 7032-7068.
- Lodish, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore i J. E. Darnell.** 2000. *Molecular Cell Biology.* 4a edició. New York: W. H. Freeman & Co.

López, R. 2004. "Bacteriófagos: de la Biología molecular a su uso terapéutico". Conferència "Omnis cellula". U.B.

de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik i K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.

Lowe, T. M. i S. R. Eddy. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964.

Luke, K., A. Radek, X. Liu, J. Campbell, M. Uzan, R. Haselkorn i Y. Kogan. 2002. Microarray analysis of gene expression during bacteriophage T4 infection. *Virology.* 299: 182-191.

Maniloff, J. i H. W. Ackermann. 1998. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the order Caudovirales. *Arch. Virol.* 143: 2051-2063.

Markine-Goriaynoff, N., L. Gillet, J. L. Van Etten, H. Korres, N. Verma i A. Vanderplasschen. 2004. Glycosyltransferases encoded by viruses. *J. Gen. Virol.* 85: 2741-2754.

Marvin, D. A. i B. Hohn. 1969. Filamentous bacterial viruses. *Bacteriol. Rev.* 33: 172-209.

Mazón, G., J. M. Lucena, S. Campoy, A. R. Fernandez de Henestrosa, P. Candau i J. Barbé. 2004. LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. *Mol. Genet. Genomics.* 271: 40-49.

McLeod, B. N. i G. B. Spiegelman. 2005. Soj antagonizes Spo0A activation of transcription in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187: 2532-2536.

Miller, J. M. 1992. A short course in bacterial genetics. Handbook. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Miller, E. S., E. Kutter, G. Mosig, F. Arisaka, T. Kunisawa i W. Ruger.** 2003. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67: 86-156. Review.
- Mmolawa, P. T., H. Schmieger i M. W. Heuzenroeder.** 2003b. Bacteriophage ST64B, a genetic mosaic of genes from diverse sources isolated from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 64.J. *Bacteriol.* 185: 6481-6485.
- Mmolawa, P. T., H. Schmieger, C. P. Tucker i M. W. Heuzenroeder.** 2003a. Genomic structure of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT 64 bacteriophage ST64T: evidence for modular genetic architecture. *J. Bacteriol.* 185: 3473-3475.
- Moore, S. D. i P. E. Jr. Prevelige.** 2002. Bacteriophage p22 portal vertex formation in vivo. *J. Mol. Biol.* 315: 975-994.
- Motallebi-Veshareh, M., D. A. Rouch i C. M. Thomas.** 1990. A family of ATPases involved in active partitioning of diverse bacterial plasmids. *Mol. Microbiol.* 4: 1455-1463.
- Mudd, E. A., A. J. Carpousis i H. M. Krisch.** 1990. *Escherichia coli* RNase E has a role in the decay of bacteriophage T4 mRNA. *Genes Dev.* 4: 873-881. Erratum in: *Genes Dev.* 4:1078.
- Mustard, J. A i J. W. Little.** 2000. Analysis of *Escherichia coli* RecA interactions with LexA, lambda CI, and UmuD by site-directed mutagenesis of recA. *J. Bacteriol.* 182: 1659-1670.
- Nakagawa, H., F. Arisaka i S. Ishii.** 1985. Isolation and characterization of the bacteriophage T4 tail-associated lysozyme. *J. Virol.* 54: 460-466.
- Nam, K., U. Blasi, M. T. Zagotta i R. Young.** 1990. Conservation of a dual-start motif in P22 lysis gene regulation. *J. Bacteriol.* 172: 204-211.
- Nash, H. A.** 1981. Integration and excision of bacteriophage lambda: the mechanism of conservation site specific recombination. *Annu. Rev. Genet.* 15:143-167.

Nechaev, S., M. Kamali-Moghaddam, E. Andre, J. P. Leonetti i E. P. Geiduschek. 2004. The bacteriophage T4 late-transcription coactivator gp33 binds the flap domain of *Escherichia coli* RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101: 17365-17370.

Neely, M. N. i D. I. Friedman. 1998. Arrangement and functional identification of genes in the regulatory region of lambdoid phage H-19B, a carrier of a Shiga-like toxin. Gene. 223: 105-113.

Newlove, T., J. H. Konieczka i M. H. Cordes. 2004. Secondary structure switching in Cro protein evolution. Structure. 12: 569-581.

Nickels, B. E., S. L. Dove, K. S. Murakami, S. A. Darst i A. Hochschild. 2002. Protein-protein and protein-DNA interactions of sigma70 region 4 involved in transcription activation by lambda cI. J. Mol. Biol. 324: 17-34.

Nudler, E. i M. E. Gottesman. 2002. Transcription termination and anti-termination in *Escherichia coli*. Genes Cells. 7: 755-768. Review.

Numrych, T. E., R. I. Gumport i J. F. Gardner. 1992. Characterization of the bacteriophage lambda excisionase (Xis) protein: the C-terminus is required for Xis-integrase cooperativity but not for DNA binding. EMBO J. 11: 3797-3806.

Oberto, J., R. A. Weisberg i M. E. Gottesman. 1989. Structure and function of the nun gene and the immunity region of the lambdoid phage HK022. J. Mol. Biol. 207: 675-693.

Obuchowski, M., Y. Shotland, S. Koby, H. Giladi, M. Gabig, G. Wegrzyn i A. B. Oppenheim. 1997. Stability of CII is a key element in the cold stress response of bacteriophage lambda infection. J. Bacteriol. 179: 5987-5991

Otsuka, Y., H. Ueno i T. Yonesaki. 2003. *Escherichia coli* endoribonucleases involved in cleavage of bacteriophage T4 mRNAs. J. Bacteriol. 185: 983-890.

Patsey, R. L. i M. F. Bruist. 1995. Characterization of the interaction between the lambda intasome and *attB*. J. Mol. Biol. 252: 47-58.

- Patzer, S. I. i K. Hantke.** 2000. The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 275: 24321-24332.
- Piesiniene, L., L. Truncaite, A. Zajanckauskaite i R. Nivinskas.** 2004. The sequences and activities of RegB endoribonucleases of T4-related bacteriophages. Nucleic Acids Res. 32: 5582-5595.
- Poranen, M. M., R. Daugelavicius i D. H. Bamford.** 2002. Common principles in viral entry. Annu. Rev. Microbiol. 56: 521-538.
- Ptasnhe, M.** 1992. A Genetic Switch: Phage Lambda and Higher Organisms. 2nd ed. Cell Press and Blackwell Science, Cambridge, Mass.
- Phizicky, E. M. i J. W. Roberts.** 1980. Kinetics of RecA protein-directed inactivation of repressors of phage lambda and phage P22. J. Mol. Biol. 139: 319-328.
- Plunkett, G 3rd. i H. Echols.** 1989. Retroregulation of the bacteriophage lambda *int* gene: limited secondary degradation of the RNase III-processed transcript. J. Bacteriol. 171: 588-592.
- Plunkett, G 3rd., D. J. Rose, T. J. Durfee i F. R. Blattner.** 1999. Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. J. Bacteriol. 181: 1767-1778.
- Poteete, A. R. i D. Botstein.** 1979. Purification and properties of proteins essential to DNA encapsulation by phage P22. Virology. 95: 565-573.
- Poteete, A. R., K. Hehir i R. T. Sauer.** 1986. Bacteriophage P22 Cro protein: sequence, purification, and properties. Biochemistry. 25: 251-256.
- Pray, T. R., D. S. Burz i G. K. Ackers.** 1998. Cooperative non-specific DNA binding by octamerizing lambda cI repressors: a site-specific thermodynamic analysis. J. Mol. Biol. 282: 947-958.

Prell, H. H., i A. M. Harvey. 1983. P22 antirepressor protein prevents in vivo *recA*-dependent proteolysis of P22 repressor. *Mol. Gen. Genet.* 190: 427-431.

Quisel, J. D., D. C. Lin i A. D. Grossman. 1999. Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol. Cell.* 4: 665-672.

Radnedge, L., B. Youngren, M. Davis i S. Austin. 1998. Probing the structure of complex macromolecular interactions by homolog specificity scanning: the P1 and P7 plasmid partition systems. *EMBO J.* 17: 6076-6085.

Ramírez, E., M. Schmidt, U. Rinas i A. Villaverde. 1999. RecA-dependent viral burst in bacterial colonies during the entry into stationary phase. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 313-317.

Ramírez, E., i A. Villaverde. 1997. Viral spread within ageing bacterial populations. *Gene.* 202: 147-149.

Ranade, K. i A. R. Poteete. 1993. Superinfection exclusion (*sieB*) genes of bacteriophages P22 and lambda. *J. Bacteriol.* 175: 4712-4718.

Retallack, D. M., L. L. Johnson, S. F. Ziegler, M. A. Strauch i D. I. Friedman. 1993. A single-base-pair mutation changes the specificities of both a transcription activation protein and its binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 9562-9565.

Revet, B., B. von Wilcken-Bergmann, H. Bessert, A. Barker i B. Muller-Hill. 1999. Four dimers of lambda repressor bound to two suitably spaced pairs of lambda operators form octamers and DNA loops over large distances. *Curr. Biol.* 9: 151-154.

Robertson, C. A. i H. A. Nash. 1988. Bending of the bacteriophage lambda attachment site by *Escherichia coli* integration host factor. *J. Biol. Chem.* 263: 3554-3557.

Roessner, C. A., i G. M. Ihler. 1986. Formation of transmembrane channels in liposomes during injection of lambda DNA. *J. Biol. Chem.* 261: 386-390.

Rusinova, E., J. B. Ross, T. M. Laue, L. C. Sowers i D. F. Senear. 1997. Linkage between operator binding and dimer to octamer self-assembly of bacteriophage lambda cI repressor. *Biochemistry*. 36: 12994-13003.

Sambrook, J., E. F. Fritsch i T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.

Sanders, G. M., G. A. Kassavetis i E. P. Geiduschek. 1997. Dual targets of a transcriptional activator that tracks on DNA. *EMBO J*. 16: 3124-3132.

Sanger, F., S. Nicklen i A. R. Coulson. 1992. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology*. 24:104-108.

Sanson, B., R. M. Hu, E. Troitskayadagger, N. Mathy i M. Uzan. 2000. Endoribonuclease RegB from bacteriophage T4 is necessary for the degradation of early but not middle or late mRNAs. *J Mol Biol*. 297: 1063-1074.

Sauer, R. T., W. Krovatin, J. DeAnda, P. Youderian i M. M. Susskind. 1983. Primary structure of the *immI* immunity region of bacteriophage P22. *J Mol Biol*. 168: 699-713.

Sauer, R. T., J. Pan, P. Hopper, K. Hehir, J. Brown i A. R. Poteete. 1981. Primary structure of the phage P22 repressor and its gene *c2*. *Biochemistry*. 20: 3591-3598.

Sauer, R. T., M. J. Ross i M. Ptashne. 1982. Cleavage of the lambda and P22 repressors by RecA protein. *J. Biol. Chem*. 257: 4458-4462.

Senear, D. F., T. M. Laue, J. B. Ross, E. Waxman, S. Eaton i E. Rusinova. 1993. The primary self-assembly reaction of bacteriophage lambda cI repressor dimers is to octamer. *Biochemistry*. 32: 6179-6189.

da Silva, A. C., J. A. Ferro, F. C. Reinach, C. S. Farah, L. R. Furlan, R. B. Quaggio, C. B. Monteiro-Vitorello, M. A. Van Sluys, N. F. Almeida, L. M. Alves, A. M. do Amaral, M. C. Bertolini, L. E. Camargo, G. Camarotte, F. Cannavan, J. Cardozo, F. Chambergo, L. P. Ciapina, R. M. Cicarelli, L. L. Coutinho, J. R. Cursino-Santos, H. El-

Dorry, J. B. Faria, A. J. Ferreira, R. C. Ferreira, M. I. Ferro, E. F. Formighieri, M. C. Franco, C. C. Greggio, A. Gruber, A. M. Katsuyama, L. T. Kishi, R. P. Leite, E. G. Lemos, M. V. Lemos, E. C. Locali, M. A. Machado, A. M. Madeira, N. M. Martinez-Rossi, E. C. Martins, J. Meidanis, C. F. Menck, C. Y. Miyaki, D. H. Moon, L. M. Moreira, M. T. Novo, V. K. Okura, M. C. Oliveira, V. R. Oliveira, H. A. Pereira, A. Rossi, J. A. Sena, C. Silva, R. F. de Souza, L. A. Spinola, M. A. Takita, R. E. Tamura, E. C. Teixeira, R. I. Tezza, M. Trindade dos Santos, D. Truffi, S. M. Tsai, F. F. White, J. C. Setubal i J. P. Kitajima. 2002. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature*. 417: 459-463.

Shotland, Y., D. Teff, S. Koby, O. Kobiler i A. B. Oppenheim. 2000. Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 299: 953-964.

Slominska, M., P. Neubauer i G. Wegrzyn. 1999. Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate. *Virology*. 262: 431-441.

Semerjian, A. V., D. C. Malloy i A. R. Poteete. 1989. Genetic structure of the bacteriophage P22 PL operon. *J. Mol. Biol.* 207: 1-13.

Schicklmaier, P. i H. Schmieger. 1995. Frequency of generalized transducing phages in natural isolates of the *Salmonella typhimurium* complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1637-1640.

Shigekawa, K. i W. J. Dower. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques*. 6: 742-751.

Schicklmaier, P. i H. Schmieger. 1997. Sequence comparison of the genes for immunity, DNA replication, and cell lysis of the P22-related *Salmonella* phages ES18 and L. *Gene*. 195: 93-100.

- Smith-Mungo, L., I. T. Chan i A. Landy.** 1994. Structure of the P22 att site. Conservation and divergence in the lambda motif of recombinogenic complexes. J. Biol. Chem. 269: 20798-20805.
- Stackebrandt, E., A. Fischer, T. Roggentin, U. Wehmeyer, D. Bomar i J. Smida.** 1988. A phylogenetic survey of budding, and/or prosthecate, non-phototrophic eubacteria: membership of Hyphomicrobium, Hyphomonas, Pedomicrobium, Filomicrobium, Caulobacter and "dichotomicrobium" to the alpha-subdivision of purple non-sulfur bacteria. Arch. Microbiol. 149: 547-556.
- Steinbacher, S., U. Baxa, S. Miller, A. Weintraub, R. Seckler i R. Huber.** 1996. Crystal structure of phage P22 tailspike protein complexed with *Salmonella* sp. O-antigen receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93: 10584-10588.
- Sullivan, S. M. i J. R. Maddock.** 2000. Bacterial sporulation: pole-to-pole protein oscillation. Curr. Biol. 10: R159-161.
- Sun, J., M. Inouye i S. Inouye.** 1991. Association of a retroelement with a P4-like cryptic prophage (retronphage phi R73) integrated into the selenocystyl tRNA gene of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173: 4171-4181.
- Surtees, J. A i B. E. Funnell.** 2003. Plasmid and chromosome traffic control: how ParA and ParB drive partition. Curr. Top. Dev. Biol. 56: 145-180.
- Susskind, M. M. i D. Botstein.** 1978. Molecular genetics of bacteriophage P22. Microbiol Rev. 42: 385-413.
- Susskind, M. M., D. Botstein i A. Wright.** 1974a. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. III. Failure of superinfecting phage DNA to enter *sieA+* lysogens. Virology. 62: 350-366.
- Susskind, M. M., A. Wright i D. Botstein.** 1974b. Superinfection exclusion by P22 prophage in lysogens of *Salmonella typhimurium*. IV. Genetics and physiology of *sieB* exclusion. Virology. 62: 367-384.

Susskind, M. M, i P. Youderian. 1982. Transcription in vitro of the bacteriophage P22 antirepressor gene. *J. Mol. Biol.* 154: 427-447.

Svenningsen, S. L., N. Costantino, D. L. Court i S. Adhya. 2005. On the role of Cro in lambda prophage induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 4465-4469.

Tanaka, K., K. Nishimori, S. Makino, T. Nishimori, T. Kanno, R. Ishihara, T. Sameshima, M. Akiba, M. Nakazawa, Y. Yokomizo i I. Uchida. 2004. Molecular characterization of a prophage of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1807-1812.

Tarahovsky, Y. S., A. A. Khusainov, A. A. Deev i Y. V. Kim. 1991. Membrane fusion during infection of *Escherichia coli* cells by phage T4. *FEBS Lett.* 289: 18-22.

Tartoff, K. D., i C. A. Hobbs. 1987. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* 9:12.

Taylor, K. i G. Wegrzyn. 1995. Replication of coliphage lambda DNA. *FEMS Microbiol. Rev.* 17: 109-119.

Thompson, J. F. i A. Landy. 1988. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res.* 16: 9687-9705.

Tinker, R. L., K. P. Williams, G. A. Kassavetis i E. P. Geiduschek. 1994. Transcriptional activation by a DNA-tracking protein: structural consequences of enhancement at the T4 late promoter. *Cell.* 77: 225-237.

Tokuno, S. I. i M. Gough. 1975. Host influence on the activity of genes c1 and c3 in regulating the decision between lysis and lysogeny in bacteriophage P22. *J. Virol.* 16: 1184-1190.

Tuma, R., M. H. Parker, P. Weigele, L. Sampson, Y. Sun, N. R. Krishna, S. Casjens, GJ Jr. Thomas i P. E. Jr. Prevelige. 1998. A helical coat protein recognition domain of the bacteriophage P22 scaffolding protein. *J. Mol. Biol.* 281: 81-94.

Tuma, R., H. Tsuruta, J. M. Benevides, P. E. Jr. Prevelige i GJ Jr. Thomas. 2001. Characterization of subunit structural changes accompanying assembly of the bacteriophage P22 procapsid. *Biochemistry.* 40: 665-674.

Ubeda C., E. Maiques, E. Knecht, I. Lasa, R. P. Novick i J. R. Penades. 2005. Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol.* 56: 836-844.

Ueno, H. i T. Yonesaki. 2001. Recognition and specific degradation of bacteriophage T4 mRNAs. *Genetics.* 158: 7-17.

Vander Byl, C. I A. M. Kropinski. 2000. Sequence of the genome of *Salmonella* bacteriophage P22. *J. Bacteriol.* 182: 6472-6481.

Vershon, A. K., S. M. Liao, W. R. McClure i R. T. Sauer. 1987a. Bacteriophage P22 Mnt repressor. DNA binding and effects on transcription in vitro. *J. Mol. Biol.* 195: 311-322.

Vershon, A. K., S. M. Liao, W. R. McClure i R. T. Sauer. 1987b. Interaction of the bacteriophage P22 Arc repressor with operator DNA. *J. Mol. Biol.* 195: 323-331.

Vershon, A. K., P. Youderian, M. M. Susskind i R. T. Sauer. 1985. The bacteriophage P22 arc and mnt repressors. Overproduction, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 260: 12124-12129.

Viener, H. L. 2004. Student presentation of bacteriophage. 2004. University of Florida.

Waldburger, C. D., i R. T. Sauer. 1995. Domains of Mnt repressor: roles in tetramer formation, protein stability, and operator DNA binding. *Biochemistry.* 34: 13109-13116.

Weaver, S. i M. Levine. 1977a. The timing of erf-mediated recombination in replication, lysogenization, and the formation of recombinant progeny by *Salmonella* phage P22. *Virology*. 76: 19-28.

Weaver, S. i M. Levine. 1977b. Recombinational circularization of *Salmonella* phage P22 DNA. *Virology*. 76: 29-38.

Wegrzyn, G., R. E. Glass i M. S. Thomas. 1992. Involvement of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in transcriptional activation by the bacteriophage lambda CI and CII proteins. *Gene*. 122: 1-7.

Wegrzyn, G., A. Pawlowicz i K. Taylor. 1992. Stability of coliphage lambda DNA replication initiator, the lambda O protein. *J. Mol. Biol.* 226: 675-680.

Wegrzyn, G., A. Wegrzyn, I. Konieczny, K. Bielawski, G. Konopa, M. Obuchowski, D. R. Helinski DR i K. Taylor. 1995. Involvement of the host initiator function *dnaA* in the replication of coliphage lambda. *Genetics*. 139: 1469-1481.

Weintraub, A., B. N. Johnson, B. A. Stocker i A. A. Lindberg. 1992. Structural and immunochemical studies of the lipopolysaccharides of *Salmonella* strains with both antigen O4 and antigen O9. *J. Bacteriol.* 174: 1916-1922.

Whipple, F. W., E. F. Hou i A. Hochschild. 1998. Amino acid-amino acid contacts at the cooperativity interface of the bacteriophage lambda and P22 repressors. *Genes Dev.* 12: 2791-2802.

Wommack, K. E. i R. R. Colwell. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 69-114.

Wu, L. J., i J. Errington. 2002. A large dispersed chromosomal region required for chromosome segregation in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 21: 4001-4111.

- Wu, L. J., i J. Errington.** 2003. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 49: 1463-1475.
- Wu, H., L. Sampson, R. Parr i S. Casjens.** 2002. The DNA site utilized by bacteriophage P22 for initiation of DNA packaging. *Mol. Microbiol.* 45: 1631-1646.
- Wulff, D. L., Y. S. Ho, S. Powers i M. Rosenberg.** 1993. The *int* genes of bacteriophages P22 and lambda are regulated by different mechanisms. *Mol. Microbiol.* 9: 261-271.
- Wulff, D. L. i M. E. Mahoney.** 1987. Cross-specificities between *cII*-like proteins and *pRE*-like promoters of lambdoid bacteriophages. *Genetics.* 115: 597-604.
- Yamaichi, Y. i H. Niki.** 2000. Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 14656-14661.
- Yin, S., W. Bushman i A Landy.** 1985. Interaction of the lambda site-specific recombination protein Xis with attachment site DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1040-1044.
- Young, R.** 1992. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol. Rev.* 56: 430-481.
- Young, R., i U. Blasi.** 1995. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev.* 17: 191-205.
- Zylicz, M., I. Gorska, K. Taylor i C. Georgopoulos.** 1984. Bacteriophage lambda replication proteins: formation of a mixed oligomer and binding to the origin of lambda DNA. *Mol. Gen. Genet.* 196: 401-406.
- Zylicz, M., J. Nieradko i K. Taylor.** 1983. *Escherichia coli dnaJ*- and *dnaK*-gene products: synthesis in minicells and membrane-affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110: 176-180.