

**Programa de Doctorado de Investigación en Cáncer
Departamento de Biología Funcional
Universidad de Oviedo**

**CONTRIBUCIÓN A LA DETERMINACIÓN DE LAS
FUNCIONES DE *cro*, *ant* y *orf22* DEL FAGO A2 SOBRE
LA DECISIÓN LISIS/LISOGENIA DURANTE LA
INFECCIÓN DE *Lactobacillus casei*.**

-TESIS DOCTORAL-

Susana Escobedo Martín

Oviedo, 2012

Índice

Abreviaturas.....	i
1. Introducción.....	1
1.1. Las bacterias del ácido láctico (BAL)	1
1.1.1 Clasificación	2
1.1.2 Aplicación de las bacterias lácticas en la industria.....	3
1.2. Bacteriófagos	5
1.2.1 Características generales.....	5
1.2.2 Clasificación	5
1.2.3 Ciclos virales	6
1.2.4 Activación de la respuesta SOS e inducción de los profagos.....	8
1.3. Bacteriófagos de <i>Lactobacillus</i>	8
1.4. El bacteriofago A2.....	10
1.4.1 Características generales.....	10
1.4.2 El interruptor lisis-lisogenia	11
1.4.3 Módulo de integración.....	14
1.4.4 Módulo de replicación	14
1.4.5 Módulo estructural o de morfogénesis	14
1.4.6 Módulo de empaquetamiento	16
1.4.7 Módulo de lisis	16
1.4.8. Transcripción	16
1.5. Antirrepresores	17
2. Objetivos.....	19
3. Material y métodos	21
3.1 Microorganismos y replicones	21
3.1.1 Microorganismos	21
3.1.2 Vectores de clonación y derivados	22
3.2 Reactivos y materiales	23
3.3 Oligonucleótidos.....	24

3.4 Medios y condiciones de cultivo	26
3.4.1 Bacteriófago A2.....	26
3.4.2 <i>Lactobacillus casei</i>	26
3.4.3 <i>Escherichia coli</i>	26
3.4.4 Condiciones de conservación de las cepas	26
3.5 Obtención y purificación de los viriones.....	27
3.5.1 A gran escala	27
3.5.2 A pequeña escala	27
3.6 Cuantificación de la cinética de producción de viriones	28
3.6.1 Infección	28
3.6.2 Inducción	28
3.7 Obtención, manipulación y análisis de ADN <i>in vitro</i>	28
3.7.1 Extracción de ADN plasmídico.....	28
3.7.2 Obtención de ADN genómico	29
3.7.2.1 <i>Lactobacillus casei</i>	29
3.7.2.2 Bacteriófago A2.....	29
3.7.3 Tratamientos enzimáticos.....	30
3.7.4 Marcaje radiactivo	30
3.7.5 Electroforesis de ADN y purificación a partir de geles de agarosa.....	30
3.7.6 Amplificación génica por PCR.....	31
3.7.6.1 Oligonucleótidos cebadores.....	31
3.7.6.2 Composición de una mezcla típica de reacción.....	31
3.7.7 Mutagénesis sitio-específica.....	32
3.7.8 Secuenciación de ADN.....	33
3.8 Procedimientos de transformación génica.....	33
3.8.1 <i>Escherichia coli</i>	33
3.8.2 <i>Lactobacillus casei</i>	34
3.9 Obtención de bacteriófagos recombinantes.....	34
3.10 Transcripción <i>in vitro</i> y purificación de ARN marcado radiactivamente	35
3.11 Expresión, análisis y purificación de proteínas	36
3.11.1 Síntesis y purificación de Ant, Ant-142 y Orf22.....	36

3.11.2 Síntesis y purificación de Ant-255	37
3.11.3 Síntesis y purificación de CI.....	37
3.11.4 Síntesis y purificación de Cro.....	38
3.11.5 Cuantificación de proteínas	38
3.11.6 Análisis aminoacídico	39
3.11.7 Determinación del grado de oligomerización por unión covalente.....	39
3.11.8 Interacción proteína-proteína.....	39
3.12 Análisis de la interacción de proteínas con ácidos nucleicos	39
3.12.1 Ensayo de retardo de ADN en gel	39
3.12.2 Ensayo de retardo de ARN en gel	40
3.13 Métodos inmunológicos	40
3.13.1 Obtención de anticuerpos	40
3.13.2 Detección de proteínas por inmunoblot.....	41
4. Resultados.....	42
4.1 Traducción diferencial del gen <i>cro</i> en <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	42
4.1.1 En <i>L. casei</i> solo se detecta la forma canónica de Cro	42
4.1.2 Generación de un profago en el que el retroceso de los ribosomas es genéticamente imposible	44
4.1.3 La mutación en la secuencia deslizante del gen <i>cro</i> es silenciosa.....	47
4.2 Estudio de la posible función codificada por el gen <i>orf22</i> del fago A2	48
4.2.1 Análisis de la secuencia de Orf22 y comparación con las de otras proteínas .	48
4.2.2 Sobre-expresión de <i>orf22</i> en <i>Escherichia coli</i>	50
4.2.3 Expresión en trans de <i>orf22</i> en <i>L. casei</i> y efecto sobre la generación de progenie viral.....	51
4.3 Análisis de la función reguladora de Ant	52
4.3.1 Comparación de las secuencias de diversos genes <i>ant</i> y de los productos deducidos de ellas	52
4.3.2 Efecto de la sobreexpresión de <i>ant</i> sobre la generación de progenie viral.....	54
4.3.2.1 En cultivos de <i>Lactobacillus casei</i> sensibles al fago A2	54
4.3.2.2 En cultivos de <i>Lactobacillus casei</i> lisogénicos para el fago A2.....	57

4.3.3 Expresión de <i>cI</i> , <i>cro</i> Y <i>ant</i> durante el ciclo lítico	60
4.3.4 Purificación de Ant y de Ant-142 y determinación de su estructura funcional	62
4.3.5 Interacción de Ant con proteínas implicadas en la decisión lisis-lisogenia.....	64
4.3.5.1 Ant no forma complejos con CI	64
4.3.5.2 Ant interacciona con Cro.....	65
4.3.6 Interacción de Ant con la región intergénica <i>cI-cro</i> y competencia con los represores CI y Cro.....	66
4.3.6.1. Interacción de Ant con la región intergénica <i>cI-cro</i>	66
4.3.6.2 Competición de Ant con CI por el segmento intergénico	67
4.3.6.3 Competición con Cro.....	68
4.3.7 Interacción de Ant con los ARNm de <i>cI</i> y de <i>cro</i>	69
4.3.8 Generación de nuevos genes <i>ant</i> y purificación de sus productos	71
4.3.8.1 Obtención de Ant-255 y efecto de su expresión sobre el ciclo lítico del profago A2.....	71
4.3.8.2 Purificación de Ant-255 y determinación de su grado de oligomerización.	73
4.3.8.3 Obtención de Ant-142 purificada	75
4.3.9 Interacción de Ant-255 con ADN.....	75
4.3.9.1 Unión a la región intergénica <i>cI- cro</i>	75
4.3.9.2 Efecto de CI y Cro sobre la unión de Ant-255 a ADN.....	76
4.3.10 interacción de Ant-255 y Ant-142 con ARN.....	76
5. Discusión	80
5.1. Traducción diferencial del gen <i>cro</i> en <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i>	80
5.2 <i>orf22</i> : Un determinante en busca de función.....	84
5.3 Características y posible función de Ant	85
6. Conclusiones.....	93
7. Bibliografía.....	95

Abreviaturas

A _____

A: adenina

Aa: aminoácidos

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

Ap: ampicilina

ATCC: “American Type Culture Collection”

ATP: adenosin trifosfato

B _____

BAL: bacterias del ácido láctico

BrEt: bromuro de Etidio

BSA: proteína seroalbúmina bovina

C _____

C: citosina

Ci: curios

CNB: Centro Nacional de Biotecnología.

Cm: cloranfenicol

CsCl: cloruro de Cesio

D _____

Da: daltons

dATP: desoxiadenina 5'-trifosfato

dCTP: desoxicitosina 5'-trifosfato

DEPC: dietilpirocarbonato

dGTP: desoxiguanina 5'-trifosfato

DMSO: dimetil sulfóxido

DNase: desoxirribonucleasa.

DO: densidad óptica.

dsADN: ADN de doble cadena

DTT: ditioneitol

dTTP: desoxitimina 5'-trifosfato

E _____

EBI: European Bioinformatics Institute

EDTA: ácido etileno-diamino-tetraacético.

EFSA: European Food Safety Authority

Em: eritromicina

EMBL: European Molecular Biology Laboratory

EMSA: ensayo de retardo en gel

ExPASy: Expert Protein Analysis System

F _____

FDA: Food and Drug Administration

G _____

G: guanina

GRAS: Generally Regarded As Safe

I _____

IPTG: 1-isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

K _____

Kb: kilobase

KDa: kilodaltons

L _____

LB: medio Luria -Bertani

M _____

M: concentración molar

MC: mitomicina

ME: microscopio electrónico

Min: minuto

Mm: masa molecular.

Moi: multiplicidad de infección

N _____

NCBI National Center for Biotechnology Information

O _____

Orf: pauta abierta de lectura

Ori: origen de replicación

P _____

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

Pb: pares de base

PBS: solución salina tamponada con fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEG: polietilenglicol.

PEI: polietilenimina

PI: punto isoeléctrico

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PM: peso molecular

QPS: Qualified Presumption of Safety

R _____

RBS: sitio de unión al ribosoma.

Rif: rifampicina

Rpm: revoluciones por minuto

S _____

SA: sulfato de amonio

SDS: sodio Dodecil Sulfato

Seg: segundos

STEC: *E. Coli* shigatoxigénica

STX: Shiga Toxinencoding

T _____

T: timina

TAE: tris-acetato sodico-EDTA

TBA: tris-acetato borico-EDTA

TE: tris-HCl-EDTA

Tm: temperatura de fusión

Tris: 2-amino-(hidroximetil)-1,3 propanodiol

U _____

U: uracilo

Ufc: unidades formadoras de colonias

Ufp: unidades formadoras de placas

UTP: uridina 5' trifostato

UV:: luz ultravioleta

V _____

V: voltios

X _____

X-Gal: 5- bromo-4cloro-3-indol-beta-D-
galapiranosido

1. Introducción

1.1. LAS BACTERIAS DEL ACIDO LÁCTICO (BAL)

Las bacterias del ácido láctico comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, generalmente inmóviles, que obtienen la energía a partir de la fermentación de los azúcares dando lugar a ácido láctico (Dellaglio y col., 1994). No forman esporas, no producen pigmentos y no reducen nitratos. Son anaerobios aerotolerantes o estrictos; los primeros pueden sintetizar peroxidasas y superóxido dismutasas, lo que les permite sobrevivir en presencia de oxígeno (Desmazeaud y de Roissart, 1994). Debido a su limitada capacidad biosintética, son muy exigentes nutricionalmente.

Constituyen un grupo de bacterias ubicuo en el ambiente natural, apareciendo tanto en la superficie de los vegetales como en el suelo. A partir de aquí colonizan los productos agropecuarios y fermentan los azúcares presentes en los mismos, siendo así esenciales para la obtención de productos lácteos, cárnicos y de pescado, cervezas, vinos, encurtidos y ensilados (Venema y col., 1996).

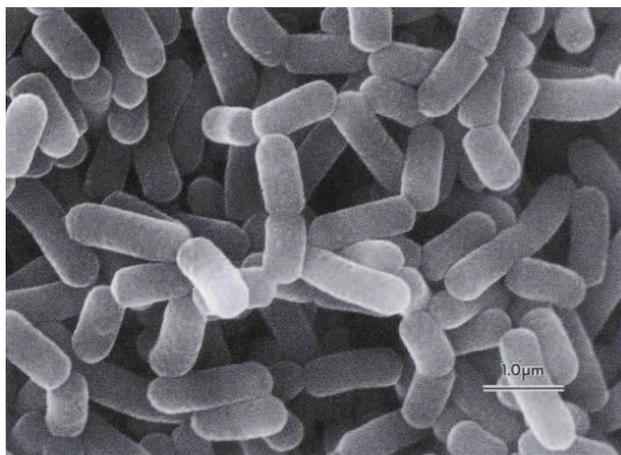


Figura 1.- Apariencia de células de *Lactobacillus casei* vistos con microscopía electrónica de barrido. Imagen obtenida de Dellaglio y col. (1994).

También forman parte de la microbiota normal que se encuentra en el tracto nasofaríngeo, gastrointestinal y urogenital de los animales, donde participan activamente en los procesos de antagonismo microbiano, tendentes a limitar o excluir a los patógenos de la superficie de las mucosas. Su papel es triple; por un lado, impiden la adherencia de los

microorganismos indeseables mediante la formación de una biopelícula que impide que alcancen el epitelio; por otro, generan compuestos antimicrobianos, principalmente ácido láctico (hasta 2,7%), pero también bacteriocinas y H₂O₂ y, por último, co-agregan con los patógenos, dificultando aún más su adherencia a las superficies mucosas y maximizando el efecto tóxico de dichos antimicrobianos.

1.1.1. CLASIFICACIÓN

Las bacterias lácticas pueden clasificarse en función de los productos finales del metabolismo de los azúcares en tres grupos (Kandler, 1983):

1. **Homofermentativas estrictas.** Fermentan exclusivamente hexosas y únicamente producen ácido láctico. A este grupo pertenecen *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* y *L. salivarius*.
2. **Heterofermentativas facultativas.** Fermentan hexosas y generan ácido láctico, pero también pentosas, dando lugar a ácido láctico y acético o etanol. Ejemplos de este grupo son *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* y *L. sakei*.
3. **Heterofermentativas estrictas.** Fermentan hexosas originando ácido láctico, acético o etanol y CO₂, y pentosas dando lugar a ácido láctico y acético o etanol, pudiéndose generar en algunos casos, además, ácido fórmico y succínico. *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* y *L. reuteri* son algunos de los miembros de esta categoría.

Desde un punto de vista filogenético, se dividen en dos grandes grupos. El primero está representado por microorganismos incluidos en la subdivisión *Clostridium* del grupo de bacterias Gram positivas, y se caracterizan por poseer genomas con bajo contenido en G+C (inferior al 50%) (Stackebrand y Teuber, 1988, Collins y col., 1991; Gasser y col., 1994). Incluye los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*. El segundo grupo comprende los géneros *Bifidobacterium* y *Propionibacterium*, que se incluyen en la subdivisión *Actinomycetes*, y se caracterizan por sus genomas con un elevado contenido en G+C (superior al 50%). Esta división ha sido confirmada con los datos de la comparación de secuencias de sus ARNr 16S (Scheifer y col., 1995).

1.1.2. APLICACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA INDUSTRIA

Las bacterias lácticas desempeñan un importante papel en la industria alimentaria como iniciadores de la fermentación, contribuyendo al cambio de las cualidades sensoriales de las materias primas de partida y aumentando el periodo útil de consumo de los alimentos fermentados respecto a los productos agropecuarios de los que proceden. Como consecuencia de ello, alcanzan grandes concentraciones en los productos finales (por ejemplo, en el yogur, las concentraciones mínimas de *L. delbrueckii* y de *S. thermophilus* han de ser de 10^8 ufc/g; BOE de 3 de Julio de 1987), sin que ello suponga ningún problema para la salud pública, por lo que se les ha calificado como organismos GRAS (Generally Regarded As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la FDA (Food and Drug Administration de Estados Unidos) y por la EFSA (European Food Safety Authority) respectivamente.

El principal factor responsable de los cambios en la materia prima es la acidez que generan, la cual dificulta el desarrollo de organismos patógenos y alterantes, pero además contribuye de manera fundamental a mejorar sus propiedades sensoriales, nutricionales e incluso promotoras de la salud. Así por ejemplo, el acetaldehído y el diacetilo resultantes de la fermentación del citrato, otorgan al yogur y a la mantequilla su sabor y aroma característicos. Las actividades lipolítica y proteolítica también influyen en la formación de compuestos que confieren las características organolépticas típicas a variedades de quesos madurados, como son los ácidos grasos libres y los derivados de la transformación enzimática de algunos aminoácidos (Borgeosis y Larpent, 1995). El uso de cultivos iniciadores productores de polisacáridos se ha incrementado en los últimos años, ya que aumentan la calidad reológica, mejoran la textura e incrementan la viscosidad (Mollet y col., 1999) Las bacterias ácido lácticas también son usadas como probióticos en determinados yogures, ya que se complementan con las bacterias presentes en nuestra microbiota intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo (Reid y Burton, 2002).

El empleo de la manipulación genética ha incrementado las posibilidades de aplicación de estas bacterias en la industria. Algunos ejemplos incluyen el desarrollo de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para la producción de yogures menos ácidos y para evitar la sobreacidificación durante el almacenamiento; la mutagénesis y selección de

Lactococcus lactis que promueven la aceleración de la maduración de quesos mediante el incremento de las actividades que dan lugar a compuestos responsables de sabor y aroma, o la modificación de las rutas que conducen a la producción de determinados péptidos y derivados volátiles de la proteólisis y del catabolismo de aminoácidos, que dan lugar a nuevos perfiles de sabor y aroma en los productos. También se han obtenido nuevas cepas por transferencia de plásmidos que codifican para la síntesis de bacteriocinas, con el objetivo de establecer barreras al desarrollo de microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos y para la resistencia a la infección por fagos, para asegurar el éxito de la fermentación láctica. Se están desarrollando además métodos que buscan la utilización de las BAL para la síntesis de compuestos de interés como vitaminas (ácido fólico, riboflavina, cobalamina), edulcorantes no calóricos, exopolisacáridos con acción texturizante y oligosacáridos con características prebióticas (Sybesma y col., 2003; Welman y Maddox, 2003; Hanniffy y col., 2004; Santos y col, 2008). Aparte de en la industria de alimentos, actualmente se está invirtiendo en el empleo de bacterias lácticas para la producción industrial de compuestos químicos tales como biopolímeros, enzimas, etanol y ácido láctico, entre otros.

En lo que respecta al campo de la salud, la aplicación de la biotecnología de bacterias lácticas ha llevado a estudios dirigidos al empleo de estos microorganismos como vehículos de vacunas por vía oral, por ejemplo para la protección frente a la toxina tetánica, colérica o la brucelosis (Mercenier y col., 2000). También se las utiliza como inductoras de la síntesis de citocinas, para modular la respuesta inmune en el tratamiento de individuos con enfermedad inflamatoria intestinal (Steidler y col., 2002). El sistema proteolítico de las bacterias lácticas se ha analizado para la generación de péptidos bioactivos con interesantes propiedades en salud como antihipertensivos, opioides, inmunomoduladores, antimicrobianos, antitrombóticos e incluso con capacidad quelante de minerales.

Principal inconveniente para el empleo de las bacterias lácticas en la industria: los bacteriófagos

Las BAL son esenciales para las industrias de fermentación alimentaria, por lo que cualquier circunstancia que afecte a su viabilidad será un problema serio para la fabricación. Es lo que ocurre con los antibióticos que, en ocasiones, aparecen en la leche como consecuencia del tratamiento de las infecciones del ganado o con los desinfectantes que se

usan en la higienización en las propias factorías. Sin embargo, la infección por bacteriófagos es el problema más frecuente, grave y difícil de controlar al que se enfrentan. Esto es porque las condiciones que favorecen la preponderancia de las bacterias que se utilizan como organismos iniciadores, promueven así mismo el desarrollo de sus bacteriófagos (Mata y col., 1986, Neve y co., 1998). Los fagos son capaces de enmascararse en los cultivos sensibles mediante los procesos de lisogenia y pseudolisogenia, además de ser muy resistentes al ambiente, por lo que su eliminación resulta ser muy problemática. Provocan la lisis de las células en los cultivos iniciadores interfiriendo con el proceso fermentativo, lo que da lugar a productos de baja calidad y en muchos casos, a la pérdida de la materia prima. El problema no ha podido eliminarse a pesar de la adopción de medidas preventivas de protección como la rotación de iniciadores, el uso de fermentadores herméticos, el mantenimiento de ambientes hiperbáricos en las factorías, la incubación de los iniciadores en medios pobres en cationes divalentes y ricos en fosfato, que los quela (el Mg^{2+} y Ca^{2+} son necesarios para la estabilidad de los viriones), etc. (Accolas y col., 1994; Klaenhammer y col., 1984; Moineau y col., 1996).

Esto ha llevado al estudio intensivo de los bacteriófagos que infectan a las bacterias lácticas y que ha dado como resultado el aislamiento y a la secuenciación de un gran número de ellos, y al mismo tiempo ha estimulado el análisis de los métodos de defensa frente a la infección desarrollados por las propias bacterias, en un intento de desarrollar sistemas para la mejora de las cepas de valor aplicado (Allison, 1998; Madera y col., 2004).

1.2. BACTERIÓFAGOS

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los bacteriófagos o fagos son los virus de las bacterias y arqueas. Por tanto son parásitos intracelulares obligados que utilizan la maquinaria biosintética celular para su multiplicación. Infectan a todo tipo de organismos procariotas y juegan un papel importante en la regulación del balance microbiano de los ecosistemas.

Los fagos están constituidos por una cubierta proteica o cápside en cuyo interior se encuentra el material genético, que puede ser ADN o ARN de cadena simple o doble. El tamaño del ácido nucleico varía dependiendo del fago. Los más simples sólo tienen el suficiente para codificar entre 3 y 5 productos génicos, mientras que los fagos más complejos

pueden codificar para más de 100 proteínas. En cuanto al tamaño, la mayoría oscila en un rango de 24-200 nm de longitud.

1.2.2. CLASIFICACIÓN

La clasificación de los fagos se basa en el tipo de ácido nucleico que poseen y la morfología de las partículas virales (figura 2) (Ackermann, 2006). Los fagos con ADN de cadena doble lineal y con cola se agrupan en el orden *Caudovirales*. Los viriones incluidos en este grupo presentan cápsides con simetría regular y forma icosaédrica y no poseen envueltas lipídicas. El orden se subdivide en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*, en función de la longitud y estructura de la cola. Los fagos de la familia *Myoviridae* poseen cola contráctil con una vaina externa y un tubo central. Los de la familia *Siphoviridae* poseen una cola larga no contráctil, y los de la *Podoviridae* tienen colas cortas (figura 3).

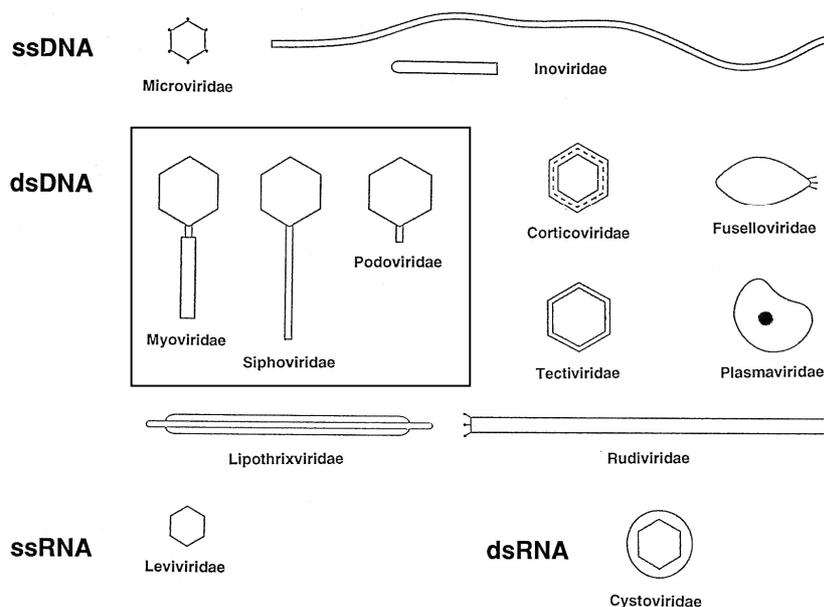


Figura 2.- Representación esquemática de las 13 familias de fagos de acuerdo con la clasificación del Comité Internacional de Sistemática de Virus. Encuadradas se encuentran las tres familias pertenecientes al orden Caudovirales (extraído de Ackermann, 2006).

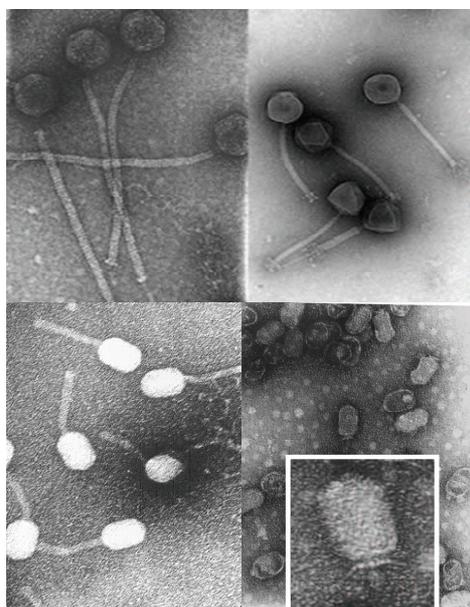


Figura 3.- Morfología de virus de bacterias lácticas. A) Bacteriófago A2 de *Lactobacillus casei* con cola larga no contráctil (familia *Siphoviridae*). B) Bacteriófago LJ65 de *Lactobacillus jensenii* con cola larga contráctil (familia *Myoviridae*). C) Bacteriófago C2 de *Lactococcus lactis* (familia *Siphoviridae*). D) Bacteriófago 434 de *Lactococcus lactis* con cola corta (familia *Podoviridae*).

1.2.3. CICLOS VIRALES

El primer paso en el proceso de infección es la **adsorción** del fago a la célula bacteriana y está mediado por las fibras de la cola o por alguna estructura análoga. Las fibras se unen a receptores específicos en la célula que pueden ser lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, proteínas e incluso flagelos. Cada fago sólo podrá infectar ciertas bacterias dependiendo de sus receptores. Una vez el fago ha logrado unirse a la envoltura bacteriana, el ácido nucleico que se encuentra en la cápside pasa a través de la cola hueca y penetra en la célula. A partir de aquí el ADN viral puede seguir dos caminos: el primero, denominado **ciclo lítico**, termina con la ruptura de la célula infectada y la liberación de la progenie viral; por el segundo, el genoma del fago se va a integrar en el de la célula hospedadora y a transmitirse a los descendientes de la misma como parte de su material genético (**ciclo lisogénico**). Los fagos que sólo llevan a cabo el ciclo lítico se denominan **virulentos**, a los que pueden elegir entre ambos ciclos se les conoce como **atemperados**. El genoma viral insertado en la célula

hospedadora se llama **profago**. El mantenimiento del estado lisogénico depende de la expresión del gen *cI*, cuyo producto génico, CI, mantendrá reprimidos todos los promotores virales, excepto el suyo propio, impidiendo así la generación de nuevos virus (figura 4).

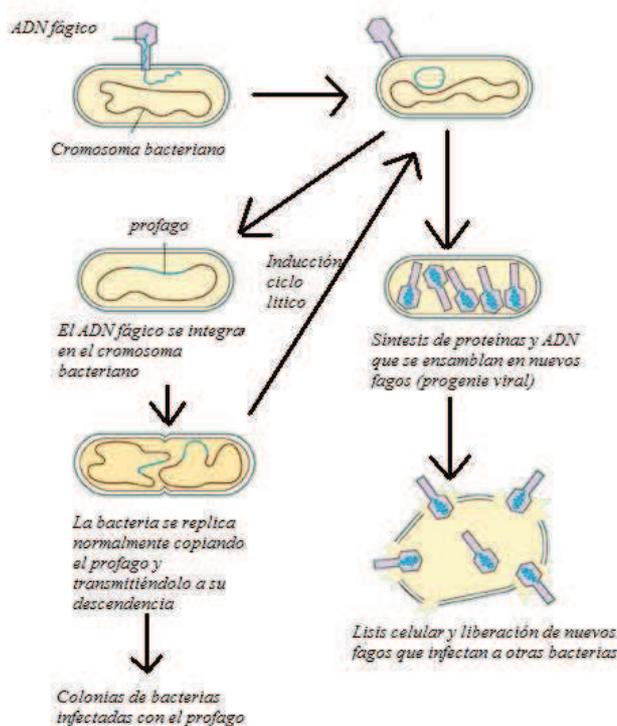


Figura 4.- Etapas de los ciclos de desarrollo de los bacteriófagos.

1.2.4. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA SOS E INDUCCIÓN DE LOS PROFAGOS

El estado de aparente armonía que se establece entre la célula lisogenizada y sus profagos puede romperse espontáneamente o tras un proceso de inducción mediado por la denominada respuesta SOS. Se trata de un mecanismo de emergencia frente al daño en el material genético o el bloqueo de su replicación. Durante ella se induce la síntesis de los productos génicos de más de 40 determinantes destinados a la reparación del daño (*sfiA*, *sfiB*, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *recA*, *umuC*, *umuD*, *polA*, *dinD*, entre otros) cuya expresión, regulación y modulación está mediada por el circuito *recA/lexA*, (Janion, 2008). La proteína LexA es el represor común a todos los genes SOS.

RecA participa en la recombinación y tiene afinidad por ADN en cadena sencilla. Cuando se daña el ADN celular, RecA se une a los extremos que se generan y eso provoca que se pegue a LexA. Esta última tiene actividad proteasa latente que se activa al unirse RecA, lo que provoca su autólisis. La eliminación de LexA libera los promotores de los genes SOS y se pone en marcha el mecanismo de reparación. RecA activada tiene también afinidad por el represor del ciclo viral CI. Al unirse a él provoca su ruptura e inactivación, de manera que los promotores virales, que estaban bloqueados por CI, quedan accesibles a la ARN polimerasa, iniciándose así el ciclo lítico.

1.3. BACTERIÓFAGOS DE *Lactobacillus*

Desde que se aisló el primer fago de *Lactobacillus* a partir de las aguas residuales de Nueva York (Kopeloff y col., 1936), se han caracterizado otros muchos que infectan a prácticamente todas las especies (Brussow y Suárez, 2006). Hasta la fecha se han identificado un total de 231 fagos, de los que 186 han sido observados por microscopía electrónica. Todos poseen cápsides isométricas y cola, lo que permite clasificarlos dentro del orden *Caudovirales*, habiéndose encontrando que 109 de ellos pertenecían a la familia *Siphoviridae*, 76 a la *Myoviridae* y 1 a la *Podoviridae* (Villion y Moineau, 2009). El genoma de los bacteriófagos de *Lactobacillus*, en los casos en que se conoce, está constituido por una molécula lineal de dsADN, oscilando su tamaño entre 30 y 50 kb, aunque los fagos de *L. plantarum* B2 (Nes y col., 1988), LP1-A y LP1-B (Caso y col., 1995) y LP65 presentan tamaños mayores (Chibani-Chennoufi y col., 2004). La lisogenia es relativamente frecuente (Coetzee y col., 1964); un estudio de 148 cepas (15 especies) concluyó que el 27% de ellas liberaban fagos tras ser expuestas a mitomicina C (Yakokura y col., 1974).

En la actualidad se conocen las secuencias de 10 genomas completos de fagos de lactobacilos. Es el caso de ϕ gle, LP65 y ϕ JL-1 (*L. plantarum*) (Kodaira y col., 1997; Chibani-Chennoufi y col., 2004; Lu y col., 2005), ϕ adh (*L. gasseri*) (Altermann y col., 1999), A2 y ϕ AT3 (*L. casei*) (García y col., 2003, Lo y col., 2005), LL-H (*L. delbrueckii*) (Alatossava y col., 1998; 1991), Lc-Nu (*L. rhamnosus*) (Forsman y col., 1991), Lv1 (*L. jensenii*) (Martín y col., 2008) y KC5a (*L. crispatus*) (Kiliç y col., 2001). Nos encontramos con un gran polimorfismo genético, que guarda relación con la diversidad encontrada en los genomas de los hospedadores. No obstante, todos ellos parecen poseer una organización similar, en la que

los genes se encuentran agrupados en módulos funcionales que guardan un mismo orden. Dichos módulos son: empaquetamiento del genoma viral en la cápside; estructural, subdividido a su vez en agrupaciones génicas para la morfogénesis de la cápside, del cuello y de la cola; lisis del hospedador; integración de su genoma; decisión entre ciclo lítico-lisogénico y replicación.

1.4. EL BACTERIOFAGO A2

1.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El bacteriófago A2 se aisló a partir del suero de una fermentación fallida de queso Gamonedo, un queso azul asturiano de producción artesanal (Herrero y col., 1994). Se trata de un fago atemperado que infecta a cepas de *L. casei* y *L. paracasei*, dos especies con propiedades probióticas que son utilizadas en la fabricación de quesos y leches fermentadas. Presenta viriones desnudos, compuestos por una cabeza isométrica de 60 nm de diámetro y una cola larga, flexible y no contráctil de 290 nm de largo y 12 nm de ancho, que termina en una placa basal con una espina sobresaliente de 28 nm (García y col., 2003); por ello se incluye dentro de la familia *Siphoviridae* (figura 5). Su genoma reside en una molécula de ADN de doble cadena de 43.411 pb, que presenta extremos cohesivos 3' sobresalientes y un contenido en G+C del 44,8% (García y col., 1997, 2003). En él se identificaron 61 pautas abiertas de lectura, organizadas en los módulos funcionales enumerados en el párrafo anterior: el correspondiente al interruptor genético, implicado en la decisión entre ciclo lítico-lisogénico (García y col., 1999; Ladero y col., 1998; 1999; 2002), el que media la integración en el hospedador (Álvarez y col., 1998), el de lisis (Ribelles y col., 2011), el responsable de la generación de los extremos cohesivos y empaquetamiento del genoma viral (García y col., 1997), el de replicación (Moscoso y col., 2000) y el que comprende los genes que originan las proteínas estructurales del fago (García y col., 2003, 2004; Rodríguez y col., 2005) (figura 6A).

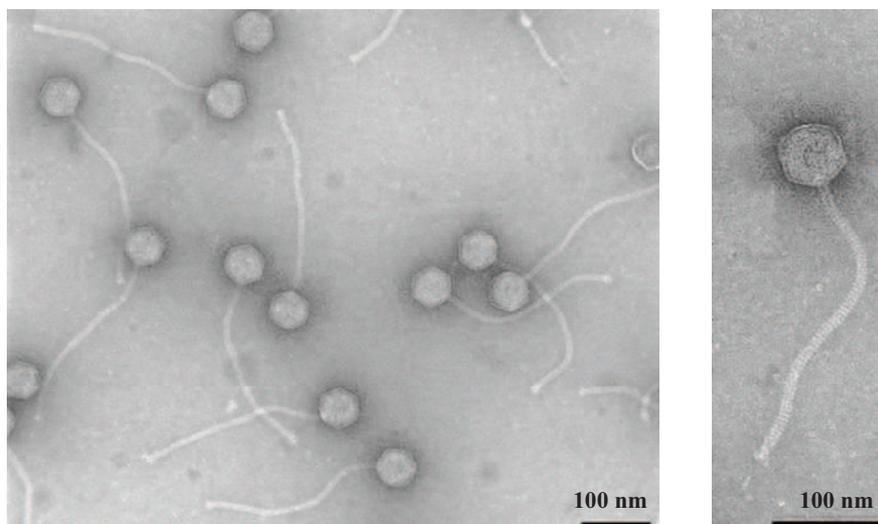


Figura 5.- Micrografía electrónica del fago A2 (la barra se corresponde con 100 nm)

1.4.2. EL INTERRUPTOR LISIS-LISOGENIA

La región que comprende el módulo de decisión entre los ciclos lítico o lisogénico de A2 presenta dos promotores adyacentes (P_L y P_R) que promueven la expresión de genes con sentidos de transcripción divergente (figura 6B). P_L gobierna la expresión de los genes *cI*, *orf22*, una pauta que podría codificar una excionasa y el determinante de síntesis de la integrasa, enzima que cataliza la inserción del genoma viral en el del hospedador bacteriano. P_R dirige la expresión de *cro*, *ant* y de los genes de replicación que se encuentran aguas abajo de ellos. En la zona intergénica se encuentran tres regiones operadoras de secuencias similares (O_1 , O_2 y O_3) que solapan con los promotores P_L y P_R y que son reconocidas por C_I y Cro con distintas afinidades. C_I se une preferentemente a O_1 y O_2 , bloquea el promotor P_R y por lo tanto la expresión de *cro* y de los genes de replicación, promoviendo la entrada del fago en un ciclo lisogénico. Cro , en cambio, tiene mayor afinidad por O_3 , con lo cual reprime a *cI* y probablemente a los genes siguientes, favoreciendo que el fago siga un ciclo lítico (Brüssow y Suarez, 2006; García y col., 1999; Ladero y col., 1999, 2002). Existen resultados preliminares que indican que la presencia de uno de los represores sobre la región operadora estimula el posicionamiento de la ARN polimerasa sobre el promotor opuesto, es decir, que los represores serían, además, activadores de su propia síntesis hasta que, cuando se hacen muy abundantes, se unen a los tres operadores y bloquean la expresión viral temprana.

El gen *cro* codifica para un polipéptido de 81 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 9,1 kDa y un pI básico (10,8). Durante la traducción en *Escherichia coli*, parte de los ribosomas sufren un desplazamiento a la pauta -1, provocado por la presencia de una secuencia deslizante U UUU UUU (pauta 0) que se corresponde con los codones 66 y 67, y de una secuencia invertida adyacente capaz de formar una estructura secundaria en el ARN [las secuencias deslizantes se caracterizan porque los codones presentes en los sitios A y P del ribosoma en la pauta 0 y los resultantes del deslizamiento a la -1 deben ser compatibles con los anticodones de los ARNt alojados en dichos sitios; es decir, que la traducción del heptanucleótido da lugar a los mismos dos aminoácidos en ambas pautas (Baranov y col., 2001; 2002)]. Como consecuencia del desplazamiento de pauta, *cro* genera dos polipéptidos, el canónico y otro que es idéntico a él hasta el aminoácido 67 y que tiene solo dos residuos más porque en la nueva pauta aparece un codón de terminación prematuro. Al inicio de esta Tesis se ignoraba si el desplazamiento de pauta ocurría también durante la traducción de *cro* en *L. casei*. Cro presenta homología de secuencia con una proteína de un pseudobacteriófago de *Pseudomonas aeruginosa* (Lee y col., 1999) y con los productos de genes localizados en posición similar en los bacteriófagos Sfi21 y TP-J34 de *Streptococcus thermophilus* (Bruttin y col., 1997; Neve y col., 1998). El codón de terminación de *cro* se solapa con el inicio de *ant*. Este gen codifica un polipéptido de 160 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 17,8 kDa y un pI de 5,39. Su localización y el hecho de poseer similar localización a genes auxiliares de otros bacteriófagos de BAL como BK5-T (Desiere y col., 2001), r1t (Nauta y col., 1996) Sfi21 (Brutin y Brussow, 1996), Lc-Nu (Tuohimaa y col, 2006) y Lv-1 (Martín y col., 2008) sugiere que podría jugar algún papel en la decisión lisis/lisogenia del fago A2. Las proteínas deducidas de los genes de todos esos fagos presentan homología con el antirrepresor de P1 (Riedel y col., 1993), aunque el Ant de A2 no tiene un parecido significativo con dicho antirrepresor.

El producto del gen *cI* es un polipéptido de 224 aminoácidos, que corresponde a un peso molecular de 25,2 kDa y un pI de 4,5. Posee un motivo de unión al ADN y un dominio de reconocimiento para la proteasa RecA, y se ha demostrado que confiere al hospedador inmunidad a la superinfección (Álvarez y col., 1999, Ladero y col., 1998). Su secuencia de aminoácidos presenta homología con represores del ciclo lítico de otros bacteriófagos como CI

de lambda (Sauger y Andreg, 1978) y de $\phi 80$ (Ogawa y col., 1988) y Rho del bacteriófago r1t (Nauta y col., 1996).

La pauta de lectura localizada inmediatamente detrás del gen *cI*, *orf22*, codifica para un polipéptido de 24,4 kDa compuesto por 225 aminoácidos y con un pI de 4,4. La comparación de la secuencia de su producto génico con proteínas de la base de datos reveló similitud con una del bacteriófago Lmr1, que infecta a *L. ramnhusus* (Durmaz y col., 2008) y TcdC, de un operón policistrónico que codifica las enterotoxinas A y B de *Clostridium difficile* (Dupuy y col., 2008). También se encontró homología con dos Orfs de función desconocida pero situadas en una posición similar, entre el gen *cI* y los genes de integración sitio-específica, Lmr1 (Durmaz y col., 2008) y phiMH1 (Jang y col., 2010), que infectan *L. ramnhusus* y *L. pseudomesenteroides* respectivamente.

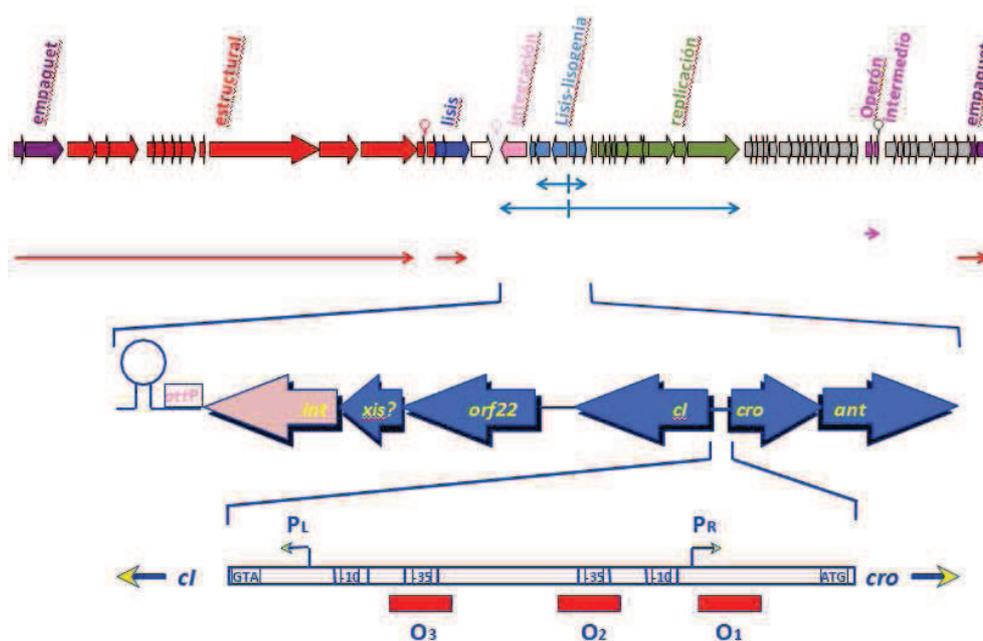


Figura 6.- A) Representación esquemática del genoma del bacteriófago A2 mostrando la localización de los diferentes módulos funcionales y los ARNs sintetizados por el fago durante los periodos temprano (flechas azules), intermedio (flecha fucsia) y tardío (flechas rojas). B) Detalle de las pautas abiertas de lectura localizadas en la región correspondiente al interruptor genético e integración. Se indican con lazos los terminadores de la transcripción. *attP*: sitio de integración del fago, *int*: integrasa, *xis*: excionasa, *cI* y *cro*: represores del ciclo lítico y lisogénico respectivamente, *ant* y *orf22*: determinantes de proteínas hipotéticas, posiblemente implicadas en la decisión lisis-lisogenia C) Esquema de la región intergénica *cI-cro*. Se muestran los inicios de la transcripción con flechas, los operadores en rojo y las cajas -10 y -35 de los promotores.

1.4.3. MÓDULO DE INTEGRACIÓN

Incluye los genes que codifican para la integrasa, que media la recombinación entre las regiones *attP* y *attB* del fago y la bacteria (Álvarez y col., 1998; 1999) y una proteína que podría ejercer las funciones de excionasa. A continuación se encuentra la región *attP*, que presenta identidad con una secuencia de 19 pb presente en la región 3' de un gen de *L. casei* codificante para el ARNt específico para leucina que presenta el anticodón CAA. La región *attP* posee una alta proporción A+T y una serie de repeticiones invertidas y directas que se corresponden con posibles sitios de unión de la integrasa y de los factores implicados en la recombinación sitio específica.

El gen de la integrasa se ha utilizado para generar una familia extensa de vectores integrativos, que median la incorporación de secuencias cualesquiera al genoma de cualquier bacteria láctica (Alvarez y col., 1998; Martin y col, 2000)

1.4.4. EL MÓDULO DE REPLICACIÓN

Comprende nueve pautas abiertas de lectura, situadas entre *ant* y la secuencia *ori*, la mayor parte de las cuales presenta homología con Orfs de otros fagos de BAL. Sin embargo, solo tres de ellas se han podido asociar con funciones relacionadas con replicación: una proteína que presenta motivos típicos de helicasas, otra de unión a ADN de cadena sencilla y una primasa. La secuencia *ori* actúa como origen de replicación y se ha usado como señuelo en trans para inhibir el desarrollo viral (Moscoso y Suarez, 2000). A continuación de *ori* se encuentra una región dispensable (mutantes con deleciones en ella no muestran ningún fenotipo especial) que se ha propuesto que podrían estar involucradas en el mantenimiento del genoma dentro de los límites de empaquetamiento de la cápsida (Ladero y col., 1998; García y col, 2003).

1.4.5. EL MÓDULO ESTRUCTURAL O DE MORFOGÉNESIS

Se trata de la región del genoma de A2 que comprende los genes que originan las proteínas implicadas en la formación de los viriones maduros.

Región de la cabeza

De las tres *orfs* incluidas en este módulo, la primera da lugar a la proteína portal, la segunda es una proteasa y la tercera origina la proteína de andamiaje y las mayoritarias de la cápsida. Durante la traducción de esta última, parte de los ribosomas sufren un desplazamiento a la pauta -1, lo que origina dos polipéptidos idénticos hasta el punto donde aparece la secuencia deslizante y que no tienen ninguna relación a partir de ese punto (véase en el apartado I.4.2 cuáles son los requisitos para que el deslizamiento pueda tener lugar, que se describen en el párrafo dedicado al gen *cro*). Posteriormente, se libera el polipéptido correspondiente a los 123 primeros aminoácidos de ambas proteínas, se supone que por acción de la proteasa codificada por el gen adyacente, que constituirá la proteína de andamiaje. Los otros dos polipéptidos se incorporan a la cápsida en proporciones de aproximadamente el 75% (traducción en la pauta 0) y el 25% (traducción en la pauta -1). Aunque ambas proteínas por separado pueden ensamblar para dar lugar a precabezas, éstas son incapaces de albergar el genoma viral, por lo que ambas son indispensables para la generación de viriones infectivos (García y col, 2004).

Región del cuello

A continuación de los genes de la cápsida se localizan los codificantes para las proteínas implicadas en la unión cabeza-cola. Se les ha adscrito esta función por su posición entre dichos módulos y por presentar homología parcial (30%) con genes que se postula tienen esa función en el fago PVL de *S. aureus*. Además, coinciden los codones de terminación de cada gen con los de inicio de los adyacentes, lo que sugiere que desempeñan una función común.

Región de la cola

El primer gen en esta región, de 6 *orfs*, codifica las proteínas mayoritarias de la cola. A partir de él se generan también dos proteínas, como consecuencia de un fenómeno de cambio a la pauta -1 (Rodríguez y col., 2005). Otro gen identificado es el correspondiente a la proteína determinante de la longitud de la cola, que se procesa para dar lugar a un polipéptido de 154 kDa (el mayor del fago) y que actúa como molde sobre el que polimerizan las otras proteínas de la cola. Por último, en esta región se localiza el determinante que da lugar a la proteína que reconoce el receptor de la célula hospedadora (Duplessis y Moineau, 2001). Los otros genes

codifican proteínas pequeñas, que no presentan similitudes significativas con las incluidas en las bases de datos.

1.4.6. EL MÓDULO DE EMPAQUETAMIENTO

Se encuentra a ambos lados de los extremos cohesivos del fago. A un lado está el determinante de la subunidad pequeña de la terminasa (García y col., 1997) y al otro el correspondiente a la subunidad grande (García y col., 2003). La secuencia *cos* está formada por una extensión de cadena simple de 13 nucleótidos en los extremos 3' del genoma lineal. La subunidad pequeña de la terminasa reconoce esta secuencia en los concatémeros de ADN y se une a ella en presencia de ATP, dando lugar a las condiciones para la unión de la subunidad grande, que hará el corte para generar los genomas de tamaño unidad durante el empaquetamiento (García y col., 1997).

1.4.7. EL MÓDULO DE LISIS

Está compuesto por dos genes que codifican para la holina y lisina del fago. La holina es una proteína pequeña que contiene tres dominios transmembrana y que puede clasificarse por ello dentro de la familia I (Young y Wang, 2006). Esta proteína es letal en *E. coli* cuando el gen se expresa a partir de un promotor inducible (M. Herrero, tesis doctoral). La lisina es una endopeptidasa que corta entre la D-Ala terminal de un tetrapéptido del peptidoglicano y el residuo de ácido aspártico que hace de puente con un tetrapeptido de una cadena adyacente. La enzima hidroliza la pared de los lactobacilos, los pediococos y *L. lactis*, todos los cuales presentan el puente de ácido aspártico (peptidoglicano de tipo A4 α y β). La lisina presenta dos dominios funcionales, su mitad amino terminal presenta el centro activo, mientras que la carboxi terminal reconoce el sustrato (Ribelles y col, 2012).

1.4.8. TRANSCRIPCIÓN

Durante el ciclo lisogénico solo se detectan dos especies de ARN, una que comprende a *cI* y otra que abarca, además, a *orf22*. Por tanto, ambos transcritos son el resultado de la expresión del promotor P_L. Al iniciarse el ciclo lítico, sea por inducción o tras infección, se generan los ARNs descritos más los correspondientes al promotor P_R, que también son dos, uno más corto que abarca a *cro* y a *ant* y otro mucho mayor que incluye asimismo los genes

del módulo de replicación. A los 45 min postinfección se detecta la síntesis de nuevas moléculas de ARN a partir de una serie de genes que se encuentran unas 15 *orfs* por detrás de la secuencia *ori* y que podrían señalar el operón intermedio del fago. Por último, a los 60 min postinfección se inicia la síntesis de una molécula de ARN que comprende los módulos de empaquetamiento y morfogénesis y que tendría más de 20 kb. El módulo de lisis es también de expresión tardía pero su transcrito es diferente del ARN de morfogénesis.

1.5. ANTIRREPRESORES

Un mecanismo clásico para la regulación negativa de la iniciación de la transcripción consiste en el bloqueo del acceso de la ARN polimerasa al promotor mediante la unión de un represor a un sitio operador que solapa con elementos de dicho promotor (Browning y col., 2004; Rojo, 2001). Este bloqueo transcripcional puede ser eliminado mediante sistemas que provoquen la separación del complejo operador-represor. Entre ellos estaría la unión no covalente del represor a factores proteicos, denominados antirrepresores (Oppenheim y col., 1970). Dicha unión bloquearía la unión del represor al ADN y podría conducir a su inactivación, bien por alteración de su conformación, por separación de subunidades en los casos en que la forma funcional es un oligómero, aumento de la susceptibilidad a la proteólisis o agregación en complejos inactivos (Navarro-Avilés y col; 2007)

La regulación de la decisión lisis-lisogenia en los bacteriófagos atemperados depende de represores, que impiden la expresión de los genes que conducen hacia uno u otro de los ciclos (véase en el apartado 1.4.2 una explicación detallada del proceso en el caso del fago A2) por lo que podría haber antirrepresores que modularan su actividad. Uno de los primeros sistemas descritos de este tipo fue el del fago P22, donde un antirrepresor (Ant) se une al represor C2 e impide su interacción con la región operadora del promotor correspondiente a los genes líticos (Susskind y col., 1980). En el genoma del fago ϕ 24_B, que forma parte de los bacteriófagos lambdoides Stx (Shiga toxin encoding) responsables de la toxicidad de *E. coli* shigatoxigénica (STEC), también se encontró un gen cuyo producto podría ser un antirrepresor, porque presentaba un 82% de homología con el extremo carboxi-terminal del antirrepresor del bacteriófago P22. Los mutantes con el gen *ant* delecionado presentaban una menor expresión de los genes tardíos tras la inducción del ciclo lítico y ésta aumentaba al ser complementado con un plásmido expresando el gen, alcanzándose niveles próximos a los de la

cepa silvestre. Su papel sería pues el de aumentar la expresión de estos genes durante la inducción del ciclo lítico (Fogg y col., 2010). La misma función parecían tener los antirrepresores codificados por los genes *ant1* y *ant2* del bacteriófago 2851, cuya sobreexpresión en la célula hospedadora, provocaba el aumento en el número de placas obtenidas al ser infectadas con el fago (Strauch y col., 2008). Los fagos P1 y P7 codifican un represor primario, CI, que reprime las funciones del ciclo lítico, y un represor secundario, C4, que es un ARN antisentido que se une al ARNm del antirrepresor de CI inhibiendo su síntesis (Riedel y col., 1993; Citron y Schuter, 1992; Biere y col., 2011).

2. Objetivos

La decisión del fago A2 de seguir un ciclo lítico o uno lisogénico, depende de la biosíntesis temprana de los dos represores CI y Cro y de su interacción con los operadores situados en la región intergénica *cI-cro*, que dificultará el asentamiento de la ARN polimerasa sobre los promotores P_R o P_L, respectivamente. Por lo tanto, es un modelo de regulación sencillo, cuyo estudio puede arrojar luz sobre los mecanismos que gobiernan la regulación de la expresión génica en sistemas más complejos.

Sin embargo, esta aparente simplicidad podría no serlo tanto, debido a que existen evidencias de que *cro* da lugar, cuando se expresa en *Escherichia coli*, a dos productos diferentes, mientras que existe transcripción acoplada de *cI* y de *cro* con *orf22* y con *ant* respectivamente. Esto sugiere que los productos de todos estos genes podrían interactuar entre sí, de manera que la decisión última sobre el ciclo de desarrollo del fago dependería del resultado de dicha interacción.

Por todo ello, en esta Tesis nos planteamos un objetivo general, **la mejor comprensión de los procesos que influyen sobre la decisión lisis-lisogenia en el fago A2**, que se articula en tres objetivos parciales, los cuales se enumeran a continuación:

- La expresión del gen *cro* en *E. coli* induce la síntesis de dos formas de Cro como consecuencia de que, durante la traducción, parte de los ribosomas se retrasan a la pauta -1 en un punto concreto del ARNm. El primer objetivo pretende determinar si dicho desplazamiento tiene también lugar durante la infección de *Lacobacillus casei* y, de ser así, investigar el efecto que tiene la expresión de ambas proteínas, respecto a la de cada una de ellas, sobre el tipo de desarrollo que seguirá el fago A2.
- El gen *ant*, que se cotranscribe con *cro*, presenta homólogos en la mayoría de fagosatemperados que infectan a bacterias Gram positivas de la División *Clostridium*. Sin embargo, no se ha determinado experimentalmente cual es su función. Se postula que las hipotéticas proteínas Ant actuarían como antirrepresores, porque su extremo carboxiterminal presenta homología con el antirrepresor del fago P22. Sin embargo, *ant* de A2 presenta un triplete de terminación que elimina la región de homología, lo que pone en entredicho la asunción anterior. Por tanto, un segundo objetivo de esta Tesis será

caracterizar estructural y funcionalmente la proteína Ant de A2 y determinar si forma parte del interruptor genético del fago.

- El gen *orf22* se cotranscribe con *cI*. Al contrario de lo que ocurre con *ant*, no está presente en prácticamente ningún otro fago, por lo que la función de su producto génico ha de ser peculiar del fago A2. El tercer objetivo será, al igual que en los otros casos, conocer cuál es dicha función.

3. Material y Métodos

3.1. MICROORGANISMOS Y REPLICONES

3.1.1. MICROORGANISMOS

El bacteriófago y las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 1.

Organismo	Características	Referencia
Bacteriófago A2	<i>Siphoviridae</i> , atemperado, ADN con extremos cohesivos	Herrero y col., 1994
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	Cepa hospedadora de A2	ATCC
<i>Lactobacillus casei</i> 393-A2	Derivado lisogénico para A2 de <i>L. casei</i> ATCC 393	Herrero y col., 1994
<i>Lactobacillus casei</i> 393-A2- <i>croI</i>	Derivado lisogénico para A2 que solo expresa el producto canónico de <i>cro</i>	Presente trabajo
<i>Lactobacillus casei</i> 393 <i>nisRK</i>	<i>L. casei</i> con los genes <i>nisR</i> y <i>nisK</i> integrados en el sitio <i>attB</i> del fago A2 (sistema de expresión controlado por nisina, NICE)	Martín y col., 2004
<i>Lactobacillus casei</i> 393 <i>nisRK2</i>	<i>L. casei</i> con los genes <i>nisR</i> y <i>nisK</i> integrados en gen de ARN_t^{ser} (<i>attB</i> del fago mv4 de <i>Lactobacillus delbrueckii</i>)	Presente trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH10B	$F^- mcrA \Delta lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 \Delta(ara, leu) 7697 galU galK \lambda^- rpsL(Str^R) nupG \Delta(mrr^- hsd RMS^- mcrBC) \Phi 80d lacZ \Delta M15 rpsL$	Casadaban y Cohen, 1980
<i>Escherichia coli</i> (DE3)/pLysS	$F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3) pLysS(Cm^R)$ codifica la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>lac UV54</i> . El plásmido pLysS codifica la lisozima del fago T7 que reprime el promotor P10 de dicho fago	Studier y Moffatt, 1986
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	$F' [::Tn10 (Tet^f) proAB^+ lacI^f \Delta(lacZ) M15] recA1 endA1 gyrA96 (Nal^R) thi-1 hsdR17 (r_k^- m_k^-) supE44 relA1 lac$	Bullock y col., 1987

Tabla 1.- Microorganismos utilizados en esta tesis.

3.1.2. VECTORES DE CLONACIÓN Y DERIVADOS

Los vectores utilizados y los plásmidos más importantes construidos a partir de ellos durante el transcurso de este trabajo se presentan en la tabla 2.

Vectores		Observaciones	Referencias
pET11a	Ap ^R , vector de expresión con el promotor P10 del fago T7		Studier y col.,1990
pET3a	Ap ^R , vector de expresión con el promotor P10 del fago T7		Studier y col. ,1990
pUC19E	Ap ^R Em ^R , derivado de pUC19		Leenhouts y col., 1990
pUC18	Ap ^R , selección por inactivación del gen <i>lacZ</i>		Yanisch-Perron y col., 1985
pNG8048E	Derivado de pNZ8048, vector de expresión con el promotor inducible por nisina P _{nisA} . Cm ^r Em ^r		Pavan y col., 2000
Plásmidos		Observaciones	Referencias
pET11a: <i>cro</i>	pET11a expresando <i>cro</i> de A2		Ladero y col., 1999
pET11a: <i>croI</i>	pET11a con el gen <i>cro</i> de A2 mutado expresando solo el producto canónico		Apartado 4.1.2.
pET11a: <i>orf22</i>	pET11a expresando <i>orf22</i> de A2		Apartado 4.2.1.
pET11a: <i>cI</i>	pET11a expresando <i>cI</i> de A2		Ladero y col., 1999
pET3a: <i>ant</i>	pET3a expresando <i>ant</i> de A2		Apartado 4.3.4.
pET3a: <i>ant-142</i>	pET3a expresando <i>ant-142</i> de A2		Apartado 4.3.8.2.
pUC19E: <i>croI</i>	pUC19E con un segmento del ADN de A2 que incluye el gen <i>cro</i> mutado para expresar solo la forma canónica		Apartado 4.1.2.
pUC18-T7 <i>cro51</i>	pUC18 con el promotor de T7, bajo el que se clonaron los primeros 51 nucleótidos de <i>cro</i>		Apartado 4.3.7.
pUC18-T7 <i>cro67</i>	pUC18 con el promotor de T7 bajo el que se clonaron los primeros 67 nucleótidos de <i>cro</i>		Apartado 4.3.7.
pUC18-T7 <i>cro250</i>	pUC18 con el promotor de T7 bajo el que se clonaron los primeros 250 nucleótidos de <i>cro</i>		Apartado 4.3.10.
pUC18-T7 <i>cro450</i>	pUC18 con el promotor de T7 bajo el que se clonaron los primeros 450 nucleótidos de <i>cro</i>		Apartado 4.3.10.

pUC18-T7 <i>cl</i>	pUC18 con el promotor de T7 bajo el que se clonaron los primeros 57 nucleótidos de <i>cl</i>	Apartado 4.3.7.
pUO183	pUC18 con la región intergénica entre <i>cl</i> y <i>cro</i> del fago A2	Ladero y col., 1999
pNG8048: <i>ant</i>	pNG8048E expresando el gen <i>ant</i> de A2 bajo el promotor P_{nisA}	Apartado 4.3.2.1.
pNG8048: <i>ant255</i>	pNG8048E expresando <i>ant-255</i> de A2 bajo el promotor P_{nisA}	Apartado 4.3.8.1.
pNG8048: <i>orf22</i>	pNG8048E expresando el gen <i>orf22</i> de A2 bajo el promotor P_{nisA}	Apartado 4.2.3.

Tabla 2.- Vectores utilizados y plásmidos generados a partir de ellos durante el presente trabajo

3.2. REACTIVOS Y MATERIALES

Producto	Casa comercial
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-UTP}$	Perkin Elmer
Sephadex G-50 DNA grade, blue sefarosa, hidroxapatita, membrana PVDF, anticuerpo secundario anti-conejo IgG-horseradish peroxidasa	Bio-Rad
Q sefarosa, SP sefarosa, heparina	GE-Healthcare
LiteAblot Chemiluminescent substrato para western blot.	EuroClone
SDS, Tris, urea	ICN
Metanol	Fluka
Seroalbúmina bovina, mitomicina C, nisina, 1,4-ditiotreitol, 2-mercaptoetanol, triton X-100, fenol, antibióticos, bromuro de etidio, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), rifampicina, IPTG, adyuvante incompleto de Freund	Sigma
Enzimas de restricción, T4 polinucleótido kinasa, T4 DNA ligasa, ARN polimerasa de T7	New England Biolabs, Takara
Fosfatasa alcalina (SAP)	USB
Proteinasa K, ribonucleasa A (RNase A), cloruro de cesio	Roche
Acetato sódico, sulfato magnésico, ácido bórico, ácido clorídrico, alcohol isoamílico, coomasie blue, xylencyanol, bromofenol blue, cloroformo,	

dimetil sulfóxido, etanol, alcohol isopropílico, glicina, hidróxido sódico, cloruro cálcico, PEG-1500, 6000, 8000, titriplexIII (EDTA)	Merck
Filtros Millex (0,22), filtros VM (0,05 µm), filtros HAWP (0,45 µm)	Millipore
Ácido acético, vaselina	Panreac
Ácido subérico	Pierce
Agarosa, agar bacteriológico	Pronadisa
Acrilamida, bisacrilamida	Serva
Glicerol, cloruro sódico, sulfato amónico	MP Biomedicals
Membranas de diálisis	Thermo scientific
Medio MRS, LB	Difco
Kits de extracción de plásmido y purificación de banda	Quiagen
Prime Start polimerasa, Taq polimerasa	Takara
Marcadores de peso molecular	Fermentas, Bio Rad

Tabla 3.- Lista de reactivos y materiales empleados y sus respectivas casas comerciales

3.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Oligonucleótido	Secuencia de ADN (5'-3')
A2-1	GGGATGACCATATGAACG
A2-2	CACCGACCTAGGTGGTTG
A2-3	CGCGGATCC TT AAGCCGTAAGTTCCGCTG
A2-4	GCCACAAGT CAT ACAACCATCTTGG
A2-5	CCAAGATGGTTGT ATG ACTTGTGGC
A2-6	CCTGTGTGGATCCGTTTCATTTAGAC
A2-7	GTT CGTCTC ACATGAACGAATTACAGCATTT
A2-8	GCGACTTGGATCCGTTTTCTTACTTGG
A2-9	TTTAAATTTAGTGTTCATTGGATTGCC
A2-10	TAAATTTAGTGTTCATTGGATTGCCTC

A2-11	AATTTAGTGTTCATTGGATTGCCTCC
A2-12	AGTGTCATTGGATTGCCTCCTTTTCG
A2-13	CATTGGATTGCCTCCTTTTCGTTTC
A2-14	GAAGTTAGCGGATCCACATTGCAC
A2-15	CAGCGCGAGGATCCTTTTAAATTTAGTG
A2-16	CCCTTCACGGATCCGAAGATCATTTAAAGTC
A2-17	<u>GGAAATTCTAATACGACT</u> ACTATAGGGTTCCCAAAGGAAACGAAAGGAGG
A2-18	<u>GGAAATTCTAATACGACT</u> ACTATAGGGAGGTGAGATACATGAAAAC
A2-19	GGAGGCAATCATATGACACTAAAT
A2-20	CAAACATTGGATCCTTATCAACAACCAC
A2-21	AACAATAAGCTTTTGACGATCATTATAGAAATATTG
A2-22	TAGTCGGCACGGATCCGTTTATCAAATAGCCTTGC
A2-23	CACCAATCAACTTGACCTTTTCCTTACAAATAACGTTCCCGATAGAGAACGAA A
A2-24	CGTTATTTGTAAAGAAAAGGTCAAGTTGATTGGTGCCATACCCCAAATGC
A2-25	ATGACCATGATTACGCCA
A2-26	GACTGATCGCCGTTTCCGTTTC
A2-27	GGAGGGGAATCATGAAACTACTTATCTTAATTGCC
A2-28	CAGCCAGATCTCCGGCTTGCACGGGGAC
A2-29	CAGCCCAGATCTCCGGCTTGCACGGGGAC
A2-30	CAGGGGACATATGAAACTACTTATCTTAATTGC
Oligonucleótido	Secuencia de ARN (5'-3')
A2-31	GUUCCCAAAGGAAACGAAAGGAG
A2-32	GUUCCCAAAGGAAACGAAAGGAGGCAAUCCAAUGAC

Tabla 4.- Cebadores utilizados en la realización de este trabajo. Subrayados aparecen los sitios de corte añadidos artificialmente, que se utilizaron para las clonaciones del producto de PCR correspondiente; en rojo aparecen los cambios de base introducidos para las mutagénesis puntuales y en azul la secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa de T7.

3.4. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.4.1. BACTERIOFAGO A2

El bacteriófago A2 se propagó sobre cultivos de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 393 en medio MRS líquido suplementado con CaCl₂ y MgSO₄ a una concentración final de 10 mM (MCM). La incubación se llevó a cabo a 30°C sin agitación. Los medios sólido y semisólido utilizados para la obtención de placas de lisis por el método de la doble capa de Adams (1959), contenían 1,5 y 0,75% de agar-agar respectivamente.

La inducción del fago A2 a partir de los derivados lisogénicos de *L. casei* ATCC 393 se llevó a cabo añadiendo mitomicina C (1 µg/ml, concentración final) a un cultivo en fase exponencial (DO₆₀₀= 0,1) de la bacteria.

3.4.2. *Lactobacillus casei*

L. casei ATCC 393 y todos sus derivados se propagaron en medio MRS y se incubaron a 30°C sin agitación.

La concentración de eritromicina para la selección de los recombinantes transformados con pUC19E fue de 2,5 µg/ml. Cuando transformamos los plásmidos obtenidos a partir del vector pNG8048E, la selección se hizo con 5 µg/ml de cloranfenicol. Para inducir la expresión de los genes clonados en dicho vector bajo el promotor P_{nisA} añadimos nisina (5 ng/ml) a cultivos en fase exponencial (D.O₆₀₀ = 0,2).

3.4.3. *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas se incubaron a 37°C en medio LB (Sambrook y col., 1989) con agitación forzada cuando el medio era líquido. La concentración de ampicilina utilizada para la selección de transformantes fue de 100 µg/ml. Para la inducción del operón *lac* se usó IPTG a una concentración final de 1 mM.

3.4.4. CONDICIONES DE CONSERVACION DE LAS CEPAS

Los cultivos bacterianos, incubados durante toda la noche, se centrifugaron y el sedimento obtenido se resuspendió en partes iguales de medio líquido fresco y glicerol (concentración final 25 %). Estas suspensiones se guardaron a -70 °C.

3.5. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS VIRIONES

3.5.1. A GRAN ESCALA

La propagación de A2 se realizó en medio MCM líquido inoculado con un cultivo de una noche de *L. casei* al 1% e incubado a 30°C hasta alcanzar una $DO_{600} = 0,1$. En ese momento se infectó con el fago A2 a una multiplicidad de infección (moi) de 0,1 y la incubación se prolongó durante 8 horas. Transcurrido ese tiempo la suspensión se centrifugó a baja velocidad para eliminar células y residuos celulares, los fagos se precipitaron usando 10% polietilenglicol (PEG 8000), concentración final a 4°C durante la noche, se centrifugaron a 10.000 rpm en un rotor Kontron por 10 min y el sedimento se resuspendió en tampón SM (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, pH 7,5).

La suspensión obtenida se ultracentrifugó a 35.000 rpm en un rotor Beckman 42Ti durante 90 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en un pequeño volumen de tampón SM, al que se añadió CsCl a una concentración final de 0,5 gr/ml, se dispuso sobre un gradiente preformado de CsCl (1,7, 1,5 1,45 y 1,15 gr/ml) y se centrifugó a 35.000 rpm durante 3 horas. La banda resultante se extrajo mediante punción lateral del tubo. A la suspensión obtenida se le añadió CsCl hasta una concentración final de 750 mg/ml y se centrifugó en un rotor Beckman SW40Ti durante 24 h (Sambrook y col., 1989). La banda correspondiente al fago se almacenó a 4°C. Cuando fue necesario usar los fagos se dializaron alícuotas de la suspensión en tampón SM. La pureza de las preparaciones se analizó por microscopía electrónica.

3.5.2. A PEQUEÑA ESCALA

En este caso, las suspensiones se obtuvieron a partir de placas Petri en las que se había propagado el fago para dar lisis semiconfluente, mediante la resuspensión de los viriones en tampón SM. Las preparaciones se limpiaron por centrifugación a baja velocidad, seguida de una ultracentrifugación a 35.000 rpm en un rotor Beckman 42Ti durante 90 minutos, a 4°C. El precipitado se resuspendió en un pequeño volumen de tampón SM, la suspensión se pasó a través de filtros de nitrocelulosa con poros de 0,45 µm de diámetro y se almacenó a 4°C.

3.6. CUANTIFICACIÓN DE LA CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE VIRIONES

3.6.1. INFECCIÓN

Con el fin de determinar el efecto que la sobre-producción de la proteína Ant tendría sobre el proceso de infección por A2, se inoculó medio MCM líquido con un cultivo de toda la noche de *L. casei* 393 *nisRK* portando el plásmido pNG8048:*ant* y se incubó a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica $DO_{600} = 0,1$. En ese momento se le añadió nisina a una concentración final de 5 ng/ml, para inducir el promotor P_{nisA} y media hora mas tarde se infectó con el fago A2 a una m.o.i. de 0,1. Se extrajo 1 ml de cultivo en el momento de añadir el fago y a distintos tiempos postinfección y las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 20 minutos. Los sobrenadantes se diluyeron en tampón SM y se usaron para infectar cultivos en fase exponencial de *L. casei* 393 que se crecieron en agar MCM semisólido, dispuesto sobre la superficie de placas de MRS sólido. Se incubaron a 30°C durante 15 horas y se procedió al contaje de las placas de lisis obtenidas a cada tiempo.

3.6.2. INDUCCIÓN

Para determinar el efecto de la sobre-producción de Ant y Orf22 sobre la inducción de cultivos lisogénicos para A2, se incubaron toda la noche cultivos de *L. casei* 393 *nisRK2* portando los plásmidos pNG8048:*ant* o pNG8048:*orf22*. Al día siguiente se diluyeron al 1% en medio MCM fresco y se incubaron a 30°C hasta que alcanzaron una $DO_{600} = 0,1$, momento en que se añadió nisina (5 ng/ml) y se prosiguió la incubación media hora mas, pasada la cual se agregó mitomicina C a una concentración final de 1 µg/ml y se procedió a extraer muestras a distintos tiempos y a cuantificar los fagos del modo descrito en el apartado anterior.

3.7. OBTENCIÓN, MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN *in vitro*

3.7.1. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

El método utilizado para la obtención de ADN plasmídico de *E.coli* a pequeña escala fue el de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979), o bien se usó el kit comercial “Plasmid MiniPrep Kit” de Qiagen.

En el caso de los plásmidos de *Lactobacillus*, se centrifugó 1 ml de cultivo de una noche y el sedimento obtenido se resuspendió en 100 µl de una solución de sacarosa al 25% conteniendo mutanolisina (1U/µl) y lisozima (1,5 mg/ml). Después de una breve incubación a 37 °C, se le añadieron 200 µl de SDS alcalino (10% SDS, pH=13 con sosa) y 300 µl de acetato de sodio 3 M (pH 4,8), se dejó reposar 10 min en hielo y a continuación se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante, al que se añadió un volumen de fenol neutralizado y otro de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó. Tras una nueva centrifugación recogimos la fase superior y repetimos los dos pasos anteriores. Por último, el sobrenadante se mezcló con igual volumen de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Se recuperó la fase superior y se precipitó con tres volúmenes de etanol al 100% a -20 °C durante 2 horas. La suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C, se lavó con etanol al 70% y el ADN se resuspendió en tampón TER (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml de ribonucleasa A; pH 8).

3.7.2. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

3.7.2.1. *Lactobacillus casei*

La extracción del ADN total se llevó a cabo a partir de cultivos en fase estacionaria. Las células se lavaron con agua destilada, se resuspendieron en solución de lisis (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA; pH 8) conteniendo lisozima (1,5 mg/ml) y mutanolisina (1 U/µl) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Para romperlas se añadió a la suspensión SDS a una concentración final del 10 % y se calentó durante 5 minutos a 65°C. Se añadió NaCl hasta una concentración final 1 M y la suspensión se dejó en hielo durante una hora. La mezcla resultante se centrifugó, el sobrenadante obtenido se trató dos veces con fenol neutralizado y el ADN se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 100% durante 2 horas a -70°C. Después se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en tampón TER.

3.7.2.2. Bacteriófago A2

La extracción del ADN del fago A2 se llevó a cabo a partir de viriones purificados como se indica en el apartado 3.5.1. A 100 µl de suspensión fágica en tampón SM se le añadieron 20 µl de mezcla lítica (500 mM Tris-HCl, 250 mM EDTA, 2,5% SDS; pH 8) y se incubó a 65°C durante 30 minutos. Tras añadir 25 µl de acetato potásico 8 M y dejar 15 min en

hielo se recuperó el sobrenadante, al que se le añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto y se mantuvo a -20°C durante 2 horas para precipitar el ADN. La suspensión se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C y el sedimento se lavó con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en tampón TER.

3.7.3. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

Los tampones y condiciones utilizados en las digestiones con endonucleasas de restricción fueron los recomendados por la casa comercial correspondiente (tabla 3).

Para las ligaciones empleamos la ligasa del fago T4 que es apropiada tanto para la unión de extremos cohesivos como de extremos romos. La proporción molar del vector y el fragmento a clonar fue de al menos 4 veces favorable al inserto.

3.7.4. MARCAJE RADIATIVO

El marcaje radiactivo de los fragmentos de 183 pb BamHI-HindIII del plásmido pUO183 (Ladero y col., 1999) conteniendo la región intergenica *cI-cro*, se llevó a cabo mediante su incubación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* durante 15 minutos a temperatura ambiente, en presencia de dCTP, dGTP, dATP y [$\alpha^{32}\text{P}$]- dCTP (3000 Ci/mmol). Tras la inactivación del enzima a 65°C durante 10 min, los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante filtración por una columna de Sephadex G-50.

3.7.5. ELECTROFORESIS DE ADN Y PURIFICACIÓN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa según el método descrito por Meyers y col (1976), utilizando como electrolito tampón Tris-borato (89 mM Tris, 8,9 mM ácido bórico y 2,5 mM EDTA; pH 8). Los geles se prepararon a concentraciones de agarosa que oscilaban entre el 0,7 y el 1,5 % en función del tamaño de los fragmentos que se querían visualizar. Las muestras de ADN se mezclaron con tampón de carga 10X (100 mM EDTA, 43% glicerol y 0,5% azul de bromo-fenol). Como patrones se utilizaron diversos marcadores de peso molecular. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas horizontales, utilizando habitualmente una diferencia de potencial de 100 V. Para la visualización de los fragmentos de

ADN tras la electroforesis, se sumergieron los geles en una solución de BrEt a una concentración final de 0,5 µg/ml en agua (Sambrook et al., 1989) y se observaron en un transiluminador de luz UV.

La purificación fragmentos de ADN, separados en geles de agarosa por electroforesis, fue llevada a cabo siguiendo las instrucciones del kit comercial “Quiaquick Gel Extraction Kit” de Quiagen.

3.7.6. AMPLIFICACIÓN GÉNICA POR PCR

3.7.6.1. Oligonucleótidos cebadores

El diseño de los oligonucleótidos cebadores se realizó en base a la secuencia nucleotídica de los fragmentos a amplificar, las mutaciones que deseábamos introducir y las secuencias de las dianas de restricción necesarias para generar las construcciones utilizando el programa “Primer3” (tabla 3).

3.7.6.2. Composición de una mezcla típica de reacción

Las mezclas para la PCR tenían habitualmente un volumen final de 50 µl y la siguiente composición: 100 ng de ADN molde, 30 pmoles de cada oligonucleótido cebador, 7,5 µl de 2 mM dNTP mix, 5 µl de tampón de reacción x10, 1 µl de 50 mM MgSO₄ y 1,25 unidades de ADN polimerasa “Prime Start” (de fidelidad elevada) o Taq. La reacción se llevó a cabo en un aparato iCyclerIQ (BioRad). Las temperaturas y tiempos de elongación utilizados oscilaron entre 50 – 60°C y 30 a 60 seg, en función de la temperatura de anillamiento de los cebadores y el tamaño del fragmento a amplificar.

3.7.7. MUTAGÉNESIS SITIO-ESPECÍFICA

Se llevó a cabo mediante la técnica de la “PCR solapante” (Adey y col., 1996), empleando como cebadores cuatro oligonucleótidos. Dos de ellos se sitúan en los extremos del fragmento que se quiere amplificar (1 y 4) y los otros dos en el interior del gen (2 y 3), con sentidos opuestos solapantes entre sí y con la mutación deseada (figura 7).

Inicialmente se llevaron a cabo dos amplificaciones independientes, limitadas por los oligonucleótidos 1-2 y 3-4, usando como molde el ADN de A2. Los productos de ambas

amplificaciones, una vez purificados, se mezclaron y se usaron como molde para realizar una nueva amplificación utilizando los oligonucleótidos 1 y 4.

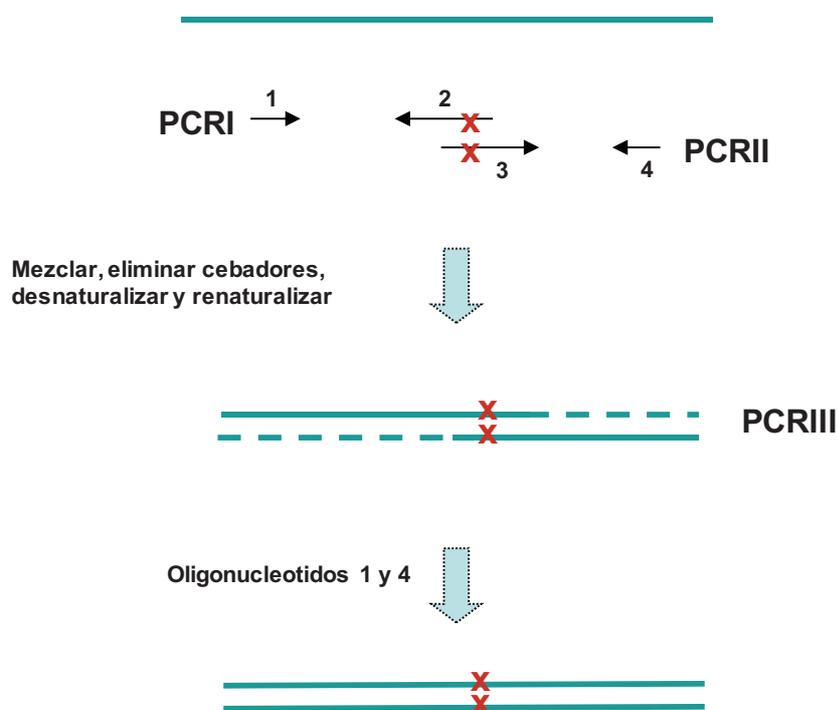


Figura 7.- Esquema general de la metodología del PCR solapante empleada en la construcción de los mutantes en *cro* y *ant* para dar *croI* y *ant-255*, respectivamente. Las parejas de oligonucleótidos A2-23-A2-24 y A2-4-A2-5 (tabla 2) fueron diseñados para introducir los cambios de base correspondientes.

Para obtener la proteína Ant-142, se diseñó un oligonucleótido que introducía un codón de terminación tras el aminoácido 141 de Ant seguido de un sitio de reconocimiento para BamHI (oligo A2-3) que se utilizó, junto al cebador A2-1 para amplificar el gen e introducir el fragmento en el vector correspondiente.

3.7.8. SECUENCIACIÓN DE ADN

Las secuenciaciones para verificar las construcciones se llevaron a cabo en el Centro de Secuenciación de la Universidad de Oviedo.

El estudio, análisis y comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se realizó con ayuda del EMBL-EBI: ClustalW2 se utilizó para realizar el alineamiento de secuencias, FASTA para la comparación de proteínas, y BLAST se usó en la comparación de nucleótidos y proteínas desde el servidor SEARCH de NCBI (Altschul et al, 1990) utilizando las bases de datos disponibles en Genbank y Uniprot.

Para el análisis de la estructura y propiedades de proteínas y ARN se utilizó, además, el servidor de proteómica del instituto suizo de Bioinformatica ExPASy y RNAfold respectivamente.

3.8. PROCEDIMIENTOS DE TRANSFORMACIÓN GÉNICA

La introducción de plásmidos en las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante electroporación con un equipo “Gene Pulser” de Bio-Rad.

3.8.1. *Escherichia coli*

Las células electrocompetentes de *E. coli* DH10B y *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS se obtuvieron siguiendo el método de Dower y col. (1988). Según éste, partiendo de cultivos de *E. coli* en fase exponencial ($DO_{600} = 0,6$), se recogieron las células por centrifugación a 10.000 rpm en un rotor Kontron A6.14 durante 10 minutos a 4° C y se lavaron usando la mitad del volumen del cultivo inicial con H₂O milliQ. Este paso se repitió 3 veces y, tras la última centrifugación, las células se resuspendieron en glicerol al 10 % y se guardaron a -70°C. La concentración de la suspensión era de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml.

Para llevar a cabo la electroporación, se descongeló una alícuota de la suspensión celular y se le añadió el ADN (0,05-4 µg) resuspendido en agua milliQ. Las condiciones del pulso fueron de 25 µF, 2500 V y 200 Ω. Una vez electroporadas, las células se resuspendieron en medio LB, se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación y se sembraron en placas del mismo medio conteniendo el antibiótico de selección apropiado.

3.8.2. *Lactobacillus casei*

La electroporación de las células electrocompetentes de *L. casei* se llevó a cabo según el protocolo de Chassy y Flickinger (1987). Se partió de un cultivo de una noche en medio

MRS suplementado con glicina al 1%. Se recogieron las células centrifugando a 10.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C en un rotor Kontron A6.14 y se resuspendieron en 5-10 volúmenes del mismo medio fresco, en el que se dejaron incubando a 30°C durante 1 hora. Las células se lavaron 3 veces con el mismo volumen de H₂O milliQ. Tras el último paso se resuspendieron en 30% PEG-1500 y se usaron en fresco.

Las condiciones del pulso fueron 25 µF, 2500 V y 400 Ω. Tras la electroporación, se añadieron 450 µl de MRS líquido y se incubaron las células durante 1 hora a 30°C. Después se lavaron con MRS para eliminar el PEG y a continuación se sembraron en placas de MRS sólido con el antibiótico apropiado para seleccionar los transformantes.

3.9. OBTENCIÓN DE BACTERIÓFAGOS RECOMBINANTES

La obtención de bacteriófagos portando la mutación (*crol*) que daba lugar solo al producto canónico de *cro* se llevó a cabo en lisógenos de *L. casei* mediante doble recombinación. Para ello, el fragmento portando la mutación generada según se indicó en el apartado 3.7.7, que presentaba sitios de restricción para los enzimas HindIII y BamHI (A2-21 y A2-22 respectivamente) se insertó en el vector pUC19E (Ap^r, Em^r), y la mezcla de ligación se transformó en *E. coli* DH10B, seleccionando por Ap^r. Los plásmidos recombinantes se usaron para transformar células de *L. casei* lisógeno para A2 silvestre, seleccionando los clones resistentes a eritromicina, que serán aquellos en los que el plásmido se ha introducido por recombinación en el genoma bacteriano, puesto que el vector pUC19E no replica en *Lactobacillus*. Mediante PCR y empleando los oligonucleótidos A2-19 y A2-20, se comprobó que efectivamente se había insertado el plásmido en el profago de estas colonias resistentes. A continuación las células recombinantes se incubaron a 30°C durante 2-3 días sin antibiótico y cambiando el medio de cultivo líquido cada día. Al cabo de este tiempo, las células de dichos cultivos se sembraron en medio sólido para obtener colonias aisladas. De entre ellas se seleccionaron las sensibles a eritromicina, cuyas células habrían sufrido la segunda recombinación que daría lugar a la liberación del plásmido, lo que igualmente se comprobó por PCR (figura 10).

3.10. TRANSCRIPCIÓN *in vitro* Y PURIFICACIÓN DE ARN MARCADO RADIATIVAMENTE

Los ensayos que muestran la interacción entre los ARNm de *cro* y *cI* con Ant, se realizaron partir de ARN sintetizado *in vitro* por la ARN polimerasa de T7.

Los ARNm de 35, 40, 45, 47 y 49 nucleótidos se sintetizaron utilizando como molde para la ARN polimerasa fragmentos resultantes de la amplificación, utilizando un oligonucleótido que presenta el sitio de reconocimiento de la ARN polimerasa de T7 (A2-17) y los cebadores A2-13, A2-12, A2-11, A2-10 y A2-9 que dan lugar a transcritos de dichos tamaños.

Los transcritos de mayor tamaño se obtuvieron mediante la clonación de los segmentos de interés en el vector pUC18. El oligonucleótido directo que se empleó para amplificar estos segmentos contenía un sitio EcoRI y la secuencia del promotor P10 de T7 justo antes del sitio +1 del inicio de la transcripción (A2-17 para *cro* y A2-18 para *cI*). El cebador reverso portaba un sitio BamHI situado a 51, 67 o 250 nucleótidos del inicio de la transcripción de *cro* (oligonucleótidos A2-15, A2-8, A2-14) y a 57 del de *cI* (A2-16). Tras la clonación de los fragmentos se obtuvieron los plásmidos pUC18-T7 *cro*51, pUC18-T7 *cro*67 y pUC18-T7 *cro*250 y pUC18-T7 *cI*. En el caso de pUC18-T7 *cro*450, se usó igualmente el cebador A2-17 (directo) y se aprovechó para el reverso un sitio SmaI que se encuentra a 450 nucleótidos del inicio de la transcripción de *cro*. Previamente a llevar a cabo la transcripción, los plásmidos recombinantes se linearizaron con BamHI o, en el caso de pUC18-T7 *cro*450, con SmaI.

La transcripción se realizó durante 16 horas a 20°C en el tampón de la ARN polimerasa de T7 (tabla 3). La concentración de los componentes de la reacción fue la siguiente: 0,4 mM ATP, GTP y CTP y 0,04 mM UTP, 10 pmoles [³²P]-UTP (3000Ci/mmol). 40 U de RNAsin, 5 mM DTT, 0,1 g de ADN molde y una unidad de ARN polimerasa de T7. Los ARN marcados se cargaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida-urea del 8% y se sometieron a una diferencia de potencial de 2000 V durante 90 minutos. Tras retirar uno de los cristales, se expuso a una película durante 1-5 minutos. De este modo se localizó la posición del ARN marcado. Se cortó la banda deseada y se dejó toda la noche en una solución conteniendo 0,5 M acetato de amonio, 0,1% SDS y 1 mM EDTA; por último, el ARN eluido se precipitó con 3 volúmenes de etanol a -20°C durante 2 horas y se resuspendió en agua DEPC.

3.11. EXPRESIÓN, ANÁLISIS Y PURIFICACION DE PROTEÍNAS

3.11.1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE ANT, Ant-142 y Orf22

Los genes codificantes para las proteínas de interés, clonados en los vectores de expresión pET11a y pET3a, se introdujeron por electroporación en la cepa hospedadora *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS para su sobreexpresión mediante la adición de 1 mM IPTG a cultivos en fase exponencial ($D.O_{600}=0,5$). Proseguimos la incubación 30 minutos, transcurridos los cuales añadimos rifampicina (200 $\mu\text{g/ml}$) y procedimos a la recolección de las células después de 3 horas por centrifugación. Los sedimentos se lavaron con tampón 50 mM fosfato potásico pH 5 y se resuspendieron en el mismo tampón conteniendo 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 200 mM NaCl, a una concentración de 200 mg/ml y se lisaron con ultrasonidos. El extracto se aclaró por centrifugación durante 1h a 17.000 rpm y se comprobó que las proteínas Ant y Ant-142 eran solubles, mientras que Orf22 permanecía en el sedimento, formando cuerpos de inclusión. En los dos primeros casos, se añadió polietilenimina al 0,25% al sobrenadante, se mantuvo en hielo y con agitación durante 30 min y se centrifugó para eliminar el ADN. A continuación, las proteínas se precipitaron con sulfato amónico al 70%, a 4°C, durante una hora. El precipitado, suspendido en ese mismo tampón sin sal, se cargó en una columna de SP sefarosa y se eluyó con un gradiente (0 – 500 mM) de NaCl. Las fracciones que contenían la proteína (correspondientes a la elución con 200 mM NaCl) se diluyeron con tampón hasta 50 mM NaCl, se cargaron en una columna de heparina y se eluyeron como en la columna anterior. Las fracciones con Ant o Ant-142 se cargaron nuevamente en la columna de SP Sefarosa y la proteína se eluyó con 0,5 M NaCl para obtenerla concentrada. Las fracciones correspondientes se dializaron frente a 25 mM Tris-HCl, 50% glicerol, 1 mM DTT, 0,5 M NaCl (pH 7,5) y se guardaron en este tampón a -70°C hasta su utilización.

3.11.2. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE Ant-255

Para la producción de Ant-255 se insertó el gen *ant* con la mutación que transformaba el codón de terminación TAA en CAT, codificante de histidina, en pNG8048E y se introdujo en *Lactobacillus casei* 393 *nisRK*. Los cultivos se incubaron a 30°C sin agitación hasta una

D.O₆₀₀=0,2, momento en que se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de nisina (5 ng/ml). Cuatro horas después se recogieron las células, se resuspendieron en tampón 50 mM Tris-HCl conteniendo 10% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl (pH 7,5) y se lisaron con ultrasonidos. La proteína apareció en el sedimento del extracto crudo, por lo que se sometió a solubilización en tampón con 1 M NaCl y se dializó tres veces frente a volúmenes iguales de tampón sin sal. De este modo, la concentración de sal bajó hasta 0,125 M, lo que permitió cargar el extracto en una columna SP sefarosa. Las proteínas se eluyeron con un gradiente desde 0 a 0,5 M NaCl y las fracciones que contenían Ant-255 (alrededor de 200 mM de sal) se diluyeron con tampón hasta 100 mM NaCl, se cargaron en una columna Blue sefarosa y se eluyeron como antes. Finalmente, Ant-255 se concentró en la columna de SP sefarosa y se almacenó como se ha descrito anteriormente para Ant.

3.11.3. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CI

Para proceder a la purificación de CI se introdujo por electroporación el plásmido pET11a-*cI*, cuya construcción se describe en García y col (1999), en *E. coli* BL21(DE3)/pLys.

La sobreexpresión se consiguió mediante la adición de 1 mM IPTG a estos cultivos cuando alcanzaron una DO= 0,5. Al cabo de 30 min se añadió rifampicina a una concentración final de 200 µg/ml y se incubaron otros 90 min., se recogieron por centrifugación, se resuspendieron, a concentración final de 200 mg/ml, en tampón A (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1% Tween 20, 250 mM NaCl; pH. 7,5) y se lisaron con ultrasonidos. Los extractos crudos se centrifugaron y se observó que más del 95 % de CI se encontraba en el sedimento. El precipitado se lavó dos veces con 25 ml de tampón A conteniendo 1 M NaCl. El sedimento resultante, que contiene mayoritariamente la proteína CI, se resuspendió en el mismo tampón hasta conseguir su completa disolución y posteriormente, la concentración de sal se rebajó a 250 mM, mediante dos diálisis sucesivas frente al mismo volumen de tampón A sin NaCl. Esta muestra se cargo en una columna Q-sefarosa equilibrada con tampón A sin DTT. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo tampón y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (250 mM - 1M) en tampón A. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las que contenían CI pura se guardaron a -20°C en glicerol a una concentración final del 50%. Todos los pasos seguidos durante la purificación se llevaron a cabo a 4 °C.

3.11.4. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE CRO

La sobreexpresión de *cro* se llevó a cabo tras la introducción del plásmido pET11a-*cro* (Ladero y col., 1999) en *E. coli* BL21 (DE3)/pLys y se consiguió de modo similar a la descrita para CI. Tras la inducción con 1 mM IPTG, las células se lavaron dos veces con tampón B (50 mM Tris-ClH, 50 mM NaCl, 1 mM DTT; pH 7,5), se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración final de 200 mg/ml y se rompieron con ultrasonidos. Los extractos crudos se centrifugaron a 10.000 rpm, 4°C, durante 30 min y el sobrenadante se cargó en una columna Q-sefarosa equilibrada con tampón B. Cro no se pega a esta columna. La fracción resultante de este lavado se trató con sulfato amónico al 40% (concentración final), la mezcla se agitó durante 1 h y se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se sometió de nuevo a una precipitación con sulfato amónico al 80%. La muestra se centrifugó (10.000 rpm, 30 min.), el precipitado se resuspendió en tampón C (50 mM fosfato sódico; pH 7,5) y se cargó en una columna Mono-S (FPLC) equilibrada con el mismo tampón. Después del lavado, las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl (0,25 - 0,5 M) en tampón C. Las proteínas Cro y Cro* se liberaron a una concentración aproximada de 0,3 M NaCl. Las fracciones que contenían ambas proteínas se mezclaron y se diluyeron hasta una concentración final de 0,1 M NaCl en tampón C. Para separar Cro canónica y Cro*, se realizó una nueva cromatografía en la misma columna con un gradiente tendido de NaCl (0,25 M a 0,35M). Las fracciones se analizaron en geles de Tricina-SDS-PAGE y aquellas que contenían Cro y Cro* puras se guardaron a -20 °C en glicerol al 50 % para su posterior utilización. Todos los pasos seguidos durante la purificación se llevaron a cabo a 4 °C.

3.11.5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteína se determinó mediante el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976) usando el kit “Quick-Start Bradford 1x Dye Reagent”(BioRad).

3.11.6. ANÁLISIS AMINOACÍDICO

Las proteínas purificadas se identificaron por MALDI-TOF-TOF de los péptidos obtenidos tras digestión con tripsina, en el servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología.

3.11.7. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OLIGOMERIZACIÓN POR UNIÓN COVALENTE

Para obtener información acerca del grado de oligomerización de las diferentes formas de la proteína Ant, se incubó cada una de ellas con ácido subérico disuelto en dimetil sulfóxido, que da lugar a uniones covalentes entre lisinas que se encuentran a 11 Å. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl siendo la concentración de proteínas de 2,8 µM (Ant), 3,1 µM (Ant-142) y 1,8 µM (Ant-255). Las preparaciones se incubaron durante 30 min a 30°C en tampón 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 50 mM NaCl (pH 7,5), con una concentración final 0,5 mM de ácido subérico. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE con un 15 % de acrilamida.

3.11.8. INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA

Para ver si la proteína Ant interactuaba con Cro o con CI se incubaron mezclas de dichas proteínas con ácido subérico. La reacción se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado anterior, siendo la concentración de proteínas de 2,8 µM (Ant), 5,4 µM (Cro) y 2 µM (CI).

3.12. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS CON ÁCIDOS NUCLEICOS

La afinidad de las proteínas por ADN o ARN se midió por la variación de la movilidad del ácido nucleico marcado cuando está libre o cuando forma un complejo con ellas.

3.12.1. ENSAYO DE RETARDO DE ADN EN GEL

El ADN se marcó en el extremo 5' como se describe en el apartado 3.7.4. Las proteínas CI o Cro se añadieron a la reacción simultáneamente con el ADN marcado y se incubaron durante 30 min, a 30°C en tampón 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 0,1% Tritón X-100, 50 ng/ml BSA, 50 ó 100 mM NaCl. Se añadió tampón de carga a la reacción y se procesaron las muestras en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5 % utilizando TAE como electrolito y aplicando una diferencia de potencial de 100 V durante una hora a temperatura ambiente. La detección de las bandas se realizó por exposición a películas "Hyperfilm MP".

3.12.2. ENSAYO DE RETARDO DE ARN EN GEL

Los oligonucleótidos de ARN usados para los ensayos, obtenidos y purificados como se describió en el apartado 3.10, se incubaron en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5) 10 mM Mg₂Cl durante 3 minutos a 95 °C y se dejaron 1 minuto en hielo. El ARN marcado con [³²P] UTP se incubó con la proteína Ant en tampón 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl (pH 7.5) durante 30 min, a 30°C. Se añadió tampón de carga a la reacción y se procesaron las muestras en un gel de Tris Glicina no desnaturizante con un 12% de acrilamida. Las bandas se detectaron por exposición a películas “Hyperfilm MP”.

3.13. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

3.13.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos policlonales específicos frente a las proteínas Ant, Cro y CI se obtuvieron por hiperinmunización de conejos con muestras de los antígenos purificados como se describe en los apartados 3.11.1 y 3.11.4, respectivamente.

Los animales se inocularon por vía intramuscular con 1 mg de proteína suspendida en adyuvante incompleto de Freund en proporción 1:1. La inyección se repitió al menos tres veces con intervalos de dos semanas. La inmunización se monitorizó por inmunoblot mediante la detección de anticuerpos en sangre extraída de la oreja, hasta que se detectó un nivel elevado de los mismos. Dos semanas después de la última inmunización, los animales se anestesiaron y se sangraron mediante punción cardiaca. La sangre recogida se dejó a 37 °C durante 2 horas y después toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se eliminó el coagulo resultante con una centrifugación a baja velocidad y se guardó el suero en alícuotas a -20 °C.

3.13.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOBLOT

La detección de proteínas con anticuerpos se llevó a cabo tras su separación en un gel de poliacrilamida en presencia de SDS y posterior transferencia a una membrana de PVDF activada con metanol y lavada con agua destilada, utilizando un sistema “Mini Trans-Blot Cell” (BioRad). La electrotransferencia se realizó en frío durante 1 hora a 75 V utilizando tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl; 128 mM Glicina, 0,1% SDS, 20% metanol; pH 8,3). Se bloquearon los radicales libres que pudieran reaccionar inespecíficamente con los

anticuerpos, con una solución de leche descremada al 3% en TBS (50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl; pH 7,5). Tras este paso, la membrana se incubó con una dilución 1:10.000 de los anticuerpos específicos frente a la proteína (apartado anterior) en solución de bloqueo al 1,5%. Finalmente se incubó con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano diluida (1:10.000) en solución de bloqueo al 1,5%.

Para revelar la membrana se usó el kit “Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate” siguiendo las instrucciones del fabricante. La detección se hizo en películas Hyperfilm-HP.

4. Resultados

4.1. TRADUCCIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *cro* EN *Escherichia coli* Y *Lactobacillus casei*

4.1.1. EN *L. casei* SOLO SE DETECTA LA FORMA CANÓNICA DE Cro

Al inicio del estudio del interruptor genético del fago A2 (Tesis Doctoral de Victor Ladero) se descubrió que el gen *cro*, sobreexpresado en *Escherichia coli*, daba lugar a dos polipéptidos. Ambos poseían extremos amino terminales idénticos, que se correspondían a lo esperado de la traducción del gen *cro*. Tras la espectrometría de masas, se determinó que el mayor, de 9.180 Da, tenía el tamaño esperado de la proteína Cro, mientras que el menor, de 7.887 Da, parecía ser el resultado de un procesamiento postraduccional del extremo C-terminal, que eliminaba los últimos 12 residuos. La posesión de ambas proteínas nos permitió identificar los dominios funcionales de Cro, ya que las dos se unían específicamente al segmento intergénico *cI-cro*, pero solo la mayor formaba dímeros (Ladero y col., 1999).

Posteriormente se descubrió (Tesis Doctoral de Isabel Rodriguez) que durante la traducción que los genes correspondientes a las proteínas mayoritarias de la cabeza y de la cola se generaban dos polipéptidos en cada caso, debido a que se producía un cambio a la pauta -1 de parte de los ribosomas en puntos concretos de su ARNm (García y col., 2004; Rodriguez y col., 2005). Esto hizo que nos planteáramos la posibilidad de que eso mismo fuera lo que pasaba durante la traducción de *cro*. Al analizar su ARNm encontramos, en la zona correspondiente a aquella en la que se había postulado que ocurría el procesamiento de Cro, una posible secuencia deslizante, el heptanucleótido U UUU UUU (pauta 0) y una posible estructura secundaria adyacente y en posición 3', aunque la energía libre de esta última era de tan solo -9 kcal/mol. El análisis por MALDI-TOF-TOF de los péptidos trípticos derivados de la digestión de las dos formas de Cro reveló que los dos péptidos eran iguales hasta el aminoácido 67 y que a partir de ahí diferían, de manera que el menor solo tenía dos aminoácidos más porque el tercer codón en la pauta -1 era de parada (Figura 8).

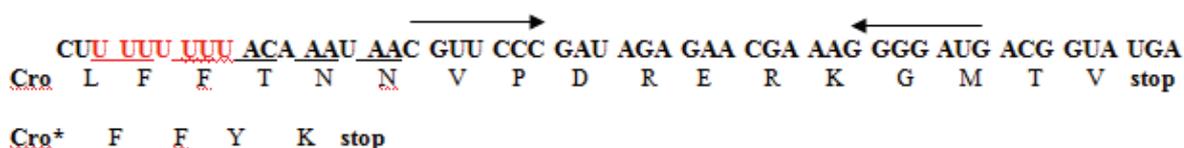


Figura 8.- Secuencia deslizante y región invertida adyacente identificadas en el ARNm correspondiente al gen *cro*. Se presentan también las secuencias de aminoácidos que resultarían de su traducción en las pautas 0 y -1.

En esta Tesis nos propusimos averiguar si el desplazamiento de pauta observado en *E. coli*, ocurría también durante la infección del fago, ya que ello podría afectar a la decisión de seguir un ciclo lítico o bien uno lisogénico; por ejemplo, la forma trunca de Cro podría competir con el Cro canónico por los operadores e influir sobre la expresión de los promotores P_L y P_R .

Para ello nos planteamos, en primer lugar, detectar las proteínas derivadas de la expresión de *cro* en cultivos infectados de *L. casei*, utilizando anticuerpos policlonales generados frente a la mezcla de los dos polipéptidos. Sin embargo, el análisis Western realizado tras el SDS-PAGE de los extractos celulares solo detectaba la forma canónica de Cro (Figura 9), al igual que ocurría tras la inducción de cultivos de *L. casei* lisogénico para A2. Esto sugería que en condiciones fisiológicas reales el desplazamiento a la pauta -1 no tenía lugar o, si ocurría, la proporción de ribosomas que la sufrían era tan pequeña que el polipéptido no se detectaba en los geles.

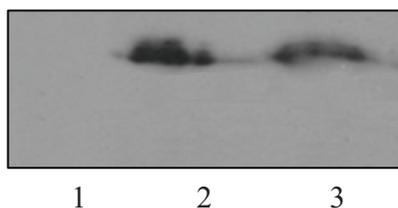


Figura 9.- Inmunoblot frente a la proteína Cro de cultivos de *L. casei*, (calle 1), *L. casei* infectado con el fago A2 (calle 2) y *L. casei* lisógeno para el fago A2 inducido con mitomicina C. Las células se recogieron después de 3 horas y se sometieron a SDS-PAGE en geles de Tris-Tricina (16 %).

4.1.2. GENERACIÓN DE UN PROFAGO EN EL QUE EL RETROCESO DE LOS RIBOSOMAS ES GENÉTICAMENTE IMPOSIBLE

Para diferenciar entre las dos posibilidades enunciadas, llevamos a cabo un experimento de mutagénesis *in vitro* en el que se cambió la secuencia deslizante U UUU UUU (pauta 0), que codifica Phe-Phe, por U UUC UUU que seguiría codificando Phe-Phe en la pauta 0, pero que pasaría a ser Phe-Leu en la -1. Así eliminaríamos la posibilidad de retroceso del ribosoma sobre el ARNm y, con ella, la de generar la forma pequeña de Cro, ya que los apareamientos codón anticodón en ambas pautas dejarían de ser equivalentes.

El experimento se inició con la amplificación de un segmento del genoma de A2 que abarcaba desde 808 pb por delante de *cro* hasta 610 pb por detrás, usando los cebadores A2-21 y A2-22 (Tabla 4), que generan, respectivamente, los sitios de restricción para HindIII y BamHI en los extremos del amplicón. A continuación, se utilizó la técnica del ADN solapante (sección 3.7.7 de Material y Métodos) para introducir la mutación en el segmento, usando los cebadores A2-23 y A2-24 (tabla 4). El amplicón resultante se ligó entre los sitios HindIII y BamHI del vector pUC19E, dando lugar al plásmido pUC19E-*cro*l y se secuenció, para confirmar que portaba la mutación. El plásmido híbrido se introdujo en células electrocompetentes del *L. casei* lisógeno para A2 y los transformantes se seleccionaron en placas de MRS con eritromicina (2,5 µg/ml) (recuérdese que pUC19E no se replica en *L. casei*, por lo que los transformantes deberán tener el plásmido integrado en el ADN bacteriano (Figura 10A).

Para comprobar este último extremo, se extrajo el ADN de las células ery^r y se llevó a cabo una PCR con los cebadores A2-25, que anilla con la secuencia contigua al sitio HindIII en pUC19E, y A2-26, que es complementario a la secuencia que se encuentra aguas abajo de *cro* en el genoma de A2 (tabla 4). El amplicón resultante (Figura 9B) se secuenció de nuevo para confirmar la presencia de la mutación introducida en el gen *cro*.

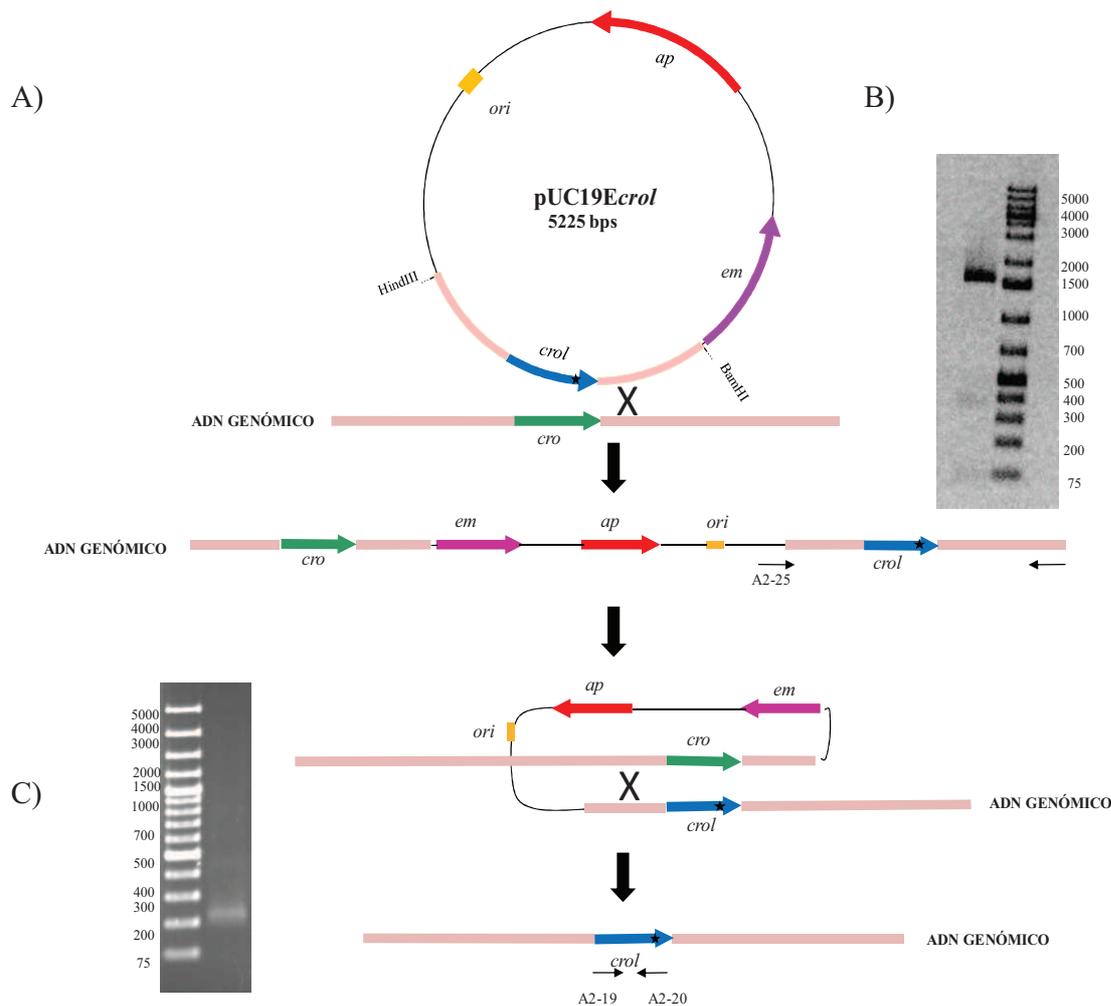
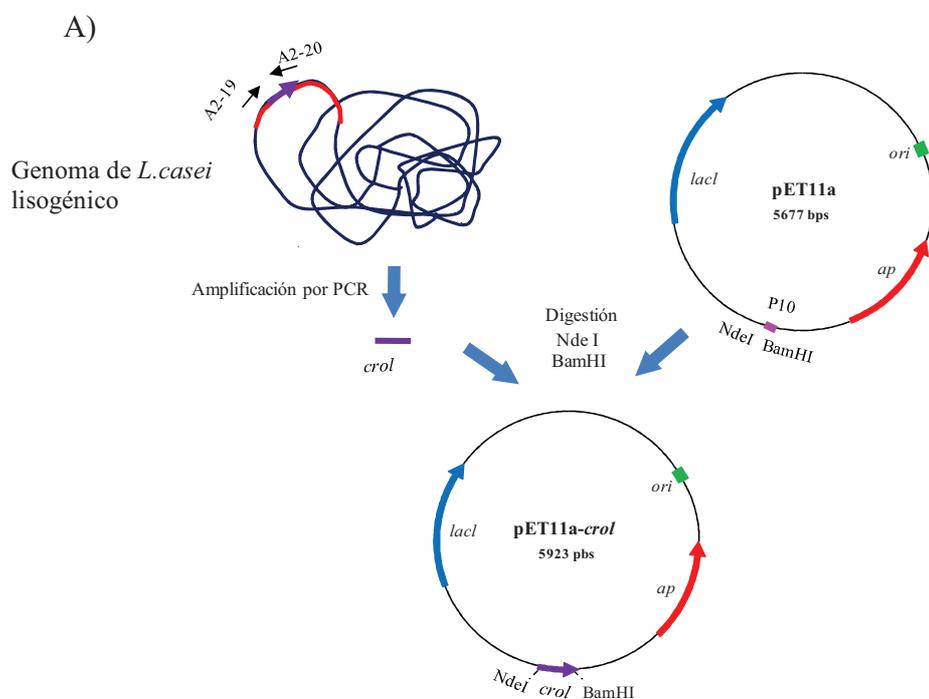


Figura 10.- A) Esquema de las recombinaciones que tienen lugar en las células de *L. casei* 393-A2 para dar lugar a un cultivo lisogénico con el profago mutado. El gen alterado aparece en azul, la mutación se representa por una estrella. Al final del proceso aparece integrada en el genoma bacteriano. En rosa se representan las secuencias de A2. Se indican también los cebadores utilizados para comprobar que la primera recombinación había tenido lugar. B) Amplicón resultante de la PCR utilizando los cebadores A-25 y A2-26, que demuestra que ha tenido lugar la integración de pUC19Ecol en el genoma de *L. casei*. C). Amplicón obtenido a partir de la PCR de los revertientes ery⁻ de *L. casei*, utilizando los cebadores A2-19 y A2-20, que flanquean el gen *cro*.

Los clones recombinantes se incubaron en MRS líquido sin antibiótico durante 3 días a 30°C (con cambio diario de medio de cultivo) para facilitar una segunda recombinación. El objetivo era obtener una cepa de *L. casei* lisógeno, cuyo profago contuviera la mutación deseada en el gen *cro* y que hubiera perdido la secuencia correspondiente al vector pUC19E (Figura 10A). Dichos clones se seleccionaron por reversión a sensibilidad a eritromicina. Para

comprobar el genotipo se extrajo el ADN total de las colonias *ery^s*, se amplificó *cro* usando los oligonucleótidos A2-19 y A2-20 (Figura 10C) y se secuenció el amplicón resultante.



B)

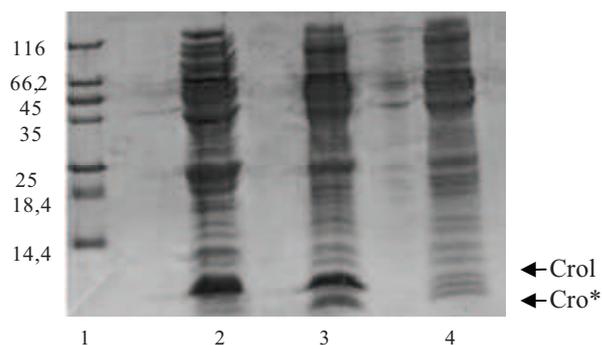


Figura 11.- A) Esquema de la clonación del gen *croL* de A2 (que solo puede expresar el producto canónico) en el vector pET11a para su sobre-expresión bajo el promotor P10 del fago T7 en *E. coli* BL21(DE3)/pLysS. B) SDS-PAGE de cepa sobre expresando el gen *croL* (calle 2), *cro* silvestre (calle 3) y control negativo sin añadir IPTG (calle 4). En la calle 1 Los patrones de peso molecular se indican en kDa.

Este último amplicón se utilizó también para comprobar que el gen mutado no permitía el cambio de los ribosomas a la pauta -1. El cebador A2-19 contiene un sitio NdeI que coincide con el triplete de inicio de la traducción de *cro*, mientras que A2-20 posee un sitio BamHI localizado aguas debajo de *cro*, lo que nos facilitó la clonación del segmento en el vector pET11a bajo la dirección del promotor P10 del fago T7. La sobreexpresión del gen en *E. coli* BL21 reveló que se producía un solo polipéptido, lo que contrasta con el gen silvestre, que como se esperaba, daba lugar a dos (figura 11B).

4.1.3. LA MUTACIÓN EN LA SECUENCIA DESLIZANTE DEL GEN *cro* ES SILENCIOSA

Si el fago silvestre produce ambas formas de Cro sería esperable que la menor tuviera algún efecto sobre la producción de progenie viral, aunque su proporción fuera tan pequeña que no se pudiera detectar con anticuerpos. Sin embargo, si en *L. casei* se genera sólo el producto resultante de la traducción estándar de *cro*, no deberían encontrarse diferencias en el comportamiento de los lisógenos que portaban los profagos silvestre y mutante.

Para determinar cuál de las dos posibilidades era cierta, se incubaron ambas cepas en medio MCM líquido y, una vez alcanzada la fase exponencial, se indujeron los profagos con mitomicina C y se sacaron muestras periódicamente, en las que se determinó la concentración de viriones viables por el método de la doble capa. En la tabla 5 se muestran los resultados promedio de tres experimentos independientes. Como se puede observar, no parece haber diferencias significativas entre los tamaños de progenie resultantes de la inducción de los dos tipos de lisógenos. Estos datos, junto a la falta de detección de la forma de Cro resultante de su traducción en la pauta -1, indicarían que dicho desplazamiento de pauta no tiene lugar durante el desarrollo intracelular del fago A2 en *L. casei*.

	0 h	4 h	6 h	8 h
Lisógeno silvestre	6×10^3	$7,2 \times 10^4$	$5,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$
Lisógeno mutante	1×10^4	$4,2 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$

Tabla 5.- Concentraciones de fagos obtenidas a diferentes tiempos postinducción de cepas lisogénicas de *L. casei*, albergando el profago silvestre y el mutado en la secuencia deslizante del gen *cro*.

4.2. ESTUDIO DE LA POSIBLE FUNCIÓN CODIFICADA POR EL GEN *orf22* DEL FAGO A2

4.2.1. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE *orf22* Y COMPARACIÓN CON LAS DE OTRAS PROTEÍNAS

El gen *orf22* está situado adyacente a *cI* y forma una unidad transcripcional con él (figura 6). Da lugar a Orf22, una proteína de 225 aminoácidos, que presenta tres partes claramente diferenciadas (figura 12A). La primera está constituida por dos dominios transmembrana localizados entre los residuos 5-23 y 37-56 respectivamente (figura. 12B), la segunda va desde el aminoácido 58 al 104 y se caracteriza por presentar una concentración inusualmente alta de serina (17 de 46 residuos), ácidos aspártico-glutámico (12/46) y lisina-arginina (5/46). Finalmente, tenemos la segunda mitad de la proteína, que es la única que presenta homología con varias otras depositadas en las bases de datos (figura 12C).

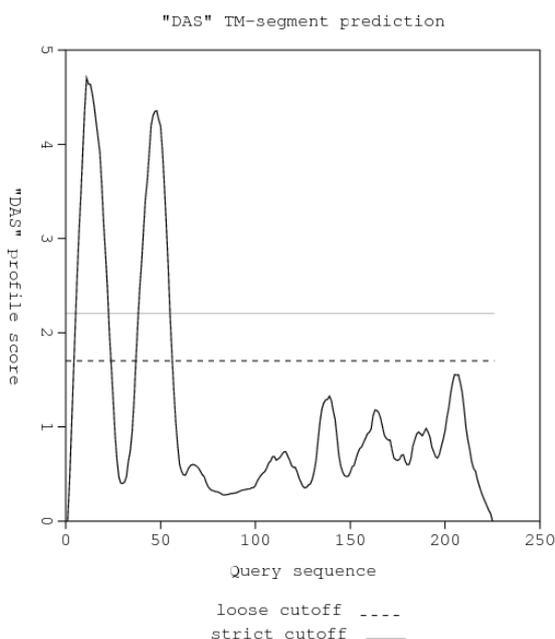
A)

```

MKLLILIAFL GLLLLAAIFG TLSIVQRKDP RKLKRNLIIIT ALSAVAFIAI FFWIGTYSGE
SNRSAASSSS SKLNRQRSKS SQEDDDSYGE SDSDDSDSEE SSSTEFNAA DYNTGITYEQ
LARTPDDYKG KNITLTGKVI QVVEGDEND LRVAVDGNVD NIVMVGYPD IMNGSRILEN
DKITFYAESL GTTTYKSTMG GKITVPLALA KKIDDAGTAP DDYGD

```

B)



C)

```

Orf22-A2          M-----KLL-ILIAFLGSLLLAAIFGTLSIVQRKDP
Gp25-Lmr1        M-----KLL-ILIAFLGSLLLAAIFGTLSIVQRKDP
TcdC-C.difficile MFSKKNEGNEFSNEGKGSSKKIIKFFKSTKGIALLAFIFGVFF-----
*                *:: :: : * *** ***.

Orf22-A2          RKLKRNLIIITALSAVAFIAIFFWIGT-YSGESNRSAASSSSSKLNRQRS-
Gp25-Lmr1        RKLKRNLIIITALSAVAFIAIFFWIGT-YSGESKRSAASSSSSKAESSKV-
TcdC-C.difficile -----GNISSPACSEDHEEVIISNQTVIDSQKTE
*.: ..*.....*...* :.:

Orf22-A2          -----KSSQEDDDSYGESDS-----DDSDSEESSSTEAFNA
Gp25-Lmr1        -----ESSQDDDDSYEDTDS-----DDSDDEESSSTETFNA
TcdC-C.difficile IETLNSKLSDAEPWFKMKDDEKKAIEAENQRKAEEAKKAEQKKEEEEEK
. .**:. . : .. **. .* :

Orf22-A2          ADYNTGITYEQLARTPDDYKGNITLTGKVIQVVEGDDENDLRVAVDGNY
Gp25-Lmr1        ADYNTGITYEQLARTPDDYKGNITLTGEVIQVVEGDDETDLRVAVDGNY
TcdC-C.difficile KGYDTGITYDQLARTPDDYKYKVKFEGKVIQVIEDGDEVQIRLAVSGNY
. *:*****:***** *::: * :*****:*. ** :*:**.***

Orf22-A2          DNIVMVGYPDIMNGSRILENDKITFYAESLGTTTYKSTMGGKITVPLAL
Gp25-Lmr1        DNIVMVGYPDIMNGSRILENDKITFYAESLGTTTYKSTMGGKITVPLAL
TcdC-C.difficile DKVVLCSYKKSII-TPSRVLEDDYITIRGISAGTITYESTMGGNITIPGIA
*::: .*. .* . **:*.* ** : . * ** ** :*****:***.*

Orf22-A2          AKKIDDAGTAPDDYGD
Gp25-Lmr1        AKKIDDAGTAPDDYGD
TcdC-C.difficile VEKI-----N
.:** :

```

Figura 12.- A) Secuencia de la proteína Orf22 del fago A2 con indicación, en azul, de los aminoácidos componentes de las regiones transmembrana y, en verde, de los correspondientes al segmento rico en serina y residuos con carga. B) Probabilidad de presencia de segmentos transmembrana en la secuencia de Orf22. C) Comparación de las secuencias de Orf22 con las de Orf25 del fago Lmr1 y TcdC de *Clostridium difficile*.

Sin embargo y en contraste con Ant, cuyo determinante estaba presente en todos los fagos que infectan a bacterias del ácido láctico, la homología de Orf22 con otras proteínas se limita a Orf25 del fago Lmr1, con la que presenta una identidad del 95%. Dicho fago se parece

a A2 e infecta a cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, una especie muy relacionada con *L. casei*, el hospedador de A2.

Aparte de ésta, aparece otra proteína con homología significativa a Orf22, la cual está limitada a su mitad C-terminal, desde los residuos 111-112 hasta 214-217: TcdC. Su determinante aparece en el genoma de una cepa de *Bacillus cereus* y en el de todas las cepas virulentas de *Clostridium difficile*, ya que forma parte de la agrupación responsable de la síntesis de las enterotoxinas A y B, dos determinantes de virulencia que median la colitis pseudomembranosa que causa este microorganismo (Matamouros et al., 2006). El grado de homología de las mitades C-terminales de todas estas proteínas con la de Orf22 se sitúa en torno al 60%. La proteína TcdC presenta un dominio transmembrana en su extremo N-terminal, de modo semejante a lo que ocurre con Orf22, siendo precisamente ésta su localización en la célula (Govind y col, 2006).

4.2.2. SOBRE-EXPRESIÓN DE *orf22* EN *Escherichia coli*

La secuencia del gen se amplificó por PCR y se insertó en el vector pET11a bajo la dirección del promotor P10 del fago T7. El plásmido resultante se introdujo en *E. coli* BL21 (DH3/pLysS) y se indujo la síntesis de la proteína Orf22. Dicha proteína dió lugar a cuerpos de inclusión, posiblemente debido a la abundancia de secuencias hidrofóbicas de sus dominios transmembrana, a pesar de haber usado múltiples estrategias de incubación de los cultivos (temperaturas entre 18 y 40°C, medios de cultivo complejos y sintéticos) de inducción de su síntesis (concentraciones de IPTG entre 0,1 y 1 mM) y de solubilización de los conglomerados de proteína (urea 7M, cloruro de guanidina 5M). Este fracaso limitó seriamente la posibilidad de llevar a cabo estudios in vitro y de sintetizar anticuerpos contra ella.

4.2.3. EXPRESIÓN EN TRANS DE *orf22* EN *L. casei* Y EFECTO SOBRE LA GENERACIÓN DE PROGENIE VIRAL.

El gen se insertó en el vector pNG8048E bajo el promotor P_{nisA} inducible por nisina y se introdujo en *L. casei nisRK2*, lisógeno para A2. A cultivos en fase exponencial de esta cepa se les añadió mitomicina C para inducir el ciclo lítico del profago residente y /o nisina para

estimular la producción de Orf22. Se tomaron muestras a diferentes tiempos postinducción y se cuantificó la concentración de fagos en los sobrenadantes de los cultivos (tabla 6).

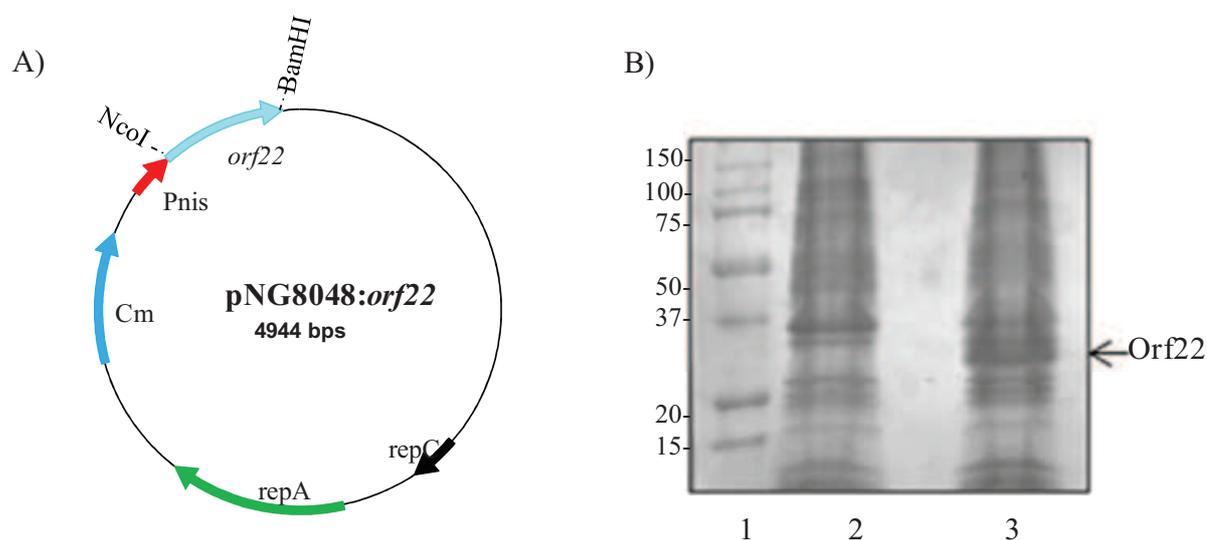


Figura 14.- A) Esquema del plásmido pNG8048:orf22 y expresión de éste último en *L. casei*. El gen amplificado por PCR a partir del ADN genómico de A2 y digerido con los enzimas de restricción BspHI y Bgl II fue insertado utilizando los sitios NcoI y BamHI en el vector pNG8048E. B) Sobreproducción de Orf22 en los cultivos de *L. casei nisRK2*. Calle 1: Marcador de masas moleculares; calle 2: *L. casei* con pNG8048E; calle3: *L. casei* pNG8048:orf22 inducido.

Los resultados obtenidos no permitieron evidenciar ninguna diferencia respecto a los datos procedentes de la inducción de un lisógeno sin el plásmido pNG8048:orf22 o de uno con el vector únicamente. Tampoco se observó ningún efecto fenotípico tras estimular la síntesis de Orf22 mediante la adición de nisina a los cultivos.

	2h	4h	6h	15h
pNG8048E+MC	7×10^3	$4,9 \times 10^4$	$6,3 \times 10^5$	$3,8 \times 10^4$
pNG8048: <i>orf22</i> +MC	$8,8 \times 10^3$	$6,7 \times 10^4$	$7,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$
pNG8048: <i>orf22</i> +nis+MC	$2,8 \times 10^4$	$5,8 \times 10^4$	$9,2 \times 10^5$	$4,9 \times 10^4$

Tabla 6.- Generación de progenie viral en cultivos de *L. casei nisRK2* lisógenos para A2 sin plásmidos, con el vector pNG8048E y con pNG8048:*orf22*. La inducción de la síntesis de Orf22 se llevó a cabo con nisina (5 ng/ml) y la del ciclo lítico con mitomicina C (1 μ g/ml).

La imposibilidad de obtener la proteína en forma soluble, unida a la ausencia de efecto de la sobreproducción de la misma sobre la generación de nuevos fagos, nos obligó a interrumpir la investigación sobre la función que podría jugar Orf22 en los ciclos de desarrollo del fago A2.

4.3. ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN REGULADORA DE *Ant*

4.3.1. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE DIVERSOS GENES *ant* Y DE LOS PRODUCTOS DEDUCIDOS DE ELLAS

La pauta abierta de lectura del fago A2 que denominamos *ant* codifica para un polipéptido de 160 aminoácidos con un peso molecular estimado de 17.844 Da. Su codón de inicio solapa con el de parada de *cro* en la secuencia ATGA, lo que sugiere una traducción acoplada. La proteína que se deduce a partir de su secuencia muestra homología con Orfs de muchos otros bacteriófagos atemperados que infectan bacterias Gram positivas (figura 15), estando sus determinantes localizados en posiciones similares de sus respectivos genomas. Por ello, postulamos que *Ant* podría ejercer una función reguladora, modulando la actividad del represor del ciclo lítico, *Cro*, de bacteriófagos atemperados. En apoyo de esta hipótesis está el hecho de que *Ant* de A2 (y de todos los demás fagos) presenta similitud con los productos de los genes de la familia *bro* de baculovirus, los cuales presentan un dominio de unión a ácidos nucleicos.

```

Ant-A2      MNELQHFDKGRQVRTVVVDNEPMFVVGKDIAEVLGYSKPANAVNKYVPDK
P28-77     MQALQTFNFKELPVRTVEIENEPIYFVVGKDIAEILGYARSNNAIRNHVDSE
Gp27-LV-1  MKDLQIFNFRGLDVRTVLIDGEPYFVVGKDVADVLGYKKPENAVANHVDEE
Orf23-AT3  MNELQLFQFEDNQIRTVSSNGIIWFSAPDVTNALKLTNTTVALKS-LDG-
Gp36-A006  MSNLQIFNFEENEVRTVFIENEPHFVIGKDVAKVLGYSNSRDALKRHVFLK
          * . ** * : * . : *** : . * . * : : * . . * : :
          :

Ant-A2      FKGVTKLMTPGGK--QDFVVAIEPGLYKLVF---K-SD---M-PNADEFT
P28-77     DKLTHQFSASGQN--RNMI I INESGLYSLIFDASKQSKNEKIRETARKFK
Gp27-LV-1  DKTTTLIQGTGSNYKSKTVIVNESGLYSLIL---S-SK---L-PTAKKFK
Orf23-AT3  DE-VTKFNLGGLS--GETNFISEPGLYKLVG---A-SR---K-PAAKRFN
Gp36-A006  NKGVVKHDSLGS--QNLTAINEAGLYQLIF---K-SK---L-ESAERFQ
          : . * . . : * .***.* : * * * . *
          :

Ant-A2      DWVAEKVLP S IRKHGAYMTPETIEKAIYNPDFI INLATQLKDEQAKTAE
P28-77     RWVTSVLP PAIRKHGIYATDNVIEQTLKDPDYIITVLT EYKKEKEQNLLL
Gp27-LV-1  HWVTSEVLP PAIRKHGAYMTDEKAFD VVNNKSGLADLLQQAAD-QLKQKDI
Orf23-AT3  RWVTHEVLP S IRKHGAYMTPETIEKAIYNPDFI INLATQLKDEQAKTAA
Gp36-A006  DWVTSEVLP SVRKHGAYMTNDTIEKAITDPDFLIRLATNLKEEKTKRIEA
          ** : .***: :*** * * : . . : : : : : : :
          :

Ant-A2      TADNETMKPKALFADAVATS↓TTILVGD LAKVIKQNGVDIGAKR LFAWLR
P28-77     QQQVEVNKPKVLFADSVAGSDNSILV GELAKILKQNGVDIGQNRLFKWLR
Gp27-LV-1  QIA-E-MKPKALFADSVATSNSTILV GELAKILRNGIEIGQNRLFDWLR
Orf23-AT3  TADNETMKPKALFADAVATSHTTILV GDLAKVLKQNGVDIGAKR LFAWLR
Gp36-A006  EQRLEIQKPKVMFAEAVSDARGTILIRDLAKLIQNGIDIGEKR LFEWMR
          * ** . :***: : * : :***: :***: : : * : * * : * *
          :

Ant-A2      EQGYLIKRI GADYNSPTQRAMELGLFEVKETAISHSDGHVTVQKTPKVTG
P28-77     NNGYLIKKS GESSYNLPTQKSM DLKILDIKKRI INNPDGSSKVSRTPKVTG
Gp27-LV-1  KNGYLISKKGSSYNLPTQKSM NLGLFKIKETTINHSNGSVSISK TAKVTG
Orf23-AT3  EQGYLIKRI GADYNSPTQRAMELGLFEVKETAISHSDGHVTVQKTPKVTG
Gp36-A006  QRGYLISRKGT DYNRPTQKSM ELGLFKIKETAIIRSSGAQTAI-TAKVTG
          : .***. : * .** ***: : * : : : * . . * . * .***
          :

Ant-A2      KGQQYFINKFLQK-----EA-----V
P28-77     KGQQYFVNKFLG-----EKQT-----S
Gp27-LV-1  KGQQYFINKFLNCMSHIYSGEKVAVAFVDEADEIK
Orf23-AT3  KGQQYFINKFLQK-----GMT-----V
Gp36-A006  KGQLYFVNKFL EQ-----SLK-----TI
          *** ** .***
          :

```

Figura 15.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen *ant* de A2 y la región inmediatamente posterior al codón de terminación (flecha verde vertical) hasta la siguiente señal de parada, con la de antirrepresores de otros bacteriófagos (AT3, A006, Φ77, y Lv1 infectan a *Lactobacillus casei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Lactobacillus jensenii* respectivamente). Los aminoácidos correspondientes a los dominios Bro y Ant se representan en rojo y azul, respectivamente

No obstante, Ant de A2 es mucho más corta que sus homólogos (figura 15). Cuando se analiza su secuencia nucleotídica se puede deducir que presenta un codón de terminación prematuro porque la secuencia aminoacídica que resultaría de la traducción tras dicho codón de terminación sigue siendo semejante a Ant de los otros fagos de bacterias lácticas. Ello sugiere que A2 derivaría de un virus ancestral con una proteína Ant de 255 aminoácidos y que la mutación puntual que determinó el acortamiento de su secuencia, ha ocurrido recientemente (ver figura 12). Por tanto, el estudio del papel de Ant de A2 es interesante por dos razones: a) Para conocer el papel de estas proteínas, dada su distribución en los fagos atemperados de bacterias lácticas y b) para saber si la delección del tercio C-terminal de Ant de A2 respecto a las proteínas homólogas de otros fagos, afecta al desarrollo de este virus.

4.3.2. EFECTO DE LA SOBREPRESIÓN DE *ant* SOBRE LA GENERACIÓN DE PROGENIE VIRAL

4.3.2.1. En cultivos de *Lactobacillus casei* sensibles al fago A2

Para investigar cual podría ser el papel de Ant durante el desarrollo intracelular de A2 nos planteamos conseguir la expresión regulada del gen mediante la utilización del sistema NICE adaptado a *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Martín, 2004).

Para ello, a partir de la secuencia de ADN del bacteriófago A2 se amplificó por PCR un fragmento correspondiente al gen *ant* y se clonó, en el vector pNG8048E, bajo el promotor P_{nisA} , inducible por nisina (Kuipers y col, 1995). Así se obtuvo el plásmido pNG8048:*ant* (figura 16) con el que se electroporaron células de *L. casei nisRK*, un derivado de *L. casei* ATCC 393 que lleva incorporado el sistema de dos componentes *nisRK* en el locus *attB*, a través del cual se integra el profago A2 en el genoma bacteriano. Dicho sistema detecta la nisina en el medio de cultivo mediante la activación de una histidín quinasa de membrana (NisK) que fosforila a un regulador citoplasmático (NisR) que, a su vez, se une al promotor P_{nisA} , induciendo su expresión en un proceso dependiente de la dosis del antibiótico aplicada.

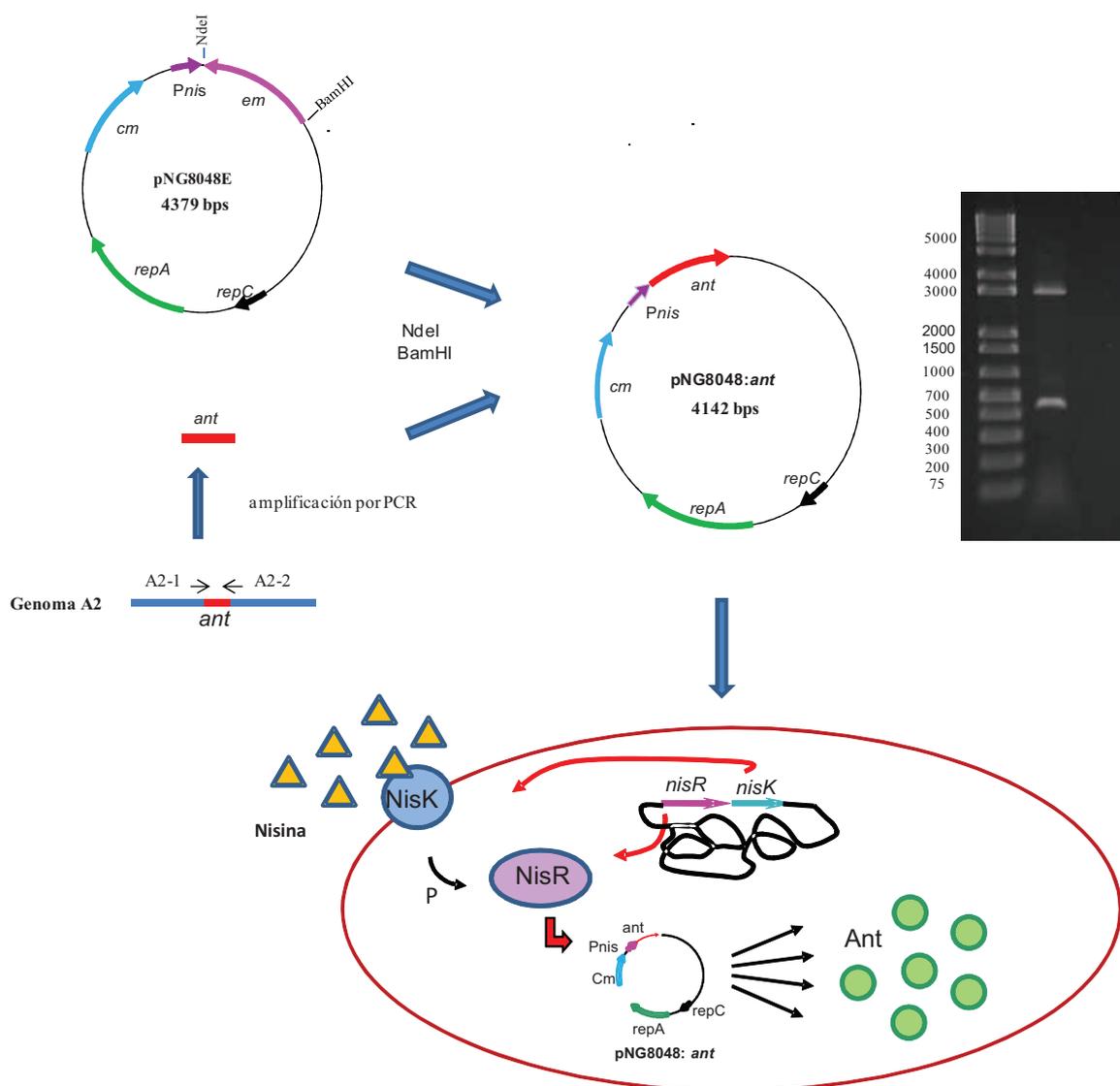


Figura 16.- A) Esquema de la clonación del gen *ant* en el vector pNG8048E y de la sobreexpresión resultante tras la adición de nisina a los cultivos de *L. casei* conteniendo el sistema NICE. B) Gel de agarosa mostrando la digestión de pNG8048:*ant* con NdeI-BamHI.

Una vez obtenida la cepa de *L. casei* pNG4048:*ant*, se trataron cultivos en fase exponencial con diferentes concentraciones de nisina (entre 1 y 50 ng/ml) para determinar aquella a la que la inducción de la producción de Ant fuese máxima, sin comprometer la viabilidad de los cultivos tratados con el antibiótico. Se determinó que la concentración óptima de bacteriocina eran 5 ng/ml (Figura 17).

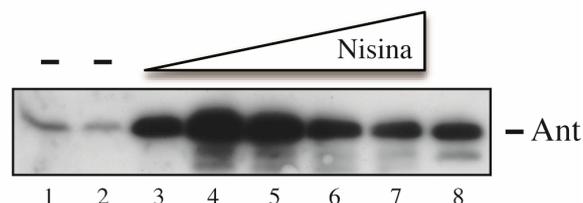


Figura 17 .- Inducción de la síntesis de Ant en células de *L. casei* pNG8048:*ant* por concentraciones crecientes de nisina. A los cultivos en fase exponencial ($A_{600} = 0,2$) (calle 1) se les añadió nisina para conseguir concentraciones finales de 0, 1, 5, 10, 25 y 50 ng/ml (líneas 2 a 7), se incubaron durante una hora, se lisaron, se separaron sus proteínas por SDS-PAGE y se puso de manifiesto la presencia de Ant con anticuerpos específicos. En la calle 8 se cargó la proteína Ant pura.

Una vez determinada la concentración de la bacteriocina que inducía óptimamente la expresión de *ant*, se llevó a cabo el experimento de infección de *L. casei* pNG8048:*ant* con el fago A2, que se añadió a cultivos exponenciales a una multiplicidad de infección de 0,1. Tomamos muestras a partir de ese momento y cuantificamos las placas de lisis generadas para conocer la cinética de producción de nuevos viriones (Tabla 7).

	0 h	4 h	5 h	8 h	15 h
<i>L. casei</i> sin plásmido	3×10^2	$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
pNG8048E	7×10^2	$2,6 \times 10^4$	5×10^3	$1,4 \times 10^6$	2×10^4
pNG8048:<i>ant</i>	$1,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	2×10^4	$1,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$
pNG8048E + nis	$6,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^4$	1×10^4	$3,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^4$
pNG8048:<i>ant</i> + nis	$7,5 \times 10^2$	$2,1 \times 10^4$	5×10^3	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^8$

Tabla 7: Rendimiento de la infección (placas de lisis/ml) de cultivos de *L. casei* ATCC 393, la misma cepa con el vector vacío (pNG8048E) y su derivado con el gen *ant* bajo la dirección del promotor P_{nisA} en ausencia y presencia de nisina (5 ng/ml).

De los datos podemos deducir que a las 4 h se ha producido ya un ciclo de propagación del fago, que va seguido de la internalización de parte de esa progenie a las 5 h y de una segunda explosión a las 8 h de incubación. Por tanto, el periodo de latencia del fago es de entre 3 y 4 h. No se aprecian diferencias notables entre los valores obtenidos en cada caso,

hasta las 8 h de incubación; esto nos indica que la síntesis basal de Ant, e incluso su sobreexpresión por efecto de la nisina, no parecen influir sobre el ciclo lítico/lisogénico que seguirán las células infectadas. Sin embargo, a las 15 h post-infección se detectan cambios drásticos entre los diferentes cultivos. En primer lugar, queda patente una disminución de la concentración viral debida, probablemente, a la inactivación de los viriones por adsorción a restos celulares u otras causas (muy evidente en los valores de los cultivos que no tenían plásmido o que portaban el vector sin *ant*, tanto en presencia como en ausencia de nisina). Por otro lado, queda también patente que los cultivos con el gen *ant* clonado en pNG8048 experimentan un incremento en la producción de fagos de unas 10^1 y 10^4 veces respecto a sus controles respectivos, según se hubiera omitido o no el tratamiento del cultivo con nisina.

4.3.2.2. En cultivos de *Lactobacillus casei* lisogénicos para el fago A2

Previamente a realizar este experimento tuvimos que generar la cepa lisogénica de *L. casei* que portara los genes *nisR* y *nisK*. La razón es que en la cepa usada en los experimentos anteriores, dichos genes están integrados en el sitio *attB* sobre el que recombina el DNA del fago A2 para formar el lisógeno, lo cual eliminaba la posibilidad de construirlo a partir de dicha cepa. Así pues, partimos de *L. casei* ATCC 393, que se transformó con el plásmido pMEC10. Este vector es un derivado de pUC19 que no replica en *Lactobacillus* pero que porta un gen de resistencia a eritromicina, la secuencia *int-attP* del fago mv4 y los genes *nisR-nisK* bajo el control del promotor *nisR* (Pavan y col, 2000). Los transformantes se seleccionaron por resistencia a eritromicina y lincomicina y se comprobó que poseían el plásmido integrado en el sitio *attB* para el fago mv4 (un gen de RNA_t^{ser}). A continuación se infectaron con el fago A2 y se seleccionaron lisógenos en base a su resistencia a la infección por dicho fago y a su inducibilidad con mitomicina C, que generaba viriones activos sobre *L. casei* ATCC393. Dichos lisógenos, como era de esperar, presentaban el profago integrado en su sitio *attB* (un gen de RNA_t^{leu}). Como último paso, estas cepas se transformaron con los vectores pNG8048E y pNG8048:*ant*.

Para realizar los experimentos de inducción del ciclo lítico partimos de cultivos en fase de crecimiento exponencial a los que añadimos nisina (5 ng/ml) para inducir la síntesis de Ant, una vez alcanzada una $DO_{600} = 0,1$. Se prosiguió la incubación media hora más, transcurrida la cual añadimos mitomicina C (1 $\mu\text{g/ml}$) y, al igual que en los experimentos de infección, tomamos muestras partir de ese momento para evaluar la generación de progenie fágica. Los resultados se recogen en la tabla 7.

	0 h	4 h	6 h	8 h	15 h
<i>L. casei</i> lisogeno A2	6×10^4	$4,1 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$
pNG8048E	$2,9 \times 10^4$	2×10^4	7×10^4	8×10^4	$1,8 \times 10^4$
pNG8048:<i>ant</i>	3×10^4	$1,2 \times 10^4$	6×10^4	4×10^4	1×10^4
pNG8048E + nis	$3,2 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	7×10^4	3×10^4	$2,1 \times 10^4$
pNG8048:<i>ant</i> + nis	4×10^4	$1,8 \times 10^4$	1×10^4	5×10^4	3×10^4
<i>L. casei</i> lisógeno A2 + MC	$1,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$	3×10^4
pNG8048E + MC	$3,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	2×10^6	$1,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^4$
pNG8048:<i>ant</i> + MC	$3,8 \times 10^4$	1×10^4	$2,6 \times 10^9$	2×10^8	$5,2 \times 10^5$
pNG8048E + nis + MC	$2,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$7,6 \times 10^5$	9×10^4
pNG8048:<i>ant</i> + nis + MC	2×10^4	2×10^9	1×10^{10}	$1,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^6$

Tabla 8. Concentraciones de fagos (ufp/ml) obtenidas a diferentes tiempos de cultivos de *L. casei nisRK*, lisogénicas para el fago A2 sin plásmidos, con el vector pNG8048E y con el mismo vector conteniendo el gen *ant*, tras añadir nisina (para inducir la sobreexpresión de dicho gen), mitomicina C (para inducir el ciclo lítico del profago) o ambas. El tiempo 0 es el de adición de la mitomicina C.

De los datos obtenidos se desprende que ni el gen *ant* plasmídico, ni la adición de nisina a los cultivos, ni ambas circunstancias a la vez, inducen el ciclo lítico de los profagos residentes en el genoma de *L. casei*, ya que no se observan cambios significativos en las progenies virales resultantes de dichos tratamientos, con respecto a los obtenidos a partir de los cultivos sin vector o con pNG8048E.

En los cultivos inducidos con mitomicina C observamos, en primer lugar, que la progenie viral se libera en torno a las 4 h de tratamiento, es decir que la fase de latencia es algo más larga que la que se obtiene tras la infección de las células sensibles. En segundo lugar, queda patente que los cultivos que albergan el gen *ant en trans* generan una progenie mucho más abundante que los lisógenos sin el plásmido o conteniendo únicamente el vector pNG8048E. Así, en esos últimos casos los incrementos obtenidos son de aproximadamente 10^2 ufp/ml sobre los valores característicos de la inducción espontánea, mientras que en el caso de cultivos con el gen *ant* ascienden a 10^5 o a 10^6 , según que el cultivo no/si hubiera sido tratado con nisina para inducir su sobreexpresión.

En la figura 15 se presentan fotos de la apariencia de los cultivos de *L. casei nisRK::pNG8048:ant*, lisógeno de A2, a las 15 h de incubación sin tratamiento, tras inducción del ciclo lítico de A2 con mitomicina C y tras activación de la sobreexpresión de *ant* con nisina, previa al tratamiento con mitomicina C, que corroboran los datos presentados en la tabla 8.

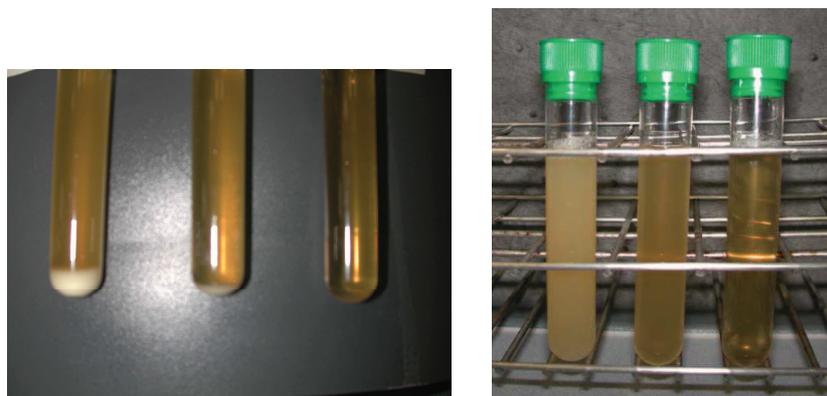


Figura 18 .- Cultivos de *L. casei::pNG8048:ant*, lisógeno de A2, a las 15 h de incubación a 30°C (tubos 1), tras inducción con mitomicina C durante la fase exponencial (tubos 2) y tratados con nisina para inducir la sobreexpresión de *ant* media hora antes de la adición de mitomicina C (tubos 3). La foto 1 muestra los cultivos recién sacados del incubador; la foto 2, después de haberlos agitado.

Por ello, tanto los experimentos de infección como los de inducción del ciclo lítico parecen indicar que Ant no tiene capacidad para desencadenarlo por sí misma, pero, una vez que éste se ha puesto en marcha, induce un incremento muy significativo en la progenie viral que se obtiene.

4.3.3. EXPRESIÓN DE *cI*, *cro* Y *ant* DURANTE EL CICLO LÍTICO

Una vez visto el efecto de Ant promoviendo el incremento del número de viriones que se obtienen tanto tras la infección de cultivos sensibles como tras la inducción de cepas lisogénicas, nos planteamos estudiar el mecanismo molecular por el que se obtenía este cambio fenotípico.

En un principio, dado que Ant por sí sola no induce el ciclo lítico de los profagos residentes en los cultivos lisogénicos, nos planteamos que su papel podría ser coadyuvar a la neutralización de CI por RecA una vez se ha inducido el ciclo lítico o bien, cooperar con Cro en la promoción de la entrada y mantenimiento de los profagos en él. Por ello, el primer experimento que llevamos a cabo fue determinar la evolución de las concentraciones relativas de las proteínas CI, Cro y Ant durante el periodo crítico de paso del ciclo lisogénico al lítico.

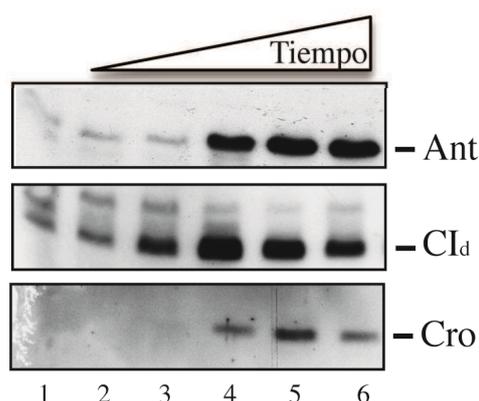


Figura 19.- Síntesis de Cro y de Ant y aparición de CI_d , resultante de la proteólisis de CI, en cultivos de *L. casei* lisógeno para el fago A2, inducidos con mitomicina C. La detección de las proteínas se llevó a cabo por reacción tipo western con anticuerpos específicos para cada proteína. Calle 1: cultivos sin inducir; calles 2 a 6: muestras tomadas 30, 60, 90, 120 y 180 minutos postinducción, respectivamente.

Para ello, recogimos muestras de cultivos de *L. casei* lisógeno de A2, antes y a distintos tiempos postinducción con mitomicina C para, posteriormente, realizar ensayos tipo western, utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas (figura 19). Pudimos apreciar que las proteínas Cro y Ant se empiezan a expresar a los 90 minutos postinducción y que se produce un aumento considerable de CI_d , resultante de la proteólisis de CI.

Para ver si el incremento de la dosis génica de *ant* tendría algún efecto sobre la expresión de *cro* y/o la degradación de CI, se compararon los datos obtenidos a partir de cultivos lisógenicos inducidos, conteniendo pNG8048E y pNG8048:*ant* (figura 20). En primer lugar, se observa que la presencia de *ant* plasmídica se traduce en una gran concentración de su producto, Ant, incluso antes de la inducción de los cultivos (calle 6) probablemente debido a que el plásmido vector es multicopia y a que el promotor P_{nisA} es rezumante (Kuipers y col, 1995). Sin embargo, esto no modifica el momento de aparición de Cro ni su concentración y tampoco influye en la cinética de formación de CI_d , es decir, de degradación de CI.

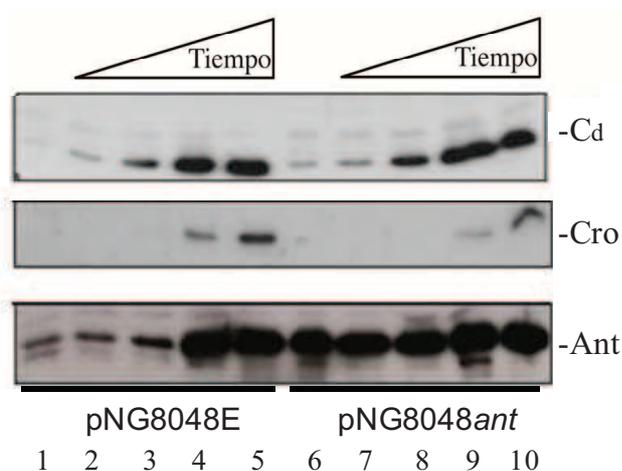


Figura 20.- Efecto de la sobreexpresión de *ant* sobre la síntesis de Cro y la generación del fragmento CI_d , procedente de CI, en cultivos de *L. casei* lisógeno para A2, inducidos con mitomicina C y revelados con anticuerpos específicos, tras transferencia tipo western. Calles 1 y 6: cultivos sin inducir; calles 2 y 7, 3 y 8, 4 y 9, 5 y 10: cultivos tomados a 30, 60, 90 y 120 min postinducción respectivamente.

4.3.4. PURIFICACIÓN DE Ant Y DE Ant-142 Y DETERMINACIÓN DE SU ESTRUCTURA FUNCIONAL

El gen *ant* se clonó en el vector de sobre-expresión pET3a, bajo el promotor P10 del bacteriófago T7. Se obtuvo así el plásmido pET3*ant* con el que se electroporaron células de *E. coli*. A los transformantes, en fase de crecimiento exponencial, se les añadió IPTG para sobre-expresar *ant*. Los cultivos se lisaron con ultrasonidos y la proteína se purificó pasando sucesivamente el extracto clarificado por una columna de intercambio catiónico y una de heparina, tal como se indica en Material y Métodos (figura 22, calle 1).

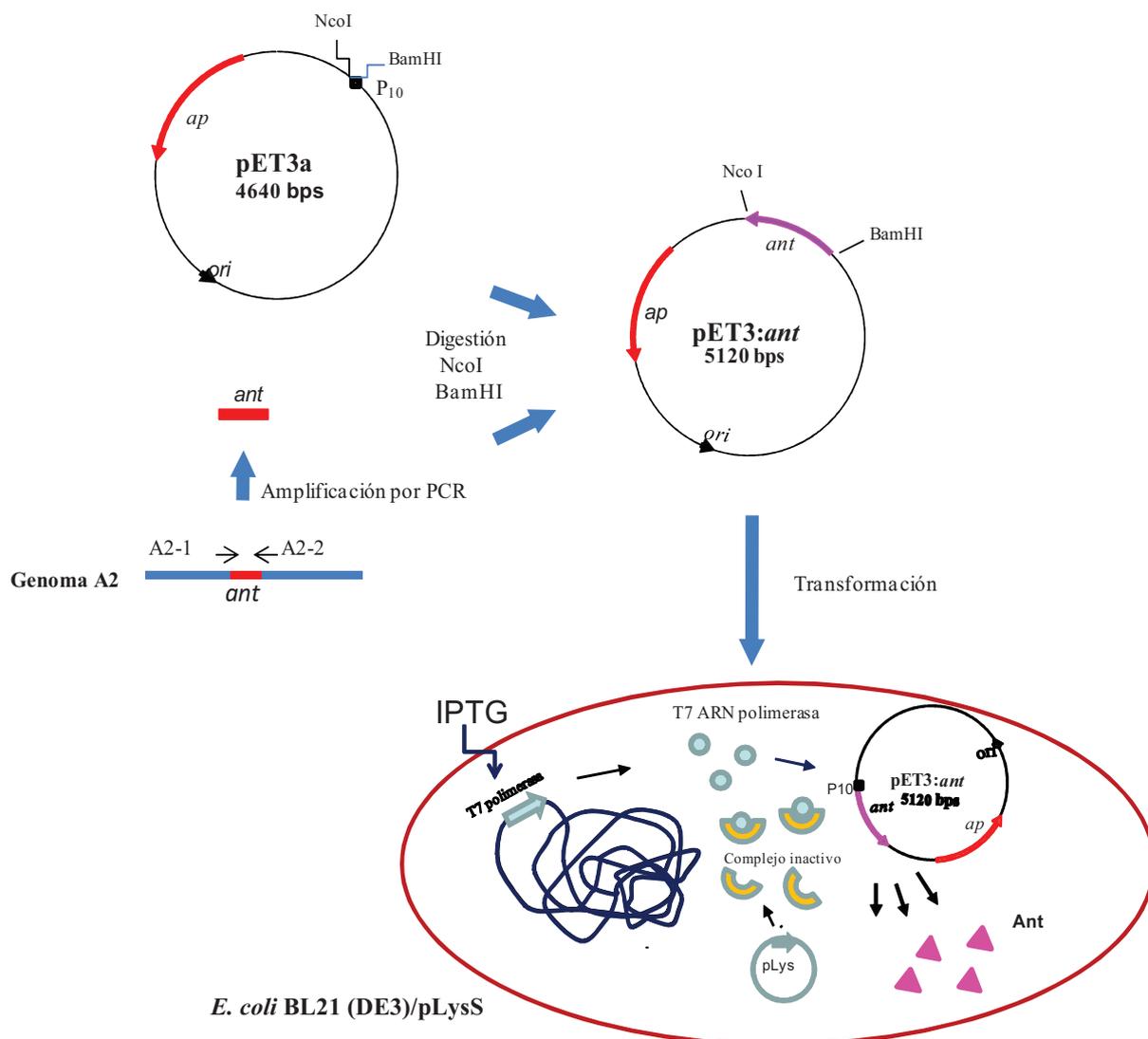


Figura 21.- Esquema de la clonación y expresión del gen *ant* en el vector pET3a.

En esa misma calle puede observarse una segunda banda, algo más pequeña que Ant, que co-purificaba con ella, lo que sugería que podía ser un producto de su procesamiento. Para comprobarlo, se sometió la banda a proteólisis con tripsina y los péptidos resultantes se identificaron por espectrometría de masas. Se comprobó así que la proteína se correspondía con una forma truncada de Ant a la que le faltaban los últimos 18 aminoácidos, razón por la que se le denominó Ant-142.

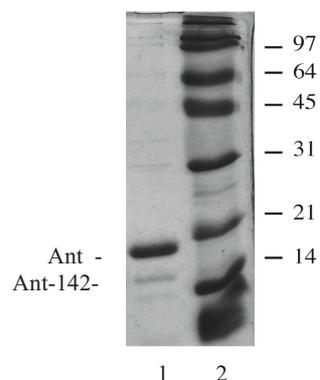


Figura 22.- SDS-PAGE de las proteínas Ant y Ant-142 (calle 1) purificadas como se indica en Material y Métodos. En la calle 2 se muestran los marcadores de masa molecular, cuyos tamaños se indican a la derecha en kDa.

Para obtener información acerca del grado de oligomerización de las proteínas Ant y Ant-142 purificadas, que pudiera darnos pistas sobre su estructura funcional intracelular, se llevó a cabo un experimento de ligación con ácido subérico (actúa como puente de unión entre residuos de lisina de polipéptidos adyacentes) (Tsuda y col., 1987).

Los productos de las reacciones se analizaron por SDS-PAGE (figura 23). Se observó que ambas proteínas forman mayoritariamente dímeros en solución, que aparecen señalados como complejos A_2 y $A-142_2$. Asumimos que también se formará el producto híbrido, que migraría entre las bandas homodiméricas, aunque no pudimos ponerlo bien de manifiesto, dada la proximidad de estas en el gel. Por encima de los dímeros aparecen bandas poco marcadas que podrían corresponder con trímeros y tetrámeros. Finalmente, el hecho de que observemos dímeros de Ant-142 nos indica que dominio carboxilo terminal de Ant no es esencial para la interacción entre los monómeros.

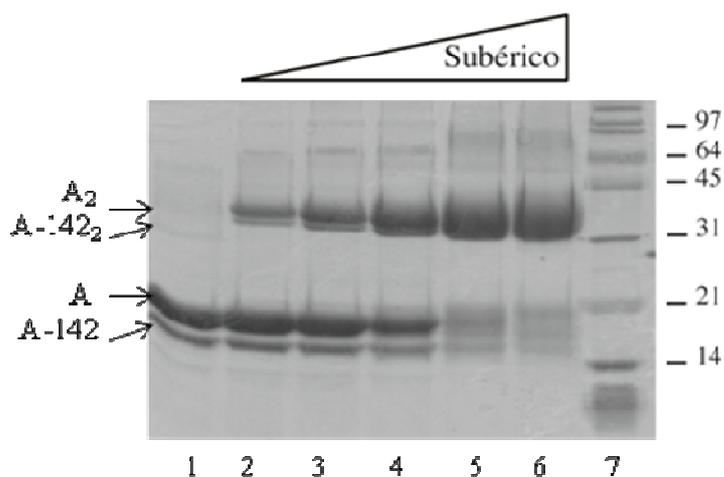


Figura 23.- Determinación del grado de oligomerización de Ant en solución. Se incubaron 4 μg de Ant pura (conteniendo Ant-142) en tampón (calle 1) y de concentraciones crecientes de ácido subérico (0,025, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,5 mM concentración final; calles 2 a 6). Las muestras se resolvieron en un gel del 15 % SDS-PAGE. En la calle 7 se muestran los marcadores de masa molecular, cuyos tamaños se indican a la derecha en kDa. A y A-142: monómeros de Ant y Ant-142 respectivamente; A_2 y $A-142_2$: los dímeros correspondientes.

4.3.5. INTERACCIÓN DE Ant CON PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA DECISIÓN LISIS-LISOGENIA

4.3.5.1. Ant no forma complejos con CI

La proteína CI se sobre-expresó en *E. coli* BL21/pLys a partir de un plásmido que lleva gen *ci* clonado en el vector pET11a bajo la influencia del promotor P10 del fago T7 y se purificó tal y como se describe en García y col (1999). Ant y CI se incubaron en presencia de ácido subérico y posteriormente la reacción se resolvió en un gel del 15% SDS-PAGE de forma similar a como se procedió en el apartado anterior (figura 24A). Como se aprecia en la calle 1, CI migra como un polipéptido de aproximadamente 28.000 Da en condiciones desnaturizantes. En las calles 7-9 del gel, en las que se presentan muestras con concentración fija de Ant y crecientes de CI, se observa que ambas proteínas forman homodímeros (véanse las calles 2 y 5) pero no aparecen heterodímeros.

Complementariamente, se llevó a cabo la detección de Ant tras una transferencia tipo Western (figura 24B). Se puede observar que los anticuerpos detectan las mismas bandas en la calle 5 que contiene solo Ant tratada con ácido subérico, que en las 6-8, en que también estaba presente CI; es decir, no aparecen bandas indicativas de la formación de heterooligómeros.

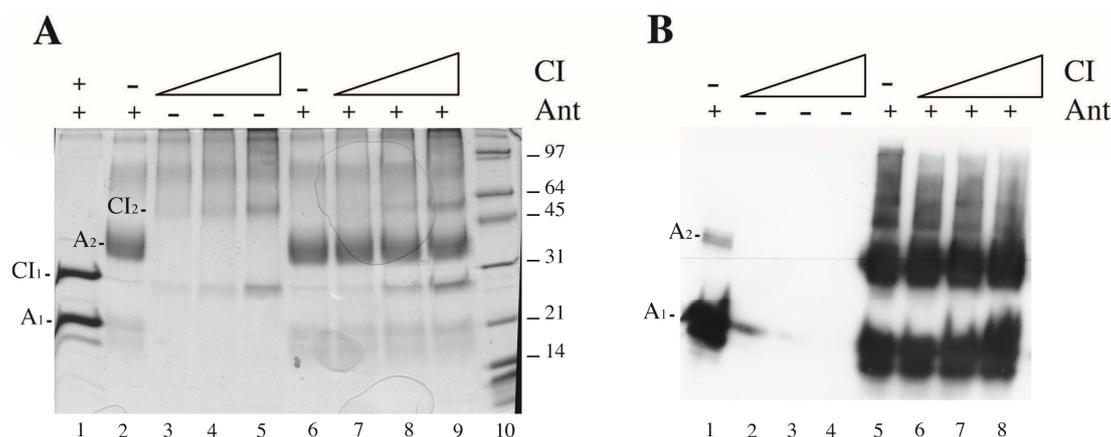


Figura 24.- Análisis de la posible interacción entre Ant y CI. A) SDS-PAGE de las proteínas; calle 1: 2 μ g de Ant y de CI; calles 2 y 6: Ant incubada con ácido subérico 0,5 mM durante 15 min a 37°C; calles 3-5: 1, 2 y 4 μ g de CI tratada con ácido subérico; calles 7-9: mezcla de Ant (2 μ g) y CI (1, 2 y 4 μ g) en presencia de ácido subérico; calle 10: patrones de masa molecular. CI₁, A₁, CI₂ y A₂ indican respectivamente los monómeros y dímeros de CI y Ant. B) Hibridación de Ant con anticuerpos específicos tras transferencia tipo Western; calle 1: 2 μ g de Ant; calles 2-4: 1, 2 y 4 μ g de CI tratada con ácido subérico; calle 5: Ant incubada con ácido subérico; calles 6-8: mezcla de Ant (2 μ g) y CI (1, 2 y 4 μ g) en presencia de ácido subérico.

4.3.5.2. Ant interacciona con Cro

La proteína Cro se purificó, tras la sobre-expresión del gen *cro* insertado en el vector pET11a, siguiendo el método publicado por Ladero y col (1999).

Cuando incubamos Cro con Ant en presencia de ácido subérico, observamos la aparición de una banda que migraba a la altura de un heterodímero (figura 25A, calle 5).

Este dato se confirmó tras una transferencia tipo Western y revelado de Ant con anticuerpos (figura 25B, calle 4). El análisis por MALDI-TOF de esta banda demostró que en ella están presentes Ant y Cro.

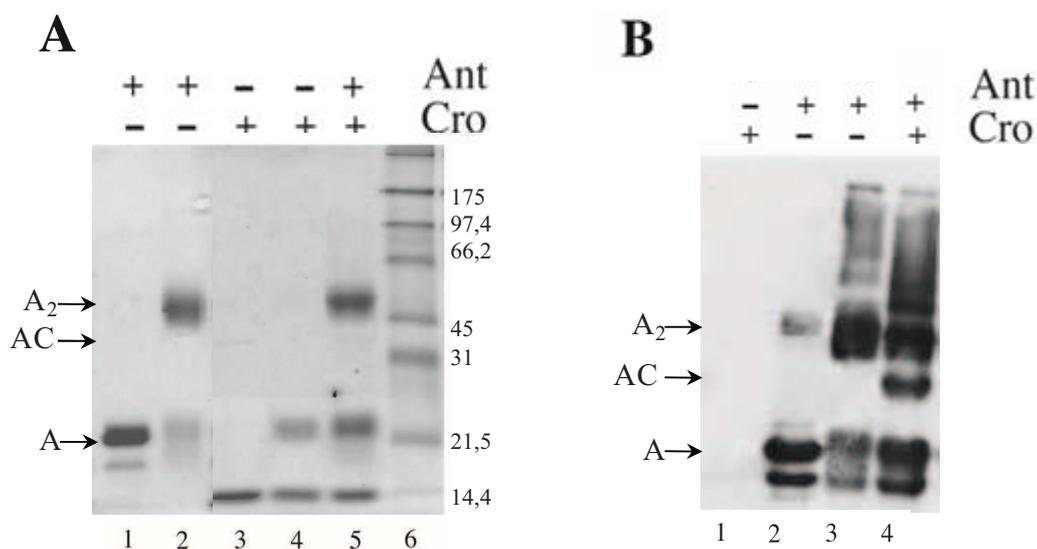


Figura 25.- Análisis de la interacción Ant-Cro. A) SDS-PAGE teñido con azul de coomassie. Calles 1 y 2: 2 μ g de Ant incubada sin y con ácido subérico respectivamente; calles 3 y 4: 1 μ g de Cro sin tratar y con ácido subérico; calle 5: mezcla de ambas proteínas en presencia de ácido subérico. B) Análisis por Western Blot de la interacción Ant-Cro revelada con anticuerpos anti Ant. Calle 1: 1 μ g de Cro; calle 2: 2 μ g de Ant; calle 3: Ant incubada con ácido subérico; calle 4: mezcla de Ant y Cro en presencia de ácido subérico. A1: Ant; A2: dímero de Ant; AC: heterodímero.

4.3.6. INTERACCIÓN DE Ant CON LA REGIÓN INTERGÉNICA *cI-cro* Y COMPETENCIA CON LOS REPRESORES CI Y Cro

4.3.6.1. Interacción de Ant con la región intergénica *cI-cro*

Esta región contiene los dos promotores divergentes y los operadores de A2 que actúan como interruptor, gobernando la entrada del fago en un ciclo lítico o bien en uno lisogénico. Para ver si el aumento de la progenie viral que se obtenía tras la sobre-expresión de Ant estaba relacionado con su posible competición con Cro o CI por los operadores, este fragmento, de 183 pb, se marcó radiactivamente, se incubó con concentraciones crecientes de Ant y la posible interacción se detectó por retardo en gel (EMSA) (figura 26).

Se encontró que Ant puede unirse a la región intergénica, aunque con poca afinidad, ya que la formación de complejos solo tiene lugar a concentraciones elevadas de la proteína.

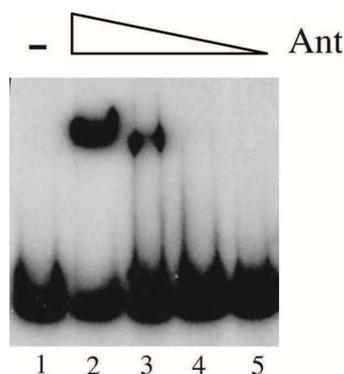


Figura 26. Determinación de la capacidad de unión entre Ant y el segmento intergénico *cI-cro*. El ADN, marcado con ^{32}P (calle 1), se incubó con concentraciones decrecientes de Ant (800, 400, 200 y 100 nM, calles 2-5) durante 30 minutos a 30°C . Los complejos se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 5 %.

4.3.6.2. Competición de Ant con CI por el segmento intergénico

En ensayos previos se había observado que CI se unía de forma específica a la región intergénica, generando dos bandas con movilidad electroforética retardada, los complejos I y II (García y col., 1999). El complejo I se forma preferentemente a concentraciones bajas de la proteína (figura 27A, calle 2), mientras que a concentraciones altas se empieza a detectar el complejo II (figura 27B, calle 2). Se incubó Ant en presencia de CI para ver si era capaz de desplazar al represor del ADN y así favorecer la transcripción desde el promotor P_R . La co-incubación de CI con Ant revela que a las concentraciones de la segunda que inducían retardo en el experimento anterior, aparecen nuevas bandas de menor movilidad (figura 27A y 27B, calles 3 y 4) que solo pueden explicarse asumiendo que ambas proteínas coexisten sobre el segmento de ADN. Obsérvese que en el gel A desaparece el complejo I, mientras que en el gel B, calle 3, se observa una banda que migra menos que el complejo II. Igualmente, en la calle 4 del gel B, aparece una banda intermedia entre los complejos I y II, que sería precisamente la resultante de agregar la proteína Ant al complejo I, lo que sugiere, de nuevo, que Ant se ha incorporado al mismo.

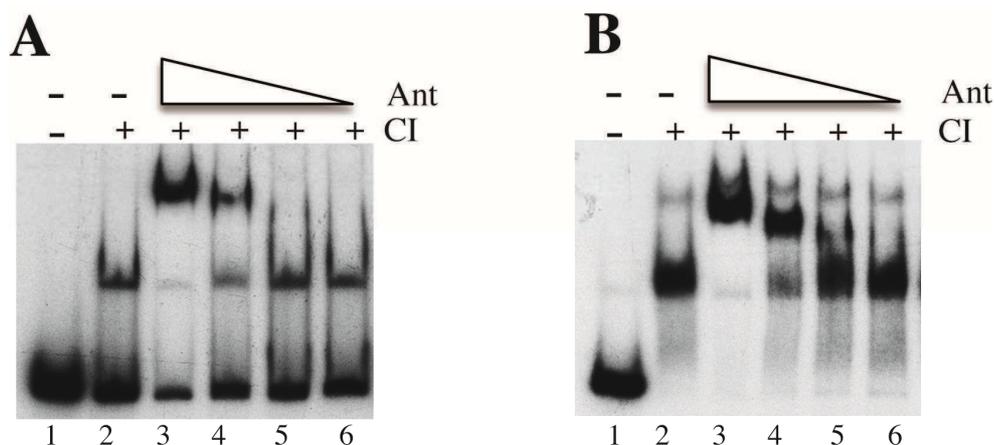


Figura 27.- Interacción de Ant y CI con el segmento intergénico *cI-cro*. El fragmento de ADN, marcado con ^{32}P (calles 1), se incubó con concentraciones constantes de CI (1,5 nM en el panel A y 12 nM en el B, calles 2) y decrecientes de Ant (800, 400, 200 y 100 nM, calles 3 a 6) durante 30 minutos a 30°C. Los complejos se resolvieron en un gel de poliacrilamida del 5 %.

4.3.6.3. Competición con Cro

Al igual que en el caso de CI, la unión de Cro a la región intergénica origina dos complejos con movilidad electroforética retardada (Ladero y col., 1999), apareciendo el complejo I a concentraciones bajas de la proteína (Fig. 28A; calle 2), mientras que el II se forma preferentemente a concentraciones mayores (Fig 28B; calle 2). La adición de Ant a la reacción provoca la paulatina desaparición de los complejos I (figura. 28A, calles 3 y 4) y II (figura 28B, calle 3) y la aparición de bandas con menor movilidad, sugiriendo que Ant se incorpora al ADN y coexiste con Cro sobre él.

La unión de Ant al ADN es específica para el segmento intergénico, ya que ensayos realizados con otros fragmentos de ADN no dieron lugar a la aparición de complejos de menor movilidad electroforética en experimentos de retardo en gel (datos no mostrados).

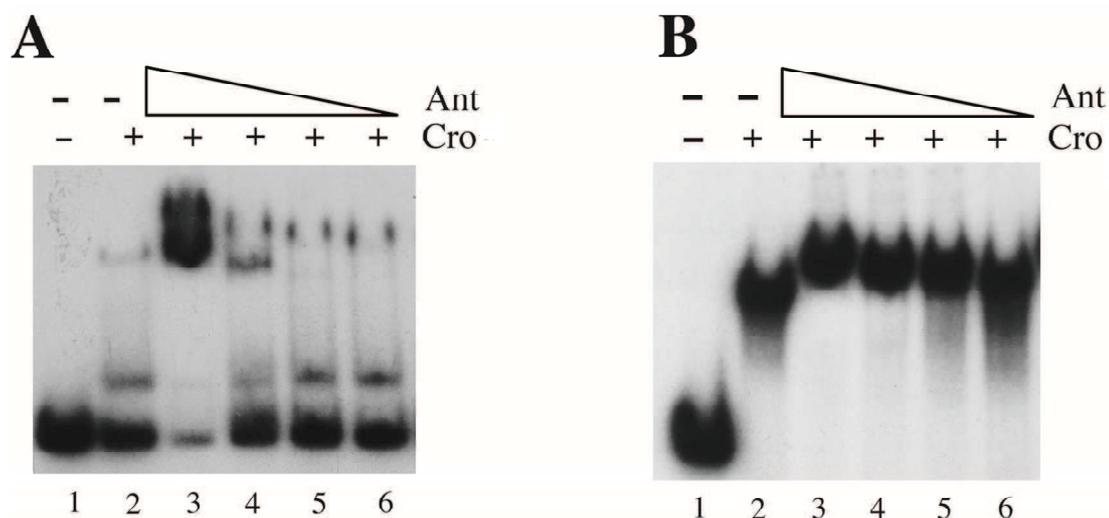


Figura 28.- Interacción de Ant con el complejo Cro-segmento intergénico *cI-cro*. El fragmento de ADN, marcado con ^{32}P (calles 1), se incubó con concentraciones constantes de Cro (1,5 nM en el panel A y 12 nM en el B, calles 2) y decrecientes de Ant (800, 400, 200 y 100 nM, calles 3 a 6) durante 30 minutos a 30°C. Los complejos se resolvieron en un gel de poliacrilamida del 5 %.

4.3.7. INTERACCIÓN DE ANT CON LOS ARNm DE *cI* Y DE *cro*

En experimentos anteriores vimos que Ant muestra baja, aunque significativa especificidad por la región intergénica y que co-existe en el ADN con Cro y CI. Por ello, hipotetizamos que quizás podría interactuar con los ARNm de uno o ambos genes. Para ello, sintetizamos los segmentos 5' terminales de 51 y 59 nucleótidos de los transcritos de *cro* y de *cI* respectivamente, los incubamos con concentraciones crecientes de Ant y determinamos si ello provocaba un retardo en la migración en gel de los ácidos nucleicos. En la figura 14 podemos apreciar que Ant se une al ARNm de *cro* a partir de una concentración 6-12 nM, mientras que los primeros indicios de retardo del ARNm de *cI* aparecen tras incubación con, al menos, 100 nM de la proteína. Podemos deducir, por tanto, que Ant tiene mayor afinidad por el ARNm de *cro* que por el de *cI*.

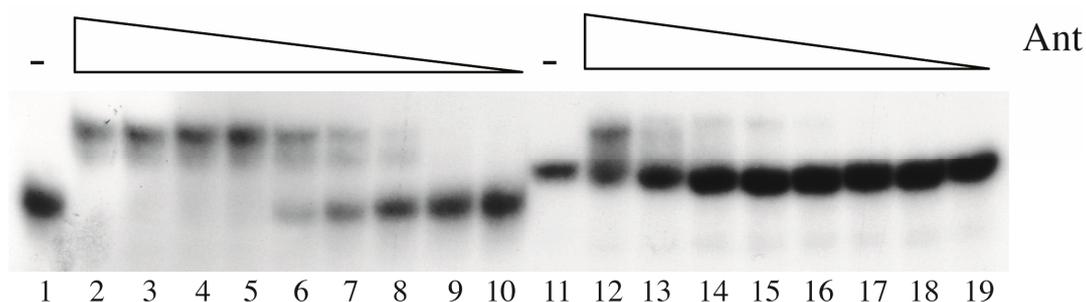


Figura 29.- Interacción de Ant con los ARN mensajeros de *cro* (calles 2 a 10) y de *cI* (calles 12 a 19) con cantidades decrecientes de Ant (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12, 6 y 3 nM). En las calles 1 y 11 se muestran los ARN_m libres de *cro* y *cI* respectivamente.

Para determinar cuál era la región del ARNm reconocida por Ant, sintetizamos varios polinucleótidos con longitudes comprendidas entre 35 y 67 residuos (el ARNm de *cro* tiene un extremo 5' no traducible de 32 nucleótidos, es decir el polinucleótido de menor longitud únicamente poseía el codón de inicio AUG de la proteína Cro). Con ellos, realizamos experimentos de retardo en gel, en todos los cuales observamos la aparición de complejos con movilidad reducida; en la figura 15 se muestran los resultados obtenidos con los fragmentos de 35 y 67 nucleótidos a modo de ejemplo. Sin embargo, no fuimos capaces de ver unión de Ant a un oligonucleótido que comprendía solo los primeros 24 residuos del ARNm (datos no mostrados). Podemos deducir, por tanto, que Ant se une al extremo 5' no traducible del ARNm de *cro* y que el tamaño mínimo del segmento reconocible está entre 25 y 35 nucleótidos.

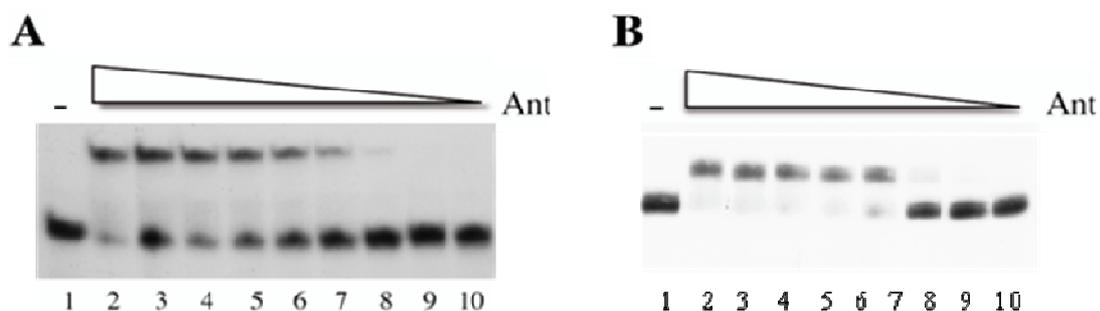


Figura 30.- Retardo de la movilidad electroforética de polinucleótidos de 35 (A) y 67 (B) residuos, correspondientes al ARNm de *cro*, tras incubación con concentraciones decrecientes de Ant (800, 400, 200, 100, 50, 25, 12, 6 y 3 nM; la concentración se calculó asumiendo que Ant actúa como un dímero). En las calles 1 se muestra la movilidad de los ARNs de 35 y 67 nucleótidos en ausencia de proteína.

4.3.8. GENERACIÓN DE NUEVOS GENES *ant* Y PURIFICACIÓN DE SUS PRODUCTOS

Como mencionamos con anterioridad, la señal de parada de la secuencia que codifica Ant de A2 parece ser el producto de una mutación puntual que ha originado el acortamiento de la proteína a 160 aminoácidos, mientras que sus homólogas, presentes en otros fagos, tienen una longitud de aproximadamente 250 residuos (apartado 4.3.2 de esta Tesis).

Por otra parte, Ant co-purificaba con una forma truncada de la misma, a la que le faltaban los últimos 18 aminoácidos (apartado 4.3.4). Aunque probablemente esto es un artefacto que se genera como consecuencia de la sobre-expresión de *ant* en *E. coli*, también es posible que el procesamiento ocurra en células de *Lactobacillus* infectadas por A2 y que tenga un significado fisiológico (datos no mostrados). De hecho, en la figura , en que se detecta la expresión de *ant* en *L. casei* con anticuerpos, se observan bandas en varias muestras que sugieren que Ant-142 también se genera en el hospedador del fago A2.

Por todo ello, decidimos llevar a cabo experimentos de mutagénesis para obtener ambas formas de la proteína Ant y comparar sus propiedades con las de la proteína “silvestre”.

4.3.8.1. Obtención de Ant-255 y efecto de su expresión sobre el ciclo lítico del profago A2

La generación de Ant-255 se llevó a cabo mediante mutagénesis *in vitro*, sustituyendo el codón de terminación TAA del gen, localizado en la posición 161, por el codón CAT, codificante de histidina. Una vez obtenido, el gen se clonó en pNG8048E para dar pNG8048:*ant-255*, que se electroporó a células de *L. casei nisRK*, lisógeno de A2 y se determinó la inducibilidad del promotor P_{*nisA*}, mediante el análisis de la producción de la proteína Ant-255 en cultivos inducidos con nisina (figura 31).

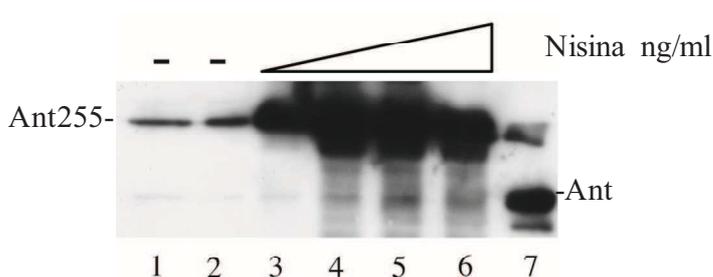


Figura 31. Inducción de la síntesis de la proteína Ant-255 por nisina. A los cultivos de *L. casei nisRK* pNG8048:*ant-255*, en fase exponencial, se les añadió el lantibiótico para alcanzar concentraciones de 1, 5, 10 y 25 ng/ml (calles 3 a 6). Las células se recogieron pasada una hora, se sometieron a SDS-PAGE, transferencia tipo Western y revelado con anticuerpos anti Ant. En las calles 1 y 2 se han incluido extractos de controles sin nisina, tomados en el momento de adición de la bacteriocina y de la recogida de los cultivos respectivamente. En la calle 7 se muestra la proteína Ant pura con su satélite Ant-142.

Una vez comprobado que el gen se expresaba, determinamos si Ant-255 afectaba a la síntesis de las proteínas tempranas del fago mediante ensayo Western, tras inducción del ciclo lítico con mitomicina C (figura 31). No se observó ningún efecto, ni sobre la acumulación de Cro y Ant (cuyos genes forman parte del genoma viral) ni sobre la degradación de CI, medida por acumulación del fragmento CI_d.

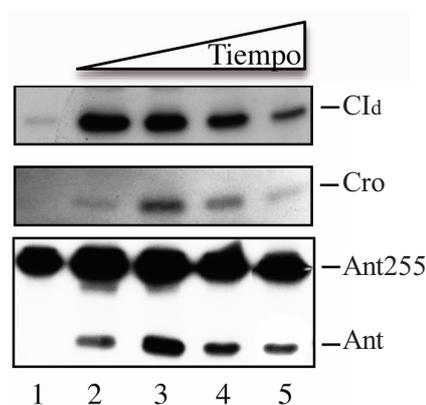


Figura 32. Efecto de la sobreexpresión de Ant-255 sobre la síntesis de Cro y Ant y la degradación de CI, medida por la generación del fragmento CI_d, en cultivos inducidos de *L. casei* pNG8048:*ant-255* lisógeno para A2. A los cultivos en fase exponencial se les añadió mitomicina C y se tomaron muestras a tiempos 0, 90, 180, 270 y 360 min (calles 1 a 5 respectivamente) que se sometieron a SDS-PAGE, transferencia Western e hibridación con anticuerpos específicos.

Por último, tomamos muestras de los cultivos a diferentes tiempos postinducción para comparar los tamaños de las progenies, según que en las células estuviera presente pNG8048:*ant-255* o pNG8048:*ant* (tabla 8). Los resultados obtenidos son semejantes entre sí y también a los incluidos en la tabla 1, donde se comparaba la progenie de cultivos conteniendo el gen *ant* en trans con otros que solo portaban el vector plasmídico. Así, la aparición de los nuevos fagos ocurre en torno a las 4 h post-inducción, la presencia de cualquiera de los genes *ant* provoca la aparición de una progenie muy numerosa y la inducción previa del promotor P_{nisA} con nisina determina la sobreproducción de las proteínas Ant y Ant-255 y un incremento de unas 5 - 10 veces en la concentración de nuevos fagos que se obtienen.

	0 h	4 h	6 h	8 h	15 h
PNG8048::<i>ant</i>	8,6x10 ³	1,5 x10 ⁴	4x10 ⁴	2,1x10 ⁴	9,1x10 ³
pNG8048::<i>ant255</i>	1,7x10 ⁴	2,6 x10 ⁴	4,1x10 ⁴	3,3x10 ⁴	1,6x10 ⁴
pNG8048::<i>ant+nis</i>	2,7x10 ⁴	3,8x10 ⁴	5,4x10 ⁴	6,3x10 ⁴	8,9x10 ⁴
pNG8048::<i>ant255+nis</i>	1,8x10 ⁴	5,1x10 ⁴	6,8x10 ⁴	3,9x10 ⁴	2,5x10 ⁴
pNG8048::<i>ant+mitC</i>	2,4x10 ⁴	1,2 x10 ⁵	2,8x10 ⁸	5,9x10 ⁸	2x10 ⁵
pNG8048::<i>ant255+mitC</i>	3x10 ⁴	2,6 x10 ⁴	4,6x10 ⁸	2x10 ⁸	4,2x10 ⁵
pNG8048::<i>ant+nis+mitC</i>	2,6x10 ⁴	1x10 ⁹	3,7x10 ⁹	1x10 ⁹	1x 10 ⁷
pNG8048::<i>ant255+nis+mitC</i>	1,3x10 ⁴	7,8x10 ⁸	2,1x10 ⁹	8,4x10 ⁸	7,2x 10 ⁶

Tabla 9.- Comparación de los tamaños de progenie obtenidos a partir de cultivos inducidos de *L. casei nisRK* lisógenos para A2 conteniendo el gen *ant* o el *ant-255* insertados en el plásmido pNG8048. El tiempo 0 corresponde al momento de adición de mitomicina C. La nisina se añadió 30 min antes que el antibiótico.

4.3.8.2 Purificación de Ant-255 y determinación de su grado de oligomerización.

El gen *ant-255*, clonado en el vector pNG8048E, se indujo con nisina en cultivos de *Lactobacillus casei* y la proteína se purificó por paso sucesivo a través de columnas de SP-Sepharosa y Blue-Sepharosa, según se ha indicado en Material y Métodos (figura 33).

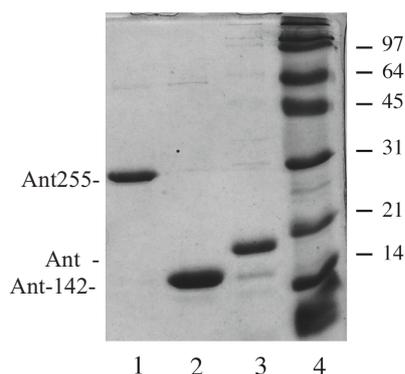


Figura 33.- SDS-PAGE de las proteínas Ant-255 (calle 1), Ant-142 (calle 2) y Ant (calle 3) purificadas como se indica en Materiales y Métodos. En la calle 4 se muestran los marcadores de masa molecular, cuyos tamaños se indican a la derecha en kDa.

Una vez obtenida Ant-255, se sometieron alícuotas de la misma a tratamiento con ácido subérico para estabilizar los posibles oligómeros y las muestras se observaron tras SDS-PAGE (figura 33). Se observa que, al igual que Ant y que Ant-142, Ant-255 forma dímeros, pero en su caso son evidentes los complejos mayores correspondientes a oligómeros con más subunidades, que eran difícilmente discernibles en los gels de las otras dos proteínas (ver figura 23).

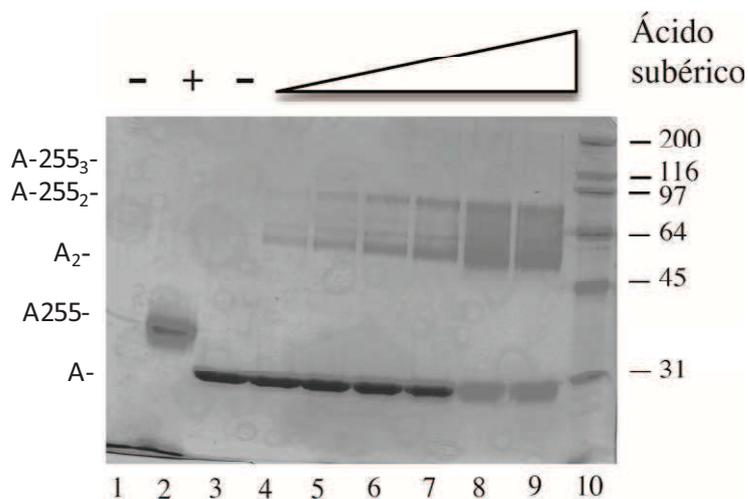


Figura 34.- Determinación del grado de oligomerización de Ant-255 en solución. Se incubaron 4 μ g de la proteína pura en tampón (calle 3) y con concentraciones crecientes de ácido subérico (0,03, 0,06, 0,12, 0,25, 0,5 y 1 mM concentración final; calles 4 a 9). Las muestras se resolvieron en un gel de gradiente del 10 al 15 % SDS-PAGE. En las calles 1 y 2 se muestran 2 μ g de Ant sin incubar e incubada con ácido subérico 0,5 mM. En la calle 7 se muestran los marcadores de masa molecular, cuyos tamaños se indican a la derecha en kDa. A y A-255: monómeros de Ant y Ant-255 respectivamente; A₂, A-255₂ y A255₃: los dímeros y el trímero correspondientes.

4.3.8.2. Obtención de Ant-142 purificada

Para generar Ant-142 llevamos a cabo un experimento de mutagénesis *in situ* por el cual se introdujo un triplete de terminación en la posición correspondiente al codón 143 de *ant*. El gen resultante se clonó en el vector pET3a, se sobre-expresó en *E. coli* y la proteína Ant-142 se purificó tal como se ha descrito para Ant (figura 22).

4.3.9. INTERACCIÓN DE Ant-255 CON ADN

4.3.9.1. Unión a la región intergénica *cI-cro*

Ant-255 se une al fragmento de ADN en el que reside el interruptor genético del fago A2 (Figura 35). La afinidad de los ligandos es mucho mayor en este caso que en el de Ant, se observa incluso a la menor concentración de las ensayadas, mientras que con Ant los primeros indicios de retardo se observaron a 400 nM (Figura 26). Adicionalmente, parece que Ant-255 puede formar agregados multimoleculares sobre el ADN, según va aumentando su concentración (en la figura 35 se observan, al menos, 6 bandas de retardo).

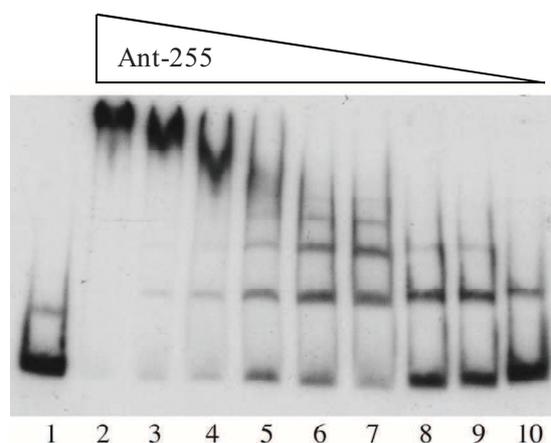


Figura 35. Interacción de Ant-255 con el segmento intergénico *cI-cro*. El ADN, marcado con ^{32}P , se incubó durante 30 min a 30°C con concentraciones decrecientes de la proteína (50, 25, 12,5, 5,25, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,38 y 0,19 nM (calculadas asumiendo que es un dímero) calles 2 a 10). Las muestras se separaron por SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida del 5%.

4.3.9.2. Efecto de CI y Cro sobre la unión de Ant-255 a ADN

Tanto CI como Cro parecen poder coexistir con Ant-255 sobre el segmento intergénico, al igual que lo hacían con Ant. Así, en la figura 36A podemos observar que las bandas de retardo provocadas por Ant-255 y por CI por separado, migran aún menos cuando ambas proteínas están presentes en la reacción (compárense, por ejemplo, las calles 2 y 6 con la 7 o las 3 y 6 con la 8). Los resultados mostrados en la figura 36B, en los que se incubó Cro. y Ant-255 con el ADN, son semejantes a los anteriores.

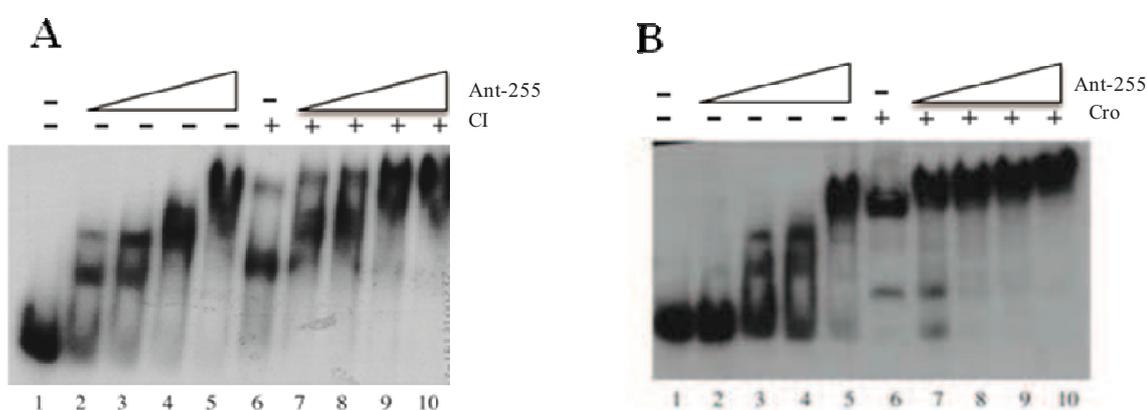


Figura 36.- Ensayo de unión de Ant-255 al segmento intergénico *ci-cro* en presencia de los productos de ambos genes. Las reacciones se llevaron a cabo con ADN marcado con ^{32}P incubado solo (calles 1) y con concentraciones crecientes de Ant-255 (3, 6,25, 12,5 y 25 nM; calles 2 a 5); las calles 6 contienen 12 nM de CI (gel A) y de Cro (gel B). De manera similar, las calles 7 a 10 de ambos geles contienen la misma concentración de cada una de estas proteínas más las antedichas de Ant-255.

4.3.10. INTERACCIÓN DE Ant-255 Y Ant-142 CON ARN

Ant-255, al contrario que Ant, no se une al extremo 5' del ARNm de *cro* (figura 37). Sin embargo, Ant-142 sí que lo hace, aunque probablemente con algo menos de afinidad que Ant (compárense, por ejemplo, la calles 5 y 14 de la figura. 25, en ambas se utilizó una concentración 50 nM de la proteína respectiva y se ve una diferencia clara en la magnitud del retardo). De estos datos podemos deducir dos cosas: que la porción C-terminal de Ant-255 bloquea su unión al fragmento que contiene los 67 nucleótidos primeros del ARNm de *cro* y

que los 18 aminoácidos que le faltan a Ant-142 respecto a Ant no son esenciales para dicha unión, aunque sí parecen tener un ligero efecto positivo.

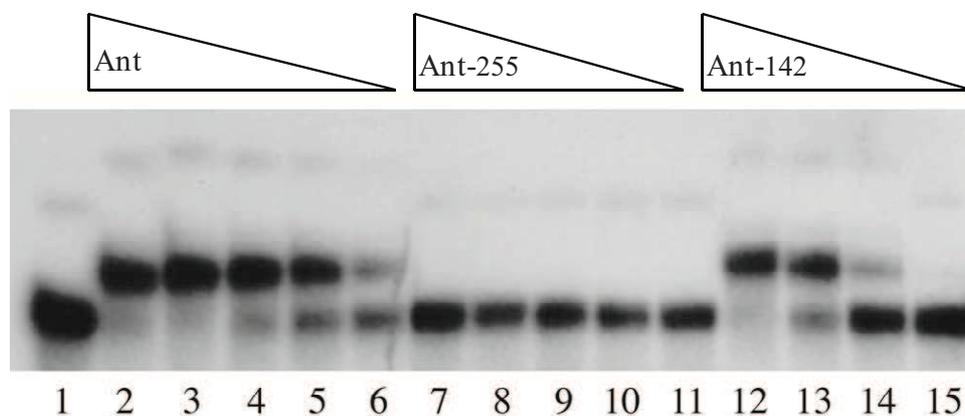


Figura 37.- Unión de las proteínas Ant-255, Ant y Ant-142 purificadas al polinucleótido de 67 residuos correspondiente al extremo 5' del ARNm de *cro*. Calle 1: ARN libre; calles 2 a 6: ARN incubado con 400, 200, 100, 50 y 25 nM de Ant; calles 7 a 11: ARN en presencia de 800, 400, 200, 100 y 50 nM de Ant250; calles 12 a 15: el ARN con 200, 100, 50 y 25 nM de Ant-142. Las muestras se incubaron durante 30 min a 30°C y se resolvieron en un gel de Tris Glicina del 12 %.

Por otra parte, tanto Ant-255 como Ant y Ant-142 se unen a moléculas de ARNm que contienen la mayor parte de la zona codificante de *cro* (figura 38A) o toda ella más parte de *ant* (figura 38B). En la primera imagen se muestra el retardo inducido en la migración de un ARN de 250 nucleótidos (desde el punto de inicio de la transcripción hasta el final de la zona codificante de *cro* hay 275 residuos); en el segundo gel, el ARN utilizado era de 450 nucleótidos (recuérdese que los codones de terminación de *cro* y de inicio de la traducción de *ant* solapan). Las proteínas Ant y Ant-142 dan lugar a imágenes superponibles en los geles, es decir que se comportan de modo similar respecto a su capacidad de unión a los ARNs ensayados. Sin embargo, el retardo inducido por Ant-255 es mucho mayor, lo que podría indicar que hay mayor afinidad entre el ARN y la proteína, que existe una unión múltiple, que se induce un cambio conformacional drástico en el ARN o una combinación de estas posibilidades, derivado de la presencia en Ant-255 de la porción C-terminal de la que carece Ant.

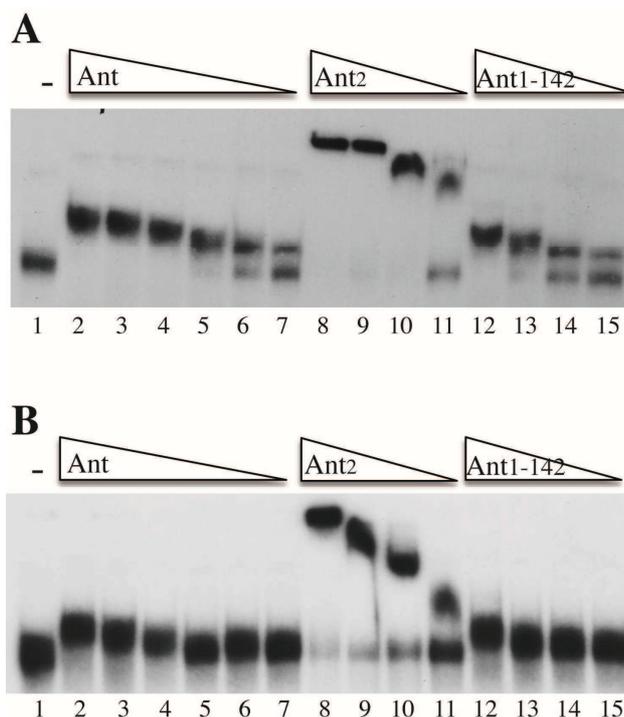


Figura 38.- Retardo producido por las proteínas Ant, Ant-255 y Ant-142 en la migración de moléculas de ARN de 250 (A) y 450 (B) nucleótidos, a contar desde el inicio de transcripción de *cro*. Calles 1: ARN libre; calles 2 a 7: ARN incubado con 800, 400, 200, 100, 50 y 25 nM de Ant; calles 8 a 11 y 12 a 15: ARN con 400, 200, 100 y 50 nM de Ant-255 y Ant-142 respectivamente. Las muestras se resolvieron en un gel de Tris Glicina al 8 %.

Dado el comportamiento peculiar de Ant-255 con respecto al de Ant y Ant-142, nos planteamos dos cuestiones; a) ¿Ant-255 se une con mayor afinidad al ADN del segmento intergénico *cI-cro* o al ARNm resultante de la expresión de este segundo gen? y b) su unión al ARNm ¿podría estar condicionada por la presencia de CI o de Cro? Para responder a estas preguntas llevamos a cabo el experimento de retardo en gel que se muestra en la figura 30. Se deduce del mismo que la afinidad de Ant-255 por el segmento de ADN es mayor que por el ARN, dado que su incubación con la mezcla de los dos inhibe totalmente el retardo del transcrito (calles 6 – 9). También se deduce que ni CI ni Cro afectan a la unión de Ant-255 al ARN, ya que los patrones de retardo son semejantes en todos los casos (comparación del resultado de las calles 2 a 6 con los de los carriles 11 – 14 y 16 – 19 respectivamente). Por último, se observa que ni CI ni Cro tienen afinidad por la molécula de ARN (calles 10 y 15 respectivamente).

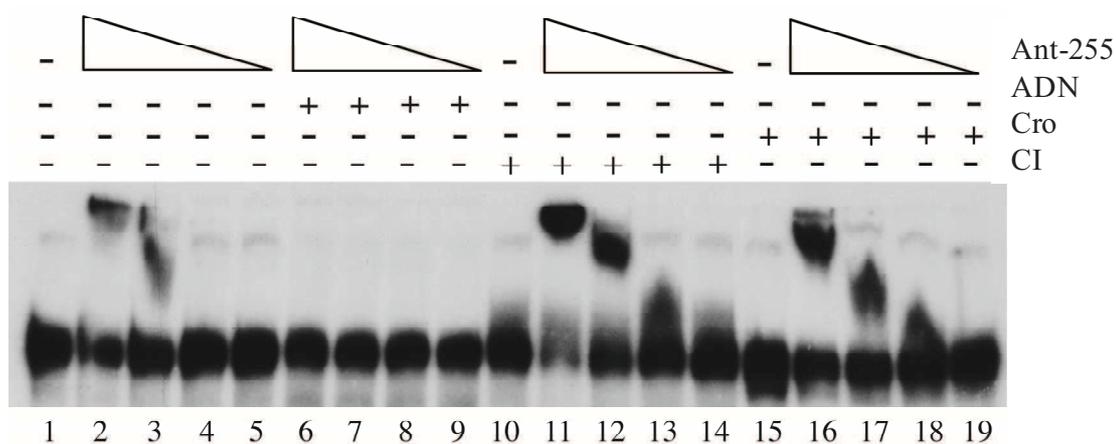


Figura 39.- Efecto del segmento intergénico *ci-cro* (ADN) y de los represores CI y Cro sobre la unión de Ant-255 al ARN de 250 nucleótidos correspondiente a la transcripción de *cro*. El ARN se incubó con Ant-255 durante 10 min antes de añadir el ADN, CI o Cro respectivamente. Calle 1: ARN libre; calles 2 a 5 ARN con 400, 200, 100 y 50 nM de Ant-255; calles 6 a 9, ARN con 400, 200, 100 y 50 nM de Ant-255 donde se añadió ADN de la región operadora como competidor; calles 10 y 15, ARN más CI y Cro (200 nM) respectivamente; calles 11 a 14, ARN con 400, 200, 100 y 50 nM de Ant-255 y 200 nM de CI: calles 16 a 19, ARN con 400, 200, 100 y 50 nM de Ant-255 y 200 nM de Cro.

5. Discusión

La organización general del interruptor genético del bacteriófago A2 ha sido previamente caracterizada (Ladero y col., 1998) y resultó ser similar a la encontrada previamente en otros bacteriófagos como lambda o P22 (Johnson y col., 1981; Potete y Patshne, 1982) aunque en general más sencilla. En A2 no existe una región semejante a la denominada OL de lambda y, por tanto, no parece que la expresión génica temprana venga condicionada por la actividad de una proteína antiterminadora semejante a N. Por otro lado, el promotor P_L de A2, responsable de la síntesis de CI, es constitutivo, lo que lo diferencia de PRM de lambda que es inducible por CI y depende de la actividad previa de otro promotor, PE, situado aguas abajo de *cro* (Oppenheim y col., 2005). Los promotores de A2 implicados en la decisión lisis/lisogenia son divergentes, lo que es una estrategia común de la regulación de la transcripción en bacterias y en los fagos que las infectan (Beck y Warren, 1988) especialmente en el caso de que las proteínas que se originan actúen como moduladores de la expresión del promotor opuesto. P_L es el promotor del gen del represor *cI* y de *orf22*, mientras que P_R gobierna la expresión de *cro*, *ant* y el modulo de replicación del fago. En este trabajo hemos abordado tres objetivos con la intención de comprender mejor los parámetros que gobiernan que el fago siga un ciclo de desarrollo lítico o bien uno lisogénico. El primero de ellos era dilucidar si *cro* da lugar a dos proteínas durante su expresión en *L. casei*, de manera similar a lo que ocurre en *E. coli*, donde parte de los ribosomas sufren un deslizamiento a la pauta -1 y originan una proteína con 12 residuos menos que la canónica. Los otros dos pretendían desentrañar el papel de las proteínas Orf22 y Ant, cuyos genes forman una unidad transcripcional con *cI* y *cro* respectivamente y que, por ello, podrían modular la elección del ciclo de vida por parte del fago tras la infección.

5.1. TRADUCCIÓN DIFERENCIAL DEL GEN *cro* EN *Escherichia coli* Y *Lactobacillus casei*

El descubrimiento de que el gen *cro* daba lugar a dos polipéptidos debido al desplazamiento a la pauta -1 de parte de los ribosomas durante la traducción de su ARNm, nos hizo pensar que quizás dicho efecto tuviera un significado fisiológico durante el desarrollo intracelular del fago A2.

La interacción entre dos proteínas resultantes de la traducción de un solo gen, conducente a la modulación de un fenotipo, no está exenta de precedentes. Un ejemplo típico son las holinas de los fagos λ y A118 de *E. coli* y de *L. monocitogenes* respectivamente.

En el primer caso se generan dos proteínas, de 107 y 105 aminoácidos, debido a la presencia de dos tripletes de inicio en tándem, siendo la mayor un inhibidor de la polimerización de la menor y, por tanto, bloqueando la formación de poros a través de los cuales la lisina accede a la capa de peptidoglicano. (Graschopf & Blasi, 1999).

En el caso de A118, la proteína mayor es la holina, que es antagonizada por la menor, que tiene 13 aminoácidos menos. Al igual que ocurre con A2, el periodo de latencia de A118 es muy largo, lo que se postula que aumentaría el tamaño de la progenie. En el caso de A118 es debido a la interacción de las dos formas de la holina; así, la expresión del gen en una cepa de *E. coli* que alberga un profago de λ defectivo para su propia holina, hace que la lisis celular se retrase significativamente respecto a la inducida por el λ silvestre. Sin embargo, si se elimina la posibilidad de sintetizar la forma inhibitoria de la proteína mediante una mutación de su triplete de inicio, el periodo de latencia del mutante hol⁻ de λ se acorta hasta valores semejantes a los del fago λ silvestre (Vukov y col., 2003).

Por otra parte, sabíamos que las dos formas de Cro, sintetizadas a partir de la sobreexpresión del gen, poseían la capacidad de unirse al segmento intergénico *cl-cro*, siendo la constante aparente de equilibrio, 6 nM y 25 nM, para la forma canónica y la truncada respectivamente. Sabíamos, además, que solo la primera oligomerizaba sobre el ADN.

Con todos estos datos formulamos la hipótesis de que posiblemente ambas proteínas Cro rivalizarían por los operadores que solapan con P_L, de manera que a las bajas concentraciones que existen al inicio de la infección/inducción del ciclo lítico, habría competencia entre ellas. De esta manera, la forma truncada unida al ADN estorbaría al establecimiento de la canónica y a su oligomerización, bloqueando su efecto represor y permitiendo la síntesis del represor CI. Al aumentar la concentración, la Cro canónica desplazaría a la otra de los operadores debido a su mayor afinidad por ellos, lo que resultaría en la represión efectiva de P_L. El efecto final de estas interacciones sería doble; por un lado, provocaría un aumento del porcentaje de fagos que irían hacia el ciclo lisogénico, lo que contrarrestaría la mayor potencia del promotor P_R respecto a P_L e impediría que el fago se

comportase funcionalmente como virulento. Por otra parte, aumentaría la duración del periodo de latencia de aquellos fagos que siguieran el ciclo lítico, lo que podría explicar, al menos en parte, la extraordinaria duración de dicho periodo en el fago A2.

Para nuestra sorpresa, los extractos de cultivos de *L. casei* infectados o los de lisógenos inducidos, únicamente mostraban la forma canónica de Cro, tras revelado con anticuerpos policlonales generados contra las dos formas de la proteína (figura 9) Esto podía significar dos cosas, no hay desplazamiento a la pauta -1 en *L. casei* o bien, la proporción de ribosomas que la sufren es tan baja que no se detecta por unión de anticuerpos.

Para diferenciar entre las dos posibilidades, vamos a analizar las características de los elementos necesarios para que el desplazamiento tenga lugar: la secuencia deslizante y la estructura secundaria que aparece inmediatamente detrás de ella en el ARNm. La secuencia deslizante de *cro* (U UUU UUU) cumple el requisito de composición X XXY YYZ en la pauta original, en la que X puede ser cualquier nucleótido, Y ha de ser A o U y Z es A, U o C (Hammel y col, 1999) (la restricción viene motivada porque la presencia de los codones CCC o GGG en las posiciones YYY estabiliza demasiado la unión al anticodón del ARNt y reduce drásticamente la frecuencia del cambio de pauta). Sin embargo, la energía libre de la estructura secundaria de *cro* es de tan solo -9 Kcal/mol; es decir, es muy inestable y probablemente no puede detener a los ribosomas, que es el requisito previo a su retroceso a la pauta -1. A modo de ejemplo, podemos citar que las correspondientes a los genes codificantes de las proteínas mayoritarias de cabeza y cola de A2, en que si se detecta el desplazamiento de pauta, son de -16,2 y de -31,9 Kcal/mol (García y col, 2004; Rodríguez y col, 2005).

Ahora bien, como ya dijimos, la baja energía libre de la estructura secundaria podría ser compatible tanto con una eliminación total de la posibilidad de generar el cambio de pauta o con una incidencia tan baja que no fuera detectable con los anticuerpos anti Cro. Esta última no es una posibilidad teórica, ni tampoco podemos decir que una baja proporción de la proteína resultante de la “recodificación” signifique que ésta no sea esencial. Por ejemplo, en el fago λ se generan dos productos gpG y gpG-T como consecuencia del deslizamiento de los ribosomas a la pauta -1 al final del gen *G*. De ellas, la primera representa el 96,5% del total, mientras que la segunda es solo el 3,5% restante. A pesar de ello, ambas son absolutamente

esenciales para el ensamblaje de la cola, a pesar de que ninguna aparece en la partícula final (Levin y col, 1993; Xu y col., 2004).

Para diferenciar entre las dos posibilidades, no síntesis/concentración escasa de la forma “no canónica” de Cro, introdujimos una mutación silenciosa en la secuencia deslizante, de manera que ya no fuera posible el desplazamiento ribosomal a la pauta -1; se provocó la sustitución del alelo silvestre de *cro* por el mutado en un profago y se compararon las progenies generadas tras la inducción de ambos tipos de lisógenos. No se encontró ninguna diferencia significativa en cuanto al tiempo de generación de la progenie, al tamaño de explosión o a la capacidad de los fagos resultantes de infectar cultivos susceptibles. La falta de cualquier consecuencia fenotípica, unida a la detección exclusiva de la forma canónica de Cro, indica que durante el desarrollo intracelular de A2 en *L. casei*, no se produce desplazamiento de pauta durante la traducción del gen *cro*.

Ahora bien, ¿por qué ocurre en *E. coli*? A fin de cuentas los elementos del cambio de pauta son los mismos en ambas bacterias. La razón podría ser doble nuevamente; por un lado, pudiera ocurrir que las condiciones fisicoquímicas del citoplasma de la bacteria Gram negativa, mucho menos rico en solutos que el de las Gram positivas, permitiera el mantenimiento de la estructura secundaria a pesar de su baja energía libre; por otra parte, hemos de tener en cuenta que el gen *cro* está bajo el promotor P10, que es el más fuerte de los del fago T7 y que la traducción se hace en presencia de rifampicina, que inhibe la síntesis de todas las demás proteínas celulares. En estas condiciones, probablemente se producirá una disminución progresiva de la concentración de los ARNt cargados, de manera que los ribosomas se detendrán a la espera de la entrada del correspondiente al codón localizado en su sitio A. Si esto sucede cuando el ribosoma está sobre la secuencia deslizante, se facilitará su paso a la pauta -1; ambas posibilidades son, en principio, compatibles, de modo que el efecto puede ser aditivo e incluso sinérgico. De todas maneras, la generación de las dos formas de Cro en *E. coli* no tiene ninguna trascendencia respecto al desarrollo intracelular de A2 en *L. casei*, aunque nos fué muy útil, en su momento, para definir los dominios funcionales de Cro; por ello, no se profundizó más en esta línea de trabajo.

5.2. *orf22*: UN DETERMINANTE EN BUSCA DE FUNCIÓN

La actividad del producto resultante de la expresión del determinante *orf22* de A2, localizado inmediatamente a continuación del gen del represor *cI*, permanece hasta la fecha desconocida, ya que su sobreproducción en trans no induce diferencias en el tamaño o tiempo de aparición de la progenie viral con respecto a los valores encontrados en los cultivos control. En todo caso, sabemos que el gen se expresa coordinadamente con *cI*; así, en experimentos de tipo Northern, llevados a cabo con el fin de analizar el patrón de transcripción de *cI* a partir del promotor P_L, se observaban dos transcritos de 0,8 y 1,4 Kb (Ladero y col., 1998). A partir del primero de ellos se obtendría CI, mientras que el segundo correspondería al producto de la transcripción conjunta de *cI* y *orf22*. De acuerdo con ello, se ha encontrado que entre ambas pautas de lectura existe una repetición invertida seguida de varias timidinas que podría actuar como un terminador de la transcripción independiente de rho, que no sería lo bastante eficiente como para detener la transcripción completamente. Esta táctica, por la que a partir del mismo promotor se originan varias proteínas de forma coordinada pero variando las proporciones de cada una de ellas, es un mecanismo habitual de adaptación de la expresión génica a las necesidades del organismo; por ejemplo, durante la síntesis de la lactococina 972, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, el gen estructural va seguido del de inmunidad y se transcriben conjuntamente; entre ambos hay un terminador que hace que el transcrito del primer gen sea mucho más abundante que el del segundo, lo que se corresponde con la necesidad de la célula de sintetizar mucha más bacteriocina, que será excretada al medio, que factor de inmunidad, que permanecerá en el citoplasma (Martinez y col., 1996).

La comparación de la secuencia deducida para Orf22 con la de proteínas de las bases de datos, muestra homología con los productos de genes localizados entre *cI* y *ant* de los fagos Lmr1 (Durmaz y col., 2008) y phiMH1 (Jang y col., 2010), que infectan a *Lactobacillus ramnhusus* y *Leuconostoc pseudomesenteroides* respectivamente. Ambos fagos presentan homología extensa con A2, lo que sugiere que todos ellos derivan de un antecesor común. Se ha observado también similitud con Orfs localizados en el genoma de cepas de bacterias lácticas pertenecientes a las especies *Lactobacillus zeae* (Kim y col., 2011) y *Oenococcus oeni* (Makarova y col., 2006) en las que, posiblemente, se corresponderían con genes de profagos integrados. Orf22 presenta también considerable homología (56% de identidad en 113 aminoácidos) con la mitad C-terminal de TcdC, la cual reprime la síntesis de las enterotoxinas

A y B de *Clostridium difficile* porque se une TcdR, un factor σ necesario para la transcripción del operón correspondiente (Matamouros y col., 2006; Dupuy y col., 2008). Dicha proteína presenta dos dominios NH₂ terminales transmembrana, al igual que le ocurre a Orf22, pero no la región intermedia rica en serina y aminoácidos cargados de esta última proteína (Govind y col., 2006).

La homología estructural y de secuencia apuntadas nos llevaron a formular la hipótesis de que Orf22 regularía la expresión de A2, posiblemente comportándose como un factor de transcripción que, por ejemplo, determinaría la entrada o no del fago en las fases tardías del ciclo lítico, de modo similar a como lo hacen las proteínas N y Q del fago lambda (Hendrix y Casjens, 2006), aunque, probablemente, por un mecanismo distinto, ya que estas proteínas se unen a ARN y ADN respectivamente (Roberts y col., 1998; Scharpf y col., 2000) y Orf22 no presenta motivos claros de unión a ácidos nucleicos.

Sin embargo, la falta de efecto fenotípico asociado a su sobreproducción, unida a la imposibilidad de obtenerla en forma soluble, limitaron drásticamente la posibilidad de confirmar o descartar la hipótesis; por ejemplo, midiendo su capacidad de unirse a CI, Cro, Ant, los ARNm tempranos o el propio ADN correspondiente al interruptor genético.

Sin embargo, hay un experimento adicional, aún pendiente, que podría arrojar luz sobre la función de Orf22; dicho experimento incluiría la mutagénesis de *orf22* en un profago, de modo semejante a como hicimos con *cro*, seguida de la inducción del ciclo lítico, para determinar si se producía algún efecto sobre la progenie, aunque, en este caso, habría que excluir la aparición de efectos polares derivados de la inactivación del gen.

5.3. CARACTERÍSTICAS Y POSIBLE FUNCIÓN DE Ant

Como ya se comentó en la sección correspondiente de Resultados (4.2.1) al gen *ant* se le atribuyó función antirrepresora porque su producto se parece a una serie de proteínas de fagos atemperados de bacterias lácticas que presentan, además, posiciones similares en sus genomas y que, a su vez, exhiben homología, en su tercio final, con el antirrepresor del fago P1 de *E. coli* (Lobocka y col., 2004) aunque esta última proteína está localizada en una región de transcripción tardía. También se indicó que mientras que Ant de A2 posee 160 aminoácidos, el resto de antirrepresores de fagos de bacterias lácticas tienen alrededor de 250 residuos y que la diferencia estriba en una probable mutación que convirtió el triplete codificante para el

aminoácido 161 en uno de parada, ya que si se ignora éste, se generaría una proteína de tamaño y secuencia semejante a las de las otras. Paradójicamente, esto hace que Ant de A2 carezca del dominio Ant que da nombre al grupo y plantea interrogantes sobre cual puede ser la función real de esa familia de proteínas. Una primera pista sobre el papel que pudieran jugar podría estar en que todas ellas presentan homología con la familia de genes *bro* (baculovirus repeated ORFs) que aparecen en nucleopoliedrovirus, granulovirus y otros virus con ADN en cadena doble que infectan a insectos (Bideshi y col., 2003). El dominio N-terminal de las proteínas Bro está muy conservado y presenta un motivo de unión a ácidos nucleicos (BroN) localizado en una región de 80 residuos (Zemskov y col, 2000). La función de las proteínas Bro no está clara, aunque se las ha relacionado con la regulación de la transcripción viral y del hospedador y con la estructura de la cromatina (Zemskov y col, 2000, Kang y col., 1999, Iyer y col., 2002). A los homólogos de *bro* identificados en bacteriófagos, profagos y transposones (Bideshi y col., 2003), se les ha denominado *bro-1* (*bro-like*) para distinguirlos de los genes *bro* de baculovirus.

Para determinar cuál podría ser el papel de Ant en el desarrollo de A2 llevamos a cabo experimentos de infección y de inducción del fago e intentamos relacionar los resultados obtenidos con los datos de interacción, *in vitro*, de la proteína con otros factores involucrados en la decisión lisis-lisogenia. Como hemos referido, la sobre-expresión de *ant* provocaba un aumento muy significativo de la progenie viral aunque, tras la infección, ésta solo se apreciaba tras una incubación prolongada de los cultivos. Estos datos indican que Ant coadyuva a que los fagos sigan un ciclo lítico, lo que podría explicarse de diversas maneras, algunas de las cuales se enumeran a continuación:

- Ant degrada a CI.
- Ant se une a CI e impide su efecto represor sobre P_R.
- Ant se une a Cro y favorece su efecto represor sobre P_L.
- Ant se une al segmento intergénico *cI-cro* e impide el reconocimiento de los operadores O₁ y/o O₂ por CI o bien favorece la unión de Cro a O₃.
- Ant se une al ARNm de *cI* y bloquea su traducción, evitando la generación del represor del ciclo lítico.

- Ant se une al ARNm de *cro* y evita su degradación (aumenta su vida media) extendiendo así el periodo durante el que se sintetiza el represor del ciclo lisogénico.

La primera opción, Ant degrada a CI de manera semejante a como hace RecA durante la respuesta SOS, se eliminó al observar que su sobreproducción no provoca una eliminación acelerada de CI en los cultivos inducidos, tal como se observa tras el revelado de ambas proteínas con anticuerpos específicos (figura 20).

Complementariamente, hemos observado que la producción de Ant en trans no induce a los profagos residentes en los lisógenos (tabla 8).

La segunda opción, Ant se une a CI e impide que éste reprima al promotor del ciclo lítico, es el más utilizado por las proteínas en las que se ha evidenciado actividad antirrepresora. Así por ejemplo, este mecanismo actúa en los bacteriófagos Gifsy y 186 (Shearwin y col., 1998; Lemire y col., 2011) y también en P1, N15 y P22, aunque aquí la situación es algo más compleja: En los dos primero, la síntesis del antirepresor se modula por ARNs antisentido complementarios del ARNm que bloquean su traducción, (Ansen y col., 1980; Riedel y col., 1993; Ravin y col., 1999), mientras que en el caso de P22, además de estar la síntesis de Ant igualmente regulada por un ARN antisentido (*sar*), su promotor se encuentra bajo el control de los productos de los genes *arc* y *mnt* (Wu T y col., 2011). La unión de las diversas proteínas Ant-CI es reversible, por lo que la correlación de las concentraciones respectivas de los ligandos es la que va a provocar que los fagos sigan un ciclo u otro (Shearwin y col., 1998). Sin embargo, en el caso de A2 no pudimos observar la formación de heterooligómeros tras la coincubación de Ant y CI, ni siquiera en presencia de ácido subérico, que estabiliza uniones muy débiles, que podrían haberse eliminado durante la migración de las proteínas en SDS-PAGE (figura 24).

Cuando el experimento de formación de heterooligómeros se llevó a cabo con Cro y Ant, si que se observó una cierta interacción tras la incubación en presencia de ácido subérico, lo que confirma que es muy débil y, de hecho, no se detectó tras la tinción de las proteínas sino que hubo que recurrir a inmunodetección para ponerla de manifiesto. El hipotético papel del heterodímero sería favorecer la afinidad de Cro por el promotor P_L , lo que aumentaría la represión de los genes *cl* a *int* y justificaría, al menos en parte, el incremento de la progenie

observado cuando Ant se sobreexpresa. Sin embargo, la unión Cro-Ant parece demasiado débil como para ejercer un efecto significativo, especialmente cuando se sabe que la forma activa de Cro es un homodímero (Ladero y col., 1999) en el que la afinidad de sus componentes es mucho más elevada (figura 25).

La cuarta hipótesis era que Ant tuviera afinidad por el segmento intergénico *cI-cro* y que enmascarara a los operadores O_1 y O_2 , a los que se une con preferencia CI, dirigiendo así el desarrollo viral hacia el ciclo lítico. Esta hipótesis tiene a su favor el hecho de que en Ant existe un dominio Bro-I, que presenta un motivo de unión a ADN, como ya se indicó.

Los experimentos revelaron que el segmento intergénico y Ant forman un complejo que migra menos que el ADN aislado en los geles (figura 26) y que el retardo es específico; es decir, no ocurre tras la incubación de Ant con otros segmentos de ADN. Ahora bien, Ant puede coexistir en el segmento tanto con CI como con Cro (figuras 27 y 28) lo que va en contra de un efecto disuasorio para el establecimiento de CI sobre los operadores. Sorprendentemente, Ant-255 se une con mucha mayor afinidad al segmento intergénico, lo que sugiere que el tercio C-terminal de esta proteína, ausente en Ant, favorece la interacción. La razón de ello puede ser que el dominio Ant presenta afinidad por ADN, si bien esta no es tan evidente como la que exhibe el dominio Bro. En el extremo C terminal de Ant1 y Kil A (P1) y Roi (HK022) existe un dominio hélice-giro-hélice conservado en el que se piensa reside la capacidad de unirse a ADN. De hecho, una mutación puntual de ese dominio en la proteína Roi fago HK022 afectaba a la capacidad de unión a ADN de esta proteína (Clerget y col., 1996).

Por último sería posible que Ant se uniera a los transcritos generados por P_L y/o P_R . En el primer caso y dados los datos de incremento de progenie tras su sobreexpresión, el efecto debería ser para bloquear la síntesis de CI y de las demás proteínas implicadas en el establecimiento del ciclo lisogénico. Por otro lado, la unión al ARNm promovido por P_R tendría el objetivo directo de incrementar la producción de Cro y de las proteínas de replicación, que forman un operón e, indirectamente, la de los productos de los genes intermedios y tardíos que conducen a la generación de nuevos viriones.

Los resultados obtenidos indican que Ant tiene una cierta capacidad de unirse al ARNm de P_L , pero la concentración mínima necesaria para observar dicha unión es unas 10 veces (en términos molares) mayor que la que se precisa para detectar la formación de

complejos Ant-ARNm de P_R (compárense las figuras 29 y 30). En el fago A2 la síntesis de los ARNm tempranos es constitutiva y sabemos que P_R es más fuerte que P_L (García y col., 1999); por tanto, es probable que, tras la infección, Ant sea secuestrada por el ARNm de P_R debido a su mayor afinidad por él y a que se acumula más rápidamente y que, en términos reales, la unión al ARNm de P_L no llegue a materializarse nunca. Durante la inducción del ciclo lítico, solo se observa ARNm específico de P_L durante los primeros 20 minutos (Ladero y col., 1998) de manera que la posibilidad de unión con Ant está muy limitada, especialmente si tenemos en cuenta que el periodo temprano de desarrollo viral dura, al menos, una hora.

La unión de Ant al ARNm de P_R ocurre en la porción 5' no traducible del transcrito, lo que avala la hipótesis de la protección frente al ataque por las ARNasas celulares, que tienden a ser exonucleasas que degradan sus sustratos empezando por el extremo 5'. Además, el hecho de que la unión se produzca en el segmento no traducible evitaría la posible interferencia de Ant con los ribosomas durante la síntesis proteica.

En este punto es importante reseñar que Ant-255 no se une al extremo 5' del ARNm de P_R aislado, sino que éste ha de tener una longitud mínima que estaría en torno a los 250 nucleótidos. Esto implica que la porción C-terminal de Ant-255, ausente en Ant, modula la interacción con el ARNm y que para que ocurra, precisa probablemente del establecimiento de estructuras secundarias en el mismo. Este sería un mecanismo de discriminación respecto al resto de moléculas de ARN que se encuentran en la célula y podría articularse a través del motivo de unión a ácidos nucleicos presente en su dominio C-terminal (lo que, por otra parte, ayudaría a explicar la constancia de éste en todos los fagos de bacterias lácticas, con la excepción notable de A2). Ahora bien, el hecho de que la molécula de ARNm reconocible por Ant-255 deba de tener un tamaño mínimo, no contradice que la unión ocurra únicamente en su extremo 5', con lo que lo dicho para Ant respecto su papel en la prevención del ataque por ARNasas y la no interferencia con los ribosomas durante la traducción, podría ser igualmente válido para el complejo Ant-255 – ARNm de P_R.

Llegados a este punto, sería conveniente confrontar los datos de unión entre Ant y el ARNm de P_R con los obtenidos sobre la producción de progenie viral tras la sobreexpresión de Ant y ver si son compatibles con un efecto protector que alargue el periodo de síntesis de Cro. A este respecto, se ha de recordar que el incremento observado tras la infección se hace evidente mucho después de haberse iniciado, lo que indica que se trata de un proceso gradual

que es prácticamente indetectable tras los primeros ciclos de propagación. En contraste, tras la inducción la liberación de los viriones ocurre al mismo tiempo en los cultivos que sobreexpresan Ant y en los controles, aunque también se observa un gran incremento en el tamaño de explosión.

Casi inmediatamente después de la penetración del ADN viral en las células se establece una competencia entre los represores CI y Cro que va a determinar si el fago seguirá un ciclo lítico o bien uno lisogénico. Esto implica que sólo parte de las células darán lugar a una progenie y que, en las lisogénicas, se detendrá la síntesis de Cro (y de Ant) tras el bloqueo de P_R , debido a que los ARNm suelen tener vidas medias muy cortas. Ahora bien, si se sobreproduce Ant previamente a la infección, dicha proteína se unirá al ARNm de P_R y lo protegerá de la degradación. En estas circunstancias no importa que se anule la expresión de P_R , ya que el ARNm sintetizado al inicio de la infección seguirá traduciéndose y así, la concentración intracelular de Cro irá aumentando paulatinamente. Ha de tenerse en cuenta, además, que la unión de los represores CI y Cro a los operadores es reversible y depende de sus concentraciones relativas. Así pues, en las células lisogénicas control los tres operadores están ocupados por CI, porque no se sintetiza Cro. Pero en las células en que Ant protege al ARNm de P_R llegará un momento en que Cro desplace a CI de O_3 (recuérdese que tiene mucha mayor afinidad por él que CI) lo que provocará la represión de P_L y, con ella, la pérdida de la capacidad de autorregulación de su expresión. La situación a partir de ese momento sería la siguiente: síntesis de Cro, represión de la generación de CI y crecimiento/división celular; como consecuencia, la concentración de CI empezará a disminuir, lo que provocará que los operadores O_1 y O_2 , antes ocupados por CI, queden libres. Esto permitirá a la ARN polimerasa iniciar la transcripción a partir de P_R y, por tanto, la entrada del profago en el ciclo lítico. El proceso es paulatino porque la dilución de CI es consecuencia del aumento de volumen y de la división posterior de las células y explica el retraso en la observación del enorme aumento de la progenie que se produce en los cultivos que expresan *ant* en trans respecto a los controles.

En realidad, la entrada de las células en el ciclo lítico como consecuencia de la dilución de CI ocurre de manera natural en todos los cultivos lisogénicos, lo denominamos “inducción espontánea” y es responsable de que en los sobrenadantes siempre aparezcan fagos viables. Lo único que hacemos al sobreproducir Ant es convertir en general un proceso esporádico.

En los cultivos lisogénicos observamos que la inducción de los profagos de células que sobreexpresan *Ant* da lugar a progenies significativamente mayores que las de los cultivos control. Esto solo puede significar dos cosas: a) cada célula genera un número mucho alto de viriones y b) el número de células que originan progenie aumenta significativamente en los cultivos que expresan *ant* en trans. La primera hipótesis es poco probable; significaría que las células aumentan su tamaño de explosión por un factor de aproximadamente 100 y que, a pesar de ello, la lisis ocurriría al mismo tiempo que en los cultivos inducidos control. De hecho, la figura 18 es una ilustración dramática de que lo que ocurre no es eso, ya que los sedimentos de los cultivos inducidos control son mucho mayores que los de los que sobreexpresan *ant*, lo que indica claramente que el porcentaje de células lisadas en este segundo caso es mucho mayor. Esto implica que tras la inducción de los cultivos lisogénicos no todas las células van a dar lugar a una progenie, posiblemente porque en algunas la destrucción de CI por RecA no afecta a una proporción suficiente de moléculas, especialmente si consideramos que la disminución de la concentración intracelular de CI daría lugar, en primer lugar, a su liberación del operador O_3 , que es por el que tiene menor afinidad y que ello liberaría a P_L , lo que pondría en marcha la producción de nuevas moléculas del represor. Por tanto, sería perfectamente concebible una situación en la que se iniciara la expresión del promotor P_R como consecuencia de la liberación de los operadores O_1 y O_2 , pero que dicha expresión fuera reversible gracias a la síntesis de novo de CI. En condiciones normales, esta situación volvería a la célula al ciclo lisogénico porque los ARNm derivados de la expresión de P_R se inactivarían rápidamente y se limitaría así la producción de Cro, con lo que la represión de P_L no llegaría a materializarse. Ahora bien, en las células que sobreproducen *Ant* ocurriría una estabilización del ARNm de P_R y, con ello, la síntesis continuada de Cro, independientemente de que hubiera una represión posterior de dicho promotor por CI. Cro bloquearía O_3 , lo que apagaría a P_L y se detendría la síntesis de CI; con ello, la célula proseguiría el ciclo lítico, sumando su progenie a la del porcentaje de células que se lisan en los cultivos inducidos control (figura 40).

Por tanto, postulamos que *Ant*, a través de su unión al ARNm de P_R , provoca que una mayor proporción de las células de los cultivos infectados e inducidos sigan el ciclo lítico, actuando, por lo tanto, no como un antirrepresor de CI sino como un coadyuvante de Cro en su función de neutralizar el ciclo lisogénico. Ciertamente, los datos presentados y la

interpretación que hemos hecho de ellos requieren de un trabajo de investigación posterior racional y dedicado pero, al menos, los primeros pasos del camino a seguir ya están trazados.

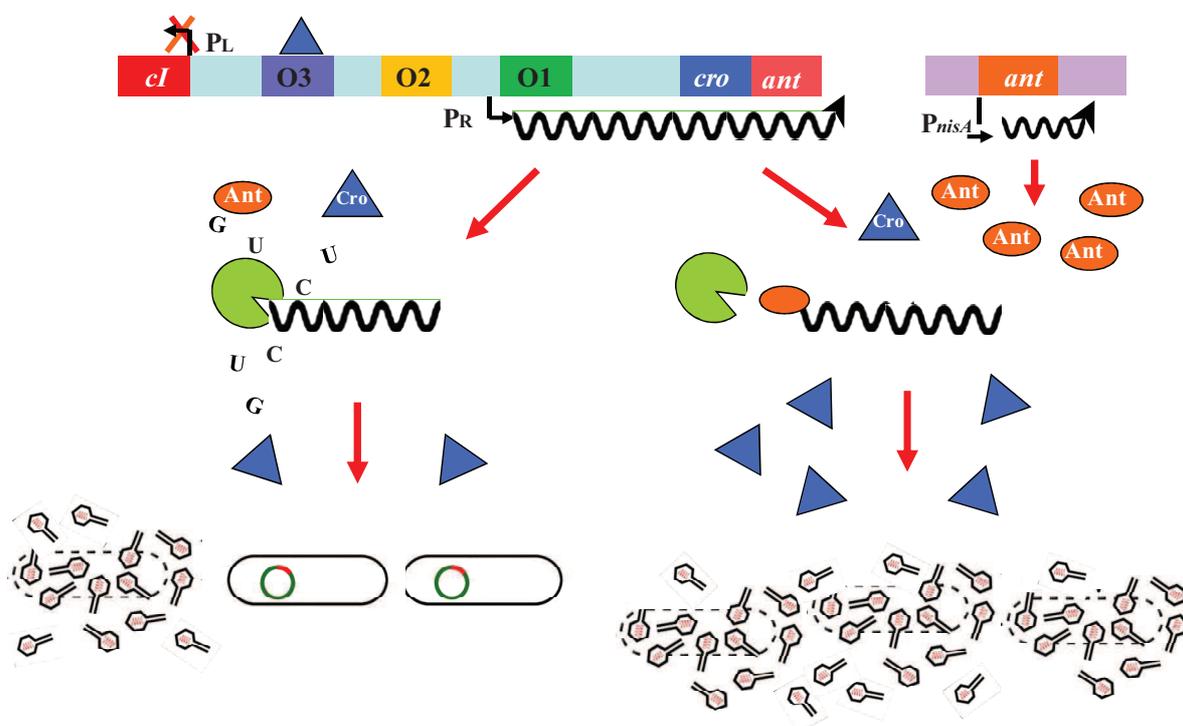


Figura 40.- Representación esquemática del efecto de la sobreexpresión de *ant* en trans sobre la progenie viral del fago A2. *ant* se une al extremo 5' del ARNm de P_R protegiéndolo de la actividad hidrolítica de las exonucleasas celulares. Como consecuencia de esta estabilización aumenta la generación de *Cro* y la posibilidad de que éste se una a *O3*, lo que resulta en una mayor efectividad de la represión de la transcripción a partir de P_L . El bloqueo más efectivo de la síntesis del represor *CI* hace que un número mayor de fagos infectantes/profagos sigan un ciclo lítico de desarrollo y conduce a un incremento de la progenie viral.

6. Conclusiones

1. La expresión del gen *cro* durante el desarrollo intracelular del bacteriofago A2, da lugar únicamente a la proteína canónica esperada. Esto contrasta con lo que ocurre tras su sobreexpresión en *Escherichia coli*, donde se genera un segundo polipéptido como consecuencia de un cambio a la pauta -1 de parte de los ribosomas.
2. La sobreexpresión de *orf22*, un gen que forma una unidad transcripcional con el correspondiente al del represor del ciclo lítico, no tiene ningún efecto fenotípico, en las condiciones utilizadas en este trabajo, sobre la infección por A2 o la inducción de los profagos presentes en las células lisogénicas de *L. casei*.
3. La sobreexpresión del gen *ant* previamente a la infección de *L. casei* por A2, provoca gran aumento en el tamaño de la progenie viral, que se hace evidente únicamente tras incubación prolongada de los cultivos. La inducción de los profagos en presencia de concentraciones elevadas de la proteína Ant también incrementa el tamaño de explosión del virus pero su detección es simultánea a la obtenida tras la inducción de los cultivos control.
4. La proteína Ant presenta un dominio Bro-1 (semejante a Bro) de unión a ácidos nucleicos y forma dímeros en solución, no siendo necesarios sus últimos 18 aminoácidos para la unión entre los monómeros. Probablemente dicho motivo Bro-1 es responsable de su elevada afinidad por el segmento 5' no traducible del ARNm de *cro*. También reconoce, aunque con menor afinidad, al ADN del interruptor genético que alberga a los promotores P_L y P_R. Sin embargo, no se une a los represores CI y Cro. Estos datos, unidos a los de incremento de la progenie enunciados en la conclusión anterior, sugieren que Ant favorece la acumulación del represor Cro, lo cual promovería, a su vez, la entrada del fago en el ciclo lítico.

5. La proteína Ant-255, producto de la mutagénesis del triplete stop del gen *ant* para generar uno codificante, presenta un dominio antirrepresor en su porción carboxi-terminal, se une al interruptor genético con mayor afinidad que Ant y es más selectiva que ella en su reconocimiento del ARNm del gen *cro*, ya que se adhiere únicamente a fragmentos que contengan, al menos, el extremo 5' y buena parte de la porción codificante del represor Cro. Sin embargo, la sobreexpresión del gen *ant-255* conduce a un aumento del tamaño de la progenie viral semejante al observado con la superproducción de la proteína Ant silvestre.

7. Bibliografía

- ✚ **Accolas J-P, Peigney C, Limsowtin GKY, Cluzel P-J, Sechaud L.** (1994). Control of bacteriophages in the dairy industry. In *Bacteries Lactiques* (de Roissart, H. and Luquet, F.M., Eds): 473-492. Loriga.

- ✚ **Ackermann H.-W.** (2006). Classification of Bacteriophages. p. 8-16. In R.Calendar and S.T.Abedon (eds.), (eds) *The Bacteriophages*. Oxford University Press, Oxford

- ✚ **Adams MH.** (1959). Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc.

- ✚ **Adey NB, Stemmer PC, Kay BK.** (1996). Preparation of second generation phage libraries. Phage display of peptides and proteins. Kay B. Winter J, McCafferty J (eds). Academic Press, San Diego: 280-291.

- ✚ **Alatossava T, Frosmann P, Mikkonen M, Raisanen L y Vasala A.** (1991). Molecular genetics and evolution of Lactobacillus phage LL-H. Finnish J. Dairy Sci. 49: 1-13.

- ✚ **Alatossava T, Frosmann P, Mikkonen M, Raisanen L y Vasala A.** (1998) Molecular genetics and evolution of Lactobacillus phage LL-H and it's relatives phages. Recent Res Devel. Agricultural. & Biological Chem. 2: 345-360.

- ✚ **Allison DG.** (1998). Exopolysaccharide production in bacterial biofilm. J. Biofilm 3: 1-19.

- ✚ **Altermann E, Klein JR, and Henrich B.** (1999). Primary structure and features of the genome of the *Lactobacillus gasserii* temperate bacteriophage (ϕ) adh. Gene 236: 333-346.

- ✚ **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3): 403-10.

- ✚ **Álvarez M.A, Herrero M, Suárez JE.** (1998). Site-specific integration of bacteriophage A2 and construction of integrative vectors for lactic acid bacteria. *Virology* 250: 185-193.

- ✚ **Álvarez, M. A., Rodríguez, A. y J. E. Suárez.** (1999). Stable expression of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 repressor blocks phage propagation during milk fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 86: 812-816.

- ✚ **Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF.** (2002). Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* 286:187–201.

- ✚ **Baranov PV, Gurvich OL, Fayet O, Prere MF, Miller WA, Gesteland RF, Atkins JF, Giddings MC.** (2001). RECODE: a database of frameshifting, bypassing and codon redefinition utilized for gene expression. *Nucleic Acids Res.* 29: 264–267.

- ✚ **Beck CF, Warren RA.** (1988). Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol. Rev.* 52: 318-326.

- ✚ **Bidishi DK, Renault S, Stasiak K, Federici BA, Bigot Y.** (2003). Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. *J. Gen. Virol.* 84 (9): 2531-44.

- ✚ **Biere AL, Citron M, Schuster H.** (1992). Transcriptional control via translational repression by c4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7. *Genes Dev.* 6(12A): 2409-16.

- ✚ **Birboim HC, Doly J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.

- ✚ **Bourgeois CM, Larpent JP.** (1995). *Microbiología Alimentaria Volumen I y II*. Zaragoza, Acribia. Ed. Acribia.

- ✚ **Bradford MM.** (1976), "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

- ✚ **Browning, DF, Busby SJW.** (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology* 2: 57-65.

- ✚ **Brussow H, Suárez JE** (2006). *Lactobacillus* phages. In R Calendar (ed). *The bacteriophages*. New York: 653-666.

- ✚ **Bruttin A, Desiere F, Lucchini S, Foley S, H Brüssow.** (1997). Characterization of the lysogeny DNA module from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage fSfi21. *Virology* 233: 136-148.

- ✚ **Bruttin A, H. Brüssow H.** (1996). Site-specific spontaneous deletions in three genome regions of a temperate *Streptococcus thermophilus* phage. *Virology* 219: 96-104.

- ✚ **Bullock WO, Fernandez JM, Short JM.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5 (4): 376-379.

- ✚ **Casdaban, M, Cohen S.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 138: 179 -207.

-
- ✚ **Caso JL, de los Reyes-Gavilán CG, Herrero M, Montilla A, Rodriguez A, Suárez JE.** (1995). Isolation and characterization of temperate and virulent bacteriophages of *Lactococcus plantarum*. *J. Dairy Sci.* 78: 741-750.
- ✚ **Chassy BM, Flickinger JL.** (1987). Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 44:173-177.
- ✚ **Chibani-Chennoufi S, Dillmann L, Marvin-Guy L, Rami-Shojaei S y Brussow H** (2004). *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family *Myoviridae*. *J. Bacteriol.* 186: 7069-7083.
- ✚ **Citron M, Schuster H.** (1992). Transcriptional control via translational repression by c4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7. *Nucleic Acids Res.* 20 (12): 3085-3090.
- ✚ **Coetzee JN, De Klerk H, Sacks TG.** (1960). Host-range of *Lactobacillus* bacteriophages. *Nature* 187: 348-9.
- ✚ **Collins MD, Rodrigues UM, Ash C, Aguirre, M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, Phillips BA, Williams AM, Walbanks S.** (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 5-12.
- ✚ **Dellagio F, de Roissart H, Torriani S, Curk MC, Janssens D.** (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En: de Roissart H, Luquet FM, editors. *Bactéries Lactiques*. Vol. I. Uriage: Loriga : 25-116.
- ✚ **Desiere F, Lucchini S, Canchaya C, Ventura M, Brussow H.** (2002) Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1-4): 73-91.

- ✚ **Desiere F, Mahanivong C, Hillier AJ, Chandry PS, Davidson BE, Brüssow H.** (2001). Comparative Genomics of Lactococcal Phages: Insight from the Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* Phage BK5-T. *Virology.*: 240–252
- ✚ **Desmazeaud MJ, Roissart H.** (1994) Métabolisme general des bactéries lactiques. En dr Roissart H. Luquet Fm. (ed). *Bacteries Lactiques*, vol. i. Uriage . Lorica : 169-207.
- ✚ **Dove, C. H., Wang, S. Z., Price, S. B., Phelps, C. J., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D. y J. L. Johnson.** (1990). Molecular characterization of the *Clostridium difficile* toxin A gene. *Infect. Immun.* 58 (2): 480-488.
- ✚ **Dower WJ., Miller JF, Ragsdale CW.** (1988). High efficiency transformation of *Escherichia coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16: 6127-6145.
- ✚ **Duplessis M, Moineau S.** (2001). Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Molecular Microbiol.* 41 (2): 325-336.
- ✚ **Dupont, I., Boizet – Bonhoure, B., Coddville, M., Auvray, F. y P. Ritzenthaler.** (1995). Characterization of genetic elements required for site – specific integration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bacteriophage mv4 and construction of an integration-proficient vector for *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 177: 586-595.
- ✚ **Dupuy B, Govind R, Antunes A, Matamouros S.** (2008). *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol.* 57(6):685-9. Review.
- ✚ **Durmaz E, Miller M. Azcarate-Peril AM, Toon SP, Klaenhammer TR.** (2008.) Genome Sequence and Characteristics of Lrm1, a Prophage from Industrial *Lactobacillus rhamnosus* Strain M. *Appl Environ Microbiol.* 74 (15): 4601–4609. *Enzymol.* 185: 60-89.

-
- ✚ **Fogg CPM, Rigden DJ, Saunders JR, McCarthy AJ, Allison HE.** (2011). Nucleic Acids Research 39(6): 2116-2129.

 - ✚ **Forsman P, Alatosava T.** (1991) Genetic variation of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* bacteriophages isolated from cheese processing plant in Finland. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1805-1812.

 - ✚ **García P, Alonso JC, y Suárez JE.** (1997). Molecular characterization of the *cos* región of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. Gene product 3, gp3, specifically binds to its downstream *cos* region. Mol. Microbiol. 23: 505-514.

 - ✚ **García P, Ladero V, Alonso JC, and Suárez JE.** (1999). Cooperative interaction of CI protein regulates lysogeny of *Lactobacillus casei* by bacteriophage A2. J. Virol. 73: 3920-3929.

 - ✚ **García P, Ladero V, Suarez JE.** (2003). Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. Arch. Virol. 148: 1051-1070.

 - ✚ **García P, Rodriguez I, and Suarez JE.** (2004). A -1 ribosomal frameshift in the transcript that encodes the major head protein of bacteriophage A2 mediates biosynthesis of a second essential component of the capsid. J. Bacteriol. 186: 1714-1719.

 - ✚ **Gasser F, Montel MC, Talon R, Champomier M.** (1994). Aplicacion de la taxonomic moleculaire a la classification des bacteries lactiques. En Bacteries lactiques. Roissart H. y F. M .Luquet (Eds) Vol I : 117-139.

 - ✚ **Graschopf A, Bläsi U.** (1999). Molecular function of the dual-start motif in the λ S holin. Mol. Microbiol 33: 569–582.

-
- ✚ **Hammell AB, Taylor RC, Peltz SW, Dinman JD.** (1999). Identification of putative programmed -1 ribosomal frameshift signals in large DNA databases. *Genome Res.* 9(5):417-27.
- ✚ **Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, Mercenier A, Daniel C, Fioramonti J, Tlaskolova H, Kozakova H, Israelsen H, Madsen S, Vrang A, Hols P, Delcour J, Bron P, Kleerebezem M, Wells J.** (2004). Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol.* 56:1-64.
- ✚ **Herero M. de los Reyes-Gavilan CG, Caso JL y Suarez JE.** (1994.) Characterization of 393-A2, a bacteriophage that infects *Lactobacillus casei*. *Microbiol.* 140: 2585-2590.
- ✚ **Iyer LM, Koonin EV, Aravind L.** (2002). Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors. *Genome Biol.* 3(3):RESEARCH0012.1-11
- ✚ **Janion C.** (2008). Inducible *SOS* Response System of DNA Repair and Mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* 4:338.
- ✚ **Johnson A D, Potete A.R, Lauer G, Sauer R T, Ackers G K, Ptashne M.** (1981). λ repressor and Cro components of an efficient molecular switch. *Nature* 294: 217-223.
- ✚ **Kandler O.** (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.
- ✚ **Kang W, Suzuki M, Zemskov E, Okano K, Maeda S.** (1999). Characterization of Baculovirus Repeated Open Reading Frames (*bro*) in *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* 73 (12) 10339-10345.

-
- ✚ **Kilic AO, Pavlova SI, Alpay S, Kilic SS, Tao L.** (2001). Comparative study of vaginal *Lactobacillus* phages isolated from women in the United States and Turkey: prevalence, morphology, host range, and DNA homology. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 31-39.
- ✚ **Kim DW, Choi SH, Kang A, Nam SH, Kim DS, Kim RN, Aeri Kim A, HS.** (2011) Draft Genome Sequence of *Lactobacillus zeae* KCTC 3804. *J. Bacteriol.* 193 (18): 5023
- ✚ **Klaenhammer TR.** (1984). Interactions of bacteriophages with lactic streptococci. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 1-29.
- ✚ **Kodaira KI, Oki M, Kakikawa M, Watanabe N, Hirakawa M, Yamada K y Taketo A** (1997) Genome structure of the *Lactobacillus* atemperate phage Φ gle: The whole genome sequence and the putative promoter/repressor system. *Gene* 187: 45-53.
- ✚ **Kopeloff N.** (1936.) Dissociation and filtration of *Lactobacillus acidophilus*. *J Infect Dis* 55: 368-379.
- ✚ **Kruipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PGGA, Luesink EJ, deVos W.** (1995). Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J. Biol. Chem.* 270: 27299-27304.
- ✚ **Ladero V, García P, Bascara V., Herrero M, Alvarez M, Suarez JE.** (1998). Identification of the repressor-encoding gene of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. *J. of Bacteriol.* 180, 3474-3476.
- ✚ **Ladero V., García P, Alonso JC, Suárez J.** (1999). A2 Cro, the lysogenic cycle repressor, specifically binds to the genetic switch region of *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Virology*. 262: 220-229.

-
- ✚ **Ladero V, García P, Alonso JC, Suárez JE.** (2002). Interaction of the Cro repressor with the lysis/lysogeny switch of the *Lactobacillus casei* temperate bacteriophage A2. *J. Gen. Virol.* 83(11): 2891-2895
- ✚ **Lee FKN, Dudas KC, Hanson JA, Nelson MB, LoVerde PT, Apicella MA.** (1999). The R – type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* C is a bacteriophage tail – like particle that contains single – stranded DNA. *Infect. Immun.* 67: 717-725.
- ✚ **Leenhouts K, Kok J, Venema G.** (1990). Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactobacillus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2726-2735.
- ✚ **Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L.** (2011). Bacteriophage Crosstalk: Coordination of Prophage Induction by Trans-Acting Antirepressors. *PLoS Genet* 7(6): e1002149.
- ✚ **Levin ME, Hendrix RW, Casjens SR.** (1993). A programmed translational frameshift is required for the synthesis of a bacteriophage lambda tail assembly protein. *J. Mol. Biol.* 5; 234 (1): 124-39.
- ✚ **Lillehaug D, Lindquist BH, Birkeland NK.** (1991). Characterization of fLC3, a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* temperate bacteriophage with cohesive single – stranded DNA ends. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3206-3211.
- ✚ **Lo T, Shih T, Lin C, Chen Hy Lin T.** (2005). Complete genomic sequence of the temperate bacteriophage Phi AT3 isolated from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Virology* 339, 42-45.
- ✚ **Lobocka MB, Rose DJ, Plunkett III G, Rusin M, Samojedny A, Lehnerr H, Yarmolinsky MB, Blattner FR.** (2004). Genome of Bacteriophage P1. *J. Bacteriol.* 186 (21): 7032-7068.
- ✚ **Lu Z, Breidt F Jr, Fleming, HP, Altermann E y Klaenhammer.** (2005). Sequence analysis of the *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, Phi JL-1. *Gene* 348: 45-54.

- ✚ **Madera C, Monjardin C, Suarez JE.** (2004). Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (12): 7365-71.

- ✚ **Martín MC, Alonso JC, Suarez JE, Alvarez MA.** (2000). Generation of food-grade recombinant lactic acid bacterium strains by site-specific recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2599-2604.

- ✚ **Martín MC, Fernandez M, Martín-Alonso JM., Parra F, Boga JA., Alvarez MA.**(2004). Nisin-controlled expression of Norwalk virus VP60 protein in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters* 237, 385-391.

- ✚ **Martín R, Soberón N, Vanechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Suárez JE.** (2008). Evaluation of newly isolated human vaginal lactobacilli and selection of probiotic candidates. *Int. Microbiol.* 11: 261-266.

- ✚ **Martinez, B; Fernandez, M; Suarez, JE; Rodriguez, A** (1999). Synthesis of lactococcin 972, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* IPLA 972, depends on the expression of a plasmid encoded bicistronic operon *Microbiology* 145: 3155–3161

- ✚ **Mata M, Trautwetter A, Luthaud G, Ritzenthaler P.** (1986). Thirteen Virulent and Temperate Bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus lactis* Belong to a Single DNA Homology Group *Appl Environ Microbiol.* 52 (4): 812–818.

- ✚ **Matamouros S, England P, Dupuy B.** (2007). *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol.* 64 (5): 1274-88.

- ✚ **Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C.** (2000) Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mo.l Biol.* 2(1):17-25. Review.

- ✚ **Meyers JA., Sánchez D, Elwell LP, Falkow S.** (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid desoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529-1537.

- ✚ **Mills DA, Rawsthorne H, Parker C, Tamir D, Makarova K.** (2005). Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking. *MS Microbiol Rev.* (3) : 465-75.

- ✚ **Moineau S., Borkaev M, Holler BJ, Walker SA, Kondo JK, Vedamuthu ER, Vandenberg PA.** (1996). Isolation and characterization of lactococcal phages from U.S. buttermilk plants. *J. Dairy Sci.* 79: 2104-2111.

- ✚ **Mollet B.** (1995). Genetically improved starter strains: opportunities for the dairy industry. *Int. Dairy J.* 9: 11-15.

- ✚ **Moscoso M, Suárez JE.** (2000). Characterization of the DNA replication module of bacteriophage A2 and use of its origin of replication as a defense against infection during milk fermentation by *Lactobacillus casei*.

- ✚ **Nauta A, van Sideren D, Karsens H, Smit E, Venema G, Kok J.** (1996). Inducible gene expression mediated by a repressor – operator system isolated from *Lactococcus lactis* bacteriophage r1t. *Mol. Microbiol.* 19: 1331-1341.

- ✚ **Navarro-Avilés G, Jiménez MA, Pérez-Marín MC, González C, Rico M, Murillo FJ, Elías-Arnanz M, Padmanabhan S.** (2007) Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Mol Microbiol.* 63(4): 980-94.

- ✚ **Nes IG, Brendehaug J, von Husby KO.** (1988). Characterization of the bacteriophage B2 of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Biochem.* 70: 423-427.

-
- ✚ **Neve H, Zenz KI, Desiere F, Koch A, Heller KJ, Brussow H.** (1998). Comparison of the lysogeny modules from the temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophages TP- J34 and ϕ Sfi21: implications for the modular theory of phage evolution. *Virology*. 241: 61-72.
- ✚ **Ogawa, T., Ogawa, H. y J. Tomizawa.** (1988). Organization of the early region of bacteriophage Φ 80. *Genes and proteins*. *J. Mol. Biol.* 202: 537-550.
- ✚ **Oppenheim AB, Kobilier O, Joel Stavans J, Court DL, Adhya S.** (2005). Switches in bacteriophage lambda development. *Annual Review of Genetics* 39: 409-429.
- ✚ **Oppenheim AB, Neubauer Z, Calef E.** (1970.) The Antirepressor: a New Element in the Regulation of Protein Synthesis. *Nature* 226: 31 –32.
- ✚ **Pavan S, Delcour J, Geoffro, M-C, Grangette C, Kleerebezen M, Mercenier,ç A.** (2000). Adaptation of the nisin-controlled expression system in *Lactobacillus plantarum*: a tool to study in vivo biological effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4132-4135.
- ✚ **Poteete A R, Ptashne M.** (1982). Control of transcription by the bacteriophage P22 repressor. *J. Mol. Biol.* 157: 21-48.
- ✚ **Ravin N, Svarchevsky . & Deho G.** (1999). The antiimmunity system of phage-plasmid N15: identification of the antirepressor gene and its control by a small processed RNA. *Mol. Microbiol.* 34: 980-994.
- ✚ **Reid G, Burton J.** (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes. Infect.* 4: 319-24.
- ✚ **Reuter MA, Hanniffy S, Wells JM.** (2003). Expression and delivery of heterologous antigens using lactic acid bacteria. *Methods Mol. Med.* 87: 101-14.

- ✚ **Ribelles P, Rodríguez I, Suárez JE.** (2012). LysA2, the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2 lysin is an endopeptidase active on a wide spectrum of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94 (1): 101-10.

- ✚ **Riedel H D, Heinrich J, Schuster H.** (1993). Cloning, expression, and characterization of the *icd* gene in the *immI* operon of bacteriophage P1. *J Bacteriol.* 175 (10): 2833–2838.

- ✚ **Rodríguez I, García P, Suárez JE.** (2005). A Second Case of –1 Ribosomal Frameshifting Affecting a Major Virion Protein of the *Lactobacillus* Bacteriophage A2 *J. Bacteriol.* 187 (23): 8201-8204.

- ✚ **Roissart H, Luquet FM.** (1994) (ed), *Bactéries Lactiques*, vol. I. Uriage: Lorica: 169-207.

- ✚ **Rojo F.** (2001). Mechanisms of transcriptional repression. *Curr Opin Microbiol.* (2): 145-51.

- ✚ **Sambrook, J, Fritsch EF, Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- ✚ **Santos F, Wegkman A, de Vos WM, Smid EJ, Hugenholtz J.** (2008). High-level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112. *Appl. Environ.l Microbiol.* 74 (10): 3291-3294.

- ✚ **Sauer RT, Andreg R.** (1978). Primary structure of the λ repressor. *Biochemistry* 17: 1092-1100.

- ✚ **Schärf M, Sticht H, Schweimer K, Boehm M, Hoffmann S, Rösch P.** (2000). Antitermination in bacteriophage lambda. The structure of the N36 peptide-boxB RNA complex. *Eur J Biochem.* 267 (8): 2397-408.

- ✚ **Schleifer KH, Ehrmann M, Beimfohr C, Brockmann E, Ludwig W, Amann R.** (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Dairy Res.* 5: 1081-1094.

- ✚ **Shearwin KE, Brumby AM, Egan JB.** (1998). The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J. Biol. Chem.* 273: 5708–5715.

- ✚ **Stackebrant E, Teuber M.** (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochemie* 70: 314-324.

- ✚ **Steidler L.** (2002). In situ delivery of cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82 (1-4): 323-31. Review.

- ✚ **Strauch E, Hammerl JA, Konietzny A, Schneiker-Bekel S, Arnold W, Goesmann, Puhler A, Beutin L.** (2008). Bacteriophage 2851 is a prototype phage for dissemination of the Shiga toxin variant gene 2c in *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 76 (12): 5466-77.

- ✚ **Studier FW, Moffatt BA.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130

- ✚ **Studier FW, Rosenberg AH., Dunn JJ, Dubendorff JW.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.

- ✚ **Susskind MM.** (1980). A new gene of bacteriophage P22 which regulates synthesis of antirepressor. *J Mol Biol.* 138 (4): 685-713.

- ✚ **Sybesma W, Starrenburg M, Kleerebezem M, Mierau I, de Vos WM, Hugenholtz J.** (2003). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* 69 (6): 3069-76.

- ✚ **Tuohimaa K-A Riipinen, Brandt K, Alatossava T.** (2006). The genome of the virulent phage Lc-Nu of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, and comparative genomics with *Lactobacillus casei* phages. *Arch. Virol.*: 151 (5): 947-965

- ✚ **Venema G, Huis in't Veld JHL, Hugenholtz J.** (1996) (ed.). *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- ✚ **Villion M, Moineau S.** (2009). Bacteriophages of *Lactobacillus*. *Frontiers in Bioscience.* 14: 1642-1660.

- ✚ **Vukov N, Moll, Bläsi U, Scherer S, Loessner MJ.** (2003). Functional regulation of the *Listeria monocytogenes* bacteriophage A118 holin by an intragenic inhibitor lacking the first transmembrane domain. *Mol. Microbiol.* 48: 173-186.

- ✚ **Welman AD, Maddox IS.** (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* 21 (6):269-74. Review.

- ✚ **Xu J, Hendrix RW, Duda RL.** (2004). Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes. *Mol Cell.* 8; 16 (1): 11-21.

- ✚ **Yakokura T, Kosaira S, Ishiwa H, Sakurai T** (1974) Lisogeny in *Lactobacilli*. *J Gen Microbiol* 84: 277-284.

- Yanisch – Perron C, Vieira J, Messing J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.

- ✚ **Young R., Wang IN.** (2006) Phage lysis. In *The Bacteriophages*. Calendar, R. (ed.). Oxford: Oxford University Press: 104–125.

- ✚ **Zemskov EA, Kang W, Maeda S.** (2000). Evidence for Nucleic Acid Binding Ability and Nucleosome Association of Bombyx mori Nucleopolyhedrovirus BRO Proteins. *J. Virol.* 74 (15): 6784-6789.