

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Ciencias Biomédicas



**Una nueva superfamilia de reguladores
transcripcionales controla el empaquetamiento y
la lisis de bacteriófagos de Gram-positivos**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Nuria Quiles Puchalt

Dirigida por: Dr. José R. Penadés Casanova

VALENCIA

2013

Este trabajo ha sido realizado gracias a las siguientes ayudas:

- BIO2008-05284-C02-02, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- CSD2009-00006, programa Consolider Ingenio, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- BIO201-30503-CA-01, Ministerio de Economía y Competitividad.

A la meua família

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento, después de más de seis años desde que empezara esta increíble locura, se acerca el final. Como en todas las etapas de la vida ha habido momentos buenos y mejores, malos y peores, pero en todos ellos me he sentido muy agradecida de por estar ahí para vivirlos. Ahora toca el momento de agradecer a todas esas personas que con su cariño y apoyo me han hecho seguir adelante.

En primer lugar debo agradecerle a mi director de Tesis, José Penadés, el haberme dado la oportunidad de empezar en el maravilloso mundo de la investigación. Me gustaría agradecerle su paciencia, esfuerzo y absoluta dedicación. Quiero darle las gracias por todo lo bueno que es mucho y también por lo malo porque me ha hecho más fuerte y espero que mejor persona. Pero sobre todo quiero darle las gracias por forzarme hasta el límite porque en esos momentos llegas a ver de lo que eres capaz.

Esta Tesis doctoral y sus frutos científicos no hubiesen existido sin el trabajo de mucha gente que me ha precedido. Gracias a Cucarella, Carles, María Pilar y Elisa porque sin ellos mucha parte de mi trabajo no existiría. Me gustaría darle las gracias especialmente a Geles, por su enorme trabajo, por ser maestra y consejera. Por enseñarme tan bien y soportar todas mis preguntas con paciencia. También quiero agradecerles su ayuda y todos los buenos ratos vividos en el laboratorio a David, Laura, Mariam y José (Blanquito). Con vosotros empecé a dar mis primeros pasitos, gracias por vuestro apoyo y cariño. Como voy a olvidarme de Miguel! Ha estado ahí para lo bueno y para lo malo, siempre con un oído disponible al que poder contarle mis penas. Quiero agradecerle a Nachete el haber estado siempre ahí, sobre todo por el apoyo y la compañía en los días en que salíamos a las mil porque con unas risas el trabajo se hacía más ameno. También quiero agradecerle su cariño y apoyo a Roser, sobre todo en esta última etapa.

A mis niñas, que os voy a decir. Habéis sido mi pilar, gracias por vuestro apoyo en los malos ratos, por vuestro cariño y por todos los buenos momentos pasados dentro y fuera del labo. Belén, mi querida compañera de bancada, gracias por todas tus preguntas y por confiar en mí, gracias por tu apoyo, cariño y por saber escucharme. María Comos, gracias por tus consejos y por enseñarme tanto y por compartir conmigo ese humor un poco "freak". María García, muchas gracias por tu amistad y el apoyo que me has dado. Sé que os voy a echar mucho de menos a mi

lado, pero esto no es un adiós es un hasta pronto. Quiero darle las gracias a Carmen, mi “primera becaria”. Muchas gracias Carmen por todo, por las risas, por ofrecerme tu amistad y por hacerme creer en mi misma. Gracias a Nuria C. por su cariño y a José F. por su entusiasmo contagioso. Gracias a la gente que sin ser del labo también me ha ayudado como Mocholí, Inma, Silvia, Marisa, Simón o Adela y en especial gracias a María Lizondo por todas las risas y porque con su trabajo ha hecho posible que el nuestro salga. Gracias a todos, gracias de corazón. Sin vosotros no hubiese sido tan divertido ir a trabajar todos los días.

Vull donar-li les gràcies a aquells amics que han estat ahí durant estos anys, en especial a Inma per ser la culpable de que ara jo estiga ací i perquè gràcies a això he descobert el que espere siga la meua professió. I sobretot a Cristina, pel seu suport incondicional, paciència i estima.

Voldria agrair a la meua família tot el suport i l’amor que m’han donat. Gràcies per tot l’afecte i les alegries que hem compartit. Gràcies al meu germà, JuanVi i a Siby per donar-me la vostra ajuda quan l’he necessitat. Gràcies als meus pares, Juan i Vicenta, per ser la meua referencia i la brúixola que em marca el camí a seguir. Moltes gràcies per tot el que heu fet i continueu fent per mí, per la vostra paciència i generositat. Vosaltres m’heu ensenyat que s’ha de donar sense esperar rés a camvi. Si a algú li pertany esta Tesis és a vosaltres. Per tot això i per més, gràcies de tot cor.

Índice



ÍNDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

<i>Staphylococcus aureus</i>	1
Bacteriófagos	2
Sistemas de regulación del empaquetamiento	11
Islas de patogenicidad de <i>S. aureus</i>	14

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

Objetivos	19
------------------------	----

CAPÍTULO III: RESULTADOS

I. RinA controla el módulo de morfogénesis y de lisis de fagos de bacterias Gram positivas	21
La delección de <i>rinA</i> elimina la producción de partículas de fago	23
RinA es un activador transcripcional del módulo de morfogénesis y de lisis	27
Identificación de un promotor inducible por RinA	28
RinA es suficiente para activar la expresión de <i>terS</i>	30
RinA se une al promotor de <i>terS</i>	34
Caracterización de la unidad transcripcional regulada por RinA	35
RinA no controla la expresión de la integrasa	38
Homólogos a RinA controlan el empaquetamiento de fagos de bacterias Gram positivas	39
II. Una superfamilia de reguladores transcripcionales controla el empaquetamiento y la lisis de bacteriófagos de Gram positivos	43
Identificación de posibles reguladores en diferentes fagos de bacterias Gram positivas	45
La delección de los genes <i>ltr</i> elimina la producción de partículas fágicas	50

Las proteínas Ltr son activadores transcripcionales del módulo de morfogénesis y lisis.....	52
Identificación de un promotor inducible por las proteínas Ltr aguas arriba de <i>terS</i>	55
Las proteínas Ltr son los únicos factores codificados por el fago necesarios para la expresión de <i>terS</i>	55
Especificidad y requerimientos mínimos para la unión de las proteínas Ltr.....	56
El extremo C-terminal controla la afinidad de las proteínas Ltr por las repeticiones presentes en la zona promotora.....	65
Las proteínas Ltr se unen específicamente a la región promotora de <i>terS</i>	67
Los represores cl codificados por los fagos controlan directamente la expresión de las proteínas Ltr.....	69
Caracterización de la unidad transcripcional regulada por LtrC	73
Homólogos de Ltr controlan la expresión de los genes tardíos en otros fagos de bacterias Gram positivas	75
III. Caracterización de las proteínas necesarias para el empaquetamiento y transferencia mediada por fagos de elementos genéticos móviles en bacterias Gram positivas.....	77
Identificación de la región mínima necesaria para el empaquetamiento y la lisis del fago $\phi 11$	79
Mutagénesis del módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$	81
Los mutantes del fago no muestran afectada ni la replicación del fago ni la de la isla	82
Los mutantes del fago tienen afectada la producción de partículas infectivas de fago e isla.....	83
Complementación de los mutantes del fago.....	87
Caracterización de los mutantes del fago $\phi 11$ que tienen afectada la formación de partículas transductantes.....	89
Caracterización de la ORF32 del fago $\phi 11$	91
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	
Caracterización de las proteínas Ltr una superfamilia de reguladores de la expresión tardía de bacteriófagos de Gram-positivos	97
Proteínas Ltr: activadores transcripcionales de la expresión génica.....	97

Significado biológico de los sistemas de regulación de la transcripción tardía.....	99
Análisis de los módulos de morfogénesis y lisis de fagos estafilocócicos	100
Caracterización de los módulos de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$	101
Las SaPIs compiten con los fagos por las proteínas de empaquetamiento codificadas por el fago.....	104
 CAPÍTULO V: MATERIAL Y MÉTODOS	
Metodología general	107
Bacterias, plásmidos y medios utilizados en estos estudios	107
Manipulaciones del DNA	107
Southern blot.....	108
Análisis computacional.....	108
Extracción de RNA y análisis por qRT-PCR.....	108
Cuantificación de la expresión de las ORFs del $\phi 11$, $\phi 55$ y $\phi iFL2A$	109
Identificación del sitio de inicio de la transcripción de <i>terS</i> mediante 5` RACE...	110
Electroforesis en geles de retardo.....	110
Purificación de proteínas.....	111
Métodos bioquímicos	111
Ensayo enzimático para la cuantificación de la actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional.....	111
Metodología utilizada en los estudios de inducción de SaPIs y fagos	112
Inducción de profagos	112
Titulación de fagos.....	113
Transducción	113
Precipitación de fagos.....	114
Microscopía electrónica.....	114
Extracción del DNA para el estudio de replicación de fagos y SaPIs	115
Metodología utilizada para la obtención de mutantes	115
Obtención de mutantes por delección.....	115

Tabla de cepas utilizadas en estos estudios	119
Tabla de plásmidos utilizados en estos estudios	129
Tabla de cebadores utilizados en estos estudios	135
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	147
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	
Bibliografía	149

Abreviaturas



ABREVIATURAS UTILIZADAS

ϕ	Fago
Δ	Delección
amp	Ampicilina
<i>att</i>	Sitio de integración
<i>att_B</i>	Sitio de integración en el cromosoma bacteriano
<i>att_L</i>	Sitio de integración izquierdo
<i>att_R</i>	Sitio de integración derecho
<i>bla</i>	Gen que codifica la β -lactamasa
bulk	DNA mayoritario (DNA genómico + fágico)
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
cDNA	DNA copia de RNAm
CsCl	Cloruro de cesio
DIG	Digooxigenina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
$\text{DO}_{(\text{nm})}$	Densidad óptica a una cierta longitud de onda (nm)
EDTA	Ácido etilediaminotetraacético
EGM	Elemento genético móvil
EMSA	Electroforesis en gel de retardo
<i>erm</i>	Gen que codifica resistencia a eritromicina
erm	Eritromicina
G	Gravedades
H	Hora
IP	Isla de patogenicidad
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kv	Kilovoltio
LB	Medio luria bertani
min	Minuto
ml	Mililitro
MC	Mitomicina C
mM	Milimolar
MW	Marcador de tamaño del DNA
nM	Nanomolar
nt	Nucleótido

ORF	Pauta abierta de lectura
<i>Ori</i>	Origen de replicación
PEG	Polietilenglicol
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Análisis cuantitativo y a tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
RT-qPCR	Transcripción reversa y PCR a tiempo real
SaPI	Isla de patogenicidad de <i>S. aureus</i>
SAGs	Superantígenos
<i>tetM</i>	Gen que codifica resistencia a tetraciclina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TSA	Medio tripticasa soja agar
TSB	Caldo tripticasa soja
U	Unidad
UFC	Unidades formadoras de colonia
uv	Ultravioleta
WT	Cepa salvaje (wild type)
Xgal	5-Bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido
μ g	Microgramo
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar

Capítulo I

Introducción

Staphylococcus aureus.

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, patógeno oportunista, que habita de forma natural la piel y las membranas mucosas de los mamíferos y aves. Su habilidad para persistir y multiplicarse en diferentes ambientes hace que ocasionalmente actúe como agente patógeno tanto en el hombre como en los animales domésticos. Esto es debido a que posee un gran número de factores de virulencia que le permiten colonizar y sobrevivir en una amplia variedad de tejidos y hospedadores (Dinges *et al.*, 2000). Según diversos estudios, casi el 30% de la población adulta es portador nasal persistente de *S. aureus* (Wertheim *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 1986). La infección por *S. aureus* se produce tras lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas, que favorecen la penetración del microorganismo desde la piel hasta los tejidos más profundos. Las infecciones que produce *S. aureus* con mayor frecuencia son las de la piel (foliculitis) y de los tejidos blandos (forúnculos, abscesos e infecciones de heridas). Desde estos focos de infección, la bacteria puede invadir la sangre y producir cuadros graves de sepsis, neumonía, endocarditis o llegar hasta las articulaciones o el hueso y producir artritis u osteomielitis. Las infecciones producidas por *S. aureus* representan una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales, siendo especialmente importantes las cepas que presentan multirresistencia a los antibióticos, como las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) o aquellas resistentes a la vancomicina, ya que constituyen un grave problema de Salud Pública.

La patogenia de las infecciones por *S. aureus* resulta de la acción combinada de más de 50 factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación bacteriana). Al igual que ocurre en otras bacterias, una característica destacable de la patogénesis de *S. aureus* es el hecho de que muchos de los genes que codifican toxinas, adhesinas, invasinas u otros factores de virulencia, se encuentran codificados en elementos genéticos móviles (EGMs).

Los EGMs son piezas diferenciadas del DNA que codifican factores que les permiten movilizarse dentro o entre genomas (Frost *et al.*, 2005; Thomas and Nielsen, 2005). En *S. aureus*, los principales EGMs son bacteriófagos, islas de patogenicidad (IP), plásmidos, transposones y cassettes cromosomales. Se ha estimado que alrededor del 20% del contenido genético de una especie bacteriana ha sido adquirido a partir de otro organismo por mecanismos de transferencia horizontal de genes (Gogarten *et al.*, 2002), lo que pone de relevancia la importancia del estudio de estos

elementos. Durante los últimos años nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio de estos elementos en nuestra bacteria modelo, *S. aureus*, centrándonos principalmente en el estudio de los bacteriófagos e islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs).

Bacteriófagos.

Los bacteriófagos, también llamados fagos, son agentes infecciosos que se replican como agentes intracelulares obligados dentro de las bacterias, y que para hacerlo utilizan la maquinaria biosintética de su hospedador.

Los bacteriófagos están ampliamente distribuidos en todo tipo de hábitats. Estudios de recuentos de bacteriófagos en el suelo han puesto de manifiesto su abundancia y su papel en la depredación bacteriana, actuando como controladores y estimuladores del crecimiento bacteriano (Ashelford *et al.*, 2003). Del mismo modo, diferentes estudios realizados han demostrado que en los ambientes acuáticos existe un orden de magnitud superior de virus que de bacterias (Bergh *et al.*, 1989; Wommack and Colwell, 2000). Por lo tanto, los bacteriófagos, con una población global estimada de 10^{30} , pueden ser considerados como los organismos más abundantes de la biosfera (Brussow and Hendrix, 2002).

Los bacteriófagos no son sólo cuantitativamente importantes como elementos genéticos móviles, sino también como vectores de transferencia horizontal entre bacterias, jugando un papel crítico en la biología, diversidad y evolución bacteriana (Brussow *et al.*, 2004). Numerosos factores de virulencia están codificados por fagos. Así, por ejemplo, en *Staphylococcus aureus*, los bacteriófagos codifican para toxinas tan conocidas como la enterotoxina A (Sea), Pantón-Valentine leukocidina (PVL) o la estafiloquinasa (Sak), entre otras (Betley and Mekalanos, 1985; Kaneko *et al.*, 1998; van Wamel *et al.*, 2006). Además de su papel en la patogénesis bacteriana, los fagos atemperados actúan como punto de anclaje para la reorganización genómica (Casjens, 2003), contribuyen a la adaptación de cepas bacterianas no patógenas a sus nichos ecológicos al alterar y variar la expresión génica de la propia bacteria (Clokie *et al.*, 2011), confieren protección frente a la posible infección lítica de otros fagos (Berngruber *et al.*, 2010) o intervienen en mecanismos de competencia ecológica entre diferentes especies bacterianas (Selva *et al.*, 2009).

Asimismo, los bacteriófagos representan una gran parte de la variabilidad genética existente entre cepas de diferentes especies bacterianas, o incluso entre

cepas de la misma especie bacteriana. Siguiendo con nuestra bacteria modelo, en *S. aureus* se han identificado y secuenciado un gran número de fagos (Kwan *et al.*, 2005). De hecho, en todas las cepas secuenciadas de *S. aureus* se han encontrado bacteriófagos que suponen hasta un 4 ó 5% del genoma total de la bacteria, siendo éstos una de las fuentes de variación más importantes al comparar los genomas de las distintas cepas virulentas (Baba *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 2004).

Existe una enorme diversidad en cuanto a la estructura y contenido génico de los bacteriófagos descritos hasta la fecha, aunque la mayoría de ellos pertenecen al orden *Caudovirales*. Éstos son virus complejos de DNA de doble cadena con una estructura de cabeza-tallo (Ackermann, 1998); la cabeza normalmente tiene una simetría icosaédrica, el tallo tiene una simetría helicoidal y el cuello y la placa basal son ensambladas por vías independientes y unidas posteriormente para formar la partícula vírica madura (Aksyuk and Rossmann, 2011). Los bacteriófagos que pertenecen a este orden se dividen a su vez en tres familias según la morfología del tallo: *Podoviridae* (tallo corto): pertenecen a esta familia los fagos P22, phi29 o T7 de *Escherichia coli*; *Myoviridae* (tallo largo y contráctil): pertenecen a esta familia los fagos P2 o T4 de *E. coli* y *Siphoviridae* (tallo largo y no-contráctil): pertenecen a esta familia los fago λ , HK97 (*E. coli*) o SPP1 (*Bacillus subtilis*), además de la mayoría de los bacteriófagos que infectan *S. aureus* (Deghorain and Van Melderen, 2012).

Además de por la morfología de la partícula, los bacteriófagos se clasifican según su ciclo de vida en fagos líticos o virulentos y fagos atemperados (Figura 1.1). Los fagos virulentos son aquellos que tras la infección de la célula bacteriana y después de su multiplicación, provocan la lisis de la bacteria liberando una nueva progenie fágica en un proceso conocido como ciclo lítico. Sin embargo, existen bacteriófagos en los que la entrada en el ciclo lítico es opcional, pudiendo llegar a integrarse en el genoma de la bacteria infectada, transmitiéndose de una generación a otra sin que se produzca la lisis celular. Estos son los llamados fagos atemperados, el fenómeno se conoce como lisogenia, a las bacterias huéspedes infectadas se las llama lisogénicas y al DNA viral integrado se le llama profago. Ante situaciones de estrés, como la exposición a la luz ultravioleta o a agentes que dañan el DNA como determinados antibióticos (Favre *et al.*, 1986; Maiques *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 1987; Ubeda *et al.*, 2005), se desencadena la denominada respuesta SOS bacteriana, iniciando el ciclo lítico que conducirá a la lisis celular. Durante la inducción, los fagos se escinden del cromosoma bacteriano y comienzan a replicarse, se encapsidan y se transfieren horizontalmente a otras bacterias.

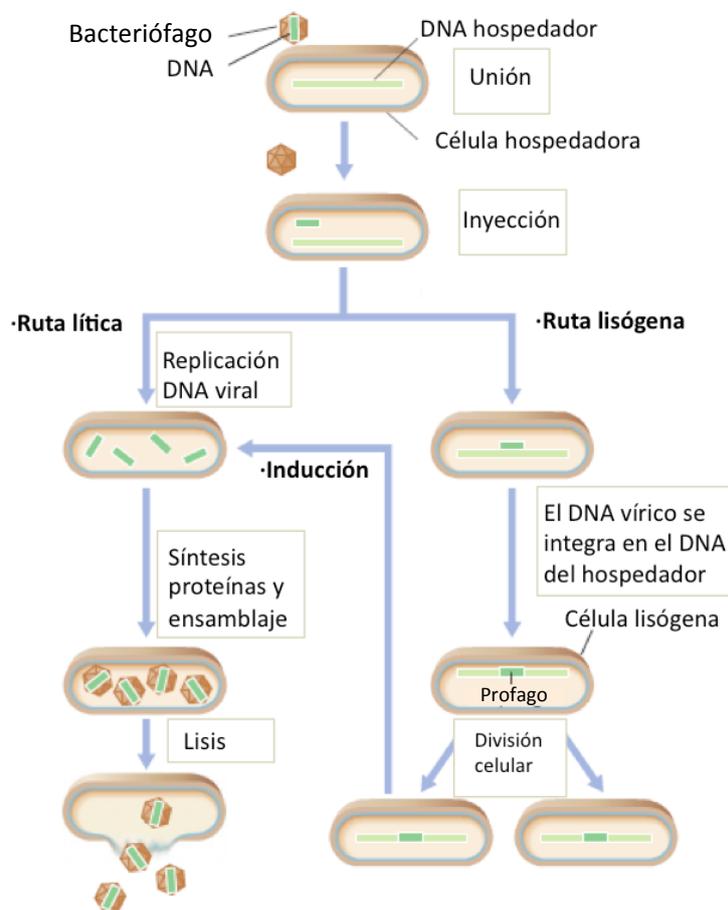


Figura 1.1. Representación de los ciclos de vida de los bacteriófagos atemperados. (Adaptación Madigan, 12^o Edición). Después de la unión (adsorción) del virión a la célula hospedadora se produce la inyección del material genético del fago. Tras la entrada del DNA, el fago puede integrarse en el genoma de la bacteria (ciclo lisogénico) y permanecer así hasta que se produce la inducción del ciclo lítico. Una vez el fago entra en el ciclo lítico, éste escinde del cromosoma bacteriano, se produce la replicación del DNA viral y la síntesis de las envolturas proteicas. Posteriormente el genoma viral es empaquetado dentro de las procápsides y se produce el ensamblaje de la partícula vírica madura. Por último, se produce la lisis de la célula bacteriana y la liberación de los viriones que infectarán a otras células bacterianas.

El bacteriófago lambda (λ) que infecta a la bacteria *E. coli* es uno de los fagos mejor estudiados, siendo el prototipo del grupo de bacteriófagos lambdoides entre los que encontramos a la mayoría de los bacteriófagos de *S. aureus*. Los bacteriófagos

miembros de este grupo tienen una organización genética muy similar. Los genes que se localizan juntos en el genoma se agrupan en módulos según su función biológica y el conjunto de módulos se combina para constituir el genoma viral (Figura 1.2). Dicha organización en módulos génicos permite la expresión de los genes del fago en forma de cascada durante el crecimiento lítico, definiéndose la fase temprana de la transcripción como el periodo en el que se expresan los genes pertenecientes al módulo de lisogenia, críticos para el desarrollo de una de las dos rutas alternativas (ciclo lítico o lisogénico). El módulo de expresión intermedio codifica para proteínas implicadas en la replicación del fago, mientras que el módulo de expresión tardía codifica para proteínas implicadas en el empaquetamiento del fago y la lisis bacteriana.



Figura 1.2. Representación esquemática de la organización genética del fago $\phi 11$ de *S. aureus*, miembro del grupo de los bacteriófagos lambdoides. Los recuadros coloreados representan los diferentes módulos funcionales: morado, lisogenia; amarillo, replicación; verde, empaquetamiento y morfogénesis de la cápside; azul, morfogénesis del tallo; rosa, lisis celular.

La organización modular de los bacteriófagos y la conservación de cierta homología en los extremos de los distintos módulos posibilitan el intercambio de módulos con una misma función entre fagos diferentes por recombinación homóloga (Botstein, 1980). Estos intercambios modulares tienen lugar con una frecuencia igual o superior a la frecuencia mutacional, por lo que el sistema modular permitiría una respuesta más rápida y flexible a nuevos factores ambientales que la evolución vertical (Casjens, 2005). Por lo tanto, los bacteriófagos pueden ser considerados como mosaicos modulares productos de la evolución y del intercambio de elementos o módulos entre fagos que infectan a la misma célula bacteriana (Brussow *et al.*, 2004; Hendrix, 2002). De este modo, cada virus es una combinación favorable de módulos, uno para cada función, que le permite al fago adaptarse de manera óptima a un nicho concreto.

En el fago lambda, los genes implicados en el establecimiento y mantenimiento de la lisogenia están agrupados en el llamado módulo de lisogenia. Se conoce como interruptor génico al mecanismo que determina que tras la infección de un fago atemperado, se desencadene el ciclo lítico o lisogénico. El control de ambos procesos es llevado a cabo por dos proteínas codificadas en este módulo, el represor (CI) y el antirepresor (Cro) del fago que actúan como reguladores de la transcripción. Cuando se expresa CI, se une a la región intergénica presente entre *cl* y *cro*, reprimiendo la expresión de los genes implicados en el desarrollo del ciclo lítico, incluido *cro*, provocando el establecimiento del ciclo lisogénico (Court *et al.*, 2007). No obstante, ante situaciones de estrés se desencadena la respuesta SOS bacteriana, donde la proteasa bacteriana RecA se activa y estimula la autólisis del represor CI por un sitio específico alanina-glicina (Kim and Little, 1993; Little, 1984). En este momento se empieza a expresar *cro*, que compite con CI para unirse a la región promotora presente entre *cl* y *cro*, inhibiendo la expresión de los genes lisogénicos tempranos, incluido *cl*, y activando la expresión de los genes líticos (Court *et al.*, 2007).

El primer gen del módulo de lisogenia codifica para la integrasa del fago que cataliza el proceso de recombinación sitio-específico entre el sitio de unión del fago (*attP*) y el sitio de unión del genoma bacteriano (*attC*), siguiendo el modelo de Campbell (Campbell *et al.*, 1992). La integración da lugar a la formación de dos sitios de unión híbridos, los llamados *attL* y *attR*, que van a permitir que la integración sea un proceso reversible. Así pues, cuando se produzca la inducción, espontánea o inducida, tendrá lugar una recombinación sitio-específica, escindiéndose el profago del genoma bacteriano. Adyacente a *int* se halla el gen *xis*, que codifica para una escisionasa, que junto a la integrasa es la que cataliza la escisión del profago (Miller *et al.*, 1981).

A continuación del módulo de lisogenia se localiza el módulo de replicación, que consta, entre otras estructuras, de un origen de replicación (*ori*). En el caso del fago λ , la replicación comienza cuando el DNA circulariza y las proteínas O y P se unen cerca del *ori* provocando el acoplamiento del enzima DnaB helicasa de *E. coli*, que desenrolla el DNA (LeBowitz and McMacken, 1986). A continuación, la DnaG girasa bacteriana elabora los cebadores de RNA para facilitar la replicación en ambas direcciones y la DNA polimerasa III comienza la replicación (Rowen and Kornberg, 1978). La replicación del DNA se produce posteriormente a la transcripción temprana y es considerado como el evento que marca la transición de las funciones virales tempranas llevadas a cabo por los genes codificados en el módulo de lisogenia, a las intermedias y tardías.

Una vez el fago empieza a replicarse, se empiezan a sintetizar las proteínas estructurales que formarán la cabeza y el tallo así como las proteínas encargadas del ensamblaje de la partícula vírica y por último las proteínas encargadas de la lisis celular. Estos genes están codificados en el módulo de morfogénesis y lisis, cuya organización está muy conservada entre los bacteriófagos lamboides, incluso entre fagos que infectan bacterias taxonómicamente alejadas como *E. coli* y arqueobacterias (Desiere *et al.*, 2000).

Los bacteriófagos se han utilizado clásicamente como modelo para el estudio de los procesos de ensamblaje. Entre los más estudiados están los bacteriófagos λ , SPP1, HK97, T4, phi29 o P2 entre otros. Aunque existen singularidades en algunos de los procesos de ensamblaje o en la estructura de la cápside o del tallo de cada uno de ellos, los principios generales del proceso de empaquetamiento son aplicables a la mayoría de los bacteriófagos (Figura 1.3)(Aksyuk and Rossmann, 2011; Feiss and Rao, 2012; Leiman *et al.*, 2003).

Uno de los primeros pasos que se llevan a cabo durante el proceso de empaquetamiento es la formación de un armazón vacío llamado procápside, que será posteriormente rellenado con el DNA vírico para formar la cápside madura. La procápside generalmente está constituida por múltiples copias de una única proteína (proteína de la cápside o proteína mayoritaria de la cabeza), aunque algunos bacteriófagos pueden codificar para dos proteínas de la cápside, como es el caso del bacteriófago T4 (Rao and Black, 2012).

Para que las proteínas de la cápside interactúen y se articulen formando la procápside se necesita de la actividad de una proteína de andamiaje o “scaffolding”. Muchos fagos codifican para una única proteína de andamiaje, aunque en algunos casos pueden codificar más de una, como es el caso del fago T4 puede codificar hasta 6 proteínas de andamiaje diferentes (Black *et al.*, 1994; Rossmann *et al.*, 2004). En otros casos la propia proteína de la cápside codifica para un dominio de andamiaje, como es el caso de los fagos HK97 o T5 (Duda *et al.*, 1995; Huet *et al.*, 2010). Las proteínas de andamiaje actúan como punto de unión para las proteínas de la cápside, favoreciendo su interacción y la formación de la estructura de la procápside, además de controlar su forma (Dokland, 1999).

El tercer elemento esencial para la formación de la procápside es la proteína conectora o proteína portal. La proteína portal se sitúa en un vértice desde el que se inicia la formación de la procápside mediante la co-polimerización de las proteínas “scaffolding” y de la cápside (Valpuesta and Carrascosa, 1994). Los monómeros de la

proteína portal se agrupan formando un anillo dodecamérico, creando un canal central a través del que pasará el DNA (Johnson and Chiu, 2007).

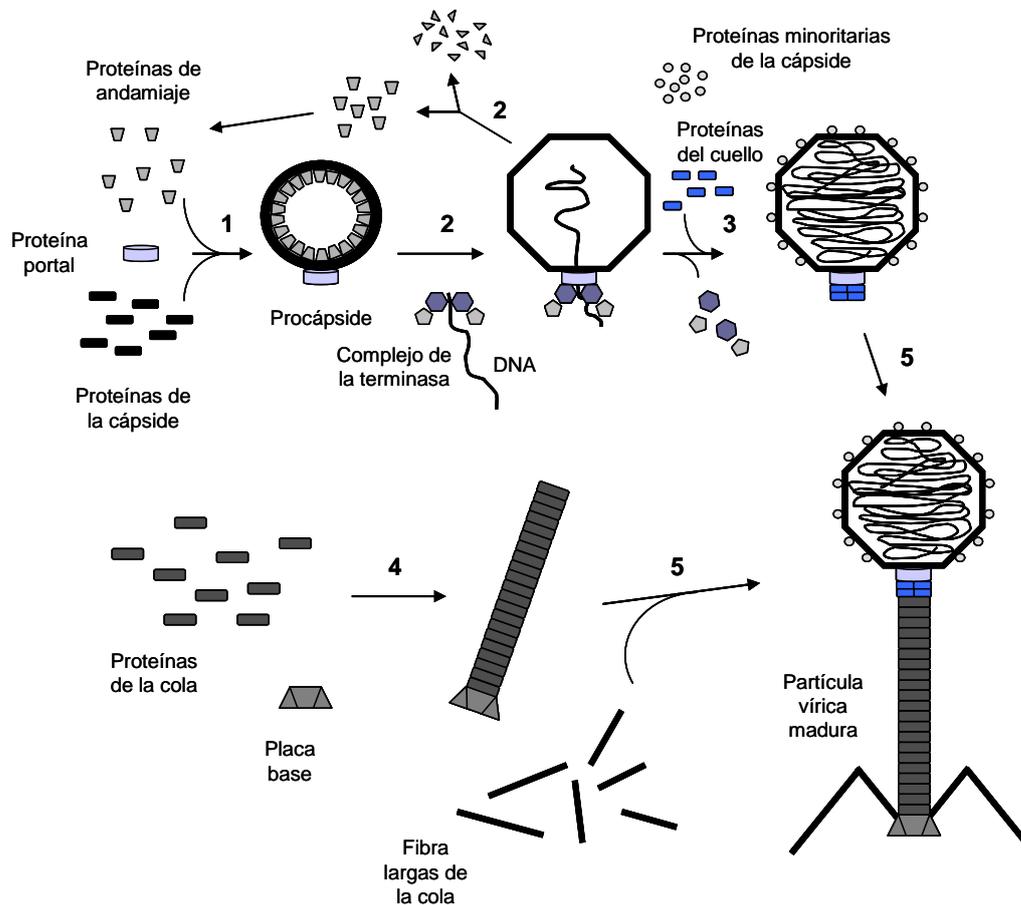


Figura 1.3. Representación esquemática de la vía general de ensamblaje de la partícula vírica de los bacteriófagos de DNA de doble cadena (dsDNA). 1) Ensamblaje de la procápside. 2) Empaquetamiento del DNA y salida de las proteínas de andamiaje. 3) Disociación del complejo de la terminasa e incorporación de las proteínas minoritarias de la cápside y del cuello. 4) Ensamblaje de las proteínas del tallo. 6) Unión de la cápside, el tallo y las fibras largas del tallo y formación de la partícula vírica madura.

Una vez se ha formado la procápside, la terminasa forma un complejo heterooligomérico que interacciona con el DNA concatemérico formado durante la replicación del bacteriófago, realiza un corte en el DNA e interactúa con la proteína portal para

introducir el DNA dentro de la procápside. Este complejo está formado por las dos subunidades de la terminasa: la subunidad grande de la terminasa tiene un dominio nucleasa que se encarga de producir el corte del DNA y un dominio ATPasa encargado de suministrar la energía necesaria para la translocación del DNA, mientras que la subunidad pequeña es la encargada de reconocer el sitio de corte y modular las actividades nucleasa y ATPasa de la subunidad grande (Rao and Feiss, 2008). Existen dos modelos clásicos de empaquetamiento del DNA. En ambos modelos la subunidad pequeña de la terminasa reconoce una secuencia específica de nucleótidos donde se une y promueve el corte llevado a cabo por la subunidad grande de la terminasa. Una vez se ha producido la entrada del DNA viral, se producen cambios conformacionales en la proteína portal que podrían ser la señal para que la subunidad grande de la terminasa produzca el segundo corte en el DNA, disociándose después el complejo de la cápside (Lander *et al.*, 2006; Rao and Feiss, 2008). En el caso de los fagos λ , T3 o T7 este segundo corte es específico de secuencia (secuencia denominada *cos*), con lo que se empaqueta una única copia del genoma del fago comprendida entre los dos sitios *cos*. Los fagos que utilizan este sistema se dice que utilizan un empaquetamiento tipo *cos*. Por el contrario, en el caso de los fagos T4, P22 o SPP1, el segundo corte es inespecífico de secuencia, empaquetándose el DNA viral hasta que la cápside esté llena, por lo que se empaqueta más de una unidad del genoma viral (Casjens, 2011; Feiss and Rao, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Rao and Feiss, 2008). Este tipo de empaquetamiento se denomina de cabeza llena o empaquetamiento tipo *pac*, haciendo referencia al nombre genérico que recibe la secuencia específica reconocida por la terminasa pequeña (secuencia *pac*) y que determina el primer corte.

Durante el empaquetamiento del DNA las proteínas de andamiaje salen de la procápside (P22, phi29) o son proteolíticamente cortadas por proteasas codificadas por el propio fago (HK97, T4) (Fane and Prevelige, 2003) o por proteasas de la bacteria (fago 80 α de *S. aureus*) (Spilman *et al.*, 2012). La desaparición de las proteínas de andamiaje y la entrada del DNA provocan la maduración de la cápside, lo que implica la expansión de la cápside que aumenta de tamaño para dar cabida al DNA viral (Figura 1.3) (Steven *et al.*, 2005). En algunos casos la expansión de la cápside está promovida por la unión de proteínas de estabilización, como la proteína gpD necesaria para empaquetar el genoma completo del fago λ (Lander *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2000), o la proteína gp Soc del fago T4 necesaria para la estabilidad del virión en ambientes con condiciones extremas de pH y temperatura (Qin *et al.*, 2010). En este momento se pueden incorporar a la cápside algunas proteínas menores de la cápside que están presentes en bajo número de copias y aunque no son esenciales

para la formación de la estructura de la cápside, son cruciales para la capacidad infectiva del virión. El fago P22, por ejemplo, posee tres proteínas minoritarias que modulan la eyección del DNA (King *et al.*, 1973).

Una vez el DNA viral ha entrado dentro de la cápside el complejo de la terminasa se disocia de la proteína portal y es sustituido por las proteínas que formarán el cuello de la partícula vírica (Figura 1.3) (Orlova *et al.*, 2003). Estas proteínas junto con las proteínas conectoras formarán un complejo asociado a la proteína portal que previene la salida prematura del DNA antes de que se asocie el tallo y se complete la partícula vírica y posteriormente posibilita la salida del DNA tras la unión de las fibras del fago a los receptores de la bacteria (Lhuillier *et al.*, 2009).

En los fagos *Siphoviridae* y *Myoviridae* el ensamblaje del tallo se produce por una vía independiente a la de la formación de la cápside (Casjens and Hendrix, 1988), mientras que en los fagos *Podoviridae* las proteínas del tallo son secuencialmente unidas a la cápside recién formada (Camacho *et al.*, 1979). El ensamblaje del tallo en los fagos *Siphoviridae* y *Myoviridae* empieza a partir del complejo iniciador que formará el dispositivo de absorción del fago en el extremo distal del tallo llamada placa base o baseplate (Sciara *et al.*, 2010). Durante el ensamblaje del tallo en el complejo de la placa base se inicia la polimerización del tubo del tallo mediante cambios conformacionales en las distintas proteínas implicadas. La longitud del tallo en los fagos *Siphoviridae* y *Myoviridae* está determinada por la proteína tape measure, que actúa como una proteína de andamiaje durante la polimerización del tubo del tallo (Katsura, 1990). Normalmente el tallo está compuesta por múltiples copias de una proteína mayoritaria del tallo, aunque existen excepciones como es el caso del fago SPP1 que codifica para dos proteínas del tallo presentes en una relación 3:1 (Auzat *et al.*, 2008). En los fagos *Myoviridae* el tallo es posteriormente recubierta por una vaina proteica contráctil (Aksyuk *et al.*, 2009). Una vez finalizado el ensamblaje del tallo se unen las proteínas terminadoras que interactúan con las proteínas del cuello y median la unión del tallo y la cápside (Vianelli *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003) (Figura 1.3).

Por último, la asociación de la cápside y el tallo es seguida por la unión de las fibras largas del tallo, responsables del reconocimiento de los receptores de la bacteria huésped (Heller, 1984; Wang *et al.*, 2000). Las fibras permanecen en una posición retraída si las condiciones son desfavorables para el crecimiento del fago, previniendo la infección (Coombs and Arisaka, 1994).

Una vez se han formado las partículas víricas, éstas deben salir de la bacteria para poder infectar nuevas células bacterianas. Los bacteriófagos han desarrollado

múltiples estrategias para promover la liberación de los viriones recién formados aunque en la mayoría de los casos incluyen la síntesis de dos proteínas codificadas por el propio fago que provocan la lisis celular. Éstas son la endolisina y la holina. Las endolisinas o lisinas son enzimas que degradan la pared bacteriana mientras que la holina es una proteína pequeña que se acumula en la membrana citoplásmica provocando pequeñas lesiones inespecíficas o agujeros en la membrana, haciéndola permeable y posibilitando la acción enzimática de la lisina sobre el peptidoglicano de la pared bacteriana (Young, 1992; Young and Blasi, 1995).

Como hemos visto, se han caracterizado ampliamente el papel de algunas familias de proteínas en el proceso de empaquetamiento de los bacteriófagos en algunos modelos concretos. No obstante, la mayoría de los bacteriófagos codifican dentro de los módulos de morfogénesis y lisis para algunas proteínas cuyo papel en el ensamblaje de las partículas víricas aún no ha sido descifrado. Nos planteamos como uno de los objetivos de la presente tesis conocer qué papel pueden jugar en el proceso de empaquetamiento del fago estas proteínas con funciones desconocidas, intentando por lo tanto determinar cuáles son los requisitos moleculares indispensables para producir partículas funcionales de fago.

Sistemas de regulación del empaquetamiento.

La organización modular de los genes en los bacteriófagos hace posible que cada gen se exprese en el momento adecuado dentro del ciclo biológico del fago. Para asegurar un control estricto de la expresión génica en los estados tardíos de la infección, los bacteriófagos han desarrollado una amplia variedad de mecanismos que implican la síntesis de factores de control codificados por el propio fago.

Existen diferentes estrategias utilizadas por los bacteriófagos para controlar la expresión de los genes tardíos. Uno de los sistemas de control mejor estudiados es el del bacteriófago λ . La regulación de la expresión de los genes tardíos responsables de la síntesis de las proteínas de la cápside, del tallo y de las proteínas que llevarán a cabo la lisis de las células bacterianas es efectuada por el regulador positivo Q, una proteína antiterminadora de la transcripción (Figura 1.4). La proteína Q se une a una región del DNA denominada *qut*, que se solapa parcialmente con el promotor del bloque de empaquetamiento y lisis (P_R). La transcripción desde el promotor P_R' es constitutiva pero en ausencia de Q finaliza a los 200 nucleótidos de iniciarse, en el terminador t_R' . Cuando Q está presente, interacciona con el complejo formado por la

RNA polimerasa posibilitando que la transcripción iniciada en el promotor P_R' continúe sin detenerse en el terminador t_R' , transcribiéndose los genes de morfogénesis y lisis en un único transcrito de 26 Kb (Weisberg and Gottesman, 1999).

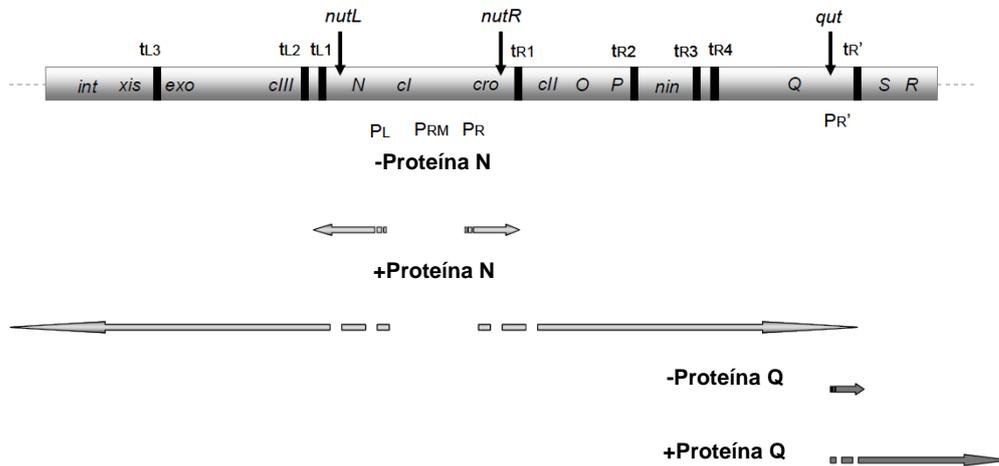


Figura 1.4. Esquema de la regulación de la expresión génica por antiterminación. Las flechas representan los RNAm que se producen.

Otro ejemplo de regulación de la transcripción tardía es la llevada a cabo por el colifago P2. En este caso, la proteína reguladora, Org, se une a una región de DNA situada a 55 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes tardíos (Christie *et al.*, 2003), para posteriormente interactuar con la subunidad α de la RNA polimerasa provocando el inicio de la transcripción (Ayers *et al.*, 1994). La transcripción tardía del bacteriófago P1 está regulada por Lpa, una proteína codificada por el fago que con la ayuda de la proteína SspA, proteína codificada por la bacteria *E. coli*, se une a una región conservada dentro del promotor tardío (Hansen *et al.*, 2003). En el caso del fago Mu, la transcripción tardía está controlada por la proteína C, también codificada por el propio fago que se une a una región situada entre 30 y 55 nucleótidos aguas arriba del inicio del transcrito tardío, promoviendo la unión de la RNA polimerasa y la activación del promotor tardío (Chakraborty and Nagaraja, 2006; Sun *et al.*, 1997).

En la activación del promotor tardío del bacteriófago T4 intervienen dos proteínas codificadas por el propio fago que actúan como subunidades de la RNA polimerasa. La proteína gp55 actúa como un factor sigma reconociendo el motivo

consenso de 8 nucleótidos del promotor tardío mientras que la proteína gp33 actúa como un coactivador de la transcripción tardía (Herendeen *et al.*, 1990; Kassavetis *et al.*, 1984). En la transcripción de los genes tardíos además interviene la proteína del fago gp45 que interacciona con las proteínas gp55 y gp33 y la DNA polimerasa bacteriana, acoplado la transcripción a la replicación del fago (Nechaev and Geiduschek, 2008).

Como ejemplos clásicos de regulación de la transcripción tardía en bacteriófagos de Gram-positivos tenemos la llevada a cabo por los fagos SP01 y phi29 de *Bacillus subtilis*. En el primer caso, el fago SP01 emplea factores sigma codificados por el fago para dirigir la activación de los promotores de la transcripción media y tardía (Talkington and Pero, 1978), además de codificar una proteína similar a la proteína gp45 del fago T4 que controla la transcripción tardía además de intervenir en la replicación del DNA viral (Greene *et al.*, 1982). El segundo ejemplo de regulación de la expresión tardía es la llevada a cabo por el bacteriófago phi29, perteneciente a la familia *Podoviridae*. La expresión de sus genes ocurre en dos estadios: uno temprano en el que se producen las proteínas implicadas en el proceso de replicación y regulación de la transcripción y otro tardío, en donde se expresan las proteínas responsables de la morfogénesis de la partícula viral y la lisis de la bacteria. En el caso del bacteriófago phi29 los promotores de los genes tempranos y tardíos están localizados en una pequeña región intergénica situada entre estos dos operones con una orientación divergente. La transición desde la expresión de los genes tempranos hacia los genes tardíos está controlada por los productos de los genes 4 y 6, dos de los genes tempranos del propio fago. La proteína reguladora p4 se une a una región del DNA dentro de esta región intergénica y modula la transcripción del fago phi29 reprimiendo los dos promotores principales de los genes tempranos, y a su vez, activando la transcripción del único promotor tardío mediante su interacción con la subunidad α de la RNA polimerasa. A su vez, la proteína p6 promueve la unión de p4 a su región de unión del DNA, activando su acción represora-activadora, además de actuar como represor de uno de los promotores tempranos del fago (Elias-Arnanz and Salas, 1999; Rojo *et al.*, 1998).

Finalmente, otro ejemplo de control de la transcripción tardía en bacteriófagos de Gram-positivos lo encontramos en el fago de *Lactococcus lactis* TP901-1, donde la proteína Alt, codificada por el propio fago, es un activador de la transcripción tardía del fago. Alt reconoce una secuencia conservada de repeticiones situada entre 32 y 76

nucleótidos aguas arriba del inicio de la transcripción localizada dentro de la región promotora de los genes tardíos (Pedersen *et al.*, 2006).

A pesar de que estos sistemas de regulación han sido extensamente estudiados en un pequeño número de fagos, la gran diversidad de bacteriófagos presentes en la naturaleza hace pensar que existen sistemas de regulación aún sin caracterizar. Especialmente escasos en número han sido los estudios realizados sobre la regulación de la transcripción tardía en los fagos que infectan *S. aureus*, siendo éste uno de los puntos de estudio de la presente tesis, lo que nos permitirá profundizar y ampliar nuestro conocimiento en los sistemas de regulación de la transcripción de los módulos fágicos de morfogénesis y lisis.

Islas de patogenicidad de *S. aureus*.

Las islas de patogenicidad de *S. aureus* (SaPIs) son segmentos cromosomales discretos, de un tamaño variable de entre 15-20 Kb, que generalmente codifican para toxinas, como la del síndrome del shock tóxico (TSST-1) u otros superantígenos (Lindsay *et al.*, 1998; Novick, 2003), o para otros factores de virulencia o de adaptación al hospedador (Ubeda *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2010).

Las SaPIs presentan una relación muy estrecha con los bacteriófagos de *S. aureus*, similar a la relación que mantienen los fagos P2 y P4 de *E. coli*, donde el fago satélite P4 parasita algunas de las funciones de P2 para poder transferirse (Ghisotti *et al.*, 1995; Lindqvist *et al.*, 1993). Así pues, para la movilización de las SaPIs es necesaria la infección de la cepa portadora de isla por parte de un fago o la inducción de profagos residentes, lo que conlleva la escisión de la isla del cromosoma bacteriano, su replicación, empaquetamiento y su transferencia en alta frecuencia (Lindsay *et al.*, 1998; Ubeda *et al.*, 2005). Asimismo, se observa que cuando el fago induce el ciclo de la isla su capacidad infectiva se ve reducida, comparado con el título de fago en una cepa SaPI negativa. Este hecho indica que existe una interferencia de la isla con el fago y muestra que la interrelación entre estos dos elementos es más compleja de lo que se ha visto hasta la fecha.

Las SaPIs presentan una organización genética muy conservada que recuerda a la organización modular de los bacteriófagos, de manera que genes con funciones relacionadas pertenecen al mismo módulo funcional (Novick *et al.*, 2010; Ubeda *et al.*, 2008) (Figura 1.5).

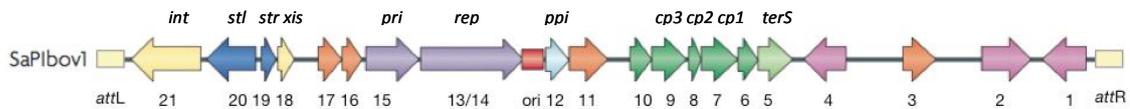


Figura 1.5. Representación esquemática de los genes pertenecientes a la isla SaPIbov1. Las flechas representan la orientación y tamaño de las diferentes pautas abiertas de lectura. Los diferentes colores representan las diferentes funciones de cada gen: amarillo, escisión-integración; azul, regulación; púrpura, replicación; rojo, origen de replicación (*oriS*); azul claro, proteína de interferencia *ppi*; verde, encapsidación (verde claro, subunidad pequeña de la terminasa *terS*); rosa, superantígenos y genes accesorios; naranja, función desconocida; *attL* y *attR*, secuencias de repetición izquierda y derecha respectivamente.

El primer gen de la isla codifica para una integrasa (*int*), cuya actividad es necesaria para la integración y escisión de las SaPIs (Maiques *et al.*, 2007; Ruzin *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2003). La integración de la isla se produce en un sitio específico en el cromosoma bacteriano (*attC*) y es dependiente de la actividad de la integrasa codificada en la isla e independiente de la actividad de la proteína RecA. A continuación encontramos el módulo de regulación de las SaPIs, constituido por dos genes, el represor global de la isla *stl* y el antirepresor *str*, codificados en una orientación divergente. La expresión de Stl bloquea la escisión de la isla lo que permite que el elemento se mantenga en un estado quiescente integrado en el genoma de la bacteria, mientras que en ausencia del represor, la isla escinde y replica autónomamente en ausencia de un fago inductor (Ubeda *et al.*, 2008). Aunque Stl tiene homología funcional con el represor CI del fago lambda, se diferencia de éste en que no posee el sitio específico alanina-glicina necesario para la autoproteólisis una vez se activa la respuesta SOS. Por el contrario, la derepresión de la isla es llevada a cabo por proteínas del fago que actuando como inductores y mediante una interacción proteína-proteína, se unen a Stl eliminando la represión ejercida por el represor y activando la transcripción de los promotores regulados por *stl* y *str* (Tormo-Mas *et al.*, 2010; Tormo-Mas *et al.*, 2013). Los bacteriófagos de *S. aureus* difieren de su capacidad para inducir diferentes SaPIs, debido a que represores distintos utilizan proteínas inductoras diferentes para su inducción. Es decir, solo aquellos bacteriófagos que codifiquen la proteína inductora que interactúa con el represor de una isla concreta serán capaces de inducir dicha SaPI.

Una vez se ha eliminado la represión, se necesita la expresión coordinada de la integrasa (*int*) y de la escisionasa (*xis*) para la correcta escisión de la isla (Mir-Sanchis *et al.*, 2012; Ubeda *et al.*, 2003). A continuación se inicia la replicación de la SaPI, gracias a la actividad de las proteínas helicasa (Rep) y primasa (Pri), que junto con el origen de replicación (*ori*) conforman la unidad replicativa (Ubeda *et al.*, 2007a; Ubeda *et al.*, 2012). Se asume que la isla replica en forma de círculo rodante, formando un concatémero lineal de gran tamaño que será posteriormente procesado durante la encapsidación de la isla. La isla no codifica para proteínas estructurales del virión, sino que empaqueta su genoma en cápsides formadas por proteínas codificadas por el fago (Tallent *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2008). No obstante, la mayoría de las SaPIs codifican para algunas proteínas relacionadas con el empaquetamiento de la isla que conforman el llamado operón I (Ubeda *et al.*, 2007b). En este operón, controlado por LexA, está codificada la subunidad pequeña de la terminasa (*terS*) que forma un complejo con la subunidad grande de la terminasa del fago, para reconocer y cortar una secuencia de DNA específica de la isla (sitio *pac*). Además la isla codifica para tres proteínas, Cpm1, Cpm2 y Cpm3 que remodelan las procápsides fágicas, dirigiendo la producción de cápsides más pequeñas, donde solamente el genoma de la isla podrá empaquetarse (Figura 1.6) (Ruzin *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2005).

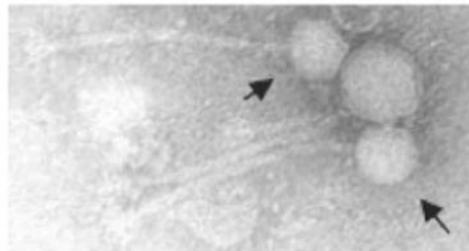


Figura 1.6. Microscopía electrónica de un lisado del fago 80 α (Ubeda *et al.*, 2005). Aumento 122000x. Las flechas señalan las partículas pequeñas donde se empaqueta el genoma de la SaPI.

Este es uno de los mecanismos que poseen las SaPIs para crear interferencia con los fagos, ya que al parasitar las proteínas de las cápsides disminuyen las partículas disponibles para el empaquetamiento del propio fago (Christie and Dokland, 2012). Un segundo mecanismo es el que emplean algunas SaPIs que codifican para la proteína Ppi, o proteína de interferencia de empaquetamiento del fago (Ram *et al.*,

2012). Esta proteína interactúa con la subunidad pequeña de la terminasa del fago, impidiendo específicamente su función y por tanto el empaquetamiento del DNA del fago.

La estructura de las SaPIs y su estrecha relación con los fagos estafilocócicos indica que las islas han evolucionado para diseminarse con gran eficiencia entre los estafilococos. De hecho, la secuenciación de un gran número de cepas de *S. aureus* ha puesto de manifiesto que todas las cepas secuenciadas poseen una o varias islas en su genoma, asumiéndose en la actualidad que la práctica totalidad de cepas clínicas contiene al menos uno de estos elementos. Además de la amplia distribución de las islas dentro de los estafilococos, se ha observado la transferencia de estos elementos entre distintos géneros y especies bacterianas. Así, Maiques *et al.* (2007) demostraron la transferencia de SaPI_{bov2} de *S. aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, y más recientemente se ha demostrado la transferencia de SaPI1 y SaPI_{bov1} desde *S. aureus* a *Listeria monocytogenes* (Chen and Novick, 2009).

Estos resultados sugieren que el rango de hospedadores de las SaPIs puede ser más amplio de lo que se pensaba hasta el momento. De hecho, recientemente se han identificado elementos similares a las SaPIs en otras especies de *Staphylococcus* (Kuroda *et al.*, 2005; Takeuchi *et al.*, 2005), y nuestro grupo ha demostrado la existencia de elementos similares a las SaPIs en otros géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus* (Matos *et al.*, 2013; Novick *et al.*, 2010), Martínez-Rubio, *et al.*, en revisión), lo que nos ha permitido sugerir la existencia de una nueva familia de elementos genéticos móviles, a la que hemos denominado PICIs (phage-induced chromosomal islands) (Martínez-Rubio, *et al.*, en revisión).

Si bien los estudios de los últimos años nos han ayudado a profundizar en nuestro conocimiento sobre estos elementos y su relación con los bacteriófagos estafilocócicos, aún faltan por conocerse algunos aspectos de esta relación. Dado que las SaPIs utilizan proteínas codificadas por el fago para formar sus partículas víricas, uno de los objetivos de este trabajo consistirá en determinar qué proteínas del fago son necesarias para el empaquetamiento y transferencia de estos elementos.

Capítulo II

Objetivos

Como hemos mencionado anteriormente, los bacteriófagos son elementos móviles con gran relevancia en la biología bacteriana. A pesar de que algunos de ellos se han caracterizado de forma extensiva, estos estudios casi siempre se han realizado en fagos que infectan *E. coli*, habiéndose asumido que los resultados obtenidos son de aplicación a la mayoría de los fagos presentes en la naturaleza. Nosotros pensamos que todavía existen mecanismos no explorados, por lo que analizaremos la biología de los fagos que infectan a diferentes bacteriófagos de Gram-positivos, centrándonos concretamente en el estudio de los fagos de *S. aureus*, nuestra bacteria modelo. En concreto, los objetivos que nos planteamos en la presente tesis doctoral son:

- ❖ Caracterización del mecanismo regulador de la transcripción del módulo de morfogénesis y lisis de los bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* y de otros bacteriófagos de bacterias Gram-positivas.

- ❖ Caracterización del proceso de empaquetamiento del fago $\phi 11$ de *Staphylococcus aureus*.

- ❖ Estudiar el papel que desempeñan las proteínas del módulo de empaquetamiento de los bacteriófagos de *S. aureus* en la transferencia de EGMs (islas de patogenicidad y plásmidos).

Capítulo III



Resultados

**I. RinA CONTROLA EL MÓDULO DE
MORFOGÉNESIS Y LISIS DE FAGOS DE BACTERIAS
GRAM POSITIVAS**

El genoma de los bacteriófagos está organizado en diferentes módulos funcionales que incluyen un módulo de lisogenia, replicación del DNA, empaquetamiento y lisis. La expresión coordinada de los distintos genes presentes en estos módulos es esencial para la correcta formación de las partículas fágicas. Para que dicha coordinación se lleve a cabo es necesaria la existencia de un sistema de control muy fino, que regule la síntesis de las diferentes moléculas necesarias para adaptarse en cada momento a cada situación. Con el fin de caracterizar el sistema de regulación de los genes de empaquetamiento y lisis de los fagos de *Staphylococcus aureus*, buscamos dentro del genoma de éstos potenciales reguladores que pudiesen desempeñar esta función.

La delección de RinA elimina la producción de partículas de fago.

Por definición, el módulo de empaquetamiento y el de lisis pertenecen al transcrito tardío del fago y no se expresan inmediatamente tras la infección del fago. Por lo tanto, es de esperar que haya factores codificados por el propio fago que sean los encargados de regular la expresión de estos genes. Dos posibles candidatos a ejercer este papel regulador de la transcripción tardía en el fago $\phi 11$, fago natural de *Staphylococcus aureus* y nuestro fago modelo, son las proteínas RinA o RinB. La mayoría de los fagos de *S. aureus* presentan homólogos de estas proteínas, y los genes que las codifican se encuentran situados justo aguas arriba del posible módulo de empaquetamiento del fago. Previamente estos genes habían sido descritos como activadores de la expresión de la integrasa del $\phi 11$ (Ye and Lee, 1993), lo que sugería que estas proteínas poseían una posible función reguladora.

Para analizar su posible papel regulador delecionamos los genes *rinA* y *rinB* del bacteriófago $\phi 11$ en la cepa RN451, lisogénica para dicho fago, generando las cepas JP4028 ($\Delta rinA$) y JP4027 ($\Delta rinB$). Posteriormente, y puesto que las SaPIs necesitan las proteínas codificadas por el fago para ser empaquetadas, se les transfirió a estos mutantes SaPIbov1 *tst::tetM*, la cual es inducida por el fago $\phi 11$ y que contiene un marcador de tetraciclina insertado en el gen *tst* que facilita el estudio de su transferencia, generando las cepas JP4128 ($\Delta rinA$ SaPIbov1) y JP4127 ($\Delta rinB$ SaPIbov1), respectivamente. Una vez generados los diferentes mutantes del fago (con y sin SaPIbov1), se analizó cada uno de los tres estados secuenciales y claramente definidos del ciclo de los fagos y de las SaPIs: escisión-inducción, replicación y empaquetamiento-transferencia (ERP).

En primer lugar se analizaron las cepas mutantes en el gen *rinA*. Para ello, las distintas cepas se indujeron con mitomicina C (MC), molécula que activa la respuesta SOS bacteriana y que por tanto activa el ciclo de los fagos, y se tomaron muestras a los 0 y 60 minutos tras la inducción. Una vez extraídos los DNAs, éstos se separaron en un gel de agarosa donde se fotografiaron. A continuación se realizaron varios Southern blots utilizando sondas específicas para el fago o para la isla. En este estudio no se ha analizado la escisión, ya que asumimos que los mutantes que producen una banda de SaPI o que replican normalmente primero deben haber sufrido escisión.

La delección de *rinA* no afectó a la replicación del fago $\phi 11$ ni a la isla SaPIbov1, ya que como se muestra en la figura 3.1 la banda de replicación del mutante es de intensidad similar a la de la cepa salvaje. Sin embargo, en el mutante en *rinA* no se observa la banda lineal característica de la SaPI. Este hecho es consistente con un defecto en empaquetamiento, ya que la banda extracromosomal de la SaPI se observa tras la rotura y posterior liberación del DNA de la isla empaquetada en cápsides pequeñas (Ruzin *et al.*, 2001; Ubeda *et al.*, 2005).

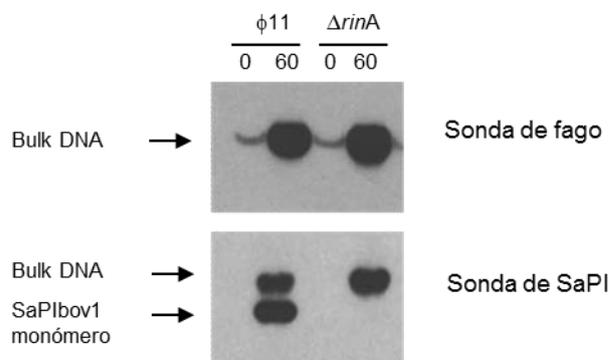


Figura 3.1. Estudio de la replicación del mutante en *rinA* del fago $\phi 11$. Tras la inducción con MC de cada cepa, se tomaron muestras a los tiempos indicados y una vez procesadas se separaron en gel de agarosa donde se fotografiaron. A continuación se realizó un Southern blot con una sonda específica para el fago y otro para la isla. La banda superior se corresponde con el “bulk” de DNA que incluye el DNA cromosomal, el DNA del fago y de la SaPI en replicación, mientras que la banda inferior que aparece con las muestras de la isla se corresponde con los monómeros lineales de DNA de la SaPI liberados tras disrupción de las cápsides pequeñas.

A continuación testamos la capacidad de los mutantes en *rinA* para producir partículas infectivas funcionales. Como puede observarse en la tabla 3.1, el mutante en *rinA* era incapaz de generar partículas funcionales de fago o de isla. Al mismo tiempo no se observó lisis del mutante en *rinA* tras la inducción con MC, sugiriendo que RinA podría controlar la expresión de los genes encargados de la lisis celular.

Tabla 3.1. Efecto en el título de fago y en la transferencia de las SaPIs de la mutación en *rinA*^a.

ϕ	Cepa donadora	SaPI	Plásmido	Título fago ^b	Título transducción ^c
ϕ 11	RN451			1.3 x 10 ⁹	
	JP1794	SaPIbov1		1.4 x 10 ⁷	1.6 x 10 ⁸
$\Delta rinA_{\phi 11}$	JP4028			< 10	
	JP4221		pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ11}	2.4 x 10 ⁸	
	JP4128	SaPIbov1		< 10	8 x 10 ³
	JP5961	SaPIbov1	pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ11}	2.2 x 10 ⁶	2.4 x 10 ⁷
80 α	RN10359			2.9 x 10 ¹⁰	
	JP3603	SaPIbov1		6.9 x 10 ⁸	7.8 x 10 ⁷
	JP3602	SaPI1		4.5 x 10 ⁸	8.2 x 10 ⁸
$\Delta rinA_{\phi 80\alpha}$	JP4717			< 10	
	JP5418		pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ11}	6.1 x 10 ⁸	
	JP5293	SaPIbov1		< 10	770
	JP5294	SaPI1		< 10	22
	JP5419	SaPIbov1	pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ11}	9 x 10 ⁷	4 x 10 ⁷
	JP5420	SaPI1	pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ11}	2.8 x 10 ⁷	6.9 x 10 ⁷
phiSLT	JP5011			1.7 x 10 ⁵	8.7 x 10 ⁴
$\Delta rinA_{\text{phiSLT}}$	JP6895			< 10	< 10
	JP6391		pCN51- <i>rinA</i> _{phiSLT}	9 x 10 ⁴	7.7 x 10 ³

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa aceptora.

^cNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa aceptora.

Para confirmar estos resultados se obtuvo un mutante en *rinA* del fago 80 α , el cual es capaz de inducir varias SaPIs, incluyendo SaPI1, SaPI2, SaPI_n1, SaPIbov1 y SaPIbov2, y que codifica para una proteína RinA básicamente idéntica a la del fago ϕ 11. Una vez obtenido el mutante analizamos la capacidad de transferencia del fago y de las islas SaPIbov1 y SaPI1. Ambas SaPIs contienen un marcador de tetraciclina insertado en el gen *tst*. Como habíamos visto previamente en el fago ϕ 11, el mutante en *rinA* del fago 80 α fue incapaz de generar partículas fágicas o transductantes de SaPI funcionales, así como de lisar la bacteria tras su inducción (Tabla 3.1).

En un intento de generalizar estos resultados realizamos un mutante en el gen *rinA* del fago phiSLT (Narita *et al.*, 2001), que codifica para una proteína RinA con tan

sólo un 23% de identidad con respecto a las codificadas por el fago $\phi 11$ o 80α (Figura 3.2). Para ello utilizamos un derivado del fago phiSLT con un marcador de tetraciclina insertado en el gen PVL (Labandeira-Rey *et al.*, 2007). Como podemos ver en la tabla 3.1, no se obtuvieron partículas fágicas funcionales y el mutante no fue capaz de lisar las células bacterianas tras la inducción.

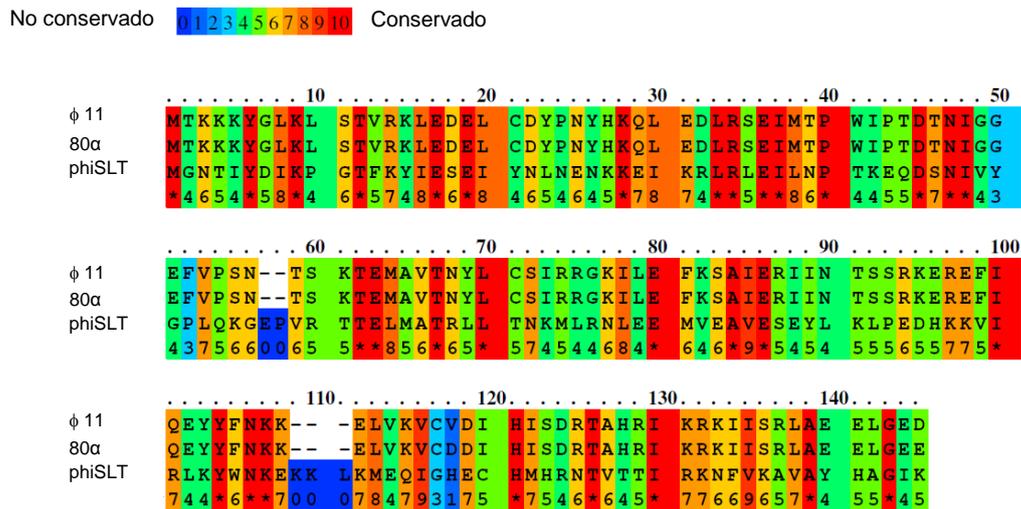


Figura 3.2. Homología de las proteínas RinA entre los fagos $\phi 11$, 80α y phiSLT. La gradación de colores indica la conservación relativa en cada posición de los aminoácidos, desde el rojo más conservado hasta el azul menos conservado (<http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>).

Para confirmar que el fenotipo observado se debía únicamente al gen mutado *rinA*, clonamos el gen deletado de los fagos $\phi 11$ y phiSLT en el plásmido pCN51 bajo el control de un promotor inducible por cadmio, generando los plásmidos pJP740 (pCN51-*rinA* _{$\phi 11$}) y pJP838 (pCN51-*rinA*_{phiSLT}), los cuales se transfirieron a sus respectivos mutantes. Tras la inducción con MC de las cepas complementadas se restauró el empaquetamiento, la lisis y la producción de partículas fágicas viables (Tabla 3.1), confirmando así su importancia en el empaquetamiento y la lisis de los fagos. De forma similar, la complementación de las cepas mutantes en *rinA* restauró el empaquetamiento y la transferencia de las islas (Tabla 3.1).

Por el contrario, en los mutantes en el gen *rinB* no se afectó la producción de partículas fágicas viables o la transferencia de las islas (resultados no mostrados), lo que sugiere que este gen no posee una función reguladora dentro del ciclo del fago.

RinA es un activador transcripcional del módulo de morfogénesis y lisis.

Los resultados anteriores sugerían que RinA podría controlar el empaquetamiento de los fago y de las SaPIs a través del control de la expresión de los genes implicados en este proceso. Para estudiar si la disminución en el empaquetamiento observada en el mutante en *rinA* era debido a una reducción en la expresión de los genes implicados en este proceso, medimos la expresión de diferentes genes representativos del módulo de morfogénesis y lisis utilizando PCR cuantitativa (PCRq). Para ello, indujimos con MC las cepas RN451, lisogénica para el fago $\phi 11$, y su derivado mutante en *rinA* JP4028 y se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 30 y 45 min) para posteriormente cuantificar la expresión relativa de las ORFs 29, 32, 39, 49 y 53 (Figura 3.3).

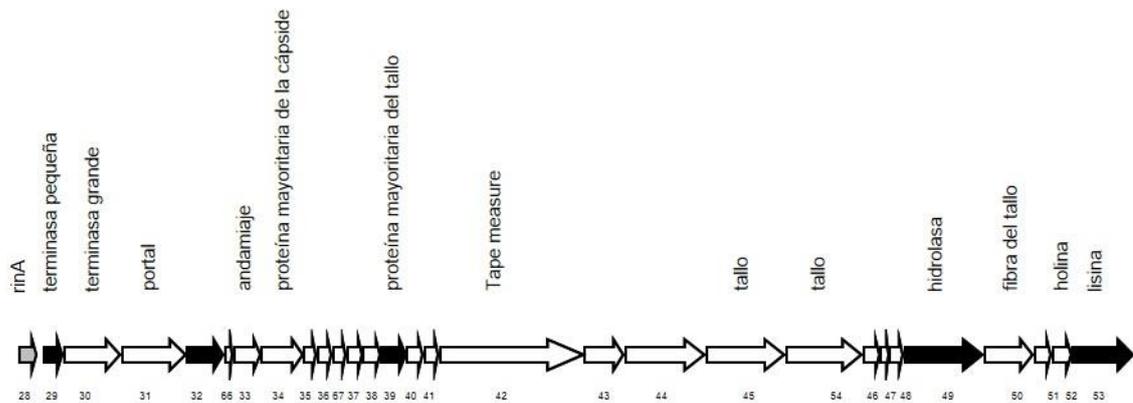


Figura 3.3. Representación esquemática de la localización de *rinA* junto con los genes que forman parte del módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$. Están marcados en negro aquellos genes utilizados en el estudio de la expresión mediante RT-PCRq.

La ORF 29 es el primer gen del módulo de empaquetamiento y codifica para la subunidad pequeña de la terminasa (TerS). La ORF32 interviene en la formación de la cápside proteica mientras que la ORF39 codifica para la proteína mayoritaria del tallo. Estas tres proteínas son imprescindibles para el empaquetamiento del DNA del fago. Asimismo, y puesto que el mutante en *rinA* no era capaz de lisar la bacteria tras la inducción, estudiamos la expresión relativa de dos genes representativos del módulo de lisis, la ORF49 (hidrolasa) y la ORF53 (lisina). Como podemos ver en la figura 3.4, la delección de *rinA* ocasionaba una disminución significativa ($P < 0.05$) de la expresión de los genes que intervienen en el empaquetamiento fágico y en la lisis bacteriana. Estos resultados sugieren que efectivamente existe una expresión temporal de estos

genes y que RinA es un activador transcripcional del módulo de morfogénesis y lisis del fago.

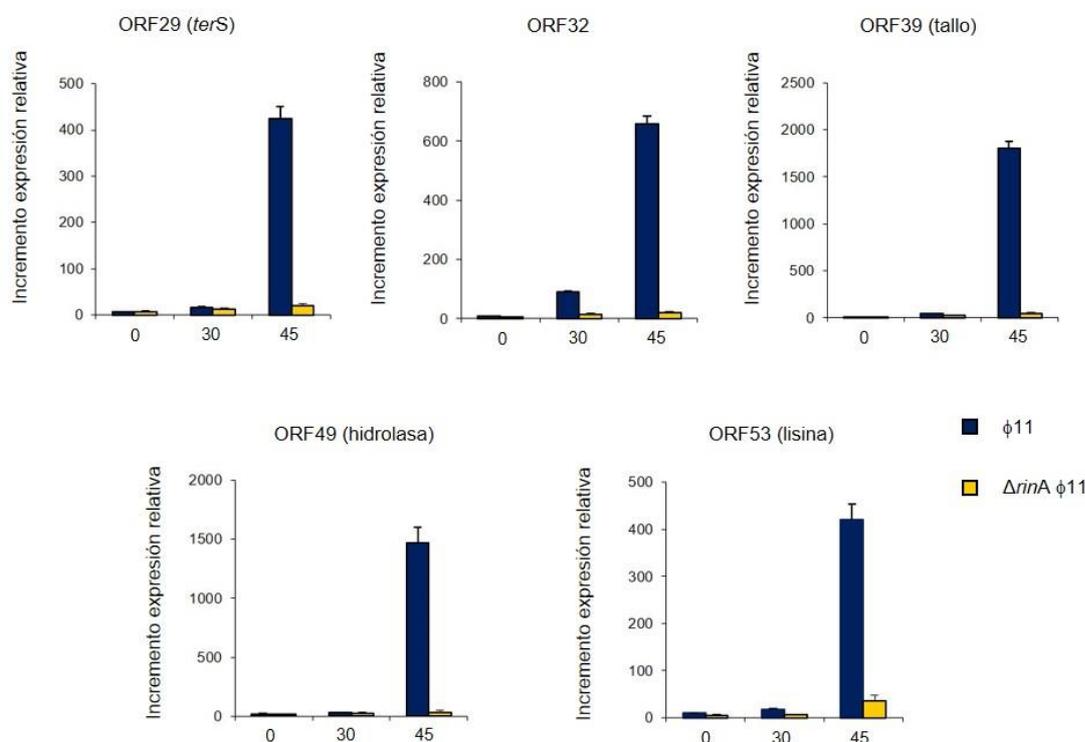


Figura 3.4. Cuantificación de la expresión relativa a tiempo real de diferentes genes del módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$ en la cepa salvaje y mutante en *rinA*. Se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 30 y 45 min) después de la inducción con MC de las cepas RN451 ($\phi 11$) en azul y JP4028 ($\Delta rinA \phi 11$) en amarillo. La expresión de cada gen se normalizó con respecto a la expresión del gen *gyrB*. La cuantificación relativa mediante el método de Livak descrito en el aparato de material y métodos (Livak and Schmittgen, 2001).

Identificación de un promotor inducible por RinA.

Los estudios previos sugerían la existencia de al menos un promotor controlado directamente por RinA. Basándonos en la organización del genoma del fago $\phi 11$ (Figura 3.3), este promotor podría estar situado justo aguas arriba del gen que codifica para la terminasa pequeña del fago (ORF 29; *TerS*), ya que supuestamente éste es el primer gen del módulo de morfogénesis. Para determinar el posible sitio de inicio de la transcripción del gen *terS* y la localización de este posible promotor se realizó un análisis mediante 5' RACE del RNA total aislado tras la inducción con MC de la cepa RN451 ($\phi 11$). Como se observa en la figura 3.5, se identificó un sitio de inicio de la

transcripción en el RNA aislado 60 minutos después de la inducción de la cepa salvaje que se corresponde con una C localizada 23 bp aguas arriba del codón de inicio ATG del gen *terS*.



Figura 3.5. Identificación del sitio de inicio de la transcripción del gen *terS* mediante análisis de 5' RACE. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción del gen *terS*, localizado 23 bp aguas arriba del codón ATG.

El resultado anterior sugería la existencia de una región promotora en posición 5' al inicio de la transcripción, en la región intergénica comprendida entre los genes *rinA* y *terS*. Para demostrar la existencia de esta región promotora, se realizó un clonaje en el plásmido pCN41 de la región intergénica entre *rinA* y *terS* junto con la región 5' del gen que codifica para la *terS*, la cual se fusionó con el gen indicador de la β -lactamasa, generando el plásmido pJP742 (ver esquema en figura 3.6). Se introdujo este plásmido en la cepa RN451, lisogénica para el fago ϕ 11 y en su derivado mutante en *rinA* (cepa JP4028), y se analizó la transcripción del indicador β -lactamasa tras la inducción del fago. Nuestra hipótesis era que si en la región clonada en el plásmido existía una región promotora dependiente de RinA, la expresión de RinA desde el fago activaría la expresión del gen reportero presente en el plásmido. Como se observa en la figura 3.6 la expresión del indicador se incrementó significativamente tras la inducción del fago en la cepa salvaje RN451 pero no en la cepa mutante en *rinA*, confirmando la existencia de un promotor controlado por RinA.

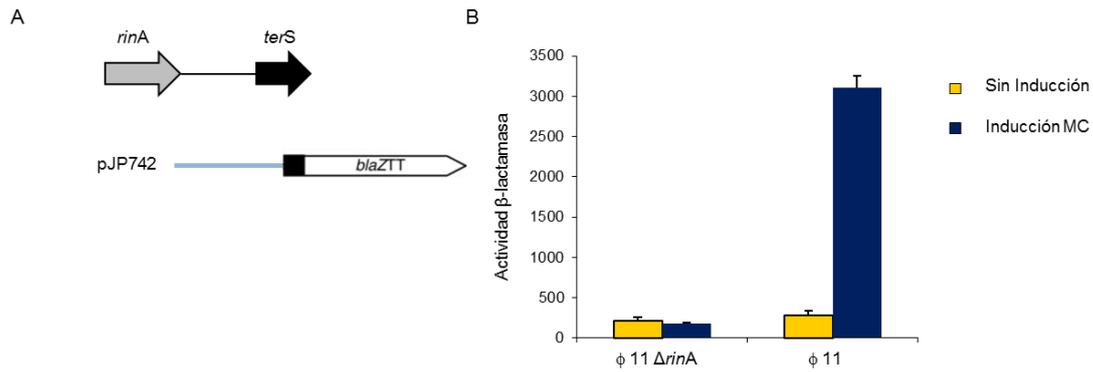


Figura 3.6. Efecto de la mutación en *rinA* en la transcripción de la *terS*. A) Representación esquemática del clonaje en el plásmido pCN41 de la región promotora entre *rinA* y *terS* del fago $\phi 11$. B) Las cepas RN451 y JP4028 con el plásmido pJP742 (pCN41 *terS*-*blaZ*) se indujeron con MC y se tomaron muestras a las 90 min para realizar un ensayo de la actividad β -lactamasa.

RinA es suficiente para activar la expresión de *terS*.

En vista de los resultados obtenidos, nos preguntamos si la expresión de RinA sería suficiente para inducir la expresión de *terS* en ausencia del resto de proteínas codificadas por el fago. Para comprobar nuestra hipótesis utilizamos el plásmido pCN42, el cual contiene un promotor inducible por cadmio y el gen indicador de la β -lactamasa. Clonamos en este plásmido el fragmento de PCR que contenía la secuencia codificante de *rinA*, cuya expresión estaría controlada por el promotor de cadmio, el promotor de *terS* y la región 5' codificante del gen *terS* fusionada al indicador de β -lactamasa, generando el plásmido pJP743 (ver esquema en Figura 3.7). Como control amplificamos la misma región usando como molde el DNA del mutante en *rinA* del fago $\phi 11$ (JP4028), generando el plásmido pJP744, en el cual *rinA* no se expresa. Se introdujeron ambos plásmidos en la cepa RN4220 y se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa. Como muestra la figura 3.7, sólo se obtuvo expresión del indicador en la cepa RN4220 con el plásmido que expresaba el gen *rinA*, confirmando los resultados anteriores e indicando que RinA es el único factor codificado por el fago necesario para la expresión de *terS*. Asimismo, la ausencia de expresión del indicador de la β -lactamasa en el plásmido mutante en *rinA* sugiere la existencia de un terminador transcripcional en la zona intergénica entre los genes *rinA* y *terS*.

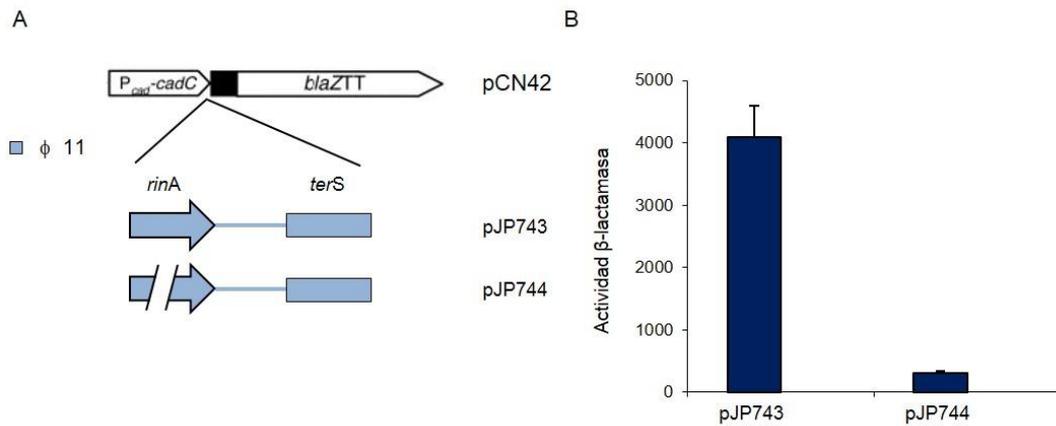


Figura 3.7. Actividad de la proteína RinA. A) Representación esquemática de las diferentes fusiones transcripcionales del fago $\phi 11$. B) Las cepas RN4220 que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de actividad β -lactamasa.

Con el objetivo de caracterizar un poco mejor la región promotora controlada por RinA, utilizamos el fago $\phi 69$. Este fago, aunque presenta un módulo de morfogénesis (incluyendo *terS*) idéntico al del fago $\phi 11$, codifica una proteína RinA con únicamente un 37% de identidad con la del fago $\phi 11$ (Figura 3.8).

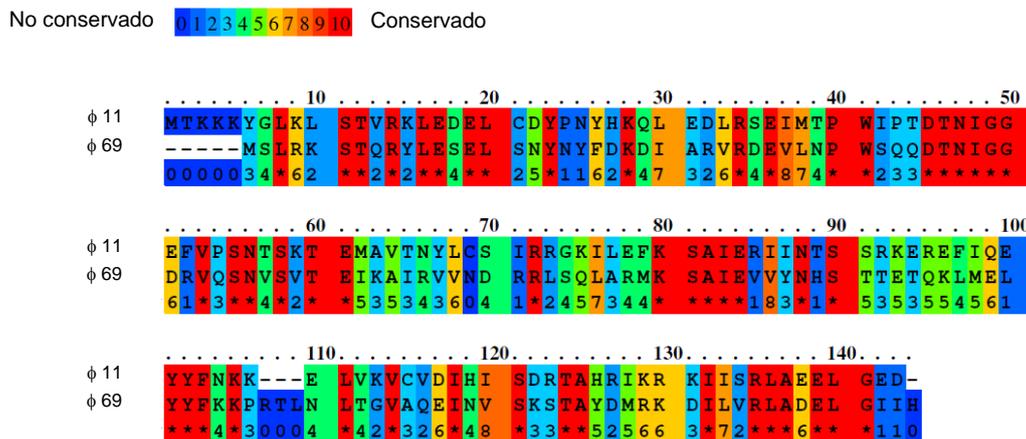


Figura 3.8. Homología de las proteínas RinA entre los fagos $\phi 11$ y $\phi 69$. <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

Además, y tal y como se muestra en la figura 3.9, al comparar las regiones comprendidas entre los genes *rinA* y *terS* observamos la existencia de una región divergente en ambos fagos, situada al final de *rinA*, que a su vez contenía dos repeticiones directas, también diferentes en los dos fagos.

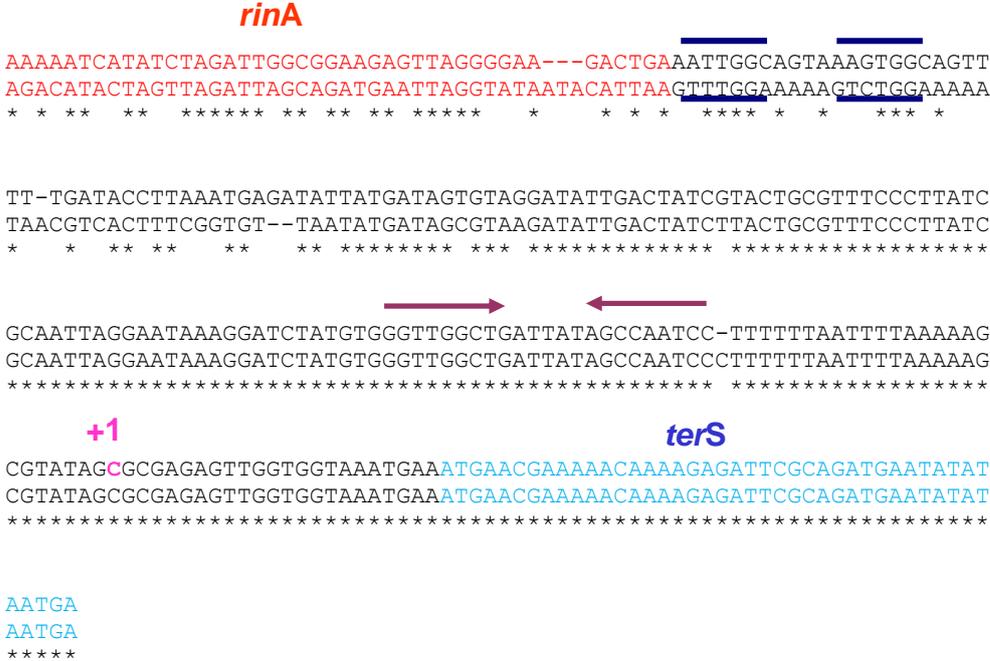


Figura 3.9. Representación esquemática de la región intergénica entre *rinA* y *terS* de los fagos φ11 (línea superior) y φ69 (línea inferior). Los asteriscos muestran los nucleótidos conservados entre ambos. Las secuencias que corresponden al final del gen *rinA* y el principio del gen *terS* están marcadas en rojo y azul respectivamente. El nucleótido +1 que marca el inicio de la transcripción del gen *terS* en el fago φ11 está marcado en rosa. Las flechas indican las repeticiones invertidas que podrían ser un posible terminador transcripcional. Las líneas azules muestran las secuencias con repeticiones directas que podrían intervenir en la unión de la proteína RinA.

Nuestra hipótesis fue que esa región divergente contenía el sitio de unión de RinA. Para confirmar esta hipótesis, en primer lugar comprobamos que la proteína RinA del fago φ69 también funcionaba como un activador transcripcional. Para ello se clonaron en el plásmido pCN42 la secuencia codificante del gen *rinA* del fago φ69 bajo el control del promotor inducible por cadmio, el promotor de *terS* y la región 5' codificante del gen *terS* del fago φ69 fusionada al indicador de β-lactamasa, generando el plásmido pJP746. Como control generamos el plásmido pJP747 que contiene la región anterior pero es mutante en *rinA*. Como se puede observar en la

figura 3.10 la proteína RinA del fago $\phi 69$ es necesaria y suficiente para activar la expresión de su propia *terS*.

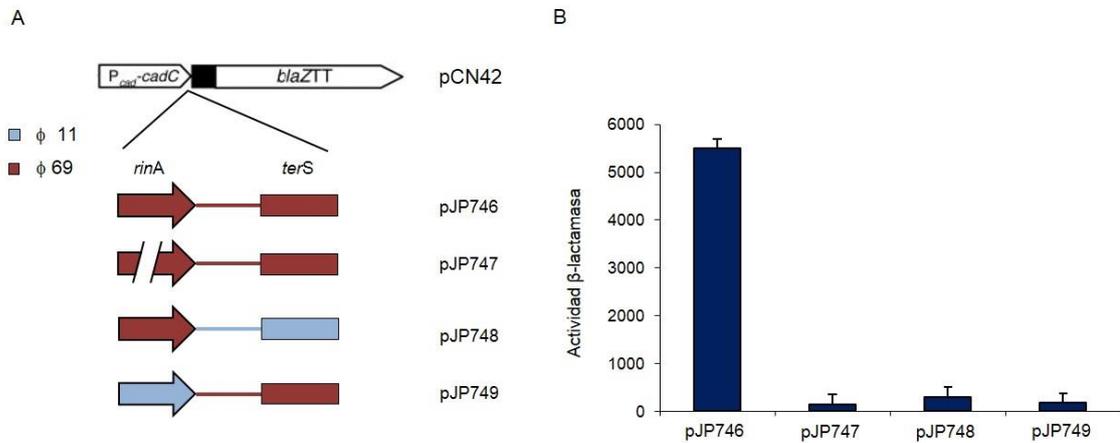


Figura 3.10. Especificidad de la proteína RinA. A) Representación esquemática de las diferentes fusiones transcripcionales de los fagos $\phi 11$ y $\phi 69$. B) Las cepas RN4220 que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa.

A continuación realizamos un ensayo de reactividad cruzada entre las proteínas RinA de los fagos $\phi 11$ y $\phi 69$ analizando la capacidad de ambas proteínas para inducir la expresión del gen *terS* del otro fago. Para llevar a cabo este ensayo generamos el plásmido pJP748, un derivado del plásmido pCN42 que posee la región codificante de *rinA* _{$\phi 11$} (bajo el control de *Pcad*), y las regiones promotora y 5' codificante de la *terS* del fago $\phi 69$ fusionada al indicador de β -lactamasa. Por otro lado generamos el plásmido pJP749, también derivado del pCN42 pero con la región codificante de *rinA* _{$\phi 69$} (bajo el control de *Pcad*), y la región promotora y la región 5' codificante de la *terS* del fago $\phi 11$ fusionada al indicador de β -lactamasa. Como se puede observar en la figura 3.10, no existe activación cruzada y las diferentes proteínas RinA activan únicamente la expresión de su propia *terS*.

Como se había comentado, al analizar detenidamente la secuencia intergénica entre *rinA* y *terS* de estos fagos podemos observar que existe una elevada homología desde la región codificante 5' del gen *terS* hasta 120 bp aguas arriba del inicio de la transcripción para después divergir significativamente (Figura 3.9). Dado la baja homología entre las dos proteínas RinA y que no existe reactividad cruzada entre ellas los resultados anteriores sugieren que cada una de las proteínas reconoce de manera específica la secuencia divergente para ejercer su función reguladora.

RinA se une al promotor de *terS*.

Los resultados obtenidos sugerían que la proteína RinA se unía específicamente a la región promotora del gen *terS*. Para comprobarlo se sobrexpresó en *E. coli* la proteína RinA del fago $\phi 11$ y se purificó para realizar un ensayo de electroforesis en gel de retardo. La proteína recombinante RinA purificada se incubó con un fragmento de PCR de 272 bp que comprendía la presunta región promotora de *terS* con el extremo marcado (Figura 3.11.A).

A

rinA

aaaaatcatatctagattg~~gcggaagagttaggggaagactga~~aat**tggcagt**aaag**tggcagt**tttt

gataccttaaatgagatattatgatagtgtaggatattgactatcgtactgcgtttcccttatcgcaa

ttaggaataaaggatctatgtgggttggctgattatagccaatccttttttaattttaaaagcgtat

agcgcgagagttggtggtaaatgaaatgaa**cgaaaaacaaaagagattcgcagatgaat**atataatga

terS

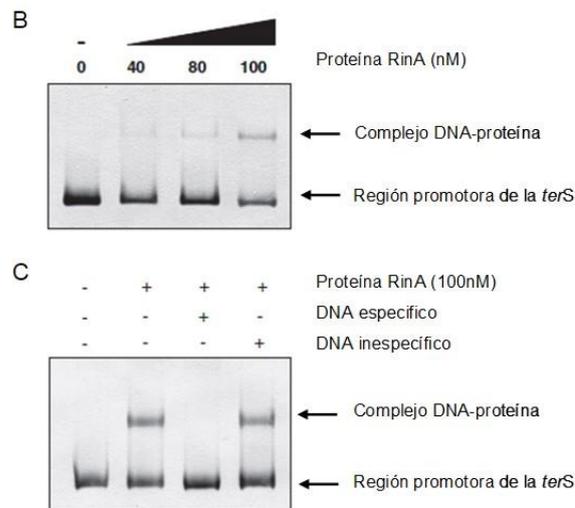


Figura 3.11. Experimentos de unión de la proteína RinA a la región promotora del gen *terS*. A) Representación esquemática de la región promotora de la *terS* del fago $\phi 11$ utilizada como molde del fragmento de PCR marcado en los ensayos de electroforesis en gel de retardo. B) Se midió la movilidad electroforética de un fragmento marcado con digoxigenina en presencia de cantidades crecientes de proteína purificada RinA del fago $\phi 11$. C) En los ensayos de competición se añadió un exceso (500 veces) de fragmentos específicos e inespecíficos de DNA no marcado. En todos los casos la concentración de la sonda marcada con digoxigenina fue de 21 nM.

Como se observa en la figura 3.11.B y C, la proteína recombinante RinA se une a esta región promotora de manera específica, confirmando que RinA es un activador transcripcional de la *terS*.

Caracterización de la unidad transcripcional regulada por RinA.

Después de caracterizar el promotor de *terS* dependiente de RinA quisimos saber si existían, dentro de los módulos de morfogénesis y de lisis, otros promotores que pudiesen estar controlados por RinA. El gen *terS* es el primero de los genes que forman parte del módulo de morfogénesis y lisis del fago, todos ellos codificados en el mismo sentido y con poca separación intergénica entre ellos. Este hecho sugeriría que estos genes podrían ser transcritos conjuntamente en un único transcrito desde la *terS* hasta los genes de lisis.

En un intento de caracterizar este posible transcrito se realizaron ensayos de northern blot con RNA extraído tras la infección de los fagos $\phi 11$ y 80α utilizando sondas que hibridaban en diferentes genes dentro del módulo de morfogénesis y lisis. En ambos casos se obtuvieron bandas de hibridación específica que aparecían a los tiempos adecuados pero todas ellas tenían un tamaño de entre 2-4 Kb (Figura 3.12.A). Este hecho sugiere la existencia de múltiples puntos de inicio de la transcripción a lo largo del módulo de empaquetamiento, o bien que este RNA es rápidamente procesado. La existencia de múltiples puntos de inicio de la transcripción originaría múltiples RNAs con el extremo 5' trifosfato. En un intento por determinar el número de promotores presente en el genoma del fago se realizó un Southern blot con DNA del fago 80α digerido con diversos enzimas de restricción. Como sondas utilizamos RNA marcado específicamente en el extremo terminal 5' de una extracción de RNA total tras la infección de la cepa RN450 con el fago 80α . Utilizando esta metodología sólo se marca el inicio no procesado de cada transcrito, por lo que cada banda que se observe en el Southern blot se corresponderá con un transcrito diferente. Aunque esta técnica no nos permite identificar inequívocamente el número exacto de transcritos sí que nos indica que el número total de promotores dentro del genoma del fago es relativamente bajo, ya que en la mayoría de carriles de las diferentes digestiones únicamente aparecen marcadas dos o tres bandas, lo que se correspondería con dos o tres inicios de la transcripción en todo el genoma del fago 80α (incluyendo los diferentes módulos). Al analizar los diferentes patrones podemos ver que en el caso de algunos fragmentos largos, que incluirían gran parte de la región final del fago, no

existía marca para ellos, lo que sugeriría la existencia de un único promotor para estos genes tardíos (Figura 3.12.B).

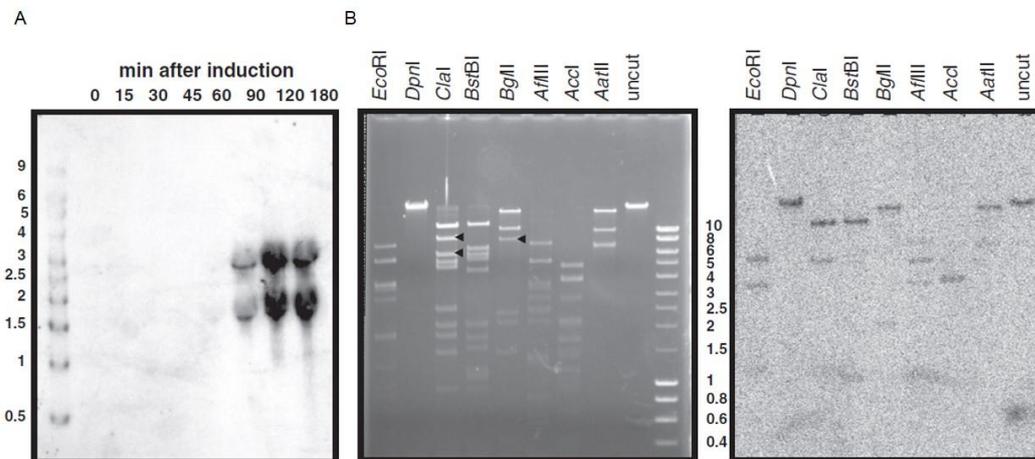


Figura 3.12. Detección de los sitios de inicio de la transcripción del genoma del fago 80 α . A) Análisis por northern blot del RNA extraído a los tiempos indicados después de la infección de la cepa RN450 con el fago 80 α . Se utilizó como sonda un fragmento marcado del gen *terS*. A la izquierda aparecen los tamaños en Kb del marcador. B) Gel de agarosa (centro) y Southern blot (derecha) del DNA del fago 80 α digerido con los enzimas indicados en la parte superior e hibridado con el RNA total extraído después de la infección a diferentes tiempos y marcado en el extremo 5' trifosfato. A la derecha del gel aparecen los tamaños en Kb del marcador. Las flechas negras en el gel muestran fragmentos de la región tardía que no son detectadas en el Southern blot, pero cuya hibridación sería esperable si hubiese sitios de inicios de transcritos adicionales aparte del ya caracterizado para la *terS*

Con el objetivo de caracterizar mejor el transcrito de los genes tardíos se extrajo RNA a los 60 min tras la infección con el fago 80 α de la cepa RN450, y posteriormente se convirtió en cDNA para realizar una RT-PCR utilizando oligonucleótidos que hibridarían en las regiones flanqueantes de las regiones intergénicas presentes a lo largo del módulo de morfogénesis y lisis del fago. En el caso de que existiese más de un transcrito no se obtendría producto de PCR con las parejas de oligonucleótidos flanqueantes del inicio y final de los transcritos adyacentes, mientras que si por el contrario sólo existe un transcrito (desde *terS* hasta los genes de lisis) se obtendría producto de PCR en todas las reacciones. Esto último es lo que ocurrió, ya que obtuvimos producto de PCR con todas las parejas de oligonucleótidos testados (desde *terL* hasta la ORF69). No obstante, no se obtuvo producto de PCR de la amplificación de la región intergénica entre la ORF69 y la holina (ORF70), ni entre la holina y la lisina (ORF71). Este hecho podría indicar la

existencia de dos nuevos promotores, aunque tanto el tamaño de la región intergénica entre ellos, de 58 y 12 nt respectivamente, así como la imposibilidad de determinar el inicio de la transcripción por 5' RACE, nos sugieren que la ausencia del amplificado se debería a un procesamiento del RNA o a la presencia de estructuras secundarias de RNA que interferirían con la síntesis del cDNA.

Dado que los anteriores experimentos en absoluto resultaron concluyentes a la hora de determinar si existían nuevas regiones promotoras controladas por RinA a lo largo de los módulos de morfogénesis y de lisis de los fagos estafilocócicos, decidimos utilizar una aproximación completamente diferente. Para ello, reemplazamos en la cepa RN451, lisogénica para el fago ϕ 11, la región intergénica entre *rinA* y *terS* del fago ϕ 11 por la región correspondiente del fago ϕ 69, generando la cepa JP7188. Posteriormente se introdujo en esta cepa la isla SaPIbov1 *tst::tetM*, generando la cepa JP7242. En el caso de que existiese un promotor adicional dependiente de RinA que controlara la expresión de los genes de lisis, en estas cepas se produciría la lisis de las bacterias tras la inducción con MC, aunque no se generarían partículas fágicas o de isla funcionales, ya que la proteína RinA del fago ϕ 11 no se uniría a la región del fago ϕ 69. Por el contrario, si todos los genes son co-transcritos desde el promotor situado en el extremo 5' de la *terS*, estas cepas además de no poder producir partículas fágicas o de isla viables, no serían capaces de lisar las células bacterianas. Después de inducir estas cepas observamos que no se producía lisis de las bacterias sugiriendo que no existía otro promotor RinA dependiente controlando los genes de lisis celular.

Tabla 3.2. Efecto en el título de fago y en la transferencia de las SaPIs en el mutante de intercambio de la región intergénica entre *rinA* y *terS* del fago ϕ 11^a.

ϕ	Cepa donadora	SaPI	Plásmido	Título fago ^b	Título transducción ^c
ϕ 11- ϕ 69 quimera	JP7188			< 10	
ϕ 11- ϕ 69 quimera	JP7242	SaPIbov1		< 10	1.2 x 10 ³
ϕ 11- ϕ 69 quimera	JP7218		pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ69}	< 10	
ϕ 11- ϕ 69 quimera	JP7243	SaPIbov1	pCN51- <i>rinA</i> _{ϕ69}	< 10	4.2 x 10 ⁶

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^cNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Finalmente, estas cepas quiméricas fueron complementadas con el plásmido pJP741 (pCN51-*rinA*_{φ69}), que sobreexpresa la proteína RinA del fago φ69. Estas cepas complementadas fueron capaces de lisar y de producir partículas de SaPIbov1 funcionales después de inducirlas con MC. Sin embargo, no se observaron partículas funcionales de fago, debido posiblemente a las diferencias en los niveles de expresión de la proteína RinA o a que ésta no se expresa en el momento adecuado en el ciclo de inducción del fago (Tabla 3.2). En conjunto, estos resultados sugieren que existe una sola unidad transcripcional que va desde el promotor dependiente de RinA situado aguas arriba del gen *terS* hasta los genes de lisis del fago.

RinA no controla la expresión de la Integrasa.

RinA había sido descrito inicialmente como un regulador necesario para la activación de la expresión de la integrasa del fago φ11 (Ye, *et al.*, 1993). En un intento por confirmar el posible papel de RinA en la activación de la expresión de la integrasa se realizó PCR cuantitativa para medir la expresión de *int* en la cepa salvaje y en el mutante en *rinA* del fago φ11 después de la inducción de ambas cepas. Como muestra la figura 3.13 la expresión de la *int* no se veía afectada en el mutante en *rinA*, sugiriendo que RinA no interviene directamente en el control de la expresión de la integrasa, al menos en las condiciones utilizadas en este estudio.

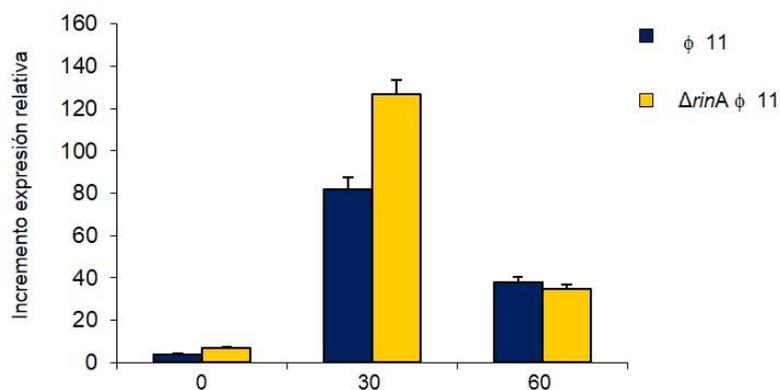


Figura 3.13. Cuantificación de la expresión relativa a tiempo real del gen de la integrasa del fago φ11. Se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 30 y 60 min) después de la inducción con MC de las cepas RN451 (φ11) y JP4028 (ΔrinA φ11). La expresión de cada gen se normalizó con respecto a la expresión del gen *gyrB*. La cuantificación relativa mediante el método de Livak descrito en el aparato de material y métodos (Livak and Schmittgen, 2001).

Adicionalmente y para confirmar este resultado, analizamos la actividad de Int en el mutante en RinA. Estudios previos habían identificado a la proteína Int como esencial para la integración y escisión del fago $\phi 11$ (Ye *et al.*, 1990). Por lo tanto, en el caso de que RinA controlara la expresión de la integrasa, en el mutante en *rinA* se vería afectada la escisión del fago. Realizamos una PCR con oligonucleótidos específicos de la región flanqueante del *att_B* del fago $\phi 11$ para medir la capacidad de escisión de la cepa salvaje y del mutante en *rinA*. Como control se utilizó la cepa mutante en *int* que no es capaz de escindir. Como era de esperar, el mutante en *rinA* escinde en igual medida que la cepa salvaje (Figura 3.14), mientras que no se produce escisión en el mutante en *int* del fago $\phi 11$. Estos resultados confirman que RinA no interviene en la regulación de la expresión de la integrasa del fago $\phi 11$.

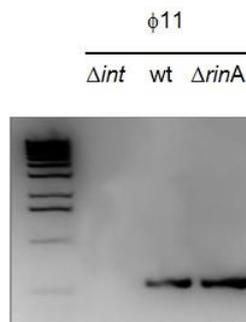


Figura 3.14. PCR de escisión. Tras la extracción de DNA de muestras tomadas de un cultivo a los 60 minutos tras la inducción con MC, se llevó a cabo la PCR utilizando oligonucleótidos específicos de las regiones flanqueantes al *att_B* del fago $\phi 11$. Marcador (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen), RN451 Δint $\phi 11$ (carril 1), RN451 $\phi 11$ (carril 2), RN451 $\Delta rinA$ $\phi 11$ (carril 3).

Homólogos a RinA controlan el empaquetamiento de fagos de bacterias Gram positivas.

La proteína RinA del fago $\phi 11$ es el prototipo de una familia de proteínas conservadas y ampliamente distribuida entre otros bacteriófagos de Gram-positivos. Podemos encontrar homólogos a RinA en diversos fagos que infectan a otras bacterias Gram positivas (Tabla 3.3), por lo que nos planteamos la posibilidad de que este mecanismo descrito para RinA sea un mecanismo general de control del empaquetamiento y lisis de fagos de Gram-positivos.

Tabla 3.3. Homólogos de RinA en fagos de bacterias Gram-positivas.

Especie	Número de acceso
<i>Lactobacillus casei</i>	YP_001987048.1
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ZP_03073841.1
<i>Bacillus thuringiensis serovar pakistani str.</i>	ZP_04123836.1
<i>Geobacillus sp. G11MC16</i>	ZP_03149736.1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ACT61868.1
<i>Enterococcus faecalis</i>	AAO81076.1
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	YP_003353517.1
<i>Clostridium thermocellum</i>	ABN53671.1
<i>Streptococcus suis</i>	ZP_03626078.1
<i>Clostridium botulinum</i>	EES48701.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	ADB68097.1
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	YP_003429885.1
<i>Clostridium phage phiSM101</i>	YP_699949.1
<i>Streptococcus equi subsp. equi</i>	YP_002747279.1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ACA36251.1
<i>Lactococcus phage phiLC3</i>	AAS66802.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ABF36520.1
<i>Lactobacillus jensenii</i>	ZP_05861716.1
<i>Bacillus cereus</i>	ZP_04240708.1
<i>Bacillus clausii</i>	YP_176339.1
<i>Streptococcus phage NZ131.2</i>	YP_002285775.1
<i>Listeria welshimeri</i>	YP_849416.1
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ZP_00782383.1

Para evaluar el papel de estas proteínas homólogas a RinA en el control de la expresión de los genes de empaquetamiento, clonamos en el plásmido pCN42 la región codificante del gen homólogo a *rinA*, la posible región promotora localizada aguas arriba de la *terS* y la región 5' codificante del gen *terS* fusionado al gen reportero β -lactamasa, de los profagos encontrados en *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* y *Lactococcus lactis* (Tabla 3.3), generando los plásmidos pJP535 (*E. faecalis*), pJP543 (*S. pyogenes*), pJP564 (*L. lactis*). Como control se generaron los plásmidos con las mismas construcciones pero mutantes en el gen homólogo a *rinA* (plásmidos pJP537, pJP544, pJP565). Estos plásmidos se introdujeron en la cepa RN4220 para realizar un ensayo de expresión del indicador de la β -lactamasa.

Como se puede observar en la figura 3.15, se produjo un aumento de la expresión de *terS* en las cepas con los plásmidos donde estaba clonado el gen *rinA*, confirmando que los homólogos a RinA son funcionales y que la RNA polimerasa de *S. aureus* era capaz de interactuar con las diferentes proteínas RinA y de reconocer las regiones promotoras clonadas.

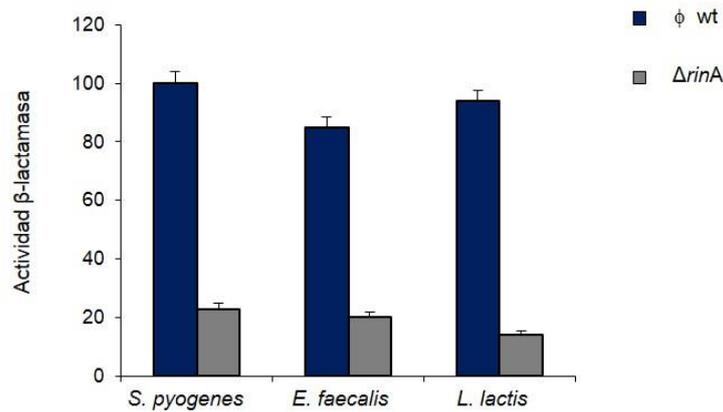


Figura 3.15. Análisis transcripcional de homólogos de RinA en fagos de bacterias Gram-positivas.

En resumen, podemos decir que la activación por RinA de los genes de transcripción tardía es una estrategia ampliamente distribuida y utilizada por los bacteriófagos de Gram-positivos para controlar el empaquetamiento fágico y la lisis bacteriana mediada por fagos.

**II. UNA SUPERFAMILIA DE REGULADORES
TRANSCRIPCIONALES CONTROLA EL
EMPAQUETAMIENTO Y LA LISIS DE BACTERIÓFAGOS
DE GRAM-POSITIVOS**

A pesar de la amplia distribución de la proteína RinA entre bacteriófagos de bacterias Gram-positivas, muchos de los fagos secuenciados que infectan a este tipo de bacterias no codifican para homólogos de RinA, lo que sugería la existencia de otras proteínas que desempeñarían el mismo papel regulador, o la existencia de otros mecanismos implicados en la activación de los genes tardíos de estos fagos. En el caso de que el primer supuesto fuese cierto, al realizar una búsqueda extensiva dentro de las bases de datos de genomas existentes analizando genes codificados en posiciones similares dentro de sus genomas y con características bioquímicas y funcionales análogas a las descritas para la proteína RinA encontraríamos otros posibles reguladores de la transcripción tardía de bacteriófagos en Gram-positivos.

Identificación de posibles reguladores en diferentes fagos de bacterias Gram-positivas.

Como hemos demostrado, la proteína RinA es un activador transcripcional de los genes tardíos presente en bacteriófagos de bacterias Gram-positivas. Aunque como hemos visto las proteínas RinA puedan diferir en algunos casos en cuanto a su secuencia, todas ellas poseen una serie de características comunes: son proteínas básicas y pequeñas de alrededor de 130 residuos y están situadas justo aguas arriba del gen de la terminasa pequeña (*terS*), el primer gen del módulo de morfogénesis y lisis.

Teniendo en cuenta estas características analizamos las bases de datos de genomas en busca de proteínas que compartieran estas características y la misma localización en el genoma del fago, y como resultado encontramos cuatro familias de proteínas diferentes a RinA. Aunque no presentaban homología de secuencia (Tabla 3.4, Figura 3.16), todas ellas cumplían las características anteriormente mencionadas para RinA, referente a carga, tamaño y posición en el genoma, lo que sugería que podían ser reguladores transcripcionales del módulo de morfogénesis y de lisis de sus respectivos fagos. Por ello, las denominamos de forma genérica Ltr, por las singlas en inglés de Late transcriptional regulators. Al igual que ocurría con RinA, estas proteínas estaban presentes en diferentes bacteriófagos que infectan una gran variedad de especies bacterianas, entre las que podemos encontrar *S. aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *E. faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus*, *Macrococcus caseolyticus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. suis*, *L. casei*, *Brevibacillus brevis*, *Listeria innocua* y *L. monocytogenes* (Tabla 3.4 y Figura 3.16).

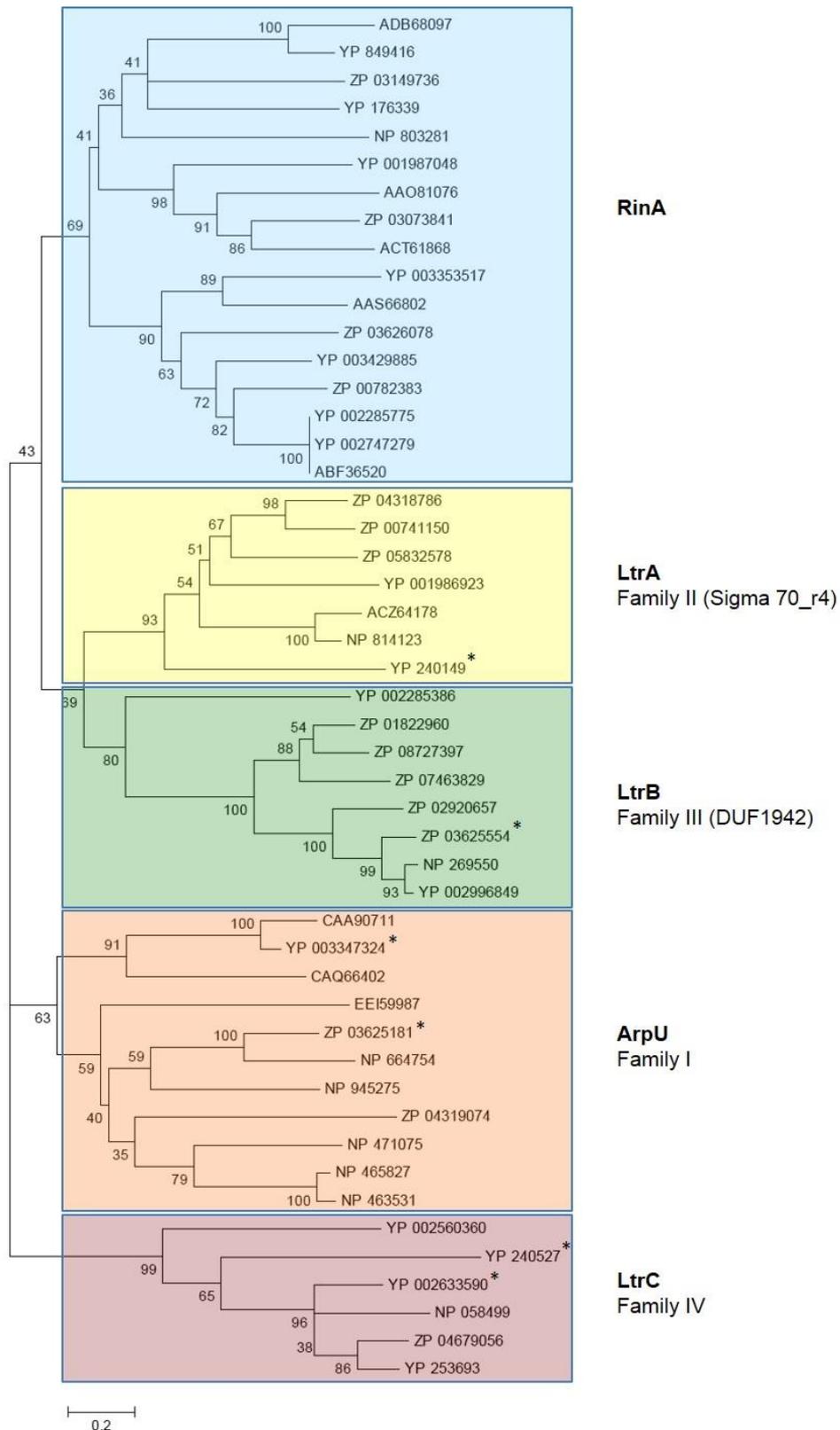


Figura 3.16. Árbol filogenético de las proteínas Ltr. Para realizar la comparativa se ha utilizado el programa MEGA5. Los números indican los valores de los intervalos de confianza. Los asteriscos indican los reguladores caracterizados en este estudio.

Tabla 3.4. Homólogos de las proteínas Ltr en fagos de bacterias Gram-positivas.

Especie	Número de acceso
Familia I: ArpU	
<i>Enterococcus hirae</i>	CAA90711
<i>Enterococcus faecalis</i> phage phiFL2A	YP_003347324*
<i>Enterococcus faecium</i> TX1330	EEI59987
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	ZP_04319074
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	CAQ66402
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	NP_465827
<i>Listeria innocua</i> Clip 11262	NP_471075
<i>Listeria</i> phage A118	NP_463531
<i>Streptococcus pneumoniae</i> EJ-1	NP_945275
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	ZP_03625181*
<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315	NP_664754
Familia II: LtrA (Sigma_70 r4)	
<i>Staphylococcus</i> phage ϕ 37	YP_240149*
<i>Enterococcus faecalis</i> phage phiFL4A	ACZ64178
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	NP_814123
<i>Enterococcus faecium</i> C68	ZP_05832578
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	ZP_04318786
<i>Bacillus tuingensis</i> ATCC 35646	ZP_00741150
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	YP_001986923
<i>Enterococcus faecium</i> C68	ZP_05832578
Familia III: LtrB (DUF1492)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ZP_01822960
<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	ZP_03625554*
<i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131	YP_002285386
<i>Streptococcus pyogenes</i> M1 GAS	NP_269550
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	YP_002996849
<i>Streptococcus infantarius</i>	ZP_02920657
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	ZP_07463829
<i>Streptococcus urinalis</i>	ZP_08727397
Familia IV: LtrC (Homologos ORF34 ϕ55)	
<i>Staphylococcus aureus</i> phage 55	YP_240527*
<i>Staphylococcus</i> phage PVL	NP_058499
<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	YP_002633590*
<i>Staphylococcus warneri</i> L37603	ZP_04679056
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435	YP_253693
<i>Macrococcus caseolyticus</i> JCSC5402	YP_002560360
<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 100599	YP_002774582

*Proteínas caracterizadas en este estudio.

Como hemos mencionado anteriormente, estas cuatro familias de proteínas, junto con la previamente descrita RinA, formarían una superfamilia de proteínas implicadas en la expresión de los genes tardíos de los fagos.

La primera familia se corresponde con homólogos de la proteína ArpU, que fue descrita por primera vez como un regulador del enzima celular muramidasa-2 de *Enterococcus hirae* (LLeo *et al.*, 1995), aunque no se ha llevado a cabo mayor caracterización de la misma. Inicialmente se describió como un gen codificado por la bacteria, pero el análisis de la secuencia en la base de datos demuestra que este gen está codificado en el genoma de un fago. Dado que existen muchos fagos anotados que han utilizado el nombre de ArpU al anotar las proteínas, hemos decidido mantener este nombre como identificador de esta familia de proteínas. Encontramos homólogos de ArpU en un gran número de bacteriófagos de distintos géneros bacterianos como Lactococco, Estreptococo o Enterococo, siendo después de RinA la familia de proteínas más diseminada.

La segunda familia, a la que hemos denominado LtrA, estaría formada por un grupo de proteínas con baja similitud con la región 4 de algunos factores sigma (Sigma70_r4) de la RNA polimerasa. Esta región de la subunidad sigma está involucrada en el reconocimiento de la secuencia -35 de algunos promotores (Dombroski *et al.*, 1992), lo que indica que estas proteínas podrían tener la capacidad de unirse al DNA y reconocer específicamente regiones promotoras.

La tercera familia, LtrB, está formada por proteínas con el dominio DUF1492. Este dominio de proteínas está altamente conservado entre los fagos de Estreptococos aunque se desconoce su función.

Finalmente la última familia identificada, LtrC, está formada por proteínas homólogas a la ORF34 del fago ϕ 55 de *S. aureus* cuya función también se desconoce. Al contrario que con las otras familias, esta familia de proteínas no ha sido identificada como tal previamente en las bases de datos. Asimismo, esta familia de proteínas parece estar principalmente distribuida entre fagos que infectan a Estafilococos.

Como se ha comentado anteriormente, las diferentes familias de proteínas reguladoras presentan una baja identidad en cuanto a su secuencia en nucleótidos. Como se observa en la figura 3.17 al analizar la homología entre estas familias de proteínas no se observa ningún tipo de similitud.

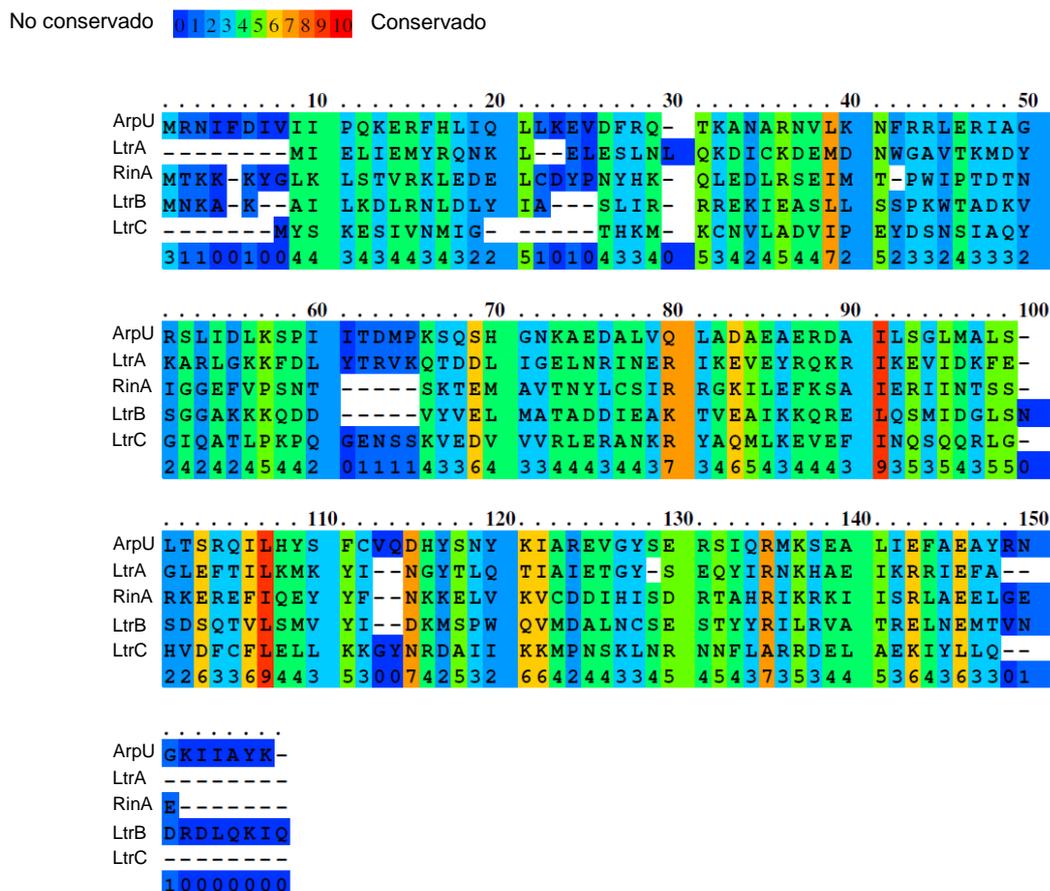


Figura 3.17 Homología de las diferentes proteínas Ltr. Se ha escogido para la alineación un representante de cada familia de las diferentes proteínas Ltr. ArpU (*E. faecalis* fago phiFL2A; YP_003347324); LtrA (*S. aureus* fago ϕ 37; YP_240149); RinA (*S. aureus*, fago 80 α ; YP_001285353); LtrB (*Streptococcus suis* 89/1591; ZP_03625554); LtrC (*S. aureus* fago ϕ 55; YP_240527). <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

Sin embargo, al analizar estas mismas secuencias empleando métodos de búsqueda de motivos HMM y de reconocimiento de plegamiento de proteínas se observa que comparten un dominio conservado, con alta similitud estructural que comprende el motivo C-terminal de estas proteínas (Figura 3.18).

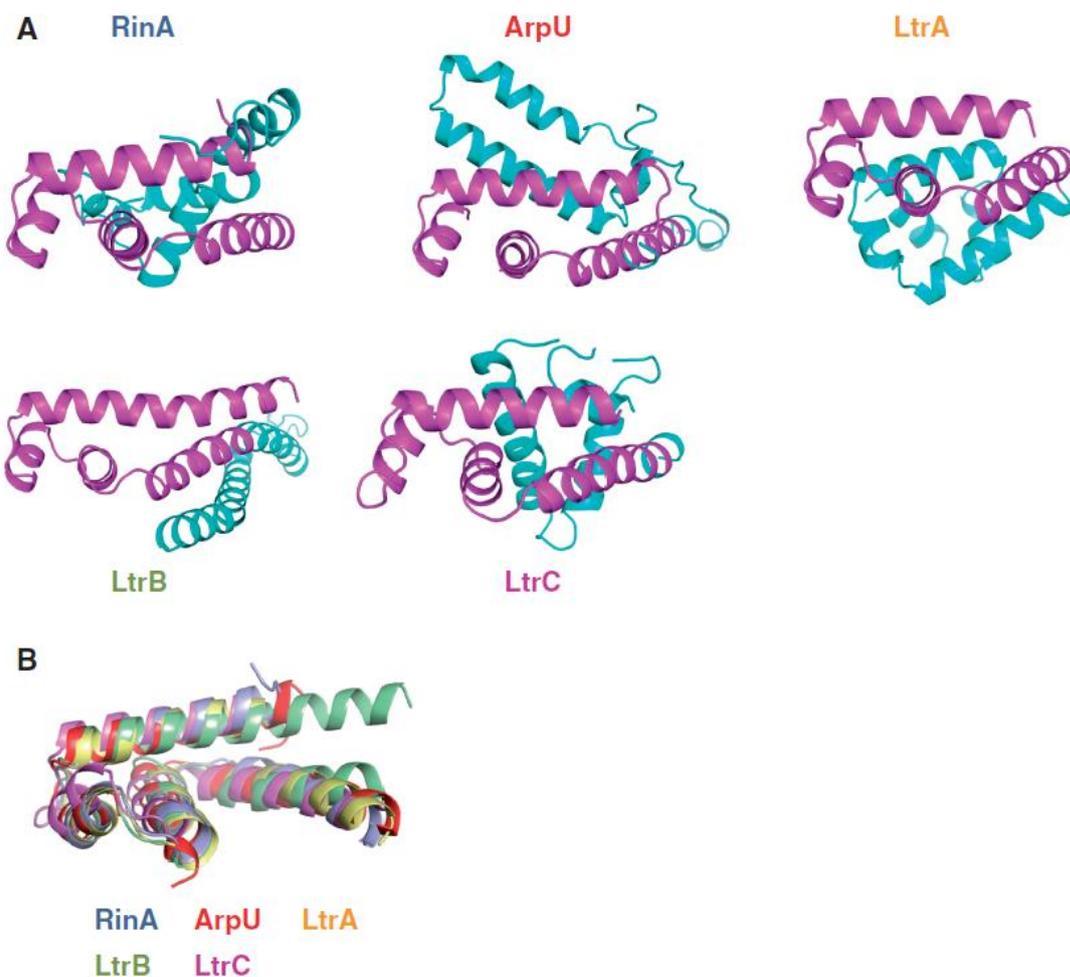


Figura 3.18 Modelaje de las proteínas Ltr. Se ha utilizado el método de Markov para detectar homología remota entre proteínas (Karplus *et al.*, 1998). A) Representación esquemática de la estructura predicha de los representantes de las diferentes familias de proteínas Ltr. Se distinguen los dos dominios, el dominio N-terminal coloreado de azul y el C-terminal coloreado de morado. B) Superposición del dominio C-terminal de las diferentes proteínas Ltr. La estructura de este dominio es virtualmente idéntica en todos los casos.

La delección de los genes *ltr* elimina la producción de partículas fágicas.

Con el objetivo de caracterizar estas proteínas y determinar su papel como posibles activadores transcripcionales se eligieron dos candidatos de las familias ArpU (proteína ArpU del fago phiFL2A de *E. faecalis*, YP_003347324) y LtrC (proteína codificada por la ORF34 del fago ϕ 55 de *S. aureus*, YP_240527). Escogimos estas proteínas porque ambas están codificadas por fagos funcionales, capaces de transducir otros elementos genéticos móviles y pertenecen a las dos familias de posibles reguladores más divergentes a RinA (Figura 3.16).

Para su caracterización, se obtuvieron mutantes por delección de ambos genes en sus profagos correspondientes, phiFL2A y $\phi 55$, generando las cepas JP8039 (phiFL2A $\Delta arpU$) y JP8071 ($\phi 55 \Delta ltrC$) respectivamente. Posteriormente, ambos mutantes, junto con las cepas salvajes, se indujeron con MC y se analizó el ciclo del fago (ERP) así como la capacidad de ambos mutantes de producir partículas infectivas. Para ello, se indujeron con MC las cepas salvajes y los mutantes y se tomaron muestras a los 0, 60 o 90 minutos tras la inducción. Una vez procesadas, las muestras se separaron en un gel de agarosa, donde se fotografiaron, para realizar posteriormente un Southern blot con una sonda específica para cada fago. Asumimos que si se observa una banda significativa de replicación, el fago previamente debe haber escindido correctamente. Como se observa en la figura 3.19, en ninguno de los dos casos se vio afectada la replicación del mutante, ya que la intensidad de la banda de replicación es similar a la que presenta la cepa salvaje.



Figura 3.19. Estudio de la replicación de los mutantes en *arpU* del fago phiFL2A y *ltrC* del fago $\phi 55$. Tras la inducción con MC de cada cepa, se tomaron muestras a los tiempos indicados y una vez procesadas, las muestras se separaron en un gel de agarosa para a continuación realizar un Southern blot con una sonda específica para cada fago. La banda que aparece a los 60 ($\phi 55$) o 90 (phiFL2A) min se corresponde con el bulk de DNA que incluye el DNA cromosomal y el DNA del fago en replicación.

A continuación testamos la capacidad de ambos mutantes para producir partículas infectivas funcionales. Como se puede ver en la tabla 3.5, la delección de las proteínas Ltr eliminó la producción de partículas fágicas funcionales. Al mismo tiempo no se observó lisis de los mutantes en *arpU* y *ltrC* tras la inducción con MC, sugiriendo que ambos mutantes tendrían afectada la expresión de los genes de lisis.

Tabla 3.5. Efecto en el título del fago en los mutantes de las proteínas Ltr^a.

Cepa donadora	Fago	Plásmido	Título fago ^b
JP6880	phiFL2A		1.3 x 10 ⁷
JP8039	phiFL2A Δ <i>arpU</i>		< 100
JP8841	phiFL2A Δ <i>arpU</i>	pBT2- <i>arpU</i> _{phiFL2A}	7 x 10 ⁴
JP2348	ϕ 55		1.1 x 10 ⁸
JP8071	ϕ 55 Δ <i>ORF34</i>		< 10
JP8172	ϕ 55 Δ <i>ORF34</i>	pCN51- <i>ltrC</i> _{ϕ55}	9.6 x 10 ⁴

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 o JH2-2 como cepa receptora.

Para comprobar que el fenotipo observado se debía al gen deletado, se generaron los plásmidos pJP1115 (pBT2-*arpU*_{phiFL2A}) y pJP1054 (pCN51-*ltrC* _{ϕ 55}) donde se clonaron los genes *arpU* y *ltrC* de los fagos phiFL2A y ϕ 55 bajo el control de un promotor inducible por cadmio, y se introdujeron en las cepas mutantes correspondientes para realizar la complementación. La inducción con MC y cadmio de las cepas complementadas restauró el empaquetamiento, la lisis y la producción de partículas fágicas viables (Tabla 3.5), confirmando así el papel regulador de estas proteínas en sus respectivos fagos. Aunque en ambos casos se recuperó el título, éste no llegó a los niveles de las cepas salvajes, debido posiblemente a las diferencias en los niveles de expresión de las proteínas Ltr o a que éstas no se expresan en el momento adecuado en el ciclo de inducción del fago. La expresión desde el plásmido de las proteínas Ltr comportaría una expresión prematura de los genes tardíos del fago y por lo tanto se produciría el empaquetamiento y la lisis celular antes de que se haya producido correctamente la replicación del fago.

Las proteínas Ltr son activadores transcripcionales del módulo de morfogénesis y lisis.

Los resultados anteriores sugieren que al igual que ocurre con las proteínas RinA, las proteínas Ltr podrían controlar el empaquetamiento del fago mediante la regulación de la expresión de los genes del módulo de morfogénesis y lisis. Para estudiar si estos mutantes tenían afectada la expresión de los genes implicados en estos procesos medimos la expresión de diferentes genes representativos del módulo de morfogénesis y de lisis utilizando PCR cuantitativa. Para ello las cepas lisogénicas JP6888 (phiFL2A) y JP2348 (ϕ 55), y sus derivados mutantes en los genes *arpU* y *ltrC*,

se indujeron con MC, se tomaron muestras a diferentes tiempos (0, 60 y 90 min) y se cuantificaron los niveles de expresión relativa de los genes que codificaban para la proteína portal, la proteína mayoritaria de la cabeza, la proteína mayoritaria del tallo y la holina de cada fago (Figura 3.20). Como control medimos la expresión de los genes *ssb* y *dnaC* relacionados con la replicación del fago y que teóricamente pertenecen al transcrito temprano de ambos fagos, por lo que no deberían estar controladas por las proteínas Ltr.

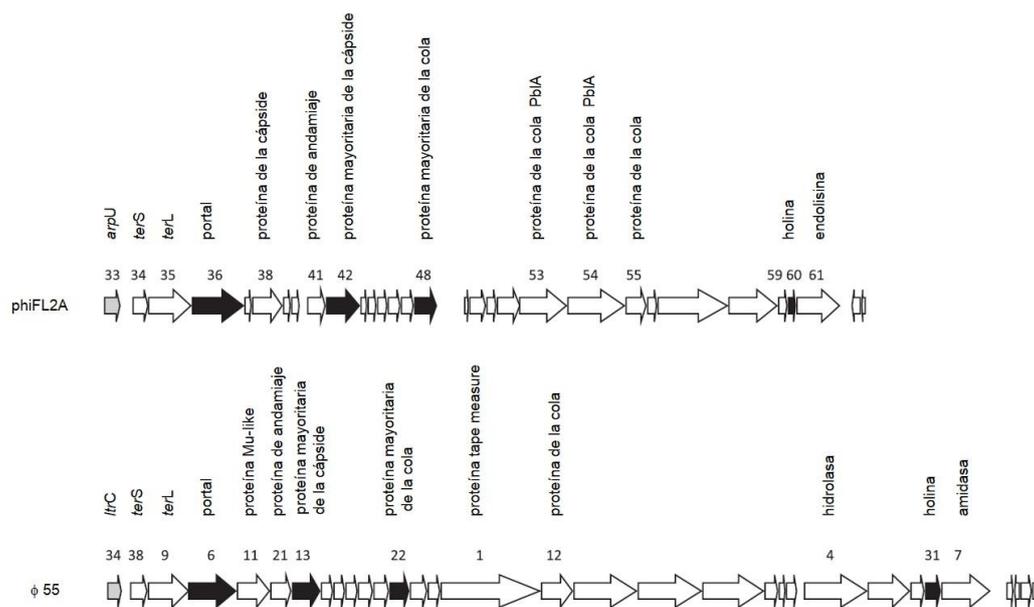


Figura 3.20. Representación esquemática de la localización de los genes *ltr* junto con los genes que forman parte del módulo de morfogénesis y lisis de los fagos phiFL2A y phi55. Están marcados en negro aquellos genes utilizados en el estudio de la expresión mediante RT-PCRq.

Como se observa en la Fig. 3.21, en los mutantes en los genes *ltr* se observa una disminución significativa ($P < 0.05$) de la expresión de los genes que intervienen en el empaquetamiento, formación de la cápside y lisis celular con respecto a la cepa salvaje, pero no en los genes de replicación. Estos resultados sugieren que las proteínas Ltr son activadores transcripcionales del módulo de morfogénesis y lisis de sus respectivos fagos.

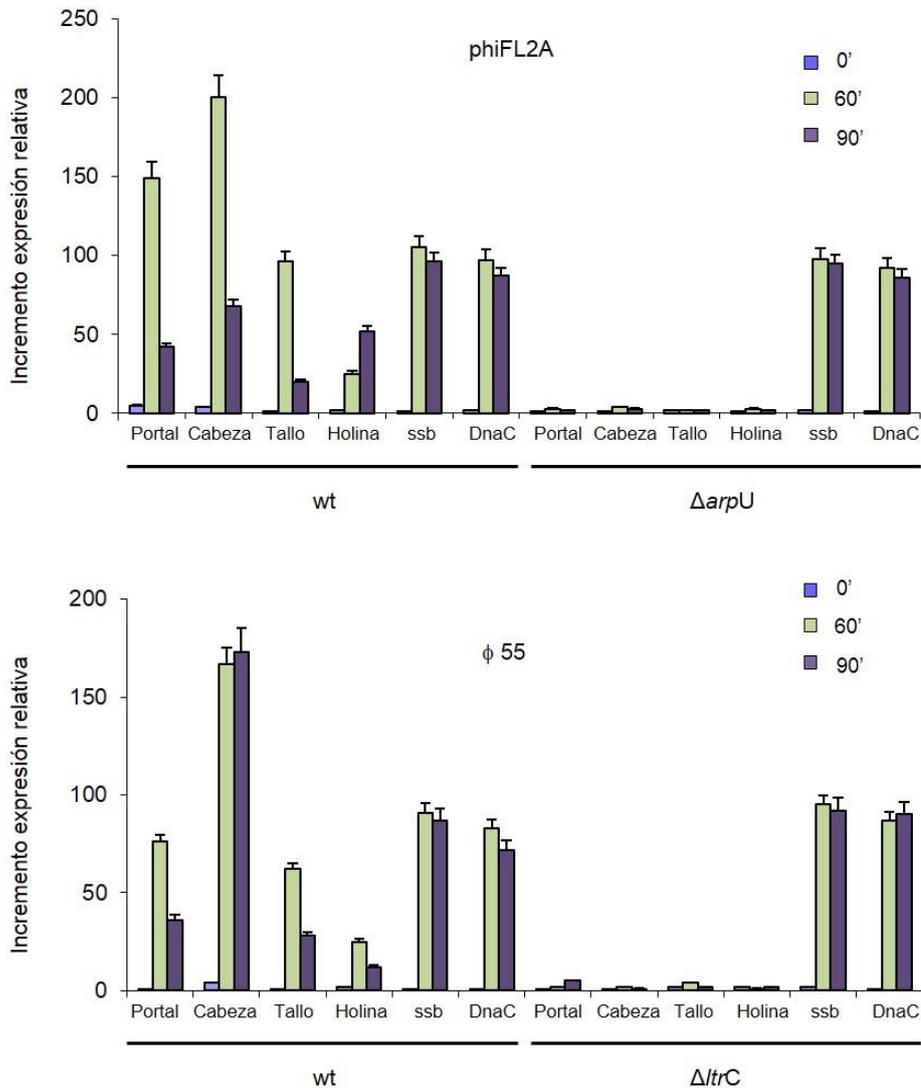


Figura 3.21. Cuantificación de la expresión relativa a tiempo real de diferentes genes del módulo de morfogénesis y lisis de los fagos phiFL2A y $\phi 55$ en las cepas salvajes y sus derivados mutantes en los genes *ltr*. Se tomaron muestras a distintos tiempos (0, 60 y 90 min) después de la inducción con MC de las cepas salvajes JP6880 (phiFL2A) y JP2348 ($\phi 55$) y las cepas mutantes JP8039 ($\Delta arpU$) y JP8071 (ΔtrC). La expresión de cada gen se normalizó con respecto a la expresión del gen *gyrB*. La cuantificación relativa mediante el método de Livak descrito en el aparato de material y métodos (Livak and Schmittgen, 2001).

Identificación de un promotor inducible por las proteínas Ltr aguas arriba de *terS*.

Según los estudios previos realizados sobre RinA y basándonos en la organización del genoma de los fagos phiFL2A y $\phi 55$ (Figura 3.20), decidimos analizar la existencia de un posible promotor controlado por las proteínas Ltr situado aguas arriba del gen de la terminasa pequeña (*terS*), el primer gen del módulo de morfogénesis. Para determinar el posible sitio de inicio de la transcripción de la *terS* y localizar este posible promotor, se realizó un análisis mediante 5' RACE del RNA total aislado tras la inducción con MC de las cepas JP6888 (phiFL2A) y JP2348 ($\phi 55$). Se identificó un sitio de inicio de la transcripción para cada uno de estos fagos, que se corresponde con una G localizada 28 bp ($\phi 55$) o 118 bp (phiFL2A) aguas arriba del codón de inicio ATG de *terS*.

Las proteínas Ltr son los únicos factores codificados por el fago necesarios para la expresión de *terS*.

Con el objetivo de confirmar la existencia de un promotor situado aguas arriba del gen *terS* y comprobar si la expresión de las proteínas Ltr es suficiente para inducir la expresión de *terS* en ausencia del resto de proteínas del fago, utilizamos el plásmido pCN42 que contiene un promotor inducible por cadmio y el gen indicador de la β -lactamasa. Clonamos en este plásmido el fragmento de PCR que contenía la secuencia codificante del gen *arpU* (phiFL2A) o *ltrC* ($\phi 55$), cuya expresión estaría controlada por el promotor de cadmio, el promotor de *terS* y la región 5' codificante del gen *terS* correspondiente fusionado al indicador de β -lactamasa, generando los plásmidos pJP1007 (phiFL2A) y pJP1046 ($\phi 55$). Como control amplificamos la misma región pero mutante en los genes *ltr* generando los plásmidos pJP1008 ($\Delta arpU_{\text{phiFL2A}}$) y pJP1047 ($\Delta ltrC$; ver esquema en figura 3.22).

Estos plásmidos se introdujeron en la cepa RN4220 y se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa. Como se observa en la figura 3.22 sólo se obtuvo expresión del indicador β -lactamasa en las cepas RN4220 con los plásmidos que expresaban las proteínas Ltr, confirmando que los reguladores ArpU y LtrC son los únicos factores codificados por el fago necesarios para la expresión de su respectiva *terS*. Asimismo, la ausencia de expresión del indicador de la β -lactamasa en el plásmido mutante en los reguladores Ltr sugiere que al igual que en el caso de RinA, existiría un terminador transcripcional en la zona intergénica entre los genes *ltr* y *terS*.

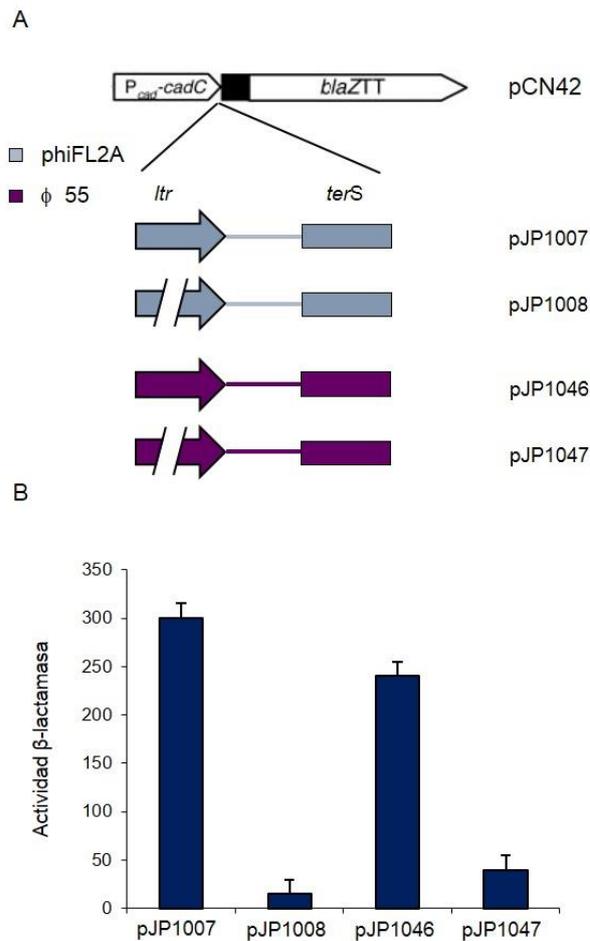


Figura 3.22. Actividad reguladora de las proteínas Ltr. A) Representación esquemática de las diferentes fusiones transcripcionales de los fagos phiFL2A y ϕ 55. B) Las cepas RN4220 que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa.

Especificidad y requerimientos mínimos para la unión de las proteínas Ltr.

La gran cantidad de secuencias de genomas de fagos que codifican para proteínas Ltr nos permite investigar tanto la especificidad como los requerimientos mínimos de DNA que posibilitan la unión de las proteínas Ltr.

Examinando un gran número de estos genomas se observa que fagos que codifican diferentes proteínas Ltr, a veces codifican en su genoma el mismo módulo de morfogénesis. Este es el caso de los fagos de *S. aureus* ϕ 55 y ϕ 29. Ambos fagos poseen un módulo de empaquetamiento muy similar. Sin embargo, el regulador de

empaquetamiento del fago $\phi 29$ es un homólogo de RinA (YP_240603), mientras que en el caso del fago $\phi 55$ es la proteína LtrC codificada por la ORF34 (Figura 3.23).

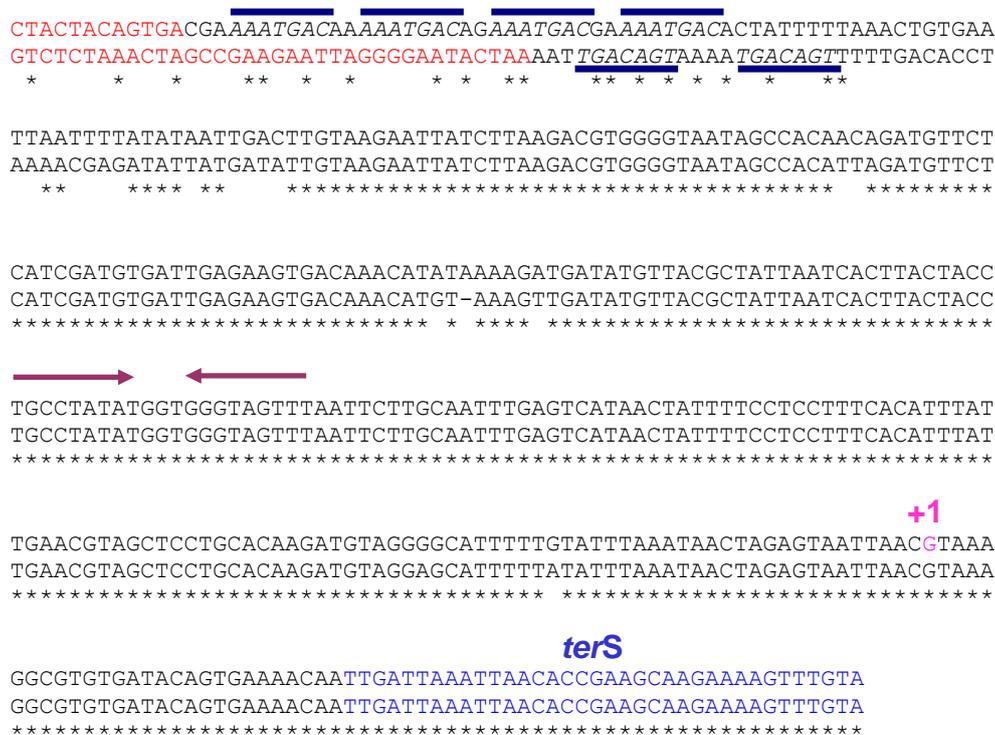


Figura 3.23. Representación esquemática de la región intergénica entre los genes *ltr* y *terS* de los fagos $\phi 55$ (línea superior) y $\phi 29$ (línea inferior). Los asteriscos muestran los nucleótidos conservados entre ambos. Las secuencias que corresponden al final del gen *ltr* y el principio del gen *terS* están marcadas en rojo y azul respectivamente. El nucleótido +1 que marca el inicio de la transcripción del gen *terS* en el fago $\phi 55$ está marcado en rosa. Las flechas indican las repeticiones invertidas que podrían ser un posible terminador transcripcional. Las líneas azules muestran las secuencias con repeticiones directas que podrían intervenir en la unión de la proteína Ltr.

Con el objetivo de comprobar la especificidad entre las distintas proteínas Ltr y las secuencias promotoras, examinamos si existía reactividad cruzada entre estos reguladores. Para ello, analizamos si el regulador RinA del fago $\phi 29$ era capaz de activar la expresión de *terS* del fago $\phi 55$, clonando el gen *rinA* del fago $\phi 29$ en el plásmido pCN51 e introduciendo dicho plásmido (pJP1114) en la cepa mutante en *ltrC* del fago $\phi 55$. Asimismo, también complementamos el mutante en *ltrC* con el plásmido

pJP1050, un derivado del plásmido pCN51 con el gen *arpU* del fago phiFL2A. Como se observa en la tabla 3.6, no existía reacción cruzada entre los diferentes reguladores, ya que sólo la cepa con la complementación del regulador del fago $\phi 55$ (pJP1115) fue capaz de restaurar el fenotipo salvaje.

Tabla 3.6. Efecto en el título del fago en el mutante en *ltrC* con los plásmidos con las diferentes proteínas Ltr^a.

Cepa donadora	Fago	Plásmido	Título fago ^b
JP8172	$\phi 55 \Delta ltrC$	pCN51- <i>ltrC</i> _{$\phi 55$}	9.6×10^4
JP8636	$\phi 55 \Delta ltrC$	pCN51- <i>rinA</i> _{$\phi 55$}	< 10
JP8635	$\phi 55 \Delta ltrC$	pCN51- <i>arpU</i> _{phiFL2A}	< 10

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220.

Al no existir reactividad cruzada entre las diferentes proteínas reguladoras examinamos qué zonas divergentes de la región intergénica podrían intervenir en la unión de la proteína reguladora. La región intergénica entre el gen que codifica para la proteína reguladora Ltr y el gen *terS* de los fagos $\phi 29$ y $\phi 55$, incluyendo el terminador y la región promotora de *terS*, es prácticamente idéntica excepto en el extremo 5' de esta región, justo después del final del gen que codifica para LtrC o RinA (Figura 3.23). En esta región divergente encontramos, tanto en el caso del fago $\phi 29$ como en del fago $\phi 55$, varias repeticiones directas situadas inmediatamente después del final del gen que codifica para los genes *ltr*. En el caso del fago $\phi 29$ (RinA _{$\phi 29$}), encontramos en la región intergénica el mismo número de repeticiones y con la misma longitud que aquellas observadas en la región intergénica entre *rinA* y *terS* del fago 80 α . Sin embargo aunque las repeticiones del fago $\phi 55$ tienen la misma longitud (que no la misma secuencia), en este caso su número es mayor, presentando cuatro repeticiones. Asimismo, al analizar la región intergénica entre *arpU* y *terS* del fago phiFL2A también encontramos tres repeticiones directas de 7 nucleótidos de longitud en la misma posición (Figura 3.24).

80 α	GAGTGA ^{AAAT} <u>TGGCAGT</u> AAAG <u>TGGCAGT</u> TTTTGATACCTAAAATGAG
ϕ 29	TACTAA ^{AAAT} <u>TGACAGT</u> AAAA <u>TGACAGT</u> TTTTGACACCTAAAACGAG
ϕ 55	CAGTGA ^{CGAA} <u>AAATGAC</u> AA <u>AAATGAC</u> AG <u>AAATGAC</u> GA <u>AAATGAC</u> ACT
phiFL2A	TAAATAA ^{TTTT} <u>TTGGCGG</u> TTTT <u>TTGGCGG</u> AAAAG <u>TTGGCGG</u> TTTTTATA

Figura 3.24. Representación esquemática de las diferentes repeticiones presentes en las regiones intergénicas de los fagos 80 α (RinA), ϕ 29 (RinA), ϕ 55 (LtrC) y phiFL2A (ArpU). Las secuencias corresponden al final del gen *ltr* (en rojo) y el principio de la región intergénica. Las repeticiones están subrayadas y resaltadas en negrita.

La presencia de estas repeticiones en el extremo 5' de las zonas divergentes de las regiones intergénicas de tres familias diferentes de reguladores sugeriría que estas repeticiones podrían ser el sitio de unión de las proteínas Ltr al DNA.

Para estudiar esta hipótesis nos planteamos comprobar si las repeticiones presentes en la región intergénica eran absolutamente necesarias para la actividad de la proteína Ltr. Para ello, clonamos en el plásmido pCN41 la región intergénica entre *rinA* y *terS* del fago ϕ 29, donde la región 5' del gen que codifica para la *terS* se fusionó con el gen indicador de la β -lactamasa. De la misma forma se realizaron otros tres clonajes en pCN41 donde se amplificó esta misma región pero cambiando los nucleótidos de la secuencia de las repeticiones por el nucleótido A, sustituyendo la primera, la segunda o ambas repeticiones. Estos plásmidos fueron introducidos en la cepa JP7904, cepa lisógena para el fago ϕ 29 y se analizó la expresión del indicador β -lactamasa tras la inducción del fago. Como se observa en la figura 3.25, únicamente se observó expresión del chivato en la cepa con el plásmido con las 2 repeticiones intactas.

Del mismo modo, analizamos el papel de las cuatro repeticiones presentes en la zona intergénica del fago ϕ 55. Así pues, mientras que la inducción del fago ϕ 55 incrementó la expresión del indicador β -lactamasa en la cepa lisógena para el fago ϕ 55 con el plásmido pJP1221, un derivado del pCN41 donde se amplificó la región intergénica entre *ltrC* y *terS* del fago ϕ 55, no se observó incremento de expresión de la β -lactamasa en la cepa lisogénica para el fago ϕ 55 con el plásmido pJP1227, en el que se amplificó la misma región pero sustituyendo la secuencia de las cuatro repeticiones por el nucleótido T (Figura 3.25). En un intento por determinar si es

necesaria la presencia de todas las repeticiones o no, se realizaron otros cuatro clonajes en los que únicamente se sustituyó una de las repeticiones por el nucleótido T. Estos plásmidos se introdujeron en la cepa lisógena para el fago $\phi 55$ (JP2348) y se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa después de la inducción del fago (Figura 3.25). En ninguna de estas cepas se observó incremento de la expresión del gen reportero, sugiriendo que todas las repeticiones son necesarias en el proceso de activación llevado a cabo por la proteína reguladora LtrC del fago $\phi 55$.

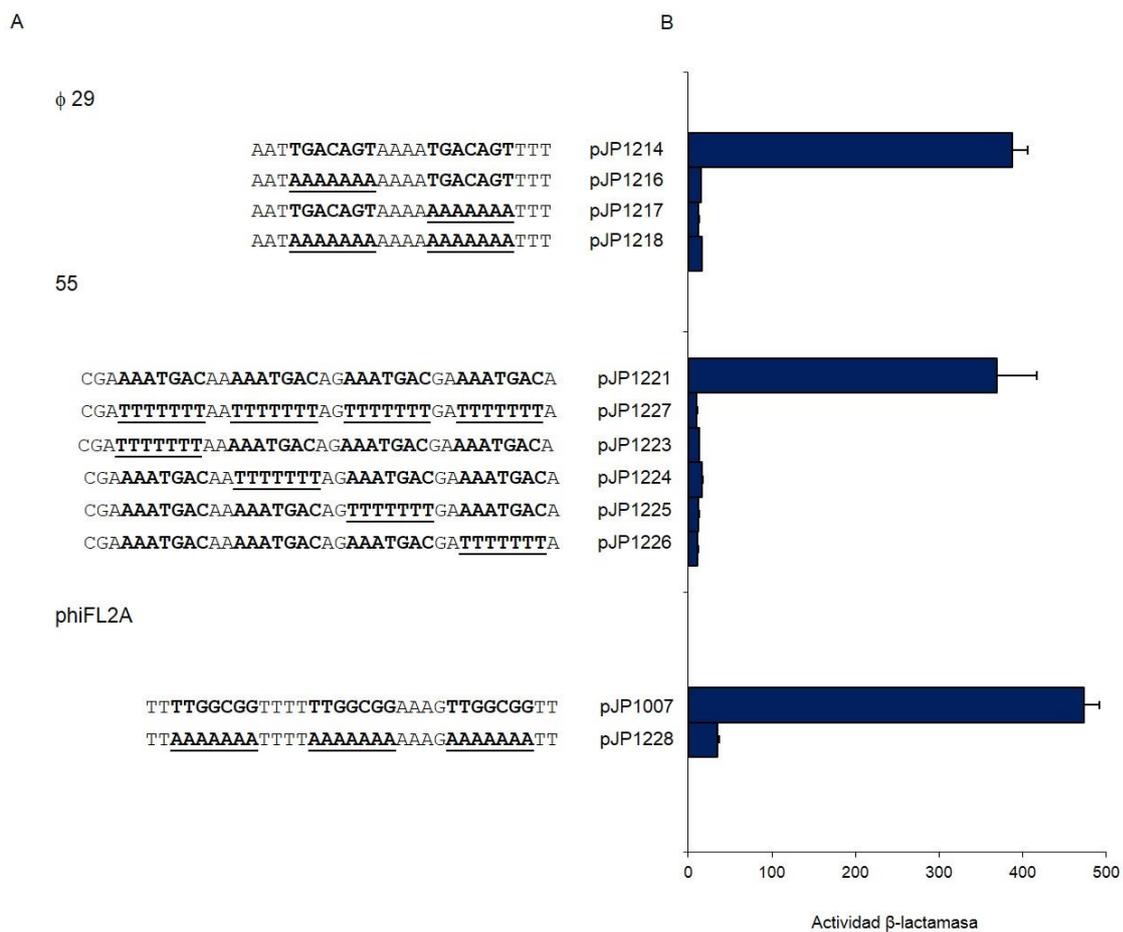


Figura 3.25. Papel de las repeticiones en la activación mediada por RinA, LtrC y ArpU. A) Representación esquemática de los plásmidos con las diferentes fusiones transcripcionales de los fagos $\phi 29$, $\phi 55$ y phiFL2A. Se resaltan las repeticiones en negrita y aquellas repeticiones mutadas aparecen subrayadas. B) Las cepas RN4220, o RN4220 lisógena para los fagos $\phi 29$ o $\phi 55$ según cada caso, que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de actividad de la β -lactamasa.

Por último analizamos las repeticiones presentes en el fago phiFL2A de *E. faecalis*. Como habíamos hecho anteriormente, decidimos caracterizar la posible zona de unión de la proteína ArpU y para ello utilizamos el plásmido anteriormente utilizado pJP1007. Como control generamos un derivado del plásmido pCN42 donde amplificamos la misma región pero sustituyendo la secuencia de las tres repeticiones por el nucleótido A (pJP1228). Estos plásmidos fueron introducidos en la cepa RN4220 y se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa después de la inducción con cadmio. Como se observa en la Figura 3.25, las repeticiones son necesarias para la transcripción de la *terS* dependiente de ArpU.

Así pues, estos resultados sugieren que las repeticiones directas presentes inmediatamente después de la región codificante de sus respectivas proteínas reguladoras serían las secuencias de reconocimiento para la unión de las proteínas Ltr. No obstante, no nos permiten afirmar si estas repeticiones son suficientes o no para posibilitar la unión de las proteínas Ltr. Con el objetivo de responder a esta pregunta utilizamos inicialmente los plásmidos pJP1207, pJP1214 y pJP1221. Estos derivados del plásmido pCN41 contienen la región promotora de la *terS*, incluyendo las repeticiones, y la región 5' codificante de la *terS* fusionada al indicador de la β -lactamasa, de los fagos 80 α , ϕ 29 y ϕ 55 respectivamente.

Tanto el fago 80 α como el ϕ 29 codifican para proteínas RinA con una homología muy elevada. Estos fagos también presentan unas repeticiones y la secuencia flanqueante a estas repeticiones prácticamente (aunque no completamente) idénticas. En cambio el resto de la secuencia que se amplificó para clonar en estos plásmidos, incluyendo la región intergénica y el inicio del gen *terS* son totalmente diferentes. Por el contrario, el fago ϕ 55 que codifica para LtrC tiene unas repeticiones y su secuencia flanqueante totalmente diferente de la presente en los fagos 80 α y ϕ 29, aunque como ya se había indicado anteriormente el resto de la secuencia amplificada del fago ϕ 55 es esencialmente idéntica a la presente en el fago ϕ 29 y totalmente diferente a la del fago 80 α . Una representación gráfica de estas secuencias se puede observar en las Figuras 3.23 y 3.26.

A

```

TGA AAT TGGCAGTAAAG TGGCAGTTTTTGTACCTAAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTGA
TAA AAT TGACAGTAAAA TGACAGTTTTTGTACACCTAAAACGAGATATTATGATATTGTAAGAATTATC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CTATCTTACTGCGTTTCCCTTATCGCAATTAGGAATAAAGGATCTATGTGGGTTGGCTGATTATAGCC
TTAAGACGTGGGGTAAATAGCCACATTAGATGTTCTCATCGATGTGATTGAGAAGTGACAAACATGTAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AATCCTTTTTTAAATTTTAAAAAGCGTATAGCGGAGAGTTGGTGGTAAATGAAATGAACGAAAAACAA
AGTTGATATGTTACGCTATTAATCACTTACTACCTGCCTATATGGTGGGTAGTTTAAATCTTGCAATT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAGAGATTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAAGCAGCAATTCAGCAGGTTA
TGAGTCATAACTATTTTCCCTTTCACATTTATTGAACGTAGCTCCTGCACAAGATGTAGGAGCATT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGATGTTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATATATTA
TTTATATTTAAATAACTAGAGTAATTAACGTAAAGGCGTGTGATACAGTGAAAACAAATTGATTA AATT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

B

```

ATATCTAGATTGGCGGAAGAGTTAGGGGAAGAGTGA AAT TGGCAGTAAAG TGGCAGTTTTTGTACCT
CTACTACAGTGA CGAAAATGACAAAATGACAGAAAATGACGAAAATGACACTATTTTAAACTGTGAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
AAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTGACTATCTTACTGCGTTTCCCTTATCGCAATTAGGAA
TTAATTTTATATAATTGACTTGTAAGAATTATCTTAAGACGTGGGGTAAATAGCCACAACAGATGTTCT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TAAAGGATCTATGTGGGTTGGCTGATTATAGCCAATCCTTTTTTAAATTTTAAAAAGCGTATAGCGGA
CATCGATGTGATTGAGAAGTGACAAACATATAAAGATGATATGTTACGCTATTAATCACTTACTACC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GAGTTGGTGGTAAATGAA ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATG
TGCCTATATGGTGGGTAGTTTAAATCTTGCAATTTGAGTCATAACTATTTTCCCTTTCACATTTAT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TAATGGTAAAAAAGCAGCAATTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGAT
TGAACGTAGCTCCTGCACAAGATGTAGGGCATTTTTGTATTTAAATAACTAGAGTAATTAACGTAAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TGTTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATATATTA
GGCGTGTGATACAGTGAAAACAAATTGATTA AATT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 3.26. Representación esquemática de la región intergénica entre los genes *ltr* y *terS*. A) fago 80α (línea superior) y φ29 (línea inferior). B) fago 80α (línea superior) y φ55 (inferior). Los asteriscos muestran los nucleótidos conservados entre ambos. Las secuencias que corresponden al final del gen *ltr* y el principio del gen *terS* están marcadas en rojo y azul respectivamente. Las líneas azules muestran las secuencias con repeticiones directas que podrían intervenir en la unión de la proteína Ltr.

Los plásmidos pJP1207 (80 α), pJP1214 (ϕ 29) y pJP1221 (ϕ 55) se introdujeron en las cepas RN10359 (80 α), JP7904 (ϕ 29) y JP2348 (ϕ 55), y los profagos residentes presentes en estas cepas se indujeron con MC. Posteriormente se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa. Como se muestra en la figura 3.27, solamente se obtuvo expresión del indicador en aquellas cepas que poseían la pareja fago y plásmido con la región de las repeticiones correspondiente al profago residente, confirmando la especificidad entre proteína Ltr y sus correspondientes repeticiones. Cabe destacar que aunque existe reacción cruzada entre las cepas RN10359 (80 α) y JP7904 (ϕ 29) y los plásmidos pJP1207 y pJP1214, la expresión del indicador es más elevada en aquellas cepas que poseen el fago y su plásmido correspondiente. Este fenómeno se analizará más adelante.

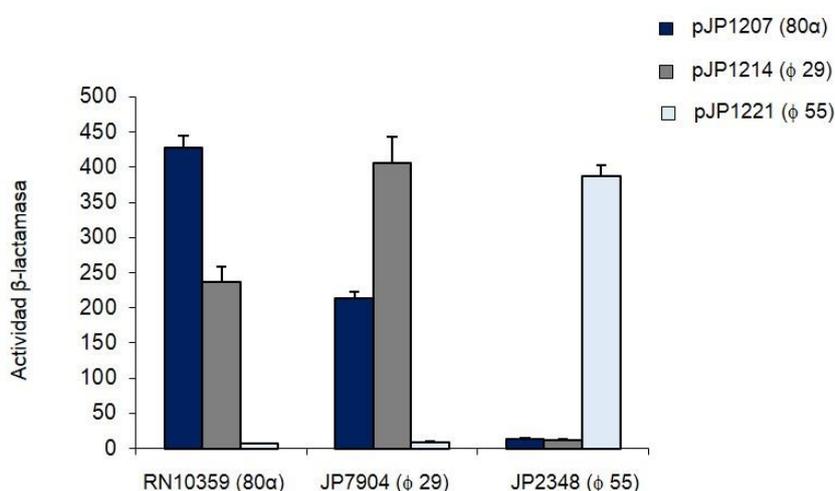


Figura 3.27. Ensayo de la actividad β -lactamasa de los diferentes plásmidos con las regiones intergénicas de los fagos 80 α , ϕ 29 y ϕ 55 en las cepas lisogénicas para los fagos 80 α , ϕ 29 y ϕ 55.

Los resultados previos sugerían que la región que contenía las repeticiones era necesaria y suficiente para la unión de la proteína Ltr. Para confirmar este resultado se generaron unas construcciones quiméricas en el plásmido pCN41 en donde se intercambiaron las regiones que contenían las repeticiones de los fagos 80 α y ϕ 55. Como se ha visto anteriormente, estos fagos poseen reguladores de diferentes familias y las secuencias entre ellos son totalmente diferentes. Se generaron los plásmidos pJP1232, que contiene la región con las repeticiones del fago 80 α fusionada a la región intergénica y la secuencia 5' del gen *terS* del fago ϕ 55, y el plásmido pJP1234, que contiene la región con las repeticiones del fago ϕ 55 fusionada

a la región intergénica y la secuencia 5' del gen *terS* del fago 80 α . Se utilizó una aproximación similar para generar quimeras entre los fagos de *S. aureus* 80 α y ϕ 55 y el fago de *E. faecalis* phiFL2A. Se generaron los plásmidos pJP1233 y pJP1235 que contenían las secuencias con las repeticiones de los fagos 80 α o ϕ 55 fusionadas a la región intergénica, sin las repeticiones, y a la secuencia 5' de la *terS* del fago phiFL2A. Un esquema de todas estas construcciones se muestra en la figura 3.28.

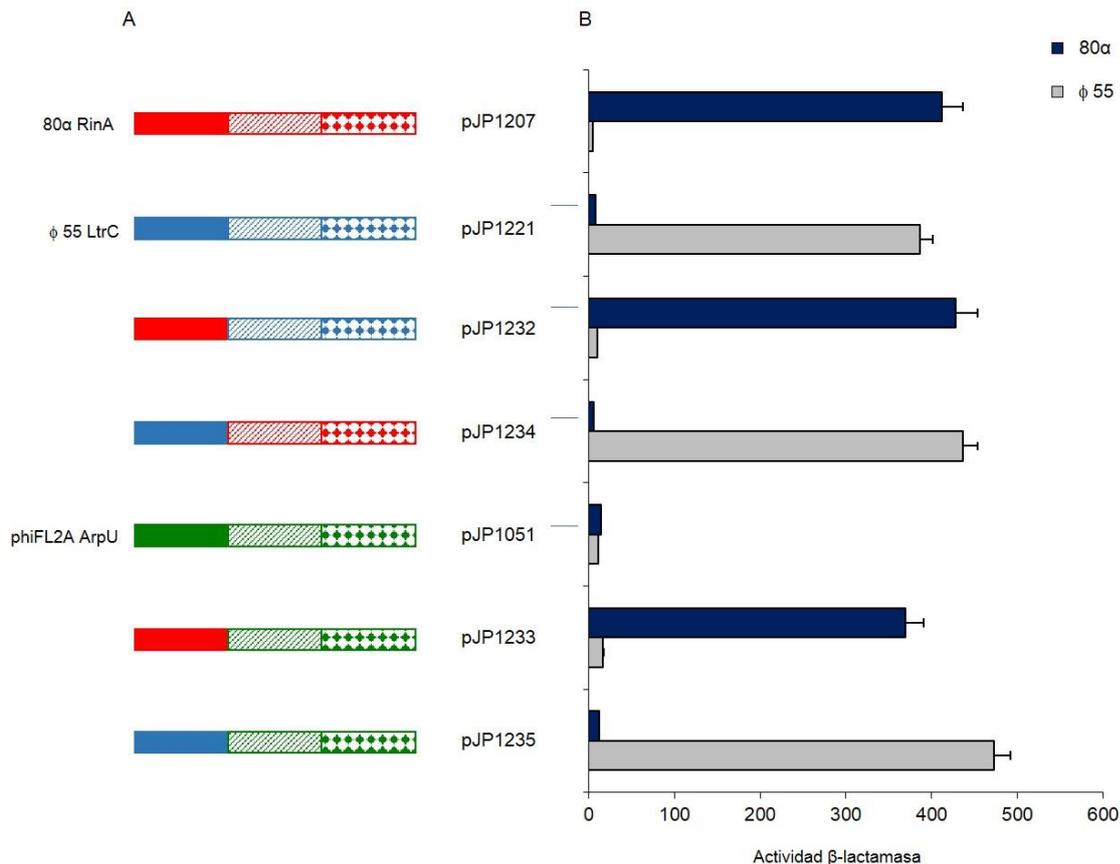


Figura 3.28. Intercambio de las repeticiones en las regiones intergénicas de las diferentes proteínas reguladoras. A) Representación esquemática de los plásmidos con las diferentes fusiones transcricionales de los fagos 80 α (rojo), ϕ 55 (azul) y phiFL2A (verde), con las repeticiones marcadas en color sólido, las regiones intergénicas marcadas con rayas y la secuencia 5' de la *terS* marcada con rombos. También se muestra el esquema de las diferentes quimeras. B) Las cepas RN10359 y JP2348, lisogénicas para los fagos 80 α y ϕ 55 respectivamente, con los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa después de ser inducidas.

Estos plásmidos se introdujeron en las cepas RN10359, lisogénica para el fago 80 α , y en la cepa JP2348, lisogénica para el fago ϕ 55. Posteriormente se midió la

expresión del indicador de la β -lactamasa después de la inducción del profago residente de cada cepa. Nuestra hipótesis de trabajo era que las diferentes proteínas Ltr producidas después de la inducción del profago activarían únicamente la expresión de la β -lactamasa en aquellas construcciones que tuviesen las repeticiones específicas para su proteína Ltr. Esta hipótesis resultó ser cierta y cómo podemos ver en la figura 3.28, tanto el fago 80 α como el ϕ 55 solamente fueron capaces de inducir la expresión de la β -lactamasa de aquellas plásmidos que contenían sus propias repeticiones. Resumiendo, todos estos resultados sugerían que las regiones que contienen las repeticiones son necesarias y suficientes para la unión específica de la unión de las proteínas Ltr.

El extremo C-terminal controla la afinidad de las proteínas Ltr por las repeticiones presentes en la zona promotora.

Como hemos visto, al realizar la reacción cruzada entre los fagos 80 α y ϕ 29 con los plásmidos pCN41 en los que se habían clonado la región promotora con las repeticiones de cada uno de ellos, existían diferencias en la expresión del gen reportero. Los fagos 80 α y ϕ 29 codifican para dos proteínas RinA que son idénticas excepto en el extremo C terminal de la proteína, donde encontramos algunas sustituciones (Figura 3.29).

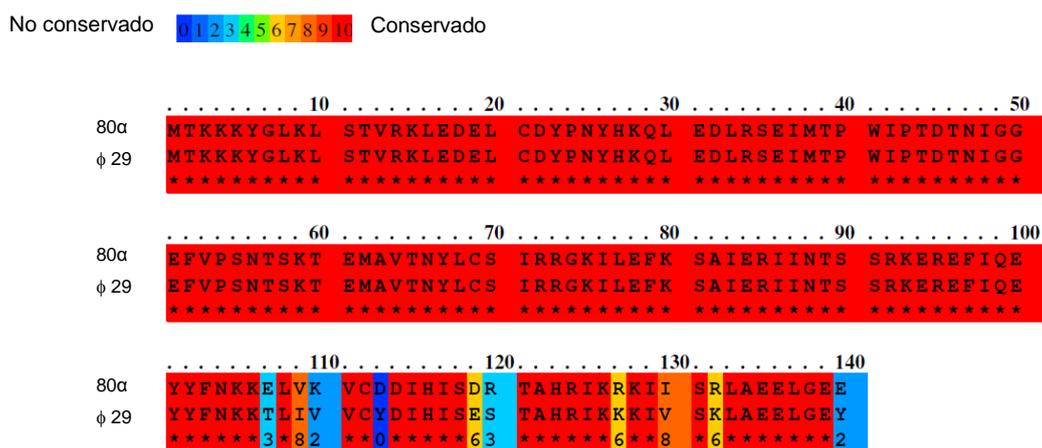


Figura 3.29. Homología de las proteínas RinA de los fagos 80 α (YP_001285353) y ϕ 29 (YP_240603). <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/>.

Asimismo, cuando examinamos la secuencia de las repeticiones en estos fagos observamos que son iguales excepto en una base (Figura 3.24 y 3.26.A). Teniendo en cuenta estos resultados y las observaciones anteriores, nos preguntamos si las diferencias en la región C-terminal de las proteínas RinA explicarían esta diferencia en la especificidad por sus respectivas secuencias de unión. A fin de comprobar esta hipótesis generamos derivados del plásmido pCN41 en donde se amplificó la región intergénica de los fagos 80α y $\phi 29$ pero intercambiando solamente las repeticiones, generando los plásmidos pJP1212 (región intergénica del fago 80α) y pJP1219 (región intergénica del fago $\phi 29$) (Figura 3.30).

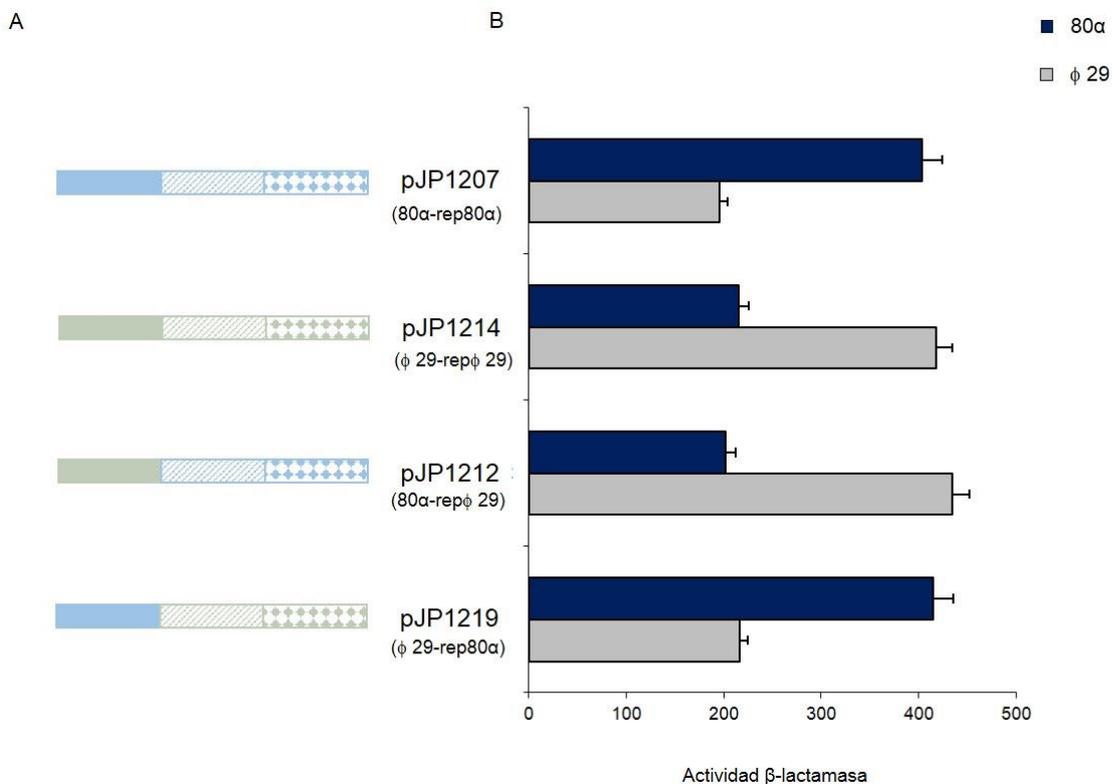


Figura 3.30. Intercambio de las repeticiones en las regiones intergénicas de los fagos 80α y $\phi 29$. A) Representación esquemática de los plásmidos con las diferentes fusiones transcripcionales de los fagos 80α (azul) y $\phi 29$ (verde), con las repeticiones marcadas en color sólido, las regiones intergénicas marcadas con rayas y la secuencia 5' de la *terS* marcada con rombos, y las diferentes quimeras. B) Las cepas RN10359 (azul) y JP7904 (gris) lisogénicas para los fagos 80α y $\phi 29$ respectivamente, que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa.

Los diferentes plásmidos fueron introducidos en las cepas RN10359 y JP7904, lisogénicas para los fagos 80 α y ϕ 29 respectivamente, y se midió la expresión del indicador de la β -lactamasa después de inducir estas cepas con MC. Como se aprecia en la figura 3.30, se observó mayor incremento de la expresión del indicador en aquellas cepas donde la proteína RinA se correspondía con su secuencia de repetición propia. En conclusión, estos resultados demuestran que la región C-terminal de la proteína RinA está involucrada específicamente en el reconocimiento de la región de unión de la proteína reguladora.

Las proteínas Ltr se unen específicamente a la región promotora de *terS*.

Los resultados previos sugieren que las proteínas Ltr se unen de forma específica y únicamente a sus respectivas regiones de unión, donde se encuentran las repeticiones caracterizadas anteriormente. Para confirmar esta hipótesis se sobre-expresaron en *E. coli* y se purificaron las proteínas ArpU (ϕ FL2A) y LtrC (ϕ 55), a fin de realizar un ensayo de electroforesis en gel de retardo. Las proteínas recombinantes purificadas se incubaron con un fragmento marcado de PCR de 100 bp que comprendía la posible región de unión con las repeticiones de cada una de las proteínas Ltr. Como se observa en la figura 3.31, las proteínas recombinantes únicamente retrasaron la movilidad de sus respectivas secuencias de unión.

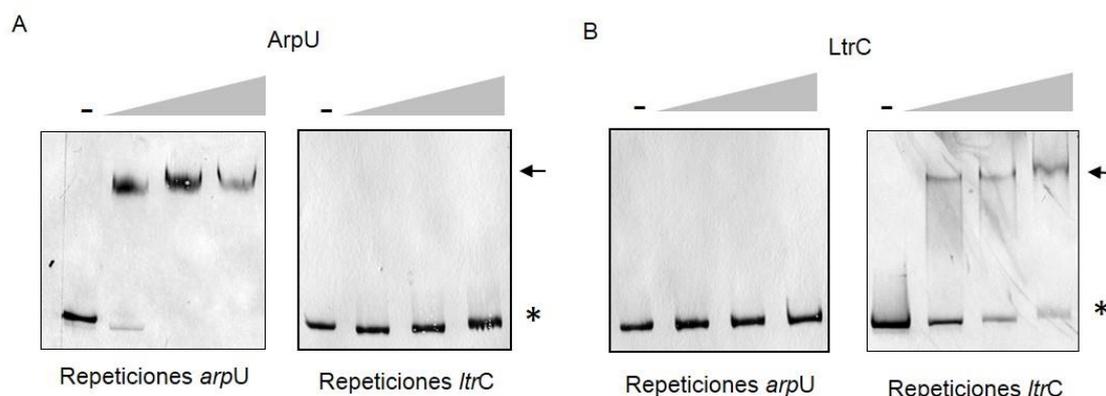


Figura 3.31. Experimentos de unión de las proteínas Ltr a la región promotora de *terS*. Se midió la movilidad electroforética de un fragmento marcado con digoxigenina de la región intergénica de los fagos ϕ FL2A (repeticiones *arpU*) y ϕ 55 (repeticiones *ltrC*), en presencia de cantidades crecientes de proteína purificada ArpU (A) y LtrC (B). Los asteriscos indican los fragmentos de PCR marcados mientras que las flechas indican los fragmentos que retrasaron su movilidad.

Asimismo la proteína ArpU se incubó con fragmentos marcados de DNA donde se sustituyeron las repeticiones, bien una a una individualmente, bien en bloques de dos o incluso las tres repeticiones a la vez. Como se observa en la figura 3.32, la movilidad del fragmento de PCR se vio parcialmente afectada en el caso de las mutaciones individuales y se eliminó completamente cuando se incubó con los fragmentos con dos o tres repeticiones mutadas, lo que sugiere que la presencia de las repeticiones es imprescindible para la unión de la proteína reguladora a la región intergénica de *terS*.

A

```

arpU-terS 5' - TAATTTGGCGGTTTTTTGGCCGAAAGTTGGCGGTTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut1      5' - TAATTTAAAAAAATTTTTGGCCGAAAGTTGGCGGTTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut2      5' - TAATTTGGCGGTTTTAAAAAAAAGTTGGCGGTTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut3      5' - TAATTTGGCGGTTTTTTGGCCGAAAGAAAAAAATTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut4      5' - TAATTTAAAAAAATTTTTAAAAAAAAGTTGGCGGTTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut5      5' - TAATTTAAAAAAATTTTTTTGGCCGAAAGAAAAAAATTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut6      5' - TAATTTGGCGGTTTTTAAAAAAAAGAAAAAAATTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'
Mut7      5' - TAATTTAAAAAAATTTTTAAAAAAAAGAAAAAAATTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG - 3'

```

B

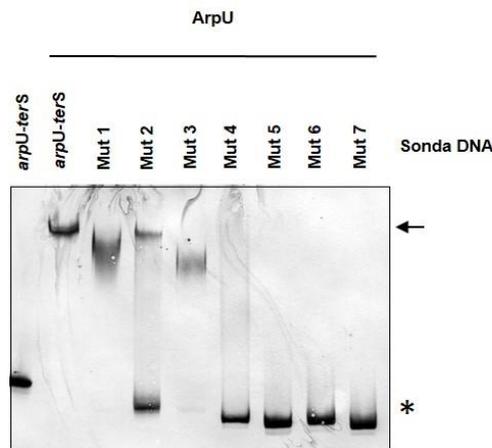


Figura 3.32. Experimentos de unión de las proteínas ArpU a la región promotora de *terS*. A) Secuencia de los fragmentos de PCR amplificados y marcados con digoxigenina en donde se han resaltado las repeticiones. B) Ensayo de movilidad electroforética de los fragmentos marcado con digoxigenina de la región intergénica del fago phiFL2A, en donde se han mutado las repeticiones, en presencia de la proteína purificada ArpU.

Estos resultados confirman que las proteínas Ltr activan la transcripción de la *terS* mediante la unión específica a la región de DNA que contiene las repeticiones.

Los represores *ci* codificados por los fagos controlan directamente la expresión de las proteínas Ltr.

Después de caracterizar cómo se regulaba la activación llevada a cabo por las proteínas Ltr nos preguntamos cómo se regularían ellas a su vez. Las proteínas Ltr están codificadas justo al final del módulo de replicación de los fagos (Figura 3.33). Los genes presentes dentro del módulo de replicación, desde el antirrepresor *cro*, primer gen de este módulo, hasta el regulador de empaquetamiento Ltr, están codificados en la misma orientación, con poca distancia intergénica entre ellos lo que sugiere que conforman una única unidad transcripcional bajo el control del propio represor codificado por el fago.

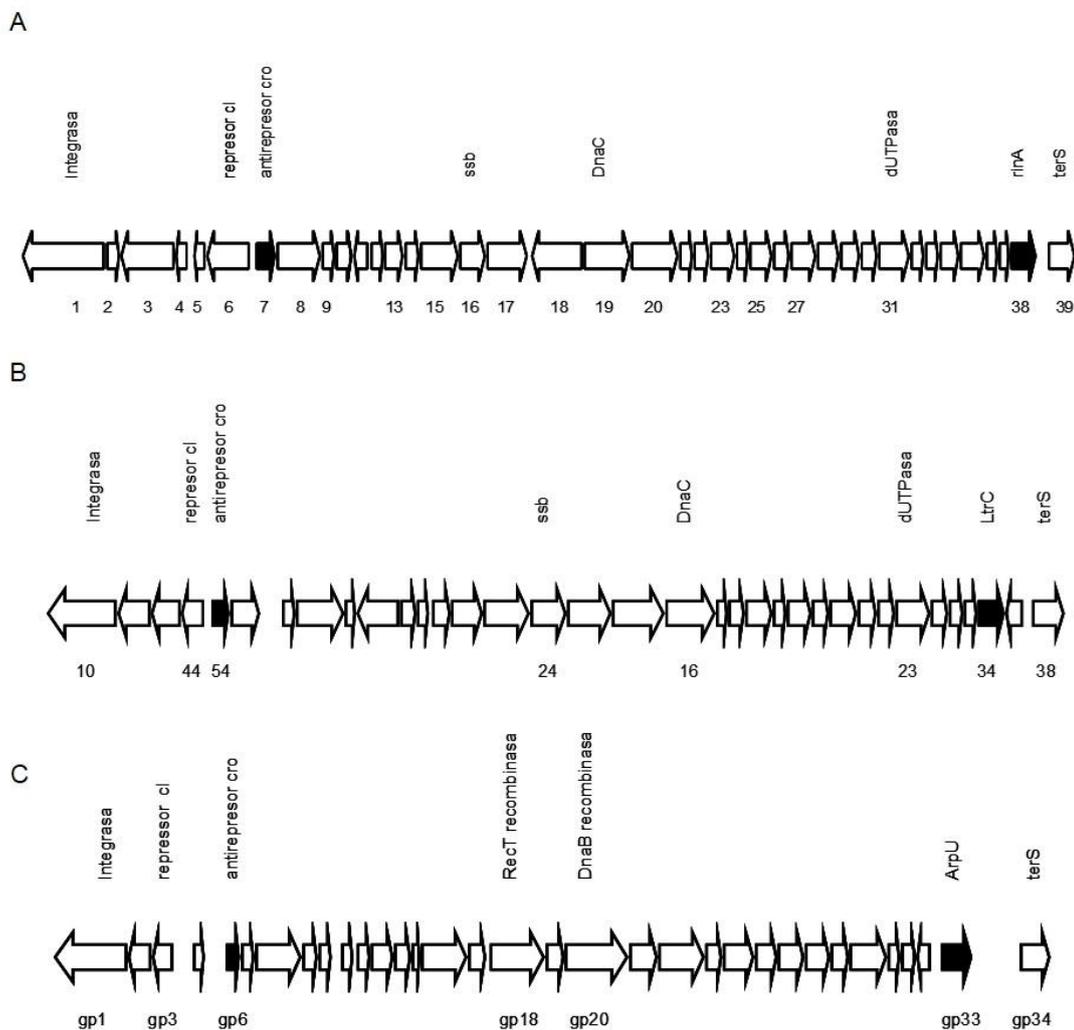


Figura 3.33. Representación esquemática de la localización de los genes del fago 80 α (A), ϕ 55 (B) y phiFL2A (C) desde la integrasa, primer gen del fago, hasta la terminasa pequeña, primer gen del módulo de morfogénesis. Marcados en negro están los genes *cro* y *Ltr*, primer y último gen del módulo de replicación.

En un intento de caracterizar las unidades transcripcionales de los distintos fagos se realizaron ensayos de northern blot con el RNA aislado después de la inducción con MC de los fagos 80 α , ϕ 55 y phiFL2A, utilizando sondas que hibridarían en el gen *cro* o antirepresor y el gen *ltr* de cada uno de estos fagos. En el fago λ , el gen *cro*, perteneciente al módulo de lisogenia y cuya expresión es previa a la de los genes de replicación, tiene una función antagonista al represor *ci* y posibilita la activación del ciclo lítico del fago (Little *et al.*, 1999). El análisis de los northern blots reveló bandas de hibridación específica en algunas muestras, aunque no en todas, que aparecían a los tiempos adecuados y que poseían un tamaño de entre 2 y 4 Kb (Figura 3.34). Este hecho, junto con la ausencia de hibridación en algunas muestras, sugiere que el RNA es rápidamente procesado.

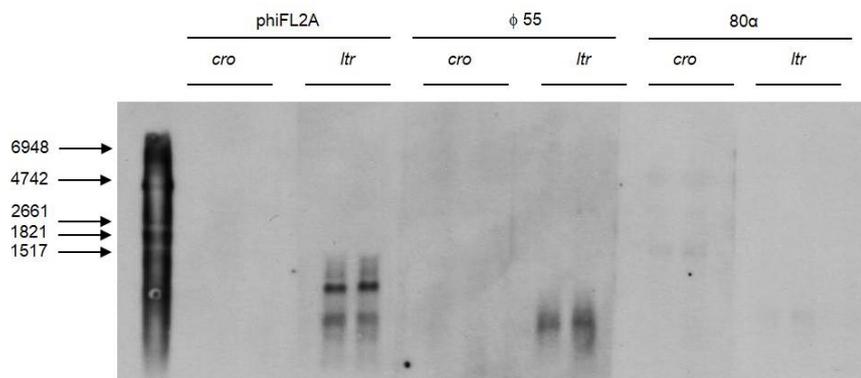


Figura 3.34. Análisis transcripcional de los fagos 80 α , ϕ 55 y phiFL2A. Se realizó análisis mediante northern-blot del RNA extraído a los 60 minutos después de la inducción con MC de las cepas RN10359 (80 α), JP2348 (ϕ 55), JP6880 (phiFL2A) de dos experimentos independientes (5 μ g). Se utilizaron como sondas un fragmento de los genes *cro* o *ltr* marcados con digoxigenina. A la izquierda aparecen los tamaños en bp del marcador. En la parte superior se indica la sonda utilizada en cada caso.

Para seguir investigando la unidad transcripcional en donde se hallan los genes *ltr* utilizamos el fago 80 α como modelo. En primer lugar se extrajo el RNA a los tiempos 0, 30 y 60 minutos después de la inducción con MC de la cepa RN10359, lisogénica para el fago 80 α , y posteriormente este RNA se utilizó para realizar ensayos de tiling microarray. Los tiling microarrays se diseñaron con sondas específicas que hibridaban de forma solapante entre ellas en 13 o 14 nucleótidos a lo largo de todo el genoma del fago 80 α . La figura 3.35 muestra las señales de hibridación del tiling

microarray utilizando el RNA obtenido a diferentes tiempos después de la inducción del ciclo del fago.

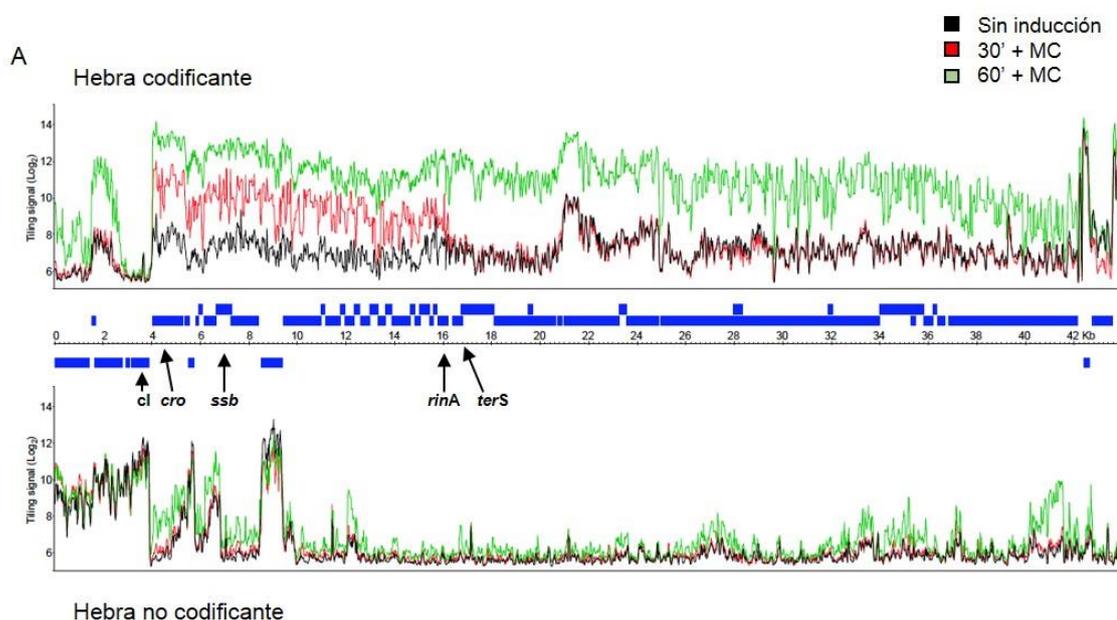


Figura 3.35. El represor del fago CI controla la expresión de *rinA*. Análisis de los tiling microarrays del RNA del fago 80 α extraído sin inducción del fago (negro) o a los 30 (rojo) o 60 minutos (verde) después de la inducción. En la parte central de la figura se muestran en azul la localización de los genes del fago 80 α . Las gráficas muestran la expresión de cada gen a los tiempos indicados tanto en la hebra codificante (gráfica superior) como en la no codificante (gráfica inferior).

Como se observa en la figura 3.35, el fago 80 α muestra una transcripción basal en ausencia de inducción debida posiblemente a la inducción espontánea que ocurre en algunas células en determinadas condiciones de crecimiento. A los 30 minutos después de la inducción del fago se observa la aparición de un transcrito que va desde el gen *cro* hasta *rinA*. Este resultado confirmaría que el gen *rinA* pertenece a la unidad transcripcional temprana y la existencia de un terminador transcripcional entre *rinA* y *terS*. Asimismo este resultado sugiere que estos genes pertenecen al mismo operón y son co-transcritos en la misma unidad transcripcional que está controlada por el represor CI codificado por el propio fago.

No obstante este resultado no descarta completamente la posibilidad de que la transcripción de *rinA* pueda ser activada por algún gen controlado a su vez por el represor del fago y presente en el módulo de replicación del fago. Para descartar esta posibilidad, generamos los plásmidos pJP1195, donde clonamos la región de DNA del

fago 80 α que comprende desde el represor *cl* hasta el gen *rinA*, el cual se fusionó al gen indicador de la β -lactamasa. Como controles obtuvimos los plásmidos pJP1196, donde se amplificó la misma región pero siendo mutante para el represor *cl*, y el plásmido pJP1197, donde se amplificó esta región pero sin el represor ni la región promotora entre *cl-cro* (Figura 3.36). Estos plásmidos se introdujeron en la cepa de *S. aureus* RN4220, que no contiene en su genoma ningún fago, y se midió la expresión del indicador β -lactamasa.

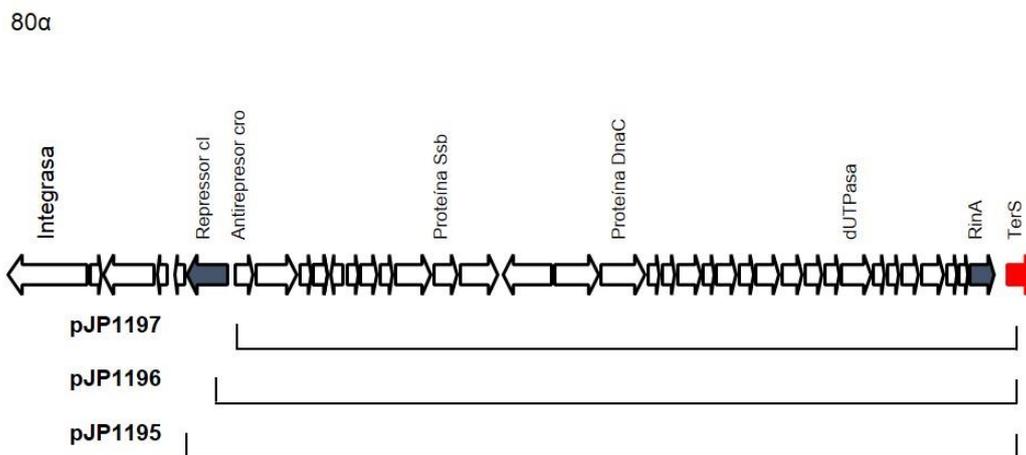


Figura 3.36. Representación esquemática de las diferentes fusiones transcripcionales para analizar la expresión de *rinA*. Los plásmidos fueron introducidos en la cepa RN4220 y se realizó un ensayo de la actividad β -lactamasa en la fase de crecimiento exponencial o después de la infección del fago 80 α .

Como era de esperar se observó un incremento de la expresión del indicador en la cepa que contenía el plásmido mutante en el represor (pJP1196), pero no en las cepas con los plásmidos con el represor (pJP1195) o sin la región promotora *cl-cro* (pJP1197), confirmando que el represor CI controla la expresión de *rinA* (Figura 3.37). Para saber si este control se realiza de forma directa o indirecta infectamos con el fago 80 α la cepa RN4220 con el plásmido pJP1197 y se midió la expresión del indicador β -lactamasa (Figura 3.37). En el caso de que existiese otro promotor distinto al controlado directamente por CI, y que fuese el responsable de regular la expresión del gen *rinA*, al infectar con el fago 80 α la cepa con el plásmido pJP1197 se incrementaría la expresión del indicador β -lactamasa. Como se observa en la figura 3.37, esto no ocurrió, y no se observó incremento en la expresión del indicador, confirmando que *rinA* se expresa en un único transcrito con inicio en el gen *cro*.

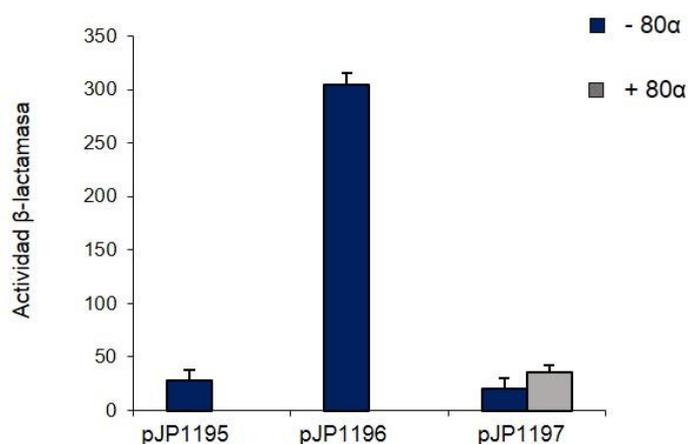


Figura 3.37. Ensayo de la actividad β -lactamasa de los diferentes plásmidos con fusiones transcripcionales para analizar la regulación de *rinA*. Las cepas RN4220 que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa después de que las cepas fuesen (gris) o no (azul) infectadas con el fago 80 α .

Caracterización de la unidad transcripcional regulada por LtrC.

Los datos obtenidos previamente con el fago 80 α nos indicaban que el transcrito tardío del fago se expresaba desde un único promotor controlado por RinA situado justo aguas arriba del gen *terS*. Estos resultados se confirmaron con los ensayos de tiling microarrays mostrados en la figura 3.35. Para determinar si esto ocurría en otros fagos, se realizaron quimeras entre los fagos 80 α y ϕ 55, en las que se reemplazó en la cepa JP2348 (ϕ 55) la secuencia codificante del gen *ltrC* y el promotor de la *terS* del fago ϕ 55 por la región que codifica para el gen *rinA* y el promotor de la *terS* del fago 80 α , generando la cepa JP8763. Asimismo se generó la cepa JP8703, donde se reemplazó en la cepa RN10359 (80 α) la secuencia codificante del gen *rinA* y el promotor de la *terS* del fago 80 α por la región que codifica para el gen *ltrC* y el promotor de la *terS* del fago ϕ 55. Posteriormente, se introdujo en ambas cepas la isla SaPI1, generando las cepas JP8764 y JP8704, respectivamente. Esta isla es inducida por ambos fagos y necesita la correcta expresión de todos los genes codificados en el módulo de morfogénesis para su transferencia (Tormo *et al.*, 2008; Tallent *et al.*, 2007). La hipótesis de trabajo era que en el caso de que todos los genes de este operón tardío sean co-transcritos desde un único promotor situado justo aguas arriba de *terS*, después de la inducción de los fagos quiméricos éstos serían capaces de producir partículas fágicas y de isla funcionales, además de lisar las células bacterianas. Las cepas se indujeron con MC y se produjo la lisis después de las 4

horas. Estas cepas además fueron capaces de producir partículas de fago y de isla de forma similar a las cepas lisogénicas con los fagos salvajes (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Efecto en el título de fago y en la transferencia de la SaPI en los mutantes de intercambio de las proteínas reguladoras RinA y LtrC^a.

ϕ	Cepa donadora	SaPI	Título fago ^b	Título transducción ^c
80 α	RN10359		2.7 x 10 ⁹	
80 α	JP3602	SaP1	4.8 x 10 ⁸	3.6 x 10 ⁷
80 α -LtrC	JP8703		1.1 x 10 ⁷	
80 α -LtrC	JP8704	SaPI1	5.7 x 10 ⁴	4.2 x 10 ⁷
ϕ 55	JP2348		4.6 x 10 ⁶	
ϕ 55	JP8205	SaP1	1.7 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁵
ϕ 55-RinA	JP8763		2.7 x 10 ⁵	
ϕ 55-RinA	JP8764	SaP1	9.8 x 10 ⁴	9.3 x 10 ⁴

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^cNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Curiosamente, se observó que en la cepa quimera del fago 80 α que expresa el gen *ltrC* del fago ϕ 55 el tamaño de las calvas era menor al del tamaño de las calvas producidas por la cepa RN10359, lisógena del fago 80 α , lo que indicaría que pese a producir calvas funcionales, este fago quimérico se ve afectado en su producción de cápsides. No obstante, algunos de estos fagos quiméricos generaban calvas con un tamaño similar al producido por el fago salvaje. Cuando se secuenció la región intergénica entre el regulador *ltrC* y *terS* de estos fagos se encontraron diferentes mutaciones puntuales en la zona de unión al ribosoma de la *terS*, sugiriendo que un posible cambio en el nivel de expresión de la terminasa pequeña optimizaría la producción de partículas funcionales.

Homólogos de Ltr controlan la expresión de los genes tardíos en otros fagos de bacterias Gram-positivas.

Además de caracterizar las proteínas reguladoras ArpU del fago phiFL2A y LtrC del fago $\phi 55$ nos propusimos determinar si otras proteínas Ltr de la misma familia o de familias diferentes actuaban de forma similar. Para ello, utilizamos el plásmido pCN42 en donde clonamos los genes *ltr* de las diferentes familias que aún no habían sido testadas, o su versión mutada y analizamos la expresión del promotor de la *terS* de cada fago (ver esquema en figura 3.38). Todas estas construcciones se introdujeron en la cepa de *S. aureus* RN4220 y medimos la expresión del indicador β -lactamasa.

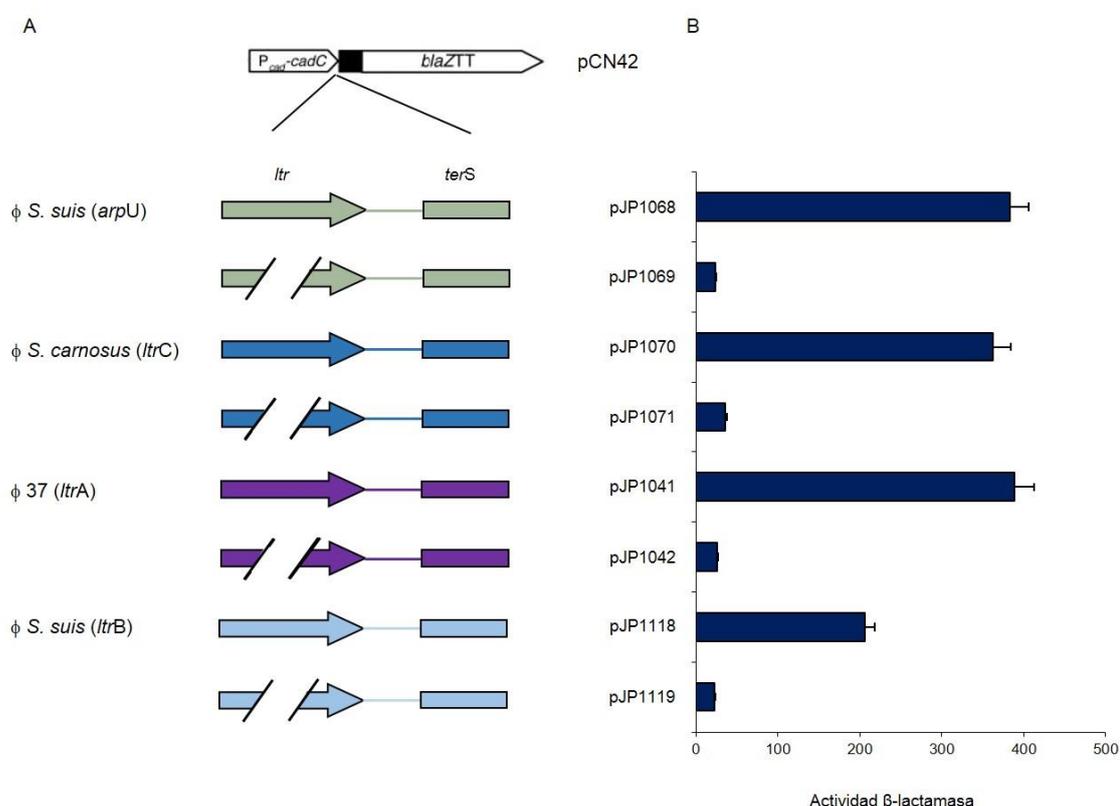


Figura 3.38. Análisis transcripcional de las proteínas reguladoras de diferentes familias de proteínas Ltr. A) Representación esquemática de las diferentes fusiones transcripcionales del fago de *S. suis* que codifica para un homólogo de ArpU (verde oscuro), el fago de *S. carnosus* que codifica para un homólogo de LtrC (azul oscuro), el fago $\phi 37$ que codifica para un representante del regulador LtrA (morado) y el fago de *S. suis* que codifica para un representante del regulador LtrB (azul claro). B) Las cepas RN4220 que contenían los plásmidos indicados se testaron en un ensayo de la actividad β -lactamasa.

En este caso analizamos la funcionalidad del gen homólogo a *arpU* del profago presente en la cepa *S. suis* 89/1591 (ZP_03625181) y el gen homólogo a *LtrC* del profago presente en la cepa *S. carnosus* TM300 (YP_00263590). Asimismo analizamos un miembro de las familias no caracterizadas hasta el momento, el regulador presente en el fago ϕ 37 de *S. aureus* (YP_240149) como modelo de la familia LtrA (*sigma70_r4*) y el regulador presente en el profago de la cepa *S. suis* 89/1591 (ZP_03625554) como ejemplo de la familia LtrB (DUF1492). Como se muestra en la figura 3.38, todas las proteínas Ltr controlaban la expresión de la *terS*

En resumen, estos resultados confirman que la activación que la transcripción llevada a cabo por los miembros de esta superfamilia representa una estrategia ampliamente distribuida utilizada por fagos que infectan bacterias Gram-positivas para controlar la expresión de los genes de morfogénesis y lisis.

**III. CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS
NECESARIAS PARA EL EMPAQUETAMIENTO Y
TRANSFERENCIA MEDIADA POR FAGOS DE
ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES EN BACTERIAS
GRAM-POSITIVAS**

Como hemos comprobado, la organización genética de los fagos de *S. aureus* se encuentra muy conservada, presentando diferentes módulos en donde se agrupan los genes según su función. Por lo tanto cabe esperar que las proteínas necesarias para el empaquetamiento del DNA, la formación de las cápsides y tallos, el correcto ensamblaje de la partícula vírica y la rotura de la pared celular para la infección de una nueva célula bacteriana estén codificadas en los genes pertenecientes al módulo de morfogénesis y lisis. No obstante y aunque se han realizado algunos estudios para conocer el papel de algunos de los genes que intervienen en el proceso de empaquetamiento, aún faltan por conocerse todos los requerimientos moleculares necesarios para la correcta formación de la partícula vírica infectiva, existiendo muchas proteínas en estos módulos de las que se desconoce su función. En este apartado intentaremos caracterizar en detalle los requerimientos necesarios para el empaquetamiento y la transferencia de elementos móviles, utilizando el fago $\phi 11$ como modelo.

Identificación de la región mínima necesaria para el empaquetamiento y la lisis del fago $\phi 11$.

Como hemos demostrado, el regulador RinA controla la expresión del operón tardío mediante su unión a las repeticiones presentes en la región intergénica aguas arriba del gen *terS*, activando la expresión de los genes de morfogénesis y lisis. Es de esperar que todos los genes implicados en la formación de la partícula vírica infectiva estén codificados en este módulo y bajo la regulación de RinA.

Para comprobar esta hipótesis y descartar que hubiese algún otro gen del fago implicado en el proceso de empaquetamiento que no estuviese presente en el módulo en estudio, realizamos un mutante del fago $\phi 11$ en donde se delecionaron los genes que van desde la integrasa (ORF1), primer gen del genoma del fago, hasta el gen *rinA* (ORF28), regulador de empaquetamiento del fago $\phi 11$ (Figura 3.39). A esta cepa, JP8963, se le introdujo el plásmido pJP740 (pCN51-*rinA* _{$\phi 11$}), un derivado del plásmido pCN51 en donde se clonó el gen *rinA* bajo el control de un promotor inducible por cadmio, y la isla SaPIbov1 mutante en el represor, generando la cepa JP8977. Al carecer de represor, esta isla replica autónomamente y sólo necesita la expresión de los genes del módulo de empaquetamiento y de lisis para la formación y liberación de partículas infectivas. Las hipótesis de trabajo era que al inducir la expresión de la proteína RinA en esta cepa, ésta se unirá a la región promotora de la *terS* para iniciar

la transcripción de los genes del módulo de morfogénesis y de lisis. Si estos módulos contienen toda la información necesaria se liberarían partículas infectivas de isla.

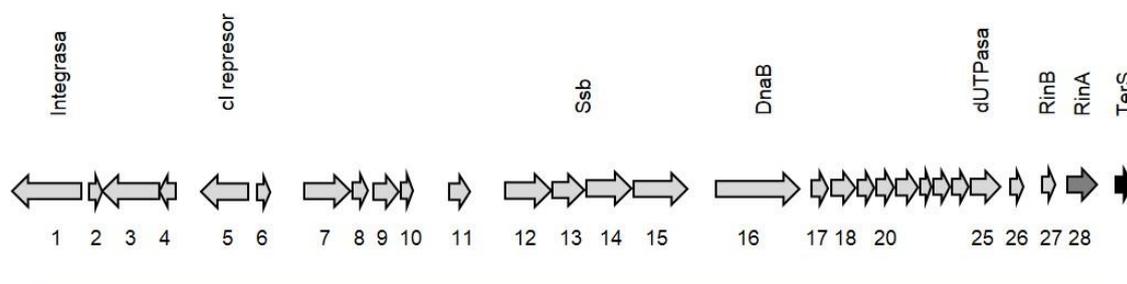


Figura 3.39. Representación esquemática de los genes que forman parte del módulo de integración, regulación y replicación del fago $\phi 11$. Las flechas indican las pautas abiertas de lectura anotadas en la base de datos (número de acceso AF424781). Se indican las funciones predichas para algunos de estos genes. Marcado en gris oscuro está el gen que codifica para *rinA* y marcado en negro el gen que codifica para la *terS*.

Después de inducir la cepa JP8977 con cadmio para sobreexpresar la proteína RinA se produjo la lisis del cultivo y se obtuvieron partículas transducentes de isla (Tabla 3.8), aunque el número de éstas fue menor respecto a la cepa salvaje, posiblemente debido a que el fago no posee los genes de replicación, por lo que la producción de las proteínas necesarias está reducida. Este resultado, sin embargo, confirma que todos los genes necesarios para el empaquetamiento del fago están codificados en el módulo de morfogénesis y lisis.

Tabla 3.8. Efecto en la transferencia de SaPIbov1 mutante en el represor en el mutante desde la integrasa hasta *rinA* del fago $\phi 11$ ^a.

$\phi 11$	Cepa donadora	Plásmido ^b	SaPIbov1	SaPI titer ^c
$\phi 11$	JP10750	pCN51	SaPIbov1 Δstl	7.4×10^7
$\phi 11 \Delta ORF1-28$	JP10751	pCN51	SaPIbov1 Δstl	< 10
$\phi 11 \Delta ORF1-28$	JP8977	pCN51- <i>rinA</i> _{$\phi 11$}	SaPIbov1 Δstl	2.6×10^5

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bLos cultivos fueron tratados, cuando fue requerido, con $CdCl_2$ 5 μM para inducir la expresión del gen clonado en el plásmido pCN51.

^cNº de transducentes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Mutagénesis del módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$.

Una vez definida la región del fago que codifica para los genes de empaquetamiento y lisis bacteriana, y a fin de conocer los requerimientos moleculares para la formación de las partículas infecciosas/transductantes, se generaron mutantes por delección de cada uno de los genes presentes en este módulo.

Como se observa en la figura 3.40, el módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$ está compuesto por 28 genes. Se han encontrado dos nuevas pautas abiertas de lectura, ORF66 y ORF67, que no habían sido anotadas en la secuencia original del fago $\phi 11$ (NC_004615.1) pero si se encuentran en la secuencia de la cepa 8325, cepa original de donde se secuenció el fago $\phi 11$. Las proteínas codificadas por las ORF66 (YP_500539) y ORF67 (YP_500534) presentan una elevada similitud con ORFs presentes en otros fagos de *S. aureus* por lo que decidimos incluirlas en este estudio.

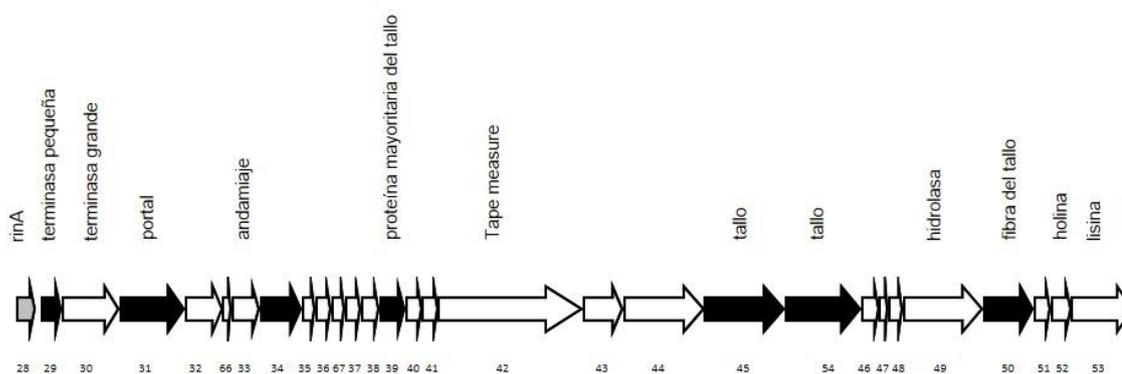


Figura 3.40. Representación esquemática de los genes que forman parte del módulo de morfogénesis y lisis del fago $\phi 11$. Las flechas indican las pautas abiertas de lectura anotadas en la base de datos (número de acceso AF424781). Se indican las funciones predichas para algunos de estos genes. Las flechas negras muestran los genes caracterizados en un estudio previo (Tormo *et al.*, 2008). Se señala el número para cada ORF siguiendo el orden de la secuencia anotada en la base de datos.

De los 28 genes presentes en el módulo de morfogénesis y lisis, 7 de ellos se habían caracterizado previamente, confirmando que intervienen en la formación de las cápsides del fago y de las SaPIs (Tormo *et al.*, 2008). Utilizando el plásmido pMAD se realizaron mutantes por delección de los 21 genes restantes en la cepa RN451 (lisogénica para el fago $\phi 11$; Tabla 3.9). A continuación se les introdujo la isla

SaPIbov1 *tst::tetM* (Tabla 3.9), y se analizó cómo la mutación en los distintos genes afectaba a la biología del fago y de la isla.

Los mutantes del fago no muestran afectada ni la replicación del fago ni la de la isla.

Inicialmente se analizó el proceso de replicación, tanto del fago como de la isla SaPIbov1 en los diferentes mutantes del fago $\phi 11$. Como se muestra en la figura 3.41, no existen diferencias en intensidad de la banda de replicación (de fago y de isla) en los diferentes mutantes, comparado con el fago original.

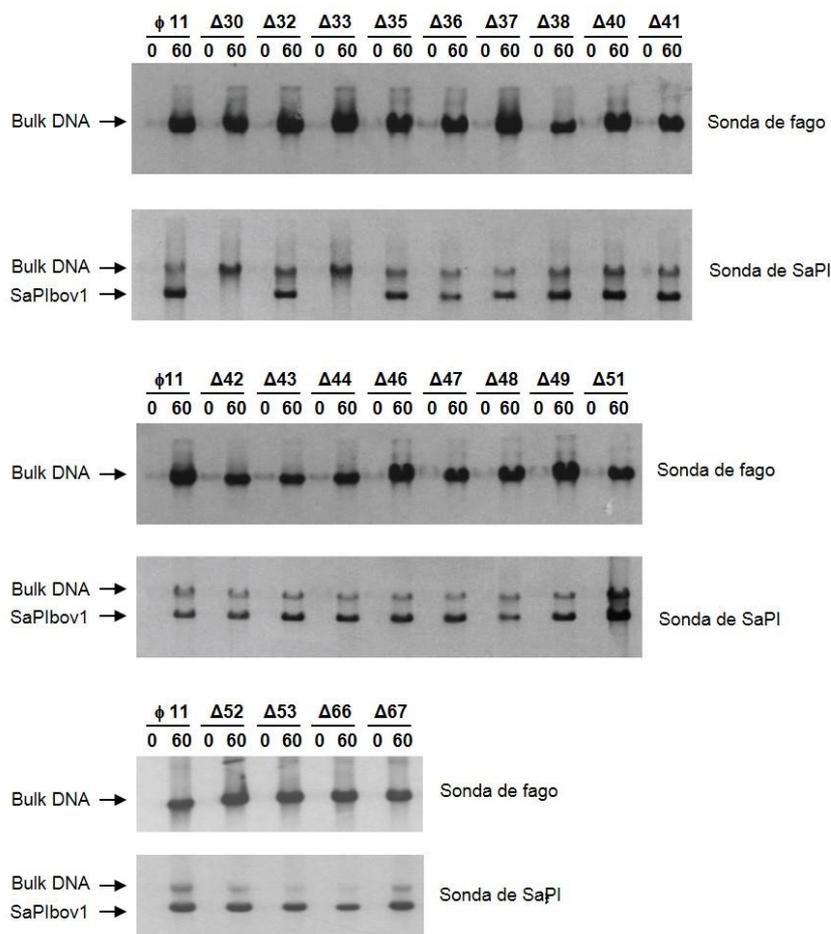


Figura 3.41. Estudio de la replicación y encapsidación de los distintos mutantes del fago $\phi 11$ o de los mutantes del fago $\phi 11$ con la isla SaPIbov1. Southern blot de las muestras de los diferentes mutantes del fago, con o sin isla, a los tiempos 0 y 60 tras la inducción con MC. La banda superior o “bulk” de DNA que aparece a los 60 minutos se corresponde con el DNA cromosomal del fago o de la isla que aparece tras la replicación, mientras que la banda inferior corresponde a los monómeros lineales de la SaPI liberados tras la rotura de las cápsides fágicas de menor tamaño.

Por lo tanto, ningún mutante tiene afectada la replicación del fago ni de SaPI_{bov1}, aunque en los mutantes de los genes 30 y 33, como se había visto previamente para los genes 31 y 34 (Tormo *et al.*, 2008), sí se ve afectado el proceso de encapsidación, ya que no se observa la banda específica de SaPI, lo que implica que estos genes intervienen en el proceso de formación de cápsides. Estos resultados corroboran las funciones morfológicas asignadas previamente *in silico* a alguno de los genes del fago (Figura 3.40 y Tabla 3.9). Asimismo, confirman que estos genes no intervienen ni en los procesos de escisión ni de replicación del fago.

Los mutantes del fago tienen afectada la producción de partículas de infectivas de fago e isla.

Para analizar la siguiente etapa del ciclo biológico del fago y de la isla se obtuvieron lisados de los diferentes mutantes y se comprobó su capacidad para producir partículas infecciosas funcionales. A su vez, se observó si estaba alterado el proceso de lisis en alguno de estos mutantes. La lisis se produjo a las 4 horas tras la inducción de los mutantes con MC en todos los casos excepto para los mutantes en los genes 49 y 52 que codifican para una hidrolasa y una holina, respectivamente, cuya lisis se vio ligeramente retrasada. Un efecto más dramático se observó en el mutante en el gen 53, que codifica para una lisina y que no fue capaz de lisar el cultivo celular. Estos resultados confirmarían las funciones predichas para estos genes que constituirían el módulo de lisis del fago $\phi 11$.

Utilizando los lisados obtenidos, se analizaron los títulos de isla y de fago, a fin de conocer qué genes estaban implicados en la formación de las partículas fágicas o de isla. Además de este tipo de transferencia específica, los fagos son el vehículo para la transducción de otros elementos genéticos móviles como son los plásmidos. En un intento por ver si en este proceso inespecífico de empaquetamiento de DNA intervienen las mismas proteínas, se introdujo el plásmido pCN51, que posee un marcador de eritromicina que facilita el estudio de su transferencia, a los diferentes mutantes en estudio, para posteriormente testar su capacidad para transferir los diferentes EGMs.

Tabla 3.9. Efecto en el título de fago y en la transferencia de la isla SaPIbov1 o del plásmido pCN51 de los diferentes mutantes del fago $\phi 11^a$.

$\phi 11$	Función predicha	Función	Cepa donadora	SaPIbov1	pCN51	Título fago ^b	Título SaPI/pCN51 ^c
$\phi 11$			JP1361	-	-	1.1×10^9	
			JP1794	+	-	5.6×10^6	7×10^7
			JP6630	-	+	5.6×10^7	2.9×10^3
$\Delta 29$	Terminasa pequeña	Terminasa pequeña	JP3377	-	-	< 10	
			JP3378	+	-	< 10	1.4×10^8
			JP9840	-	+	< 10	< 10
$\Delta 30$	Terminasa grande	Terminasa grande	JP4030	-	-	< 10	
			JP4130	+	-	< 10	< 10
			JP9841	-	+	< 10	< 10
$\Delta 31$	Portal	Portal	JP2729	-	-	< 10	
			JP3018	+	-	< 10	< 10
			JP9842	-	+	< 10	< 10
$\Delta 32$	Morfogénesis de la cápside	Conector cabeza-tallo	JP4032	-	-	< 10	
			JP4132	+	-	< 10	9×10^7
			JP9843	-	+	< 10	2.7×10^2
$\Delta 33$	Andamiaje	Andamiaje	JP4033	-	-	< 10	
			JP4133	+	-	< 10	< 10
			JP9845	-	+	< 10	< 10
$\Delta 34$	Mayoritaria de la cápside	Mayoritaria de la cápside	JP2733	-	-	< 10	
			JP3020	+	-	< 10	< 10
			JP9846	-	+	< 10	< 10
$\Delta 35$	Desconocida	Conector cabeza-tallo	JP4035	-	-	6×10^7	
			JP4135	+	-	4.8×10^5	2.2×10^7
			JP9847	-	+	1.9×10^7	1.5×10^3
$\Delta 36$	DNA-packaging	Conector cabeza-tallo	JP4036	-	-	< 10	
			JP4136	+	-	< 10	< 10
			JP9848	-	+	< 10	< 10
$\Delta 37$	Desconocida	Conector cabeza-tallo	JP4037	-	-	< 10	
			JP4137	+	-	< 10	< 10
			JP9850	-	+	< 10	< 10
$\Delta 38$	Desconocida	Conector cabeza-tallo	JP4038	-	-	< 10	
			JP4138	+	-	< 10	< 10
			JP9851	-	+	< 10	< 10
$\Delta 39$	Mayoritaria del tallo	Mayoritaria del tallo	JP2930	-	-	< 10	
			JP3021	+	-	< 10	< 10
			JP9852	-	+	< 10	< 10
$\Delta 40$	Desconocida	Proteína del tallo	JP4040	-	-	< 10	
			JP4140	+	-	< 10	< 10
			JP9853	-	+	< 10	< 10
$\Delta 41$	Desconocida	Proteína del tallo	JP4041	-	-	< 10	
			JP4141	+	-	< 10	< 10
			JP9854	-	+	< 10	< 10
$\Delta 42$	Tape measure	Proteína del tallo	JP4042	-	-	< 10	
			JP4142	+	-	< 10	< 10
			JP9855	-	+	< 10	< 10

$\phi 11$	Función predicha	Función	Cepa donadora	SaPIbov1	pCN51	Título fago ^b	Título SaPI/pCN51 ^c
$\Delta 43$	Proteína del tallo	Proteína del tallo	JP4043	-	-	< 10	
			JP4143	+	-	< 10	< 10
			JP9856	-	+	< 10	< 10
$\Delta 44$	Endopeptidasa del tallo	Proteína del tallo	JP4044	-	-	< 10	
			JP4144	+	-	< 10	< 10
			JP9857	-	+	< 10	< 10
$\Delta 45$	Minoritaria del tallo	Minoritaria del tallo	JP2906	-	-	< 10	
			JP3017	+	-	< 10	< 10
			JP9858	-	+	< 10	< 10
$\Delta 46$	Desconocida	Desconocida	JP4046	-	-	9.7×10^8	
			JP4146	+	-	4.8×10^6	6×10^7
			JP9860	-	+	2.3×10^7	1.2×10^3
$\Delta 47$	Desconocida	Desconocida	JP4047	-	-	6.3×10^8	
			JP4147	+	-	9.5×10^6	8×10^7
			JP9861	-	+	3.3×10^7	2×10^3
$\Delta 48$	Desconocida	Desconocida	JP4048	-	-	7.1×10^8	
			JP4148	+	-	8×10^5	1.1×10^7
			JP9862	-	+	2.4×10^7	1.4×10^3
$\Delta 49$	Hidrolasa	Hidrolasa	JP4049	-	-	2.6×10^8	
			JP4149	+	-	2.9×10^6	1×10^8
			JP9863	-	+	2×10^6	40
$\Delta 50$	Proteína del tallo	Proteína del tallo	JP2731	-	-	9.6×10^8	
			JP3019	+	-	4.6×10^6	8×10^7
			JP9864	-	+	2×10^7	5.8×10^2
$\Delta 51$	Desconocida	Desconocida	JP4051	-	-	1.2×10^9	
			JP4151	+	-	8.7×10^6	9×10^7
			JP9865	-	+	2.3×10^7	1.4×10^3
$\Delta 52$	Holina	Holina	JP4052	-	-	1.4×10^7	
			JP4152	+	-	1.9×10^6	2.2×10^8
			JP9866	-	+	8×10^5	1.1×10^3
$\Delta 53$	Lisina	Lisina	JP4053	-	-	< 10	
			JP4153	+	-	< 10	5.7×10^5
			JP9867	-	+	< 10	4.1×10^3
$\Delta 54$	Minoritaria del tallo, Placa base	Minoritaria del tallo, Placa base	JP2735	-	-	< 10	
			JP3022	+	-	< 10	3×10^5
			JP9859	-	+	< 10	< 10
$\Delta 66$	Desconocida	Desconocida	JP7195	-	-	8.7×10^8	
			JP7261	+	-	5.8×10^6	6×10^7
			JP9844	-	+	1.7×10^7	1×10^3
$\Delta 67$	Desconocida	Conector cabeza-tallo	JP7196	-	-	< 10	
			JP7262	+	-	< 10	< 10
			JP9849	-	+	< 10	< 10

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^cNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Como se muestra en la tabla 3.9, los diferentes mutantes se pueden agrupar según su fenotipo en tres grupos. En primer lugar encontramos aquellos en los que la mutación afectó significativamente a la capacidad de producir partículas fágicas funcionales, entre los que se encuentran los mutantes de los genes 29-34, 36-45, 53-54 y 67, los cuales son incapaces de generar partículas fágicas viables (Tabla 3.9). Un segundo grupo estaría formado por los mutantes en los genes 35, 49 y 52, que no vieron drásticamente afectada la producción de partículas infectivas (entre 10 y 100 veces; Tabla 3.9), pero que producían calvas de menor tamaño (Figura 3.42). Por último encontramos aquellos genes donde la mutación no afectó a la capacidad infectiva del fago, mutantes de los genes 46-51 y 66 (Tabla 3.9), lo que indicaría que estas proteínas no son necesarias para la formación de la partícula vírica en las condiciones testadas en este estudio.

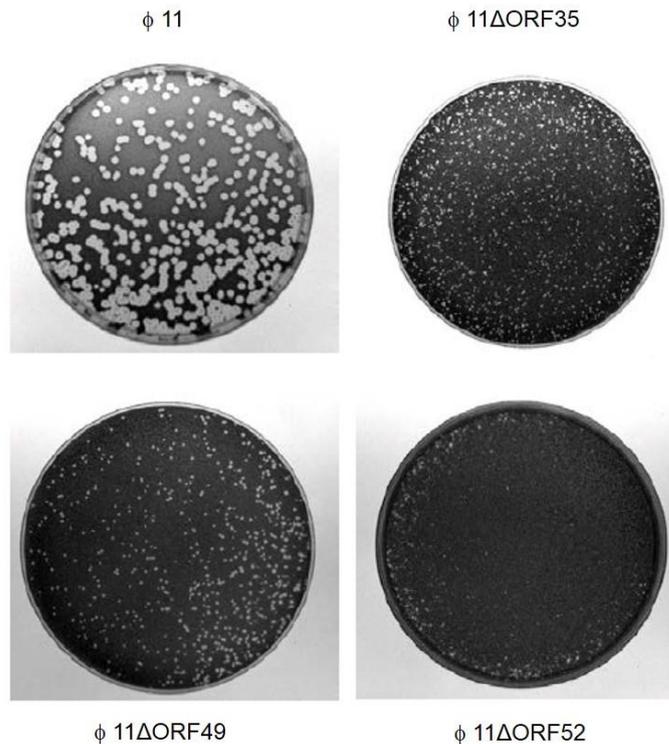


Figura 3.42. Formación de partículas infectivas como resultado de la inducción de los mutantes en los genes 35, 49 y 52 del fago $\phi 11$. Se compararon el tamaño de las calvas de los mutantes del fago $\phi 11$ con respecto a la cepa salvaje en una infección sobre placa sobre la cepa RN4220.

Como era de esperar, los mutantes incapaces de producir partículas fágicas infectivas eran incapaces de producir partículas transducentes de SaPI_{bov1}, a excepción de los mutantes en los genes 29, 32, 53 y el mutante en el gen 54,

previamente caracterizado como un componente del tallo (Tormo *et al.*, 2008). El gen 29 codifica para la subunidad pequeña de la terminasa del fago (TerS), cuyo homólogo en la isla SaPI_{bov1} es la proteína codificada por la ORF5 que se encarga de reconocer específicamente el DNA de la isla para su empaquetamiento (Ubeda *et al.*, 2007). El mutante en el gen 53 codifica para una lisina que interviene en la lisis de la pared bacteriana, y como hemos comentado anteriormente, este mutante no es capaz de lisar el cultivo celular. En el caso del mutante en el gen 32 se obtuvieron partículas transductantes de isla pero no de fago, lo que sugería que esta proteína no sería necesaria para formar partículas específicas de SaPI, o bien que existe algún gen de la isla que complementa en cierto grado la función de esta proteína. Esta cuestión se discutirá más adelante.

Resultados similares se obtuvieron para la transducción del plásmido por parte de los mutantes del fago $\phi 11$. Como vemos en la tabla 3.9, aquellos mutantes que tenían afectada la producción de partículas fágicas funcionales tampoco fueron capaces de transducir el plásmido. Como excepción encontramos los mutantes en los genes 32, 54 y 53, que al igual que sucedía con la transferencia de la SaPI, si son capaces de transducir el plásmido.

En el caso de los mutantes que no tenían afectada la producción de partículas infectivas no se observó una disminución significativa en la producción de transductantes de SaPI_{bov1} o del plásmido pCN51.

Complementación de los mutantes del fago.

Para confirmar que los efectos observados en los diferentes mutantes en la transferencia tanto del fago como de la SaPI eran debidos únicamente al gen mutado, se amplificó el gen correspondiente y se clonó en el plásmido pCN51 bajo el control de un promotor inducible por cadmio. Los plásmidos resultantes se introdujeron en las respectivas cepas mutantes del fago $\phi 11$, se indujeron con MC y se sobre-expresaron los genes clonados añadiendo cadmio. Como muestra la tabla 3.10, la complementación restauró parcialmente el título de fago, confirmando que las diferentes mutaciones eran las únicas responsables del fenotipo observado en los distintos mutantes. Asumimos que la complementación no pudo restaurar completamente el título del fago debido a que el nivel de expresión del gen clonado no es el mismo al del gen original en el fago, o bien la expresión del gen no se produce en el momento adecuado en el proceso de inducción del fago.

Tabla 3.10. Efecto de la complementación en el título de los mutantes del fago $\phi 11$ y la isla SaPIbov1^a.

$\phi 11$	Cepa donadora	SaPIbov1	Plásmido ^b	Título fago ^c	Título SaPI ^d
$\phi 11$	JP6630	-	pCN51	6.6×10^8	
	JP6631	+	pCN51	1×10^7	3.3×10^7
$\Delta 30$	JP6609	-	pJP546	1.9×10^5	
	JP6619	+	pJP546	1×10^2	3.4×10^4
$\Delta 32$	JP4506	-	pJP547	7×10^4	
	JP6620	+	pJP547	3.2×10^2	1.3×10^7
$\Delta 33$	JP6610	-	pJP548	4.1×10^6	
	JP6621	+	pJP548	3.1×10^4	1.8×10^7
$\Delta 35$	JP8563	-	pJP1121	7.2×10^8	
	JP8564	+	pJP1121	1.6×10^7	5.9×10^7
$\Delta 36$	JP6611	-	pJP575	1×10^4	
	JP6622	+	pJP575	2.6×10^2	2.1×10^6
$\Delta 37$	JP6612	-	pJP549	1.4×10^4	
	JP6623	+	pJP549	4.7×10^4	1.2×10^3
$\Delta 38$	JP6613	-	pJP550	6×10^3	
	JP6624	+	pJP550	1.9×10^2	9×10^5
$\Delta 40$	JP6614	-	pJP576	9×10^3	
	JP6625	+	pJP576	1.5×10^2	3.7×10^4
$\Delta 41$	JP6615	-	pJP577	7.7×10^4	
	JP6626	+	pJP577	6.1×10^2	3.5×10^5
$\Delta 42$	JP6616	-	pJP569	2.9×10^7	
	JP6627	+	pJP569	1.7×10^5	3.4×10^7
$\Delta 43$	JP6617	-	pJP551	6×10^5	
	JP6628	+	pJP551	6×10^3	8×10^6
$\Delta 44$	JP6618	-	pJP552	1.2×10^8	
	JP6629	+	pJP552	4.3×10^5	1.9×10^7
$\Delta 49$	JP8671	-	pJP1122	1.6×10^9	
	JP8672	+	pJP1122	1.1×10^7	1×10^8
$\Delta 52$	JP10693	-	pJP990	1.5×10^8	
	JP8653	+	pJP990	2.1×10^6	4.4×10^7
$\Delta 53$	JP10694	-	pJP989	7.0×10^4	
	JP8654	+	pJP989	1×10^2	5.2×10^7
$\Delta 67$	JP7669	-	pJP1006	1.9×10^4	
	JP7670	+	pJP1006	3.5×10^2	4.6×10^6

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bLos cultivos fueron tratados, cuando fue requerido, con CdCl_2 5 μM para inducir la expresión del gen clonado en el plásmido pCN51.

^cNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^dNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Asimismo introdujimos en las cepas complementadas la isla SaPI_{bov1} y se comprobó su capacidad de formar partículas funcionales de fago y SaPI después de inducirlas con MC. En todos los casos el título de la isla en las cepas mutantes complementadas se restableció hasta niveles similares a la cepa salvaje, mientras que por el contrario en el caso del fago, aunque sí se produjo complementación, el título se vio considerablemente reducido en presencia de isla (Tabla 3.10). De hecho, y como ya se había observado previamente, los títulos de la isla en muchos de los mutantes complementados fueron entre 100 y 1000 veces mayores a los del propio fago, confirmando el empaquetamiento preferencial de las SaPIs sobre los fagos (Lindsay *et al.*, 1998; Tormo *et al.*, 2008).

Caracterización de los mutantes del fago $\phi 11$ que tienen afectada la formación de partículas transductantes.

Algunos de los mutantes que tenían afectada la formación de las partículas fágicas codifican para proteínas que habían sido caracterizadas previamente o presentan dominios cuya función ha sido descrita con anterioridad (Tabla 3.9). Entre estas proteínas encontramos las terminasas pequeña (gp29) y grande (gp30), proteína portal (gp31), proteína de andamiaje (gp33), proteína mayoritaria de la cápside (gp34), proteína mayoritaria del tallo (gp39), tape measure (gp42), proteína minoritaria del tallo (gp45), proteína del tallo (gp50) y proteína de la placa base (gp54). Sin embargo, el resto de mutantes que tenían afectada la producción de partículas fágicas codifican para proteínas cuyo papel en el proceso de la producción de las partículas fágicas no había sido establecido hasta la fecha. En un intento por caracterizar mejor la función que estas proteínas podían llevar a cabo en este proceso decidimos analizar por microscopía electrónica las partículas fágicas presentes en los lisados de estos mutantes.

En la figura 3.43 se puede observar una muestra representativa de las partículas fágicas presentes en los lisados de los diferentes mutantes. En los mutantes en las proteínas gp32 y gp35 encontramos algunas partículas funcionales, aunque estas preparaciones también contenían cápsides y tallos no ensamblados, lo que sugería que estas proteínas podrían desempeñar una función de unión entre las cápsides y los tallos. Esta función no sería completamente esencial, ya que en estos mutantes no se elimina completamente la capacidad para producir partículas infectivas. Por el contrario, los mutantes en gp36, gp37, gp38 y gp67 son incapaces de ensamblar partículas fágicas funcionales, aunque sí producen tallos y cápsides. El fenotipo de estos mutantes sugiere un defecto en el proceso de ensamblaje del tallo a

la cápside repleta de DNA. Por último en las muestras de los mutantes en las proteínas gp40, gp41, gp43 y gp44 sólo encontramos cápsides fágicas, lo que sugiere que estas proteínas intervienen en el proceso de formación de los tallos.

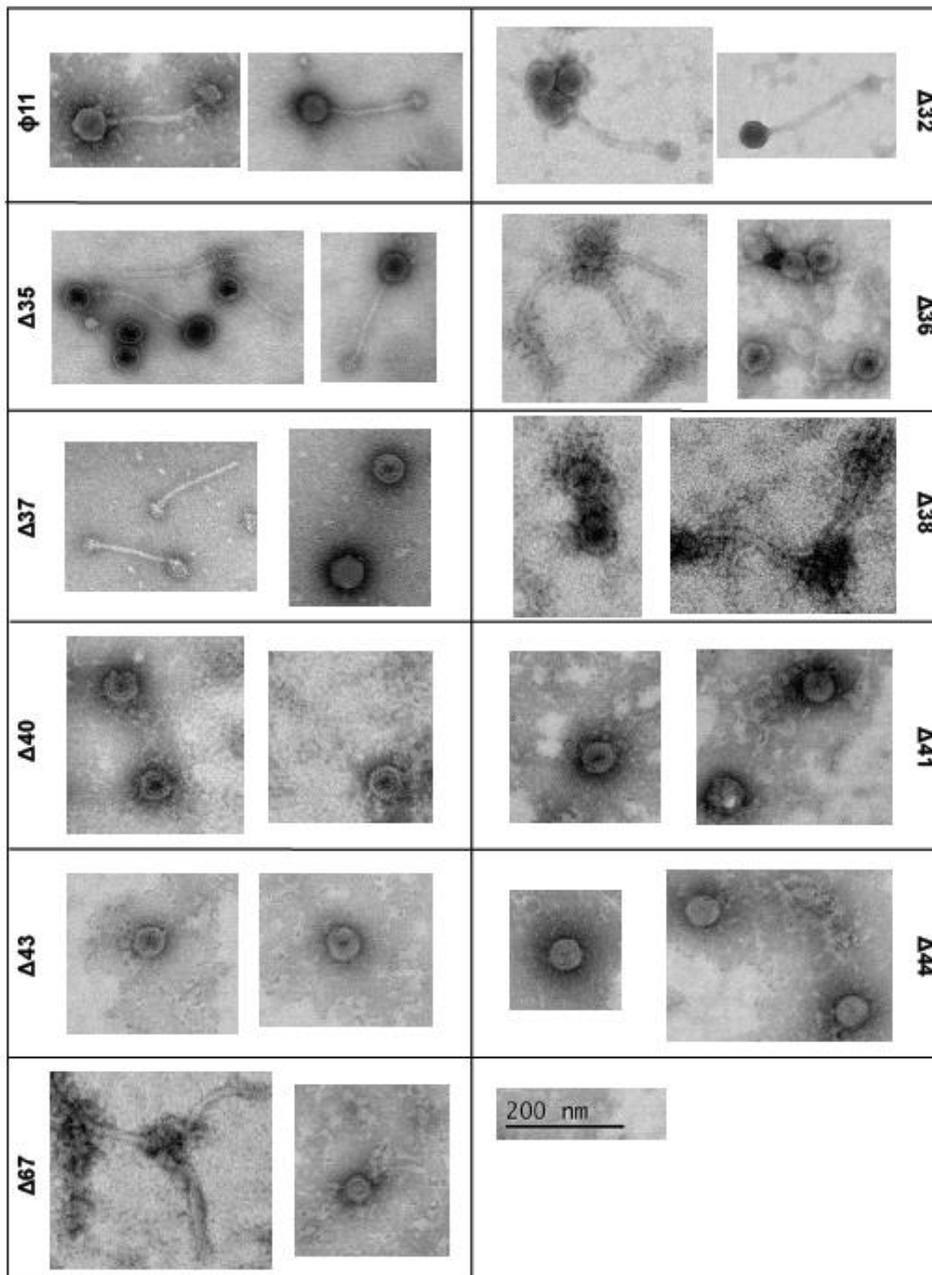


Figura 3.43. Microscopia electrónica de lisados del fago ϕ 11 y de los mutantes en las proteínas gp32, gp35, gp36, gp37, gp38, gp40, gp41, gp43, gp44 y gp67.

Caracterización de la ORF32 del fago $\phi 11$.

Como se había visto anteriormente, el mutante del gen 32 tiene afectada la formación de partículas fágicas funcionales, aunque es capaz de producir partículas transductantes de isla de forma similar a la cepa salvaje. Con el objetivo de caracterizar más ampliamente la función de esta proteína en el ciclo del fago, realizamos un mutante por delección de la ORF44 del fago 80 α , gen homólogo a la ORF32 del fago $\phi 11$, generando la cepa JP3463. A continuación, y como el fago 80 α es capaz de inducir el ciclo de SaPIbov1 y SaPI1, estas islas se introdujeron en el mutante del fago 80 α , generando las cepas JP3468 y JP3464, respectivamente. Como se había visto para el mutante en la gp32 del fago $\phi 11$, la gp44 del fago 80 α es necesaria para la producción de partículas funcionales de fago pero no de partículas transductantes de isla (Tabla 3.11).

A continuación analizamos la posibilidad de que este gen estuviese implicado en la producción de las partículas de fago, pero no en aquellas partículas más pequeñas que contienen específicamente el genoma de la SaPI. Para comprobar esta posibilidad introdujimos en el mutante en el gen ORF44 del fago 80 α la isla SaPIbov2 que también es inducida por este fago y no produce cápsides pequeñas (Maiques *et al.*, 2007). También introdujimos los mutantes de la isla SaPIbov1 en los genes ORF8 y ORF9, tanto en el mutante del fago $\phi 11$ y 80 α . Estas proteínas son imprescindibles para la producción de las partículas pequeñas específicas de las SaPIs y por lo tanto en las cepas con la isla mutante en estos genes el genoma de la SaPI se empaqueta en las partículas fágicas de gran tamaño (Ubeda *et al.*, 2007). Además para explorar la posibilidad de que algún gen de la isla pudiese compensar la mutación en la ORF32 del fago $\phi 11$ analizamos la formación de partículas transductantes en aquellos mutantes en el resto de genes que forman el operón I de SaPIbov1, ya que este operón de la isla está implicado en el empaquetamiento específico de la isla (Úbeda *et al.* 2007).

Después de la inducción de estas cepas se analizó su capacidad para formar partículas de fago y SaPI funcionales. Como se observa en la tabla 3.11, no se obtuvo título de fago en ninguno de los mutantes aunque el título de las islas fue similar al de la cepa salvaje, descartando que las diferencias observadas entre las islas y los fagos tengan que ver con la formación de cápsides de gran tamaño y descartando que algún gen de la isla compensase la mutación del fago.

Tabla 3.11. Efecto en el título de fago y en la transferencia de las SaPIs en los mutantes en las ORFs 32 y 44 de los fagos $\phi 11$ y $80\alpha^a$.

Fago	Cepa donadora	SaPI	Título fago ^b	Título SaPI ^c
80 α	RN10359	-	3.8×10^{10}	
$\Delta 44$	JP3463	-	< 10	
80 α	JP3602	SaPI1	7×10^8	7×10^7
$\Delta 44$	JP3464	SaPI1	< 10	5×10^7
80 α	JP3603	SaPIbov1	3.9×10^{10}	1.0×10^7
$\Delta 44$	JP3468	SaPIbov1	< 10	1.3×10^6
80 α	JP10689	SaPIbov1 Δ ORF8	3.7×10^9	4.9×10^7
$\Delta 44$	JP10690	SaPIbov1 Δ ORF8	< 10	2.7×10^7
80 α	JP10691	SaPIbov1 Δ ORF9	3.5×10^9	5.1×10^7
$\Delta 44$	JP10692	SaPIbov1 Δ ORF9	< 10	1.4×10^8
80 α	JP4493	SaPIbov2	1.8×10^8	2×10^7
$\Delta 44$	JP3470	SaPIbov2	< 10	4.4×10^6
$\phi 11$	RN451	-	8.3×10^8	
$\Delta 32$	JP4032	-	< 10	
$\phi 11$	JP1794	SaPIbov1	1.7×10^6	7×10^7
$\Delta 32$	JP4132	SaPIbov1	< 10	1.4×10^8
$\phi 11$	JP1796	SaPIbov1 Δ ORF5	2.1×10^6	4.2×10^7
$\Delta 32$	JP3804	SaPIbov1 Δ ORF5	< 10	2.3×10^3
$\phi 11$	JP1797	SaPIbov1 Δ ORF6	3.7×10^6	4.1×10^7
$\Delta 32$	JP3826	SaPIbov1 Δ ORF6	< 10	1.3×10^7
$\phi 11$	JP1798	SaPIbov1 Δ ORF7	1.2×10^6	5.6×10^7
$\Delta 32$	JP3827	SaPIbov1 Δ ORF7	< 10	1.2×10^8
$\phi 11$	JP1799	SaPIbov1 Δ ORF8	1.2×10^6	3.5×10^7
$\Delta 32$	JP3965	SaPIbov1 Δ ORF8	< 10	1.8×10^7
$\phi 11$	JP1800	SaPIbov1 Δ ORF9	1.5×10^6	5.2×10^7
$\Delta 32$	JP3966	SaPIbov1 Δ ORF9	< 10	3.4×10^8
$\phi 11$	JP1801	SaPIbov1 Δ ORF10	1.1×10^6	3.3×10^7
$\Delta 32$	JP3828	SaPIbov1 Δ ORF10	< 10	3.0×10^7

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^cNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Inicialmente se había propuesto que la proteína homóloga a la gp32 presente en el fago 80 α (gp44) podría tener actividad proteasa, siendo la responsable del procesamiento de la proteína de andamiaje y la proteína mayoritaria de la cápside (Poliakov *et al.*, 2008), por lo que sería imprescindible para la correcta formación de la cápside. Por el contrario, un estudio reciente parece descartar esa posibilidad, al

involucrar una proteasa bacteriana en este proceso (Spilman *et al.*, 2012). Del mismo modo, nuestros resultados contradicen este posible rol como proteasa debido al fenotipo que presenta el mutante en la gp32 del fago ϕ 11 en las muestras de microscopía electrónica, con cápsides totalmente formadas y rellenas de DNA, y al hecho de que las distintas islas se transfieren utilizando las partículas fágicas producidas por el mutante en la proteína gp44 del fago 80 α .

Por el contrario, un homólogo a la gp32 del fago ϕ 11 presente en el bacteriófago SSP1, gp7, es una proteína minoritaria de la cápside involucrada en la eyección del genoma del fago del virión al citoplasma de la bacteria (Vinga *et al.*, 2006). En este estudio se determinó que en la infección con fagos SPP1 mutantes en el gen 7 se producían partículas víricas cuya morfología y composición proteica era idéntica a la producida por el fago SPP1 salvaje. Sin embargo, sólo el 25% de las partículas virales producidas por el mutante gp7 eran capaces de infectar a las bacterias receptoras como consecuencia de un alto número de procesos abortivos en los que se eyectaba el DNA viral al medio antes de producirse la infección. Para analizar la hipótesis de que la gp32 del fago ϕ 11 tuviese un papel similar al llevado a cabo por la proteína gp7 del fago SPP1, en primer lugar estudiamos si en las partículas fágicas producidas por el mutante en la gp32 del fago ϕ 11 se empaquetaba el DNA del fago. Se indujo la cepa JP4032, mutante en el gen ORF32 y como control la cepa mutante en la proteína mayoritaria de la cápside JP2733 y la cepa RN451, lisógena del fago ϕ 11. Los lisados de estas cepas se precipitaron y posteriormente el DNA que se extrajo de las cápsides se corrió en un gel de agarosa para realizar un Southern blot con una sonda específica del fago ϕ 11.

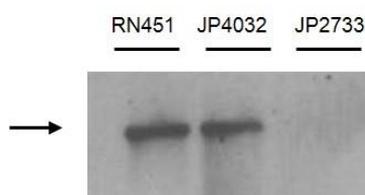


Figura 3.44. Estudio del DNA de las cápsides del mutante en la ORF32 del fago ϕ 11. Se indujeron las cepas RN451, JP4032 (Δ ORF32 ϕ 11) y JP2733 (Δ ORF34 ϕ 11) y los lisados obtenidos se precipitaron con polietilenglicol y NaCl y se extrajo el DNA de las cápsides. Este DNA se corrió en un gel de agarosa y se realizó un Southern blot con una sonda específica del fago ϕ 11. La flecha señala la banda correspondiente el genoma del fago empaquetado en las cápsides.

En la figura 3.44 se observa una banda correspondiente al DNA del fago empaquetado en la cepa JP4032, mutante en la gp32 del fago ϕ 11, confirmando que el mutante en gp32 es capaz de empaquetar el DNA fágico.

A continuación realizamos una titulación donde se utilizaron cepas complementadas con el gen deletado como bacterias receptoras (Tabla 3.12). En el caso de que el mutante en la gp32 del fago ϕ 11 produjese un determinado número de partículas infectivas estos fagos mutantes podrían seguir su ciclo de infección ya que en la bacteria receptora se estaría expresando la gp32, que sería utilizada por estos fagos en las siguientes rondas de amplificación para posibilitar la infección en un alto porcentaje y acabar produciendo calvas visibles en la titulación. Además del mutante en el gen ORF32 del fago ϕ 11 utilizamos como control los mutantes en la proteína mayoritaria de la cápside y del tallo, ya que como componentes mayoritarios de la partícula infectiva, la producción de partículas infectivas en estos mutantes es altamente improbable aunque se complemente la cepa receptora, pues en el lisado original de estos mutantes no es de esperar la presencia de partículas funcionales.

Tabla 3.12. Efecto en el título de fago de los mutantes del fago ϕ 11 sobre las cepas complementadas^a.

ϕ 11	Cepa donadora	Cepa receptora	Título fago ^b
ϕ 11	JP1361	JP4256	1.7×10^9
Δ 32	JP4032	JP4256	3×10^4
ϕ 11	JP1361	JP3165	1.3×10^9
Δ 34	JP2733	JP3165	< 10
ϕ 11	JP1361	JP3166	1.4×10^9
Δ 39	JP2930	JP3166	< 10

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Como muestra la tabla 3.12 la titulación sobre las cepas complementadas solamente restauró el título del mutante en la proteína gp32 del fago ϕ 11, aunque de una forma parcial. Este hecho junto con la presencia en el estudio de microscopía de las partículas generadas por este mutante de cápsides y tallos sueltos sugiere que esta proteína podría tener una función estructural como conector en la formación de la partícula fágica, más que como controladora de la salida del DNA de la cápside. Asimismo los resultados muestran que aunque se producen partículas infectivas, su número está muy afectado, a diferencia de lo que ocurre con la proteína gp7 del fago

SPP1. Para confirmar que este mutante era capaz de generar un pequeño número de partículas infectivas, se introdujo un marcador de eritromicina en el fago salvaje $\phi 11$ y en su mutante en la ORF32, para poder así analizar tanto el título de fago, contabilizando las calvas formadas, como la formación de partículas fágicas al contabilizar los lisogenos generados tras la infección (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Efecto del mutante del fago en la ORF32 del fago $\phi 11$ en la estabilidad de la partícula^a.

$\phi 11$ (<i>erm+</i>)	Temperatura ^b	Días ^c	Título fago ^d	Lisogenización ^e
$\phi 11$		0	3.4×10^7	5.1×10^6
$\Delta 32$		0	< 10	5.8×10^4
$\phi 11$	-20 °C	1	4.9×10^7	9.7×10^5
$\Delta 32$	-20 °C	1	< 10	3.7×10^{94}
$\phi 11$	-20 °C	5	7.1×10^7	3.9×10^6
$\Delta 32$	-20 °C	5	< 10	3.1×10^4
$\phi 11$	4°C	1	4.7×10^7	7.7×10^5
$\Delta 32$	4°C	1	< 10	2.4×10^4
$\phi 11$	4°C	5	6.1×10^7	3.8×10^6
$\Delta 32$	4°C	5	< 10	4.2×10^4
$\phi 11$	T ^a ambiente	1	2.6×10^7	5.9×10^5
$\Delta 32$	T ^a ambiente	1	< 10	3.1×10^4
$\phi 11$	T ^a ambiente	5	1.7×10^7	8.0×10^5
$\Delta 32$	T ^a ambiente	5	< 10	5.0×10^4
$\phi 11$	30°C	1	2.2×10^6	4.0×10^4
$\Delta 32$	30°C	1	< 10	1.9×10^4
$\phi 11$	30°C	5	1.8×10^5	8.0×10^3
$\Delta 32$	30°C	5	< 10	8.0×10^3
$\phi 11$	37°C	1	8.8×10^3	9.2×10^2
$\Delta 32$	37°C	1	< 10	7.1×10^2
$\phi 11$	37°C	5	< 10	<10
$\Delta 32$	37°C	5	< 10	< 10
$\phi 11$	42°C	1	7.0×10^3	7.7×10^2
$\Delta 32$	42°C	1	< 10	3.5×10^2
$\phi 11$	42°C	5	<10	<10
$\Delta 32$	42°C	5	< 10	< 10

^aLa tabla muestra la media de 3 experimentos, con variaciones menores del 5%.

^bLos lisados de los fagos se guardaron las temperaturas indicadas.

^cNº de días en los que los lisados se guardaron a las temperaturas indicadas.

^dNº de calvas de fago x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

^eNº de transductantes x ml de cultivo inducido, usando RN4220 como cepa receptora.

Como se muestra en la tabla 3.13, y en concordancia con nuestros resultados anteriores, el mutante en la ORF32 no era capaz de producir calvas pero si de infectar y generar lisógenos, aunque en un número menor (100 veces) al de la cepa salvaje. Finalmente y con el fin de comparar los roles de las proteínas gp32 del fago $\phi 11$ y gp7 del fago SPP1, analizamos la estabilidad y la capacidad infectiva de las partículas generados por estas cepas del fago $\phi 11$ con marcador. Para ello los lisados generados por las cepas JP6400 ($\phi 11$ *erm*-positiva) y JP10985 ($\phi 11$ Δ ORF32 *erm*-positiva) se guardaron a diferentes condiciones de temperatura durante uno o cinco días y posteriormente se analizó su capacidad de generar lisógenos sobre una cepa receptora.

Como se observa en la tabla 3.13, la capacidad de formar lisógenos del mutante se mantuvo durante el tiempo y las partículas generadas por el mutante en la ORF32 fueron proporcionalmente más estables y resistentes que las partículas generadas por la cepa salvaje, lo que sugiere que a diferencia de la proteína gp7 del fago SPP1, este mutante es capaz de retener el DNA dentro de la partícula vírica, no produciendo inyecciones abortivas de DNA en ausencia de bacteria receptora. Resumiendo, nuestros resultados sugieren que la proteína gp32 del fago $\phi 11$ de *S. aureus* y la proteína gp7 del fago SPP1 de *B. subtilis* tienen diferentes roles en la biología del fago y que la proteína gp32 actuaría como una proteína conectora de la cabeza y el tallo, aunque su papel no sería absolutamente imprescindible ya que en su ausencia el fago es capaz de generar algunas partículas viables.

En resumen, estos estudios nos han permitido caracterizar por primera vez de forma completa el módulo de empaquetamiento de un fago, asignando nuevas funciones a proteínas cuya función dentro del proceso de formación de la partícula viable se desconocía. Asimismo hemos podido establecer los requerimientos para la producción de partículas fágicas y transductantes viables.

Capítulo IV

Discusión

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS LTR: UNA SUPERFAMILIA DE REGULADORES DE LA EXPRESIÓN TARDÍA DE BACTERIOFAGOS DE GRAM-POSITIVOS.

En este trabajo hemos identificado y caracterizado una nueva superfamilia de proteínas encargadas de regular la transcripción de los genes de morfogénesis y lisis en una gran variedad de fagos que infectan a bacterias Gram-positivas. Además, hemos demostrado que la eliminación de estos activadores dio como resultado no sólo la eliminación de la capacidad infectiva de los fagos, sino que también redujo significativamente la transferencia de otros elementos genéticos móviles cuya transferencia está mediada por fagos. Por lo tanto, la actividad de estos reguladores es crítica para la viabilidad del fago y clave para su papel dentro del proceso de transferencia horizontal de genes y factores de virulencia.

Proteínas Ltr: activadores transcripcionales de la expresión génica.

Para asegurar un control estricto de la expresión de los genes tardíos, los bacteriófagos han desarrollado diferentes mecanismos de control, que en la mayoría de los casos incluyen la síntesis de factores codificados por el propio fago en las fases tempranas de la infección/inducción. En este trabajo decidimos estudiar qué factores podían estar implicados en la regulación de los genes tardíos en los bacteriófagos de *S. aureus* y de otros fagos de Gram-positivos, los cuales, a pesar de su importancia en la virulencia de la bacteria, han sido poco caracterizados hasta la fecha.

En este trabajo hemos identificado y caracterizado cinco familias de reguladores de la transcripción tardía, todas ellas ampliamente distribuidas en bacteriófagos de Gram-positivos. Estas proteínas reguladoras, aunque diferentes en su secuencia, presentan unas mismas características bioquímicas, funcionales y estructurales, conformando una superfamilia de proteínas reguladoras de la transcripción tardía a la que hemos denominado Ltr. Las proteínas Ltr regulan el empaquetamiento y la lisis del fago mediante la unión específica a las repeticiones situadas en la región intergénica entre *ltr*, último gen del módulo transcripcional temprano y *terS*, primer gen del módulo de morfogénesis y lisis, siendo los únicos factores codificados por el fago necesarios para la expresión del transcrito tardío desde un único promotor. Asimismo, en este trabajo hemos podido demostrar que el dominio C-terminal de las proteínas Ltr, con una estructura altamente conservada en

todas ellas, participa en el reconocimiento específico de las secuencias de DNA que contiene las repeticiones presentes en la región promotora controlada por estos reguladores.

El regulador de la expresión tardía Alt del fago TP901-1 de *L. lactis* posee algunas semejanzas con los reguladores Ltr, aunque a diferencia de las proteínas Ltr su distribución está más restringida, encontrándose solamente en bacteriófagos de *L. lactis* (Brondsted *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2006). Al igual que las proteínas Ltr, el regulador Alt está codificado aguas arriba de la *terS* y actúa reconociendo unas repeticiones en la región intergénica entre *alt* y *terS*, activando la transcripción del promotor de la *terS*. Estas similitudes podrían sugerir que este regulador formaría también parte de la superfamilia de reguladores Ltr, aunque se deberían realizar más estudios para conocer si su funcionamiento es igual al de las proteínas Ltr.

Dentro de las proteínas Ltr, la familia LtrA presentaba una cierta homología con la región 4 de la subunidad sigma 70 de la RNA polimerasa, lo que plantea la cuestión de si estos reguladores podrían en realidad actuar como factores sigma alternativos codificados por el propio fago. A diferencia de las subunidades sigma, cuyas secuencias de reconocimiento están situadas en los promotores, cerca del inicio de la transcripción, los reguladores Ltr requieren para su unión secuencias localizadas hasta 155 nucleótidos aguas arriba del inicio de la transcripción de la *terS*, llegando hasta más de 500 nucleótidos en el caso del regulador ArpU del fago phiFL2A de *E. faecalis*. Este hecho sugiere que estas proteínas actuarían como proteínas activadoras, uniéndose al DNA y promoviendo posteriormente la unión de la RNA polimerasa a la región intergénica entre *ltr* y *terS*. Este hecho viene avalado por la presencia de un terminador situado aguas abajo del sitio de unión de las proteínas Ltr. En el caso de que las proteínas Ltr actuaran como subunidades sigma y que su sitio de reconocimiento se correspondiese con el promotor de *terS*, la transcripción acabaría en este terminador, con lo que nunca se produciría la transcripción del módulo de morfogénesis del fago.

Así pues, las proteínas Ltr no actúan como antiterminadoras de la transcripción, que es la función que lleva a cabo por la proteína Q del fago λ de *E. coli*, (Nudler and Gottesman, 2002). Los experimentos realizados con los plásmidos de expresión indican que el papel de estas proteínas es el de activar la transcripción de *terS*, y no el de impedir la terminación del transcrito que viene desde el módulo de replicación. Asimismo, la especificidad observada entre las proteínas Ltr y las repeticiones presentes en la región intergénica, pero no entre las proteínas Ltr y las regiones

antiterminadoras, apoyan la idea de que estas proteínas son activadores transcripcionales de los módulos de empaquetamiento y lisis fágicos.

En la mayoría de los sistemas de regulación de la expresión tardía de fagos descritos hasta la fecha, una característica común a todos ellos es el reconocimiento por parte de una proteína activadora de la transcripción tardía de una secuencia de nucleótidos situada a menos de 100 nucleótidos aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, en algunos casos solapándose con el sitio de unión de la RNA polimerasa (Grambow *et al.*, 1990; Hansen *et al.*, 2003; Rojo *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1997). Los reguladores Ltr, por el contrario no parecen tener este tipo de restricción en cuanto a la distancia entre las secuencias de DNA con las repeticiones y el inicio de la transcripción. Esta amplia distancia entre el sitio de inicio de la transcripción y la secuencia de unión del regulador Ltr, así como la presencia de un terminador en esta región intergénica sugiere un mecanismo para la activación de la transcripción más complejo que la unión directa entre el regulador y la RNA polimerasa que no habría sido visto en otros sistemas.

Significado biológico de los sistemas de regulación de la transcripción tardía.

Los bacteriófagos viven bajo una intensa presión de selección, debiéndose adaptar continuamente a las cambiantes condiciones ambientales y en donde una tasa alta de replicación, un empaquetamiento eficiente y una elevada tasa de transferencia pueden representar una posible ventaja competitiva. El control de cada una de las etapas dentro del ciclo biológico de los bacteriófagos es un proceso clave para optimizar la expresión de cada uno de sus genes, para alcanzar así la máxima tasa de crecimiento del bacteriófago. En este sentido, un estricto control temporal es necesario para evitar el empaquetamiento prematuro del DNA del fago antes de que haya finalizado el proceso de replicación. En un gran número de bacteriófagos de Gram-positivos este control es llevado a cabo por las proteínas Ltr que están codificadas al final del módulo de expresión intermedio y se expresan junto a los genes de replicación del fago. Así pues, la expresión de los genes *ltr* y por lo tanto la activación del promotor tardío del fago está ligada a la inducción del fago y la síntesis de las proteínas de replicación. De esta manera la expresión de los genes *ltr* marca la transición desde la expresión de los genes tempranos hacia los genes tardíos y asegura que el aumento de la expresión de los genes *ltr* se producirá únicamente después de una eficiente replicación del bacteriófago.

Las proteínas Ltr forman una superfamilia de reguladores de la transcripción tardía que presentan unas características bioquímicas y estructurales así como un mecanismo de activación común a todas ellas, mientras que por el contrario no presentan homología en cuanto a su secuencia diferenciándose en diversas familias de proteínas reguladoras distribuidas ampliamente entre diversos bacteriófagos de Gram-positivos. Interesantemente, esta diferenciación también se observa en las secuencias de las repeticiones que son reconocidas por los reguladores para unirse y activar la expresión de los genes de morfogénesis y lisis. De hecho, incluso entre proteínas con elevada homología entre sí, como son las proteínas RinA codificadas por los fagos 80 α y ϕ 29 observamos pequeñas diferencias entre las proteínas activadoras, a la vez que en las secuencias de las repeticiones que cada una de ellas reconoce. Estas pequeñas diferencias afectan a la capacidad de cada regulador por activar la expresión del promotor del otro fago. Todas las cepas secuenciadas de *S. aureus* contienen al menos un profago y la mayoría de ellas pueden contener hasta cuatro (Lindsay, 2010), por lo que podría existir la posibilidad de que una misma cepa contuviese dos fagos que codificaran para dos reguladores Ltr idénticos. En este hipotético caso si uno de estos dos fagos tuviese un mayor nivel de expresión de los genes de replicación, y por lo tanto una expresión más temprana del regulador de empaquetamiento, podría activar la expresión de los genes tardíos del segundo fago antes de que este hubiese replicado completamente, lo que imposibilitaría la correcta formación de las partículas y una disminución del título final del segundo fago. Esta guerra biológica entre los diferentes fagos por evitar la activación cruzada de sus respectivos promotores tardíos sería una de las razones que explicaría esta diferenciación entre las proteínas reguladoras y en última instancia la responsable de la gran diversificación y especialización observada en la superfamilia de reguladores Ltr.

ANÁLISIS DE LOS MÓDULOS DE MORFOGÉNESIS Y LISIS DE FAGOS ESTAFILOCÓCICOS.

El empaquetamiento de los bacteriófagos y la formación de la partícula infectiva han sido extensamente estudiados en un número reducido de fagos. Aun así, faltan por conocerse qué papel juegan en este proceso un gran número de proteínas codificadas dentro de los módulos de morfogénesis y lisis de la mayoría de los fagos identificados. En este estudio hemos determinado qué genes codificados en el fago

ϕ 11 son necesarios para la formación de la partícula vírica, definiendo así los requerimientos mínimos para la formación de la partícula infectiva. Además, hemos podido establecer la posible función de algunas proteínas cuyo papel dentro del proceso de formación de la partícula infectiva se desconocía hasta la fecha. Por último, hemos demostrado que las SaPIs y otros elementos genéticos móviles utilizan el mismo mecanismo para su transferencia que el de los bacteriófagos de *S. aureus*.

Caracterización de los módulos de morfogénesis y lisis del fago ϕ 11.

El bacteriófago ϕ 11 es un fago natural de *S. aureus* perteneciente a la familia *Siphoviridae*, del que se dispone su secuencia completa (Iandolo *et al.*, 2002) y que es capaz de movilizar la isla de patogenicidad SaPI_{bov1} en alta frecuencia (Ubeda *et al.*, 2005). Su genoma, al igual que el de otros fagos pertenecientes a la misma familia, está dividido en módulos funcionales, entre los que encontramos un módulo de morfogénesis y lisis que codifica para proteínas altamente conservadas en fagos de *S. aureus* y en otros fagos de Gram-positivos. En este estudio hemos podido definir qué proteínas codificadas por el fago son imprescindibles para la formación de la partícula fágica viable, confirmando la hipótesis de que estos genes estarían codificados en el módulo de morfogénesis y lisis del fago.

Después de realizar la mutagénesis de los genes codificados en el módulo de morfogénesis y lisis del fago ϕ 11, al analizarlos junto con los 7 mutantes caracterizados previamente (Tormo *et al.*, 2008), hemos podido determinar que de los 28 genes codificados en el módulo, 22 de ellos vieron afectada su capacidad para formar partículas fágicas funcionales. Algunos de estos genes cuya mutación afectó a la funcionalidad del fago codifican para proteínas con elevada homología con otras proteínas ampliamente estudiadas en otros fagos tanto de bacterias de Gram-positivas como de Gram-negativas, por lo que *a priori* podíamos suponer que su papel dentro del proceso de empaquetamiento del fago ϕ 11 sería similar al ya descrito. Estas corresponden a las subunidades pequeña y grande de la terminasa (gp29 y gp30), la proteína portal (gp31), la proteína de andamiaje (gp33), la proteína mayoritaria de la cápside y del tallo (gp34 y gp39), la proteína tape measure (gp42), proteínas del tallo (gp43, gp45 y gp50), la proteína de la placa base (gp54) y las proteínas implicadas en la lisis de la bacteria: holina (gp52) y amidasa (gp53).

Por otra parte, entre aquellos genes cuya mutación afectó a la viabilidad del fago encontramos genes que codifican para proteínas que aunque presentan dominios

conservados y se encuentran homólogos en otros fagos de Gram-positivos, se desconoce su función dentro del proceso de formación de la partícula vírica. Este es el caso de las proteínas gp36, gp37, gp38 y gp67, que actuarían como proteínas conectoras de la cabeza y el tallo, ya que estos mutantes producen cápsides y tallos pero no están ensamblados. Por lo que respecta al mutante en la ORF35, éste presentaba un menor título de fago y el tamaño de las calvas que produce es más reducido que el de la cepa salvaje, indicando que el proceso está alterado. Al observar las partículas producidas por este mutante encontramos cabezas y tallos sueltos junto a partículas totalmente formadas, sugiriendo que esta proteína también actuaría como un conector de la cabeza y el tallo, aunque su actividad no es absolutamente necesaria pudiéndose formar algunas partículas funcionales.

El análisis por microscopía electrónica de los mutantes en las proteínas gp40, gp41, gp43 y gp44 reveló una ausencia completa de tallos en el lisado de estos mutantes. Estos resultados sugieren que estas proteínas son absolutamente necesarias en el proceso de formación del tallo, bien porque son componentes estructurales actuando como proteínas minoritarias del tallo o bien porque intervienen en el proceso de ensamblaje de las distintos componentes del tallo.

Otro de los mutantes que vio afectada la producción de partículas fágicas fue el mutante en la ORF32 del fago ϕ 11. Este gen presenta un dominio conservado presente en la proteína Gp7 del fago SPP1 de *Bacillus subtilis*, una proteína minoritaria de la cápside relacionada con la correcta eyección del DNA del fago hacia el citoplasma de la bacteria durante la infección (Vinga *et al.*, 2006). El mutante en la gp32 es capaz de generar partículas de fago funcionales, aunque en bastante menor número a las producidas por la cepa salvaje. No obstante, las partículas generadas por este mutante son capaces de mantener el DNA en el interior de la partícula vírica a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones ambientales, y son proporcionalmente más estables que las generadas por la cepa salvaje, por lo que al contrario del papel que desempeña la proteína Gp7 en el fago SPP1, nuestros resultados sugieren que la proteína gp32 podría intervenir en el proceso de formación de la partícula vírica o bien formar parte de la partícula fágica como una proteína conectora de la cabeza al tallo. No obstante, la presencia de esta proteína no sería absolutamente indispensable ya que en su ausencia el fago es capaz de formar partículas víricas funcionales. Curiosamente, la mutación en esta proteína parece afectar más a la viabilidad de las partículas del fago que a la de las partículas víricas con la isla, que se comportan como la cepa salvaje.

Sorprendentemente, los mutantes en las proteínas gp46, gp47, gp48, gp50 gp51 y gp66 no vieron afectada su capacidad para formar partículas fágicas en las condiciones empleadas en el laboratorio. La proteína gp50 había sido caracterizada previamente como una proteína de la fibra larga del tallo (Tormo *et al.*, 2008). Estas proteínas son las responsables del reconocimiento de los receptores del hospedador en el caso de algunos fagos como el fago λ o el fago T5 (Heller, 1984; Wang *et al.*, 2000). Sin embargo, dado que el ciclo del fago no se vio afectado en este mutante no parece que ésta vaya a ser la función principal de esta proteína. En el caso de los genes gp46-49 y gp50-51 su posición en el genoma, codificados después de las proteínas del tallo y situados al final del módulo de morfogénesis, sugiere que podrían ser proteínas del tallo o que podrían intervenir en su formación. En este punto es importante señalar que el hecho de que no hayamos sido capaces de asignar una función para estas proteínas *in vitro* no significa que no tengan un papel importante en las condiciones naturales de infección *in vivo*, donde el número de bacterias receptoras es significativamente más reducido. Así pues serán necesarios más estudios para poder caracterizar la función de estas proteínas.

En este trabajo, hemos podido definir que proteínas codificadas por el fago intervienen en el proceso de lisis bacteriana. La hidrolasa de la pared celular (gp49) y la holina (gp52) no son esenciales para producir partículas fágicas funcionales ya que posee un título similar al de la cepa salvaje. No obstante su mutación afecta a la capacidad infectiva del fago al generar calvas más pequeñas y al retrasarse la lisis del cultivo bacteriano. En el caso de la hidrolasa (gp49), en un estudio reciente se ha demostrado que esta proteína ayuda a la estabilización de la partícula ya que en su ausencia muchas de las partículas pierden su contenido de DNA (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013) por lo que podría poseer un papel estructural además de la posible función lítica. Por otra parte, el mutante en la amidasa (gp53) no fue capaz de lisar el cultivo ni de producir partículas fágicas funcionales. Así pues, la hidrolasa, la holina y la amidasa formarían el módulo de lisis del fago ϕ 11 encargado de degradar la pared celular de la bacteria para liberar las partículas de fago fuera de la célula bacteriana.

Los bacteriófagos son el vehículo para la transferencia horizontal de otros elementos genéticos móviles como los plásmidos o las islas de patogenicidad de *S. aureus*. En este estudio hemos demostrado que aquellas proteínas necesarias para la formación de partículas fágicas infectivas también lo eran para la transferencia de ambos EGM, a excepción de los mutantes en las proteínas gp29 (*terS*), gp32, gp53 y gp54. Las SaPIs codifican para su propia subunidad pequeña de la terminasa que

forma un complejo con la subunidad grande de la terminasa del fago que reconoce específicamente el DNA de la isla (Tormo *et al.*, 2008), lo que explica que la delección del gen fágico *terS* no afecte su transferencia. Por el contrario el plásmido necesita la subunidad pequeña de la terminasa del fago para su transferencia, ya que en ausencia de la misma el DNA no se puede empaquetar. En el caso de las proteínas gp32, gp53 (amidasa) y gp54 (fibra del tallo) el hecho de que se obtengan partículas transductantes de isla y plásmido pero no de fago puede que sea debido a que para la formación de las calvas se requieren diferentes rondas de amplificación del fago, mientras que en el caso de la transferencia de la isla y el plásmido solo se necesita que una partícula entre en la célula bacteriana y se inserte en el genoma de la bacteria (SaPIs) o comience su ciclo (plásmidos) para detectar su transferencia. Estos resultados sugieren que estos mutantes no serían totalmente defectivos para el empaquetamiento del fago y que por lo tanto todos los EGMs utilizan las mismas proteínas y el mismo mecanismo de transferencia que utiliza el propio fago.

Las SaPIs compiten con los fagos por las proteínas de empaquetamiento codificadas por el fago.

Las SaPIs no codifican para proteínas estructurales del virión sino que utilizan las proteínas codificadas por el fago para la formación de partículas víricas más pequeñas donde empaquetarán su genoma (Tallent *et al.*, 2007; Tormo *et al.*, 2008). Al igual que ocurre con el fago satélite P4 que parasita al fago P2 de *E. coli*, las SaPIs codifican para proteínas que reestructuran la cápside fágica para empaquetar su genoma de menor tamaño (Ubeda *et al.*, 2007)(Christie and Dokland, 2012). Para producir estas cápsides el fago P4 codifica para la proteína Sid, una proteína de andamiaje externa que dirige la producción de cápsides pequeñas (Dearborn *et al.*, 2012). Tras empaquetarse el genoma del fago satélite P4, la proteína Sid se libera, por lo que en las partículas maduras de P4 Sid no se detecta. A su vez, la mayoría de las SaPIs codifican para dos proteínas CpmA y CpmB (Ubeda *et al.*, 2007), que a diferencia de Sid sí se encuentran en las partículas maduras (Poliakov *et al.*, 2008) y que actúan como proteínas de andamiaje internas, sustituyendo a la proteína de andamiaje del fago y promoviendo la formación de las cápsides pequeñas donde se empaquetara el genoma de la isla (Damle *et al.*, 2012; Dearborn and Dokland, 2012). Esta dependencia de la presencia de un fago inductor para su transferencia también se ha observado en el caso del fago satélite RS1, que es escindido del cromosoma y

transferido como un fago filamentosos utilizando las proteínas estructurales del fago ϕ CTX de *Vibrio cholerae* (Faruque *et al.*, 2002).

¿Cuál podría ser la fuerza evolutiva que hace que las islas dependan completamente de la maquinaria de empaquetamiento del fago inductor? Las SaPIs han evolucionado de manera que su ciclo vital no depende directamente de la respuesta SOS bacteriana, sino que utiliza proteínas codificadas por los fagos como anti-represores (Tormo-Mas *et al.*, 2010; Tormo-Mas *et al.*, 2013). De esta manera, la inducción de la isla va ligada a la presencia de un fago en replicación cuyas proteínas de encapsidación podrán ser secuestradas por la isla para su propio empaquetamiento, con lo que la presencia de un módulo de morfogénesis y lisis propio de la isla podría ser prescindible. Asimismo, y el hecho de que la isla no posea un módulo de empaquetamiento propio y tenga que competir con el fago por las proteínas para formar las partículas víricas podría ser beneficioso para la bacteria ya que al interferir con la biología del fago, las islas actuarían como elementos protectores para la población frente a las infecciones fágicas. De hecho las SaPIs presentan diferentes estrategias de interferencia con la biología del fago. Así, además de la producción de partículas víricas de menor tamaño, las SaPIs codifican para la proteína Ppi, cuya función es bloquear la funcionalidad de la subunidad pequeña de la terminasa del fago, impidiendo por tanto su empaquetamiento y diseminación (Ram *et al.*, 2012).

De hecho, los ensayos de complementación de los distintos mutantes de empaquetamiento en los que se observa un empaquetamiento preferencial de la isla frente al fago podrían mostrar de una forma bastante real la relación existente entre el fago y la isla *in vivo*. Normalmente las células no están expuestas a concentraciones tan elevadas de los agentes dañinos del DNA como las utilizadas en el laboratorio y por lo tanto la respuesta SOS no llega a alcanzar los niveles tan elevados de inducción observados en el laboratorio (Little *et al.*, 1999). De forma similar, en los experimentos de complementación el nivel de expresión del gen clonado es menor al del gen original en el fago por lo que la producción de cápsides es limitada. Por lo tanto, frente a una leve inducción de la respuesta SOS el número de partículas víricas producidas sería bajo y se produciría una lucha entre el fago y la isla por encapsidar su DNA y en este punto la producción por parte de la isla de proteínas que interfieren con la biología del fago como la proteína Ppi o las proteínas remodeladoras de la cápside, inclinaría la balanza a favor de las SaPIs. Como consecuencia de esta guerra biológica, se producen menos partículas de fagos y en consecuencia, menos bacterias se infectan por lo viriones recién formados.

En resumen, en esta Tesis Doctoral hemos profundizado en la biología de los fagos de *S. aureus*, y en su relación con otros EGMs. Nuestros resultados sugieren la existencia de mecanismos no caracterizados en la relación entre los diferentes EGMs y que son necesarios nuevos estudios a fin de conocer y entender los ciclos biológicos de estas fascinantes criaturas subcelulares.

Capítulo V

Material y Métodos

METODOLOGÍA GENERAL.

Bacterias, plásmidos y medios utilizados en estos estudios.

Las cepas y plásmidos utilizados en estos estudios se muestran en las Tablas 5.1 y 5.2.

Las cepas de *S. aureus* se crecieron rutinariamente a 32 °C, 37 °C o 43 °C en medio agar TSA o medio líquido TSB (Scharlau) y se guardaron posteriormente como glicerizados a -80 °C. Cuando fue conveniente se incorporaron los antibióticos eritromicina (10 µgr ml⁻¹ o 2,5 µgr ml⁻¹), tetraciclina (3 µgr ml⁻¹), cloramfenicol (20 µgr ml⁻¹) o el producto Xgal (20 mg ml⁻¹) (Roche).

Las cepas de *E. faecalis* se crecieron rutinariamente a 32 °C, 37°C o 43 °C en medio BHI (Scharlau) o BHI agar suplementado con los antibióticos apropiados en cada caso: eritromicina (2,5 µgr ml⁻¹), clorafenicol (20 µgr ml⁻¹) o el producto Xgal (20 mg ml⁻¹) (Roche).

Las cepas de *Escherichia coli* DH5α se crecieron en caldo de cultivo Luria-Bertani (LB) o en placas de agar Luria-Bertani (Pronadisa). Para mantener las construcciones en *E. coli* se utilizó el antibiotico ampicilina (100 µg ml⁻¹).

Manipulaciones del DNA.

Las manipulaciones rutinarias del DNA se realizaron utilizando procedimientos estándar (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1990).

El DNA cromosómico de las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *L. lactis*, *S. suis*, *S. pyogenes*, *S carnosus* fue extraído utilizando el kit “Genelute bacterial genomic DNA” (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante, a excepción de la lisis bacteriana de las cepas de *S. aureus*, que fue llevada a cabo previamente con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) a 37 °C durante 1 hora.

El DNA plasmídico fue extraído de las cepas de *E. coli* utilizando el kit “Genelute plasmid miniprep” (Sigma) siguiendo el protocolo del fabricante. El DNA plasmídico de las cepas de *S. aureus* y de *E. faecalis* fue extraído utilizando el mismo protocolo a excepción de una lisis previa de las células bacterianas con lisostafina (Sigma; 12,5 µgr ml⁻¹) o lisozima (Sigma; 10 µgr ml⁻¹) respectivamente a 37 °C durante 1 hora.

Los plásmidos obtenidos de *E. coli* fueron transformados en estafilococos y enterococos mediante electroporación (Cucarella *et al.*, 2001).

Todas las enzimas necesarias para la manipulación del DNA fueron suministradas por MBI Fermentas, Roche o Amersham. Los cebadores se obtuvieron de Invitrogen y están listados en la Tabla 5.3.

El DNA fue secuenciado por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia (IBMCP-UPV), mediante el método de la terminación de cadena por incorporación de dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos.

Southern blot.

Para la hibridación mediante Southern blot, se purificó DNA cromosómico, se digirió en su caso si fue necesario y se separó mediante gel de electroforesis de agarosa. Los geles se transfirieron a membranas de nylon (Hbond-N 0.45 mm de diámetro de poro; Amersham Life Science) utilizando métodos estándar (Ausubel, 1990; Sambrook, 1989). El marcado de la sonda y su hibridación con el DNA se realizó de acuerdo al protocolo aportado por el kit de marcado de DNA PCR-DIG y detección de quimioluminiscencia (Roche).

Análisis computacional.

Para las búsquedas de homología de las secuencias obtenidas se utilizó el programa BLAST del servidor NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias fueron comparadas con la base de datos del GenBank.

Para el análisis de árboles filogenéticos se utilizó el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). En el alineamiento múltiple de secuencias se utilizó el programa praliné del servidor <http://www.ibi.vu.nl/programs/pralinewww/> (Simossis and Heringa, 2005) y para detectar homologías remotas entre proteínas se utilizó el método de los modelos ocultos de Markov (Karplus *et al.*, 1998).

Extracción de RNA y análisis por qRT-PCR.

El protocolo de extracción de RNA total se realizó utilizando el “Fast RNA-blue kit” (Bio 101) siguiendo las directrices del fabricante.

Se cuantificó el RNA en un espectrofotómetro Genesys 10 uv a una longitud de onda de 260nm. 4 µg del RNA obtenido fue tratado con la DNasa I, “Amplification Grade” (Invitrogen). El tratamiento se realizó a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente la enzima fue inactivada a 65 °C en presencia de EDTA. Para verificar la ausencia de DNA genómico en cada muestra se realizó una transcripción reversa (RT) en presencia y en ausencia de “Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase” (Invitrogen). Todas las preparaciones fueron purificadas con el kit “QIAquick PCR purification” de Qiagen.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de Bio-Rad. Las diluciones del cDNA se hicieron usando un factor de 2, siendo la cantidad mayor de 80 ng de RNA en la reacción de RT. Las reacciones se realizaron por cuadruplicado. La obtención y análisis de los datos se realizó mediante el programa de ordenador iCyclerTMiQ (Optical System Software, Bio-Rad).

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, que contenía dNTPs (Roche) a una concentración final de 200 µM, cebadores (Tabla 5.3) a una concentración final de 200 nM, SYBRGreen I (Molecular Probes) a una dilución final 1:400.000, fluoresceína (Bio-Rad) a una concentración final 5 nM, tampón para PCR de Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen) sin Mg, MgCl₂ a una concentración final de 1,5 mM (Invitrogen) y Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen) a 0,5 unidades por reacción.

Cuantificación de la expresión de las ORFs de los fagos φ11, φ55 y phiFL2A.

Para cuantificar la expresión de las diversas ORFs de los fagos φ11 φ55 y phiFL2A se tomaron muestras para la extracción del RNA a tiempo 0, 30 y a los 60 min. tras la inducción de la respuesta SOS con mitomicina C en las cepas salvajes y sus respectivos derivados mutantes en los reguladores de empaquetamiento.

Los transcritos del gen *gyrB*, que se expresa constitutivamente, fueron utilizados como control endógeno y los niveles de expresión de las diferentes ORFs se normalizaron con respecto a la expresión de *gyrB*. Se usaron cebadores internos específicos para cada ORF de los fagos φ11, φ55 y phiFL2A (Tabla 5.3). Para calcular las variaciones de la expresión de cada transcrito y relativizarlas respecto a su control (*gyrB*), se utilizó el protocolo descrito por Livak (Livak and Schmittgen, 2001), y en el que se utiliza la siguiente fórmula:

$$CT_{gen} - CT_{gyrB} = \Delta CT$$

$$\Delta CT_{\Delta L.tr} - \Delta CT_{wt.} = \Delta \Delta CT$$

CT indica el valor umbral de amplificación de cada gen ("cycle threshold"). El valor $2^{-\Delta\Delta CT}$ representa el número de veces que incrementa o disminuye la expresión del gen problema en el mutante respecto a la cepa salvaje, relativizadas al gen constitutivo (girasa).

Identificación del sitio de inicio de la transcripción de *terS* mediante 5' RACE.

Para caracterizar de una forma exacta el inicio de la transcripción del gen de la terminasa pequeña (*terS*) en los fagos $\phi 11$, $\phi 55$ y ϕ FL2A se decidió utilizar el kit RACE (Roche), al tratarse de un método que permite una rápida amplificación del extremo 5' del cDNA.

Siguiendo el protocolo suministrado por el kit, y a partir de una extracción de RNA total de las distintas cepas lisogénicas para los distintos fagos, se sintetizó la hebra de cDNA mediante el uso de una transcriptasa reversa y los cebadores específicos de cada fago (Tabla 5.3).

El cDNA obtenido fue purificado por columna (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) y se le añadió una tallo poli(A) en el extremo 5' mediante el uso de la Terminal transferasa.

La existencia de esta tallo poli(A) permitió la amplificación mediante PCR, utilizando para ello los cebadores específicos de cada fago (Tabla 5.3) y el oligo (dT). El producto de PCR obtenido se usó como molde para una segunda PCR en la que se utilizó un cebador localizado aguas arriba del utilizado en la anterior PCR (Tabla 5.3). Este último producto de PCR fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % y se clonó utilizando el sistema TOPO-PCR (Invitrogen).

El producto de PCR insertado en el TOPO fue secuenciado con el fin de caracterizar el inicio de la transcripción.

Electroforesis en gel de retardo.

Para determinar si las diferentes proteínas Ltr (RinA, LtrC y ArpU) se unían específicamente a sus respectivas regiones promotoras de la *terS* se clonaron cada una de estas proteínas en el plásmido pGEX-4T-1, se sobreexpresaron en *E. coli* y se purificaron. Se prepararon sondas de DNA mediante la amplificación por PCR de la región promotora de cada fago, en donde uno de los cebadores de la pareja marcado en el extremo 5' con digoxigenina (DIG) y purificando el producto de PCR en un gel

de agarosa de bajo punto de fusión entre el 2 % y 3 %. Los oligonucleótidos utilizados para amplificar y marcar con digoxigenina el fragmento del promotor están listados en la Tabla 5.3.

La mezcla de DNA y proteína (20 μ l), que contiene unos 10 ng de la sonda de DNA marcada con digoxigenina y 100 nM de proteína purificada, se incubó en el buffer de unión (5mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM NaCl, 5% Glicerol, 1 μ g de DNA de salmón y 50 μ g/ml de suero de albúmina bovina). Después de 30 min. a 30 °C, la mezcla de reacción se cargó en un gel al 6% de poliacrilamida Tris-glicina no desnaturante (pre-separación de 30 min. a 10 V/cm en 25 mM Tris-HCl [pH 8.5]-250 mM glicina-1 mM EDTA). Los complejos DNA-proteína se separaron a 100 V durante una hora y seguidamente se transfirieron a una membrana de nylon "Biodine B" (Pall Gelman Laboratory).

La detección se realizó siguiendo las directrices del fabricante (Roche). Para los experimentos de competición específica se usaron 500 veces más de DNA específico no marcado, y para los de competición inespecífica 500 veces más de DNA inespecífico no marcado. La electroforesis en gel de retardo se realizó tres veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Purificación de proteínas.

La clonación y purificación de las proteínas de fusión His₆-Ltr se realizó tal y como está descrito en el artículo de Chien y colaboradores (Chien *et al.*, 1999). La pureza de las proteínas purificadas se comprobó mediante electroforesis y tinción con Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Sigma) de geles de poliacrilamida al 12% los cuales contenían SDS. La proteína se encontraba pura en un 98%. La concentración de la proteína purificada se determinó mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Calif.), utilizando como estándar albúmina de suero bovino.

MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

Ensayo enzimático para la cuantificación de la actividad β -lactamasa en los plásmidos de fusión transcripcional.

Para la realización de esta técnica se utilizó un cultivo de las cepas de interés crecido a 37 °C en agitación durante toda la noche. En primer lugar diluimos el cultivo

1:50 en TSB y crecimos hasta $DO_{540}=0.3-0.4$, momento en el recogemos una alícuota de 100 μ l de muestra que anotamos como t_0 y que será congelada para su posterior análisis. A continuación, en caso de ser necesario en función del experimento, se añade MC y se incuba en agitación lenta a 32 °C. Transcurridos 90 y 180 minutos de la inducción, se recogen alícuotas de 50 μ l de cada muestra para el análisis y a las que se les añade Azida Sódica (5 mM). Se transfiere a placas de poliestireno de fondo plano de 96 pocillos y se procede a la lectura de la placa en el aparato THERMOmax (Molecular devices) a una longitud de onda de DO_{650} y DO_{490} . A continuación añadimos 50 μ l de la solución de nitrocefina (132 μ g/ml en una solución de fosfato sódico 0.1M a pH 5,8) y se introduce de nuevo la placa en el aparato THERMOmax para su lectura durante 20 minutos a intervalos de 20 segundos.

Para el cálculo de las unidades de actividad β -lactamasa, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Unidad de actividad } \beta\text{-lactamasa} = V_{\text{max}} \cdot \text{factor de dilución} / DO_{650\text{nm}}$$

$$V_{\text{max}} = \Delta \epsilon \times 10^3 / \text{min}$$

Un incremento de absorbancia de 0.001 DO_{490} se define como 1 unidad de actividad β -lactamasa.

METODOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ESTUDIOS DE INDUCCIÓN DE SaPIs Y FAGOS.

Inducción de profagos.

El ciclo lítico de los fagos que se encuentran en estado latente en la bacteria puede inducirse mediante la aplicación de sustancias que activen la respuesta SOS. Para obtener un lisado de una cepa lisogénica de *S. aureus*, se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció hasta alcanzar una $DO_{540} = 0.3-0.4$. Seguidamente se añadió mitomicina C (Sigma, 2 μ g ml^{-1}) sustancia que provoca daño celular y activa la respuesta SOS. Posteriormente los cultivos se crecieron en agitación lenta (80 rpm) a 32 °C. La lisis normalmente solía ocurrir sobre las 4 h. Antes de que ocurriera la lisis, en determinados experimentos, se tomaron muestras (1 ml) a distintos tiempos de los cultivos inducidos y se extrajo su DNA (ver apartado de extracción de DNA).

Los lisados obtenidos se filtraron utilizando filtros de 0,2 μm para eliminar aquellas bacterias que no hubieran sido lisadas. Posteriormente estos lisados se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Alternativamente también se obtuvieron lisados por infección de bacterias sensibles a fagos. Los fagos penetrarían en la bacteria, comenzarían su ciclo lítico, amplificándose considerablemente la población de fagos que acabarían lisando la bacteria. Para ello se realizó una dilución 1/50 en TSB de un cultivo estacionario y se creció el cultivo hasta alcanzar una $\text{DO}_{650} = 0.15$. Posteriormente el cultivo se centrifugó, se resuspendió en TSB-Phage buffer (1 mM NaCl, 0.05M Tris pH = 7.8, 1 mM MgSO_4 , 4 mM CaCl_2) (1:1) y se infectó con el fago a una multiplicidad de fagos/bacterias 3:1 o 1:1. La lisis ocurría también sobre las 4 h después de la infección.

Titulación de fagos.

Para cuantificar el número de partículas fágicas que contiene un lisado se diluyó un cultivo estacionario de la cepa RN4220 (sensible a la mayoría de los fagos de *S. aureus*) 1/50 en TSB y se creció hasta alcanzar una $\text{DO}_{540} = 0.3-0.4$. Se infectaron 50 μl de este cultivo con 100 μl de diluciones seriadas en Phage buffer del lisado a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los cuales, la mezcla de fagos y bacterias se plaqueó en placas de Phage base (25 gr de Nutrient Broth N°2, Oxoid; 7gr de agar) suplementadas con CaCl_2 a una concentración final 10 mM. Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se cuantificaron el número de calvas producidas por el fago y se multiplicó por el factor de dilución.

Transducción.

Para estudiar el proceso de transferencia de una SaPI o de otros EGM como plásmidos, se utilizaron los lisados obtenidos mediante el método de inducción o infección que se han comentado anteriormente. Cabe destacar que SaPI_{bov1} y SaPI1 (SaPIs que se estudiaron) contienen un marcador genético que confiere resistencia a tetraciclina a la bacteria, lo cual nos permite estudiar la transferencia de estas islas. El derivado SaPI_{bov1} *tst::tetM* que contiene el gen marcador *tetM* incluido en el gen *tst* de SaPI_{bov1} fue proporcionado por Ross Fitzgerald (Fitzgerald *et al.*, 2001); el

derivado SaPI1 *tst::tetM* que posee el marcador de tetraciclina en el gen *tst* de SaPI1 fue proporcionado por Richard Novick (Lindsay *et al.*, 1998).

Se realizaron diluciones seriadas de estos lisados en Phage buffer. 100 microlitros de estas diluciones se añadieron a 1 ml de bacteriasceptoras crecidas hasta $DO_{540} = 1.4$ a las que se añadió $CaCl_2$ a una concentración final 4.4 mM. La mezcla del lisado con las bacterias se incubó a 37 °C durante 20 minutos para dar tiempo suficiente a la isla a penetrar en la bacteria. Posteriormente se plaqueó la mezcla en placas de TSA con tetraciclina, en el caso de la isla u otro antibiótico según se requiriera. Estas placas contenían Citrato Sódico (17 mM) para impedir la infección de las bacteriasceptoras por los fagos del lisado. Se utilizó la cepa RN4220 como bacteria aceptora.

Precipitación de fagos.

El volumen del lisado obtenido tras la inducción de las distintas cepas se centrifugó (9.000 g durante 15 min) para eliminar los restos celulares no lisados. El sobrenadante se trató con DNasa y RNasa a una concentración de 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$, con el objetivo de eliminar el posible DNA que pudiera estar adherido y no encapsidado, así como el RNA ribosomal. Posteriormente se añadió NaCl hasta 1 M. Tras centrifugarlo de nuevo, se precipitó con PEG 8.000 dejándolo toda la noche en hielo. Posteriormente, se centrifugó y el lisado puro lo sometimos a ultracentrifugación en un rotor Beckman 72 Ti (110.000 g durante 4 h a 4 °C) con el fin de precipitar el fago y poder resuspenderlo en un volumen reducido para concentrarlo lo máximo posible. El pellet obtenido del lisado inicial de 500 ml se resuspendió en un volumen final de 2 ml de buffer S.M.

Microscopía electrónica.

Las cepas que contenían el fago $\phi 11$ y los diferentes mutantes se indujeron con mitomicina C (Sigma, 2 $\mu\text{g} \text{ml}^{-1}$) y 15 ml de estos lisados se trataron con 5 μl de RNasa (10 mg/ml) durante 20 min. a temperatura ambiente y se filtraron utilizando filtros de 0,2 μm . Se centrifugaron 10 ml de los lisados filtrados a 81,374 x g durante 2 h a 15 °C (rotor Beckman 50 Ti), el pellet se resuspendió en 200 μl de Phage buffer a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente, 5 μl de cada muestra se aplicaron en gradillas cubiertas por una película de cobre y teñidas con acetato de uranilo y se examinaron

con un microscopio electrónico (Phillips CM12) a 53,000x y 110,000x aumentos y se fotografiaron.

Extracción del DNA para el estudio de replicación de fagos y SaPIs.

Con el fin de identificar la inducción de una SaPI por fagos o analizar la replicación de los diferentes fagos, después de la infección o inducción de las diferentes cepas en estudio se tomaron muestras a distintos tiempos, que posteriormente se centrifugaron para precipitar las bacterias. Los precipitados obtenidos se resuspendieron en TES-sacarosa (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5 M sacarosa a pH 6) y se lisaron mediante lisostafina (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de RNasa pancreática (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 30 min. a 37 °C. El lisado obtenido se incubó con proteinasa K (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) en presencia de SDS (1%) durante 30 min. a 55 °C. Posteriormente se añadió tampón de carga y se vortió durante al menos 20 minutos. Seguidamente se introdujo la muestra en un baño de hielo seco hasta que el lisado se congeló y posteriormente se descongeló en un baño de agua a 65 °C. Esta operación se repitió dos veces más. Por último las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.7 % y se dejaron correr durante toda la noche con un voltaje de 20 V para poder separar mejor el DNA genómico de la banda de replicación del fago o de la posible banda de inducción de la SaPI. Finalmente el gel se fotografió y en los casos en los que fue necesario se transfirió el gel a una membrana de nylon para la realización de un Southern blot.

METODOLOGÍA UTILIZADA PARA LA OBTENCIÓN DE MUTANTES.

Obtención de mutantes por delección.

Para la mutación de un determinado gen, se lleva a cabo la clonación de fragmentos flanqueantes a la secuencia a deleccionar en el plásmido pMAD (Arnaud *et al.*, 2004), el cual permite realizar delecciones sin introducir ningún marcador cromosómico. Para ello, se amplifican los fragmentos flanqueantes a la zona a deleccionar utilizando dos parejas de cebadores (Figura 5.1). Una pareja amplificaría la región 5' a la delección (cebadores 1 y 2) y la otra pareja amplificaría la región 3' a la delección (cebadores 3 y 4). La secuencia del cebador 3 (delimita el extremo 3' de la delección) contiene una cola en su extremo 5' que es complementaria con la secuencia

del cebador 2 (delimita el extremo 5' de la delección). En una segunda PCR utilizamos como DNA molde 1 μ l de los amplificados obtenidos en la primera PCR y los cebadores 1 y 4 (cebadores externos). En los primeros ciclos de la PCR las secuencias complementarias de los cebadores 2 y 3 hibridan y permiten la obtención de un molde de DNA que contiene los dos amplificados. En los siguientes ciclos de la PCR los cebadores externos 1 y 4 permiten la amplificación del nuevo molde de DNA formado. De esta forma un solo amplificado contendría los dos fragmentos necesarios para realizar la delección (Figura 5.1).

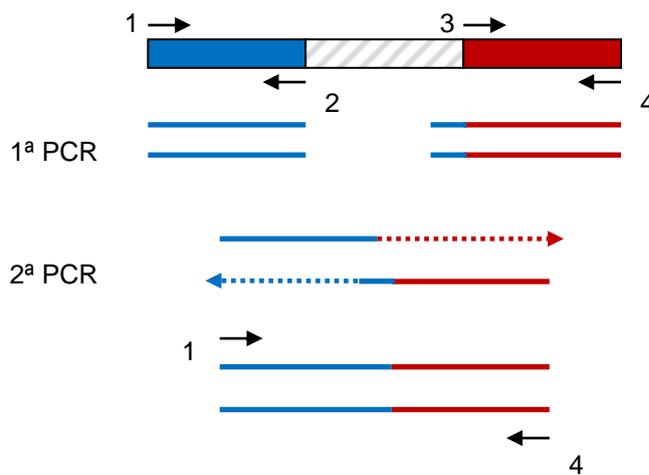


Figura 5.1. Representación esquemática de la doble PCR realizada para obtener los mutantes por delección. La caja rayada indica la zona a deleccionar. Las cajas azul y roja representan los fragmentos 5' y 3' flanqueantes a la delección amplificados en la PCR 1. Las flechas indican la posición donde hibridan los cebadores.

Los fragmentos amplificados pueden clonarse en los vectores pc-TOPO o pGEM-T (Promega), los cuales facilitan la ligación de los productos de PCR ya que no necesitan ser digeridos previamente. A continuación estos fragmentos fueron liberados de las construcciones generadas cortando con un par de enzimas de restricción, y fueron ligados en el plásmido pMAD que previamente había sido digerido con el mismo par de enzimas de restricción. El plásmido pMAD contiene un origen de replicación para Gram negativos y un origen de replicación termosensible para Gram positivos. También contiene un gen que confiere resistencia a eritromicina en *S. aureus* y un gen que codifica para la enzima β -galactosidasa que al metabolizar la sustancia X-gal produce un metabolito de color azul. De esta forma, las bacterias que presenten el plásmido serán resistentes a eritromicina y en presencia de X-gal, las colonias que produzcan serán azules.

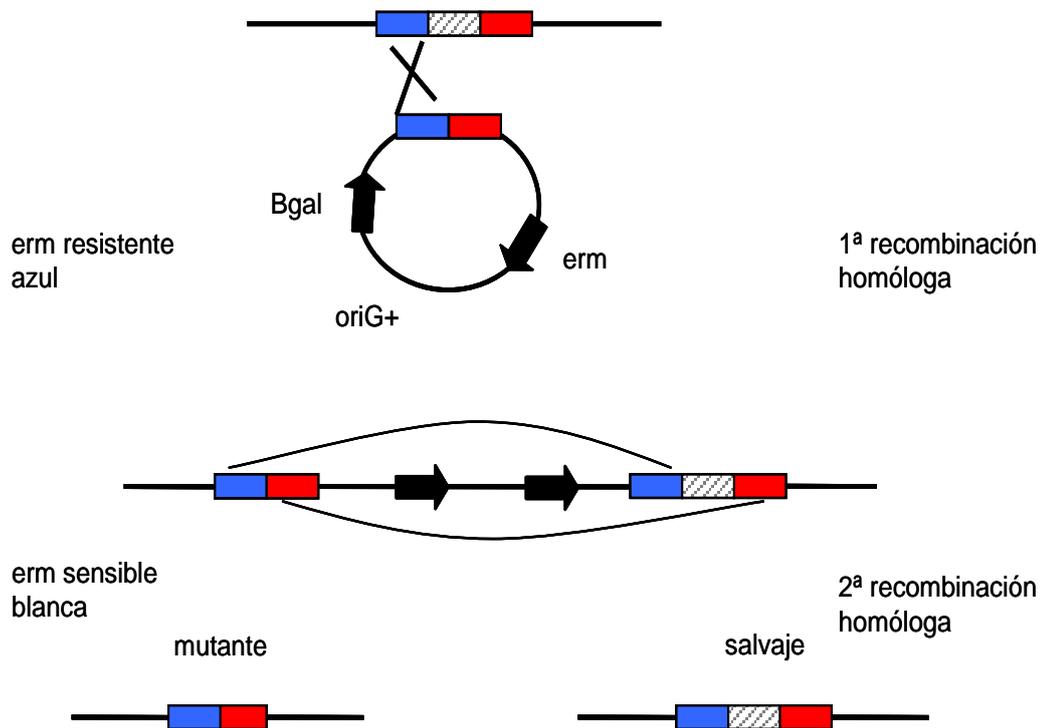


Figura 5.2. Esquema representativo de la mutagénesis por pMAD. En la 1ª recombinação homóloga (integración del plásmido) la bacteria es azul y es capaz de crecer en presencia de *erm*. En la 2ª recombinação homóloga (delección del plásmido) la bacteria es blanca y sensible a *erm*. En esta 2ª recombinação se pueden producir dos genotipos: mutante por delección ó restauración del genotipo salvaje.

Las construcciones generadas en pMAD se introducen a una cepa de *S. aureus*, en nuestro caso la RN4220 por ser fácilmente transformable. Se crecen las bacterias obtenidas a 30°C en TSB conteniendo eritromicina y se plaquean diluciones del cultivo en fase estacionaria en TSA conteniendo eritromicina y Xgal a 43 °C (temperatura restrictiva). El plásmido pMAD no puede replicar a 43 °C, por lo que las colonias que crezcan en eritromicina serán bacterias con el plásmido integrado en el cromosoma bacteriano por recombinação homóloga de alguno de los dos fragmentos flanqueantes al gen a delecionar. A continuación, se pican de 1 a 5 colonias en TSB sin antibiótico, se plaquean diluciones del cultivo estacionario en TSA conteniendo Xgal a 43 °C y se seleccionan aquellas colonias de color blanco, que serán las que hayan perdido el plásmido en la segunda recombinação. Finalmente se comprueba que se había producido el genotipo deseado mediante secuenciación del amplificado

obtenido mediante PCR con cebadores flanqueantes a la deleción. La Figura 5.2 muestra un esquema de la técnica de mutagénesis por deleción mediante pMAD.

Tabla 5.1. Cepas utilizadas en estos estudios.

Cepas utilizadas en el estudio de RinA		
Cepas	Descripción	Referencia
RN4220	Derivado defectivo en restricción de RN450	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
RN450	NTCT8325 curada de los ϕ 11, ϕ 12 and ϕ 13	(Novick, 1967)
RN451	RN450 lisogénica para ϕ 11	(Novick, 1967)
RN10359	RN450 lisogénica para 80 α	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2007)
JP1794	RN451 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2005)
JP4028	RN451 Δ <i>rinA</i>	
JP4128	JP4028 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	
JP4221	JP4028 (pJP740)	
JP5961	JP4128 (pJP740)	
JP4027	RN451 Δ <i>rinB</i>	
JP4127	JP4027 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	
JP3602	RN10359 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2008)
JP3603	RN10359 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2008)
JP4717	RN10359 Δ <i>rinA</i>	
JP5293	JP4717 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	
JP5294	JP4717 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP5418	JP4717 (pJP740)	
JP5419	JP5293 (pJP740)	
JP5420	JP5294 (pJP740)	
JP5011	RN4220 lisogénica para phiSLT <i>pvt::tetM</i>	
JP6895	JP5011 Δ <i>rinA</i>	
JP6391	JP6895 (pJP838)	
JP4223	RN451 (pJP742)	
JP4222	JP4028 (pJP742)	
JP4216	RN4220 (pJP743)	
JP5963	RN4220 (pJP744)	
JP5619	RN4220 (pJP746)	
JP5620	RN4220 (pJP747)	
JP5925	RN4220 (pJP748)	
JP5926	RN4220 (pJP749)	
JP7188	RN451 quimera ϕ 11- ϕ 69 (ϕ 11 con el <i>P_{terS}</i> del fago ϕ 69)	
JP7242	JP7188 SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i>	
JP7218	JP7188 (pJP741)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP7243	JP7242 (pJP741)	
JP4001	RN451 Δint	
JP3960	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	(Paulsen <i>et al.</i> , 2003)
JP5093	<i>Streptococcus pyogenes</i> NZ131	(McShan <i>et al.</i> , 2008)
JP3345	<i>Lactococcus lactis</i> IL1403	(Bolotin <i>et al.</i> , 1999)
JP3762	RN4220 (pJP535)	
JP3763	RN4220 (pJP537)	
JP3766	RN4220 (pJP543)	
JP3767	RN4220 (pJP544)	
JP3779	RN4220 (pJP564)	
JP3780	RN4220 (pJP565)	

Cepas utilizadas en el estudio de los reguladores Ltr

Cepas	Descripción	Referencia
RN4220	Derivado defectivo en restricción de RN450	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
JH2-2	<i>Enterococcus faecalis</i>	(Yasmin, <i>et al.</i> , 2010)
LIV1040	JH2-2 phiFL2A	(Yasmin, <i>et al.</i> , 2010)
JP1221	<i>Staphylococcus carnosus</i> TM300	(Rosenstein <i>et al.</i> , 2009)
JP3987	<i>Streptococcus suis</i> 89/1591	
JP2348	RN4220 lisogénica para $\phi 55$	
JP8205	JP2348 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP6197	<i>Staphylococcus aureus</i> cepa propagadora lisogénica para $\phi 37$.	
JP7904	RN4220 lisogénica para $\phi 29$	
RN10359	RN450 lisogénica para 80α	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2007)
JP3602	RN10359 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	(Ubeda, <i>et al.</i> , 2008)
JP8071	JP2348 $\Delta ORF34$	
JP8172	JP8071 (pJP1054)	
JP8636	JP8071 (pJP1114)	
JP8635	JP8071 (pJP1050)	
JP8703	RN10359 quimera 80α - $\phi 55$ (80α con ORF34 del $\phi 55$)	
JP8704	JP8703 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP8763	JP2348 quimera $\phi 55$ – 80α ($\phi 55$ con RinA del 80α)	
JP8764	JP8763 SaPI1 <i>tst::tetM</i>	
JP8039	LIV1040 $\Delta arpU$	

Cepas	Descripción	Referencia
JP8841	JP8039 (pJP1115)	
JP7957	RN4220 (pJP1046)	
JP7958	RN4220 (pJP1047)	
JP7650	RN4220 (pJP1007)	
JP7651	RN4220 (pJP1008)	
JP8273	RN4220 (pJP1068)	
JP8274	RN4220 (pJP1069)	
JP8275	RN4220 (pJP1070)	
JP8276	RN4220 (pJP1071)	
JP7832	RN4220 (pJP1041)	
JP7833	RN4220 (pJP1042)	
JP8842	RN4220 (pJP1118)	
JP8843	RN4220 (pJP1119)	
JP9585	JP7904 (pJP1214)	
JP9769	JP7904 (pJP1216)	
JP9770	JP7904 (pJP1217)	
JP9771	JP7904 (pJP1218)	
JP9513	JP2348 (pJP1221)	
JP9633	JP2348 (pJP1227)	
JP9758	JP2348 (pJP1223)	
JP9759	JP2348 (pJP1224)	
JP9760	JP2348 (pJP1225)	
JP9761	JP2348 (pJP1226)	
JP9632	RN4220 (pJP1228)	
JP9371	RN10359 (pJP1207)	
JP9588	RN10359 (pJP1214)	
JP9829	RN10359 (pJP1221)	
JP9417	JP7904 (pJP1207)	
JP9828	JP7904 (pJP1221)	
JP9830	JP2348 (pJP1207)	
JP9831	JP2348 (pJP1214)	
JP9653	RN10359 (pJP1232)	
JP9756	JP2348 (pJP1232)	
JP9755	RN10359 (pJP1234)	
JP9649	JP2348 (pJP1234)	
JP9832	RN10359 (pJP1051)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP9833	JP2348 (pJP1051)	
JP9655	RN10359 (pJP1233)	
JP9835	JP2348 (pJP1233)	
JP9834	RN10359 (pJP1235)	
JP9651	JP2348 (pJP1235)	
JP9590	RN10359 (pJP1212)	
JP9587	JP7904 (pJP1212)	
JP9589	RN10359 (pJP1219)	
JP9586	JP7904 (pJP1219)	
JP9592	RN4220 (pJP1195)	
JP9839	RN4220 (pJP1196)	
JP9593	RN4220 (pJP1197)	

Cepas utilizadas en el estudio del módulo de empaquetamiento del fago ϕ 11

Cepas	Descripción	Referencia
RN4220	Restriction-defective derivative of RN450	(Kreiwirth <i>et al.</i> , 1983)
RN451	RN450 lysogenic for ϕ 11	(Novick, 1967)
JP8963	RN451 Δ ORF1-28 ϕ 11	
JP10750	RN451 (SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i> Δ <i>stI</i>) (pCN51)	
JP10751	JP8963 (SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i> Δ <i>stI</i>) (pCN51)	
JP8977	JP8963 (SaPI _{bov1} <i>tst::tetM</i> Δ <i>stI</i>) (pJP740)	
JP3377	ϕ 11 Δ ORF 29	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4030	ϕ 11 Δ ORF 30	
JP2729	ϕ 11 Δ ORF 31	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4032	ϕ 11 Δ ORF 32	
JP4033	ϕ 11 Δ ORF 33	
JP2733	ϕ 11 Δ ORF 34	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4035	ϕ 11 Δ ORF 35	
JP4036	ϕ 11 Δ ORF 36	
JP4037	ϕ 11 Δ ORF 37	
JP4038	ϕ 11 Δ ORF 38	
JP2930	ϕ 11 Δ ORF 39	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4040	ϕ 11 Δ ORF 40	
JP4041	ϕ 11 Δ ORF 41	

Cepas	Descripción	Referencia
JP4042	φ11 Δ ORF 42	
JP4043	φ11 Δ ORF 43	
JP4044	φ11 Δ ORF 44	
JP2906	φ11 Δ ORF 45	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4046	φ11 Δ ORF 46	
JP4047	φ11 Δ ORF 47	
JP4048	φ11 Δ ORF 48	
JP4049	φ11 Δ ORF 49	
JP2731	φ11 Δ ORF 50	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4051	φ11 Δ ORF51	
JP4052	φ11 Δ ORF52	
JP4053	φ11 Δ ORF53	
JP2735	φ11 Δ ORF 54	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP7195	φ11 Δ ORF66	
JP7196	φ11 Δ ORF67	
JP1794	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP3378	JP3377 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4130	JP4030 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3018	JP2729 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4132	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4133	JP4033 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3020	JP2733 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4135	JP4035 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4136	JP4036 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4137	JP4037 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4138	JP4038 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3021	JP2930 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4140	JP4040 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4141	JP4041 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4142	JP4042 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4143	JP4043 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4144	JP4044 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3017	JP2906 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4146	JP4046 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4147	JP4047 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP4148	JP4048 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4149	JP4049 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3019	JP2731 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP4151	JP4051 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4152	JP4052 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP4153	JP4053 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3022	JP2735 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP7261	JP7195 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP7262	JP7196 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP6630	RN451 (pCN51)	
JP9840	JP3377 (pCN51)	
JP9841	JP4030 (pCN51)	
JP9842	JP2729 (pCN51)	
JP9843	JP4032 (pCN51)	
JP9845	JP4033 (pCN51)	
JP9846	JP2733 (pCN51)	
JP9847	JP4035 (pCN51)	
JP9848	JP4036 (pCN51)	
JP9850	JP4037 (pCN51)	
JP9851	JP4038 (pCN51)	
JP9852	JP2930 (pCN51)	
JP9853	JP4040 (pCN51)	
JP9854	JP4041 (pCN51)	
JP9855	JP4042 (pCN51)	
JP9856	JP4043 (pCN51)	
JP9857	JP4044 (pCN51)	
JP9858	JP2906 (pCN51)	
JP9860	JP4046 (pCN51)	
JP9861	JP4047 (pCN51)	
JP9862	JP4048 (pCN51)	
JP9863	JP4049 (pCN51)	
JP9864	JP2731 (pCN51)	
JP9865	JP4051 (pCN51)	
JP9866	JP4052 (pCN51)	
JP9867	JP4053 (pCN51)	
JP9859	JP2735 (pCN51)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP9844	JP7195 (pCN51)	
JP9849	JP7196 (pCN51)	
RN10359	RN450 lysogenic for phage 80 α	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP3602	RN10359 (SaPI1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP3603	RN10359 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP10689	RN10359 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF8)	
JP10691	RN10359 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF9)	
JP4493	RN10359 (SaPIbov2 <i>bap::tetM</i>)	
JP3463	ϕ 80 α Δ ORF 44	
JP3464	JP3463 (SaPI1 <i>tst::tetM</i>)	
JP3468	JP3463 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i>)	
JP10690	JP3463 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF8)	
JP10692	JP3463 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF9)	
JP3470	JP3463 (SaPIbov2 <i>bap::tetM</i>)	
JP1796	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF5)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP1797	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF6)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP1798	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF7)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP1799	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF8)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP1800	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF9)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP1801	RN451 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF10)	(Ubeda, <i>et al</i> 2007)
JP3804	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF5)	
JP3826	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF6)	
JP3827	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF7)	
JP3965	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF8)	
JP3966	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF9)	
JP3828	JP4032 (SaPIbov1 <i>tst::tetM</i> Δ ORF10)	
JP6400	RN451 <i>erm</i> positive	
JP10985	JP6400 Δ ORF 32 ϕ 11	
JP2796	RN4220 (pCN51)	
JP5982	RN4220 (pJP546)	
JP4256	RN4220 (pJP547)	
JP5984	RN4220 (pJP548)	
JP3165	RN4220 (pJP403)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP8559	RN4220 (pJP1121)	
JP5993	RN4220 (pJP575)	
JP5985	RN4220 (pJP549)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP5986	RN4220 (pJP550)	
JP3166	RN4220 (pJP417)	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
JP5994	RN4220 (pJP576)	
JP5995	RN4220 (pJP577)	
JP5987	RN4220 (pJP569)	
JP5988	RN4220 (pJP551)	
JP5989	RN4220 (pJP552)	
JP8629	RN4220 (pJP1122)	
JP7296	RN4220 (pJP990)	
JP8652	RN4220 (pJP989)	
JP7654	RN4220 (pJP1006)	
JP6609	JP4030 (pJP546)	
JP4506	JP4032 (pJP547)	
JP6610	JP4033 (pJP548)	
JP8563	JP4035 (pJP1121)	
JP6611	JP4036 (pJP575)	
JP6612	JP4037 (pJP549)	
JP6613	JP4038 (pJP550)	
JP6614	JP4040 (pJP576)	
JP6615	JP4041 (pJP577)	
JP6616	RN4042 (pJP569)	
JP6617	JP4043 (pJP551)	
JP6618	JP4044 (pJP552)	
JP8671	JP4049 (pJP1122)	
JP10693	JP4052 (pJP990)	
JP10694	JP4053 (pJP989)	
JP7669	JP7196 (pJP1006)	
JP11034	RN10359 (pCN51)	
JP11036	JP3463 (pJP547)	
JP6631	JP6630 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP6619	JP6609 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP6620	JP4506 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP6621	JP6610 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP8564	JP8563 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP6622	JP6611 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	
JP6623	JP6612 (SaPI _{bov1} tst::tetM)	

Cepas	Descripción	Referencia
JP6624	JP6613 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP6625	JP6614 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP6626	JP6615 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP6627	JP6616 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP6628	JP6617 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP6629	JP6618 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP8672	JP8671 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP8653	JP10693 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP8654	JP10694 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP7670	JP7669 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP11035	JP11034 (SaPIbov1 tst::tetM)	
JP11037	JP11036 (SaPIbov1 tst::tetM)	

Tabla 5.2. Plásmidos utilizados en estos estudios.

Plásmidos utilizados en el estudio de RinA		
Plásmidos	Descripción	Referencia
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>erm</i> y el gen <i>lacZ</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pJP508	Derivado del pMAD para deleccionar <i>rinA</i> del $\phi 11$ y 80 α	
pJP835	Derivado del pMAD para deleccionar <i>rinA</i> del ϕ SLT	
pJP956	Derivado del pMAD para generar la quimera $\phi 11$ - $\phi 69$ ($\phi 11$ con el <i>P_{terS}</i> del $\phi 69$)	
pCN51	Vector de expresión con origen de replicación para <i>S. aureus</i> , contiene el gen de resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN41	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de β –lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN42	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de un promotor inducible por Cd y β –lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pJP740	Derivado del pCN51 para expresar RinA del $\phi 11$	
pJP741	Derivado del pCN51 para expresar RinA del $\phi 69$	
pJP838	Derivado del pCN51 para expresar RinA del ϕ SLT	
pJP742	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 11$, derivado de pCN41	
pJP743	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> y <i>terS</i> del $\phi 11$, derivado del pCN42	
pJP744	Análisis transcripcional de Δ <i>rinA</i> y <i>terS</i> del $\phi 11$, derivado del pCN42	
pJP746	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> y <i>terS</i> del $\phi 69$, derivado del pCN42	
pJP747	Análisis transcripcional de Δ <i>rinA</i> y <i>terS</i> del $\phi 69$, derivado del pCN42	
pJP748	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> $_{\phi 11}$ y <i>terS</i> $_{69}$, derivado del pCN42	
pJP749	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> $_{\phi 69}$ y <i>terS</i> $_{11}$, derivado del pCN42	
pJP750	Derivado del pGXT4 para sobreexpresar RinA del $\phi 11$	
pJP535	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>Enterococcus faecalis</i> en presencia de <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP537	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>Enterococcus faecalis</i> en presencia de Δ <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP543	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>Streptococcus pyogenes</i> en presencia de <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP544	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>Streptococcus pyogenes</i> en presencia de Δ <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP564	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>L. lactis</i> en presencia de <i>rinA</i> , derivado del pCN42	

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJP565	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>L. lactis</i> en presencia de Δ <i>rinA</i> , derivado del pCN42	

Plásmidos utilizados en el estudio de los reguladores Ltr

Plásmidos	Descripción	Referencia
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>erm</i> y el gen <i>lacZ</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pJP1045	Derivado del pMAD para delecionar la ORF34 del ϕ 55	
pJP1116	Derivado del pMAD para generar la quimera 80 α - ϕ 55 (80 α con la ORF34 del ϕ 55)	
pJP1117	Derivado del pMAD para generar la quimera ϕ 55-80 α (ϕ 55 con RinA del 80 α)	
pBT2	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>cat</i> y el gen <i>lacZ</i>	(Bruckner, 1997)
pJP1037	Derivado del pBT2 para delecionar <i>arpU</i> del phiFL2A	
pCN51	Vector de expresión con origen de replicación para <i>S. aureus</i> , contiene el gen de resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN41	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de β -lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pCN42	Utilizado en la fusión transcripcional de <i>Staphylococcus</i> , portador de un promotor inducible por Cd y β -lactamasa <i>blaZ</i> , contiene resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pJP1054	Derivado del pCN51 para expresar ORF34 del ϕ 55	
pJP1114	Derivado del pCN51 para expresar RinA del ϕ 29	
pJP1050	Derivado del pCN51 para expresar ArpU del phiFL2A	
pJP1115	Derivado del pBT2 para expresar ArpU del phiFL2A	
pJP1049	Derivado del pGXT4 para sobreexpresar la ORF34 de ϕ 55	
pJP1039	Derivado del pGXT4 para sobreexpresar ArpU del phiFL2A	
pJP1046	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago ϕ 55 en presencia de ORF34, derivado del pCN42	
pJP1047	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago ϕ 55 en presencia de Δ ORF34, derivado del pCN42	

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJP1007	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago phiFL2A en presencia de <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP1008	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago phiFL2A en presencia de Δ <i>rinA</i> , derivado del pCN42	
pJP1068	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. suis</i> en presencia de <i>arpU</i> , derivado del pCN42	
pJP1069	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. suis</i> en presencia de Δ <i>arpU</i> , derivado del pCN42	
pJP1070	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. carnosus</i> en presencia de <i>ORF34</i> , derivado del pCN42	
pJP1071	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. carnosus</i> en presencia de Δ <i>ORF34</i> , derivado del pCN42	
pJP1041	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago ϕ 37 en presencia de Sigma 70, derivado del pCN42	
pJP1042	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago ϕ 37 en presencia de Δ Sigma 70, derivado del pCN42	
pJP1118	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. suis</i> en presencia de DUF1492, derivado del pCN42	
pJP1119	Análisis transcripcional <i>terS</i> del fago de <i>S. suis</i> en presencia de Δ DUF1492, derivado del pCN42	
pJP1214	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ 29, derivado de pCN41	
pJP1216	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ 29 mutante en la primera repetición, derivado de pCN41	
pJP1217	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ 29 mutante en la segunda repetición, derivado de pCN41	
pJP1218	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ 29 mutante en la primera y segunda repetición, derivado de pCN41	
pJP1219	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ 29 en presencia de las repeticiones del fago 80 α , derivado de pCN41	
pJP1207	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del 80 α , derivado de pCN41	
pJP1212	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del 80 α en presencia de las repeticiones del ϕ 29, derivado de pCN41	

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJP1221	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$, derivado de pCN41	
pJP1227	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ con las cuatro repeticiones mutadas, derivado de pCN41	
pJP1223	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ mutante en la primera repetición, derivado de pCN41	
pJP1224	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ mutante en la segunda repetición, derivado de pCN41	
pJP1225	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ mutante en la tercera repetición, derivado de pCN41	
pJP1226	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ mutante en la cuarta repetición, derivado de pCN41	
pJP1228	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ FL2A con las tres repeticiones mutadas, derivado de pCN42	
pJP1232	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del $\phi 55$ en presencia de los sitios de unión del 80α , derivado de pCN41	
pJP1233	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ FL2A en presencia de los sitios de unión del 80α , derivado de pCN41	
pJP1051	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ FL2A, derivado de pCN41	
pJP1234	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del 80α en presencia de los sitios de unión del $\phi 55$, derivado de pCN41	
pJP1235	Análisis transcripcional de <i>terS</i> del ϕ FL2A en presencia de los sitios de unión del $\phi 55$, derivado de pCN41	
pJP1195	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> del 80α en presencia de la región comprendida entre <i>cl</i> y <i>rinA</i> , derivado del pBT2	
pJP1196	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> del 80α en presencia de la región comprendida entre la región divergente entre <i>cl-cro</i> y <i>rinA</i> , derivado del pBT2	
pJP1197	Análisis transcripcional de <i>rinA</i> del 80α en presencia de la región comprendida entre <i>cro</i> y <i>rinA</i> , derivado del pBT2	

Plásmidos utilizados en el estudio del módulo de empaquetamiento del fago ϕ 11

Plásmidos	Descripción	Referencia
pBT2	Vector for efficient allelic replacement	(Bruckner, 1997)
pJP695	Derivado del pBT2 para insertar el cassette de eritromicina en el fago ϕ 11	
pMAD	Vector lanzadera con origen termosensible para <i>S. aureus</i> , gen de resistencia a <i>erm</i> y el gen <i>lacZ</i>	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pJP451	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 30 de ϕ 11	
pJP458	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 32 de ϕ 11	
pJP452	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 33 de ϕ 11	
pJP642	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 35 de ϕ 11	
pJP643	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 36 de ϕ 11	
pJP453	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 37 de ϕ 11	
pJP461	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 38 de ϕ 11	
pJP566	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 40 de ϕ 11	
pJP803	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 41 de ϕ 11	
pJP454	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 42 de ϕ 11	
pJP455	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 43 de ϕ 11	
pJP459	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 44 de ϕ 11	
pJP644	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 46 de ϕ 11	
pJP625	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 47 de ϕ 11	
pJP570	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 48 de ϕ 11	
pJP626	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 49 de ϕ 11	
pJP572	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 51 de ϕ 11	
pJP519	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 52 de ϕ 11	
pJP619	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 53 de ϕ 11	
pJP958	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 66 de ϕ 11	
pJP959	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 67 de ϕ 11	
pJP652	Derivado del pMAD para delecionar la ORF 44 de 80 α	

Plásmidos	Descripción	Referencia
pCN51	Vector de expresión con origen de replicación para <i>S. aureus</i> , contiene el gen de resistencia a <i>erm</i>	(Charpentier <i>et al.</i> , 2004)
pJP740	Derivado del pCN51 para expresar RinA del ϕ 11	
pJP546	Derivado del pCN51 para expresar ORF30 del ϕ 11	
pJP547	Derivado del pCN51 para expresar ORF32 del ϕ 11	
pJP548	Derivado del pCN51 para expresar ORF33 del ϕ 11	
pJP403	Derivado del pCN51 para expresar ORF34 del ϕ 11	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
pJP1121	Derivado del pCN51 para expresar ORF35 del ϕ 11	
pJP575	Derivado del pCN51 para expresar ORF36 del ϕ 11	
pJP549	Derivado del pCN51 para expresar ORF37 del ϕ 11	
pJP550	Derivado del pCN51 para expresar ORF38 del ϕ 11	
pJP417	Derivado del pCN51 para expresar ORF39 del ϕ 11	(Tormo <i>et al.</i> , 2008)
pJP576	Derivado del pCN51 para expresar ORF40 del ϕ 11	
pJP577	Derivado del pCN51 para expresar ORF41 del ϕ 11	
pJP569	Derivado del pCN51 para expresar ORF42 del ϕ 11	
pJP551	Derivado del pCN51 para expresar ORF43 del ϕ 11	
pJP552	Derivado del pCN51 para expresar ORF44 del ϕ 11	
pJP1122	Derivado del pCN51 para expresar ORF49 del ϕ 11	
pJP990	Derivado del pCN51 para expresar ORF52 del ϕ 11	
pJP989	Derivado del pCN51 para expresar ORF53 del ϕ 11	
pJP1006	Derivado del pCN51 para expresar ORF67 del ϕ 11	

Tabla 5.3. Cebadores utilizados en estos estudios.

Cebadores utilizados en el estudio de RinA		
Cebadores utilizados para los mutantes de RinA y clonajes en plásmidos		
Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP508	orf28phi11-1mB orf28phi11-2c orf28phi11-3m orf28phi11-4cE	CGCGGATCCGTGATAAGAAGTGACGC TTTAGTCATGAATACCCTCCG CGGAGGGTATTCATGACTAAAAGATTGGCGGAAGAGTTAGGG CCGGAATTCGTACTTCAGTGAAGTTATCG
pJP835	phiSLTp36-1mB phiSLTp36-2c phiSLTp36-3m phiSLTp36-4cE	CGCGGATCCATCAGAGCTGAAGTTTCATGG GATATCATATATTGTGTTCCG GGAACACAATATATGATATCAACTTTGTTAAAGCGGTAGCG CCGGAATTCAAACATTTTAAGCCGATGGGC
JP956	orf29phi11-11mB orf28phi11-15c orf30phi69-18m orf25phi69-17cS	CGCGGATCCATCAGTCTGATTTGATGAGGGC GTCTTCCCCTAACTCTTCCG CGGAAGAGTTAGGGGAAGACTAAGTTTGAAAAAGTCTGG ACGCGTTCGACTAATGTACTTCAGTGAAGTTATCG
pJP740	orf28phi11-6mB orf28phi11-5cK	CGCGGATCCGGTGATGTAAAAGTTAAAGAGCG CGGGGTACCACTGCCAATTTAGTCTTCCG
pJP741	orf30phi69-1mB orf30phi69-6cK	CGCGGATCCGTTTGGTGTGATGTTGCAAGC CGGGGTACCATGTATTATACCTAATTCATCTGC
pJP838	phiSLTp36-5mB phiSLTp36-6cE	CGCGGATCCTTGCAGAATAAAGAATAACG CCGGAATTCGCCTTTTGCACAATCTTTGC
pJP742	orf28phi11-5mB orf29phi11-3cK	CGCGGATCCATCAAGCAGGAAAGAACGC CGGGGTACCTAACCTGCTGTAATTGCTGC
pJP743	orf28phi11-6mB orf29phi11-3cK	CGCGGATCCGGTGATGTAAAAGTTAAAGAGCG CGGGGTACCTAACCTGCTGTAATTGCTGC
pJP744	orf28phi11-6mB orf29phi11-3cK	CGCGGATCCGGTGATGTAAAAGTTAAAGAGCG CGGGGTACCTAACCTGCTGTAATTGCTGC
pJP746	orf30phi69-1mB orf25phi69-2cK	CGCGGATCCGTTTGGTGTGATGTTGCAAGC CGGGGTACCTCATTTACCACCAACTCTCGC
pJP747	orf30phi69-1mB orf30phi69-3c orf30phi69-4m orf35phi69-2cK	CGCGGATCCGTTTGGTGTGATGTTGCAAGC ATTGCTTTGCACCCTATCTCC GGAACACAATATATGATATCAACTTTGTTAAAGCGGTAGCG CGGGGTACCTCATTTACCACCAACTCTCGC
pJP748	orf28phi11-6mB orf28phi11-7cK orf30phi69-5mK orf25phi69-2cE	CGCGGATCCGGTGATGTAAAAGTTAAAGAGCG CGGGGTACCGTCTTCCCCTAACTCTTCCG CGGGGTACCATTAAGTTTGAAAAAGTCTGG CCGGAATTCCAAATTAATTAATATGCCATCAG
pJP749	orf30phi69-1mB orf30phi69-6cK orf28phi11-8mK orf29phi11-3cE	CGCGGATCCGTTTGGTGTGATGTTGCAAGC CGGGGTACCATGTATTATACCTAATTCATCTGC CGGGGTACCTGAAATTGGCAGTAAAGTGGC CCGGAATTC AACCTGCTGTAATTGCTGC
pJP750	orf28phi11-5cX orf28phi11-7mB/b	CCGCTCGAGACTGCCAATTTAGTCTTCCG CGCGGATCCATGACTAAAAGAAATACGG
pJP535	EF_V583-Pla-1mS EF_V583-Pla-4cB	ACGCGTTCGACAATCCATCAAGGCCGCATCG CGCGGATCCTGTCCGAGTTCCTCTAGC

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP537	EF_V583-Pla-1mS EF_V583-Pla-2c EF_V583-Pla-3m EF_V583-Pla-4cB	ACGCGT <u>CGACA</u> ATCCATCAAGGCCGCATCG TAATTCCTTCCCGTTGACG TCAACGGGAAGAAGAATTACATTAATTGGACTTGCCAGC CGCGGATCCTGTCCGGCAGTTCCTCTAGC
pJP543	Spy_NZ131-Pla-1mB Spy_NZ131-Pla-4cE	CGCGGATCCCGTGCTAGTGATGATAGAGC CCGGAATTC <u>TTTA</u> ATAGCCGCTGCTGTCCG
pJP544	Spy_NZ131-Pla-1mB Spy_NZ131-Pla-2c Spy_NZ131-Pla-3m Spy_NZ131-Pla-4cE	CGCGGATCCCGTGCTAGTGATGATAGAGC AAATTTGCTCTTCCTCCACCG GTGGAGGAAGAGCAAATTTGCCTATACAAGACATCTGTCCG CCGGAATTC <u>TTTA</u> ATAGCCGCTGCTGTCCG
pJP564	bIL309-Alt-1mB bIL309-Alt-5cE	CGCGGATCCACACTTGGTCAGTAGTATGG CCGGAATTC <u>TATA</u> AATTTCTTGAACCTCACC
pJP565	bIL309-Alt-1mB bIL309-Alt-2c bIL309-Alt-3m bIL309-Alt-5cE	CGCGGATCCACACTTGGTCAGTAGTATGG AGAATATGCTGTACGAATGCC CATTCGTACAGCATATTCTGGTTACGGTGGTTTTACATGG CCGGAATTC <u>TATA</u> AATTTCTTGAACCTCACC

Cebadores utilizados para realizar qPCRs y RACE

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
gyr-L gyr-U	CACCATGTAAACCACCAGATA TTATGGTGCTGGGCAAATACA	qPCR. Expression of <i>gyrB</i> gene
orf29-phi11-4m orf30-phi11-2c	CAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCG CTTACCGCTCGAACCTCCACC	qPCR. Expression of ϕ 11 <i>terS</i> gene
orf32-phi11-7m orf32-phi11-8c	GATGAGTTTCGATGTAAGCG TGAACACGTGCCGATTCCG	qPCR. Expression of ϕ 11 ORF32
orf39-phi11-1m orf39-phi11-2c	TACAGAGGATACAATGGACGG GTGGAATCTGTATCCAGTCGC	qPCR. Expression of ϕ 11 ORF39
orf49-phi11-6m orf48-phi11-4cE	TTTTGTACCACAACCAGGCG CCGGAATTCGTTTTTCGAGTCGTCGATTACC	qPCR. Expression of ϕ 11 ORF49
orf53-phi11-7m orf53-phi11-8c	AGTGGTTGAAAACCTTCTGAGGG TACCTTTAGGGTTACTACCACG	qPCR. Expression of ϕ 11 ORF53
orf1-phi11-1m orf1-phi11-2c	AGCGTACGAGTGTCTTAAATGG CTGTGTGGGCAGTTTTAAAGC	qPCR. Expression of ϕ 11 <i>int</i>
orf29-phi11-sp1c orf29-phi11-sp2c orf29-phi11-sp3c	TGGTCAATAGATCTCTGACGC AACCTCTTTTCCACTTCATCG TAGAAGCAGATAACGCTAAAGC	RACE 5'

Cebadores utilizados en el estudio de los reguladores Ltr		
Cebadores utilizados para los mutantes de Ltr y clonajes en plásmidos		
Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP1045	orf34phi55-1mB	CGCGGATCCTCTATCGACCAACTCATTGAC
	orf36phi96-2c	CACTTCATTTTTATGTGTGCC
	orf36phi96-3m	GGCACACATAAAATGAAGTGATTATCAAGAAGATGCCTAACTC
	orf36phi96-4cE	CCGGAATTCGAGGAATGCATCAGCTGTGC
pJP1116	phi80α-11mB	CGCGGATCCAGTGAATTTTACAGTCCTACG
	orf38phi80α-4c	GAATACCCTCCATACAAATATT
	orf34phi55-7m	ATATTTGTATGGAGGGTATTCATGTATAGCAAAGAGTCAAT
	orf34phi55-18c	TCTTTTGTTCGTTTCATTTGTTTTCACTGTATCACACG
	orf38phi80α-5m	ATGAACGAAAAACAAAAGAGA
	orf30phi11-8cS	ACGCGTTCGACCATGACTATGTCTGATATGCC
pJP1117	orf34phi55-1mB	CGCGGATCCTCTATCGACCAACTCATTGAC
	orf34phi55-9c	ATCCATATTTCTTTTAGTCATCTACTCTGACACCTCCGCCCT
	orf38phi80α-6m	ATGACTAAAAGAAATATGGATT
	orf38phi80α-7c	TTCATTTACCACCAACTCTCG
	orf34phi55-17m	GAGAGTTGGTGGTAAATGAATTGATTAATAACACCGAAGC
	orf34phi55-11cS	ACGCGTTCGACGTAACTACAACGTGAGAATACC
pJP1037	ArpUphiFL2A-1mB	CGCGGATCCGATAACGGCGAAGTGTTCGG
	ArpUphiFL2A-2c	CAATTGAATCAAGTGAATCG
	ArpUphiFL2A-3m	CGATTCCACTTGATTCAATTGAAGATTGCTAGAGAAGTTGGC
	ArpUphiFL2A-4cS	ACGCGTTCGACAGAAGGAGCGACCTTCTAGC
pJP1054	orf34phi55-5mB	CGCGGATCCGCTAATGATGATGCAGAGGCG
	orf36phi96-8cE	CCGGAATTCGTCATTTTCGTCATTTCTGTC
pJP1114	orf30phi29-1mS	ACGCGTTCGACTTAAGAAGTAGATTGAGACAC
	orf30phi29-2cB	CGCGGATCCTAATATCTCGTTTTAGGTGTC
pJP1050	ArpUphiFL2A-13mS	ACGCGTTCGACGAAAATACTATCTCATAGTACG
	ArpUphiFL2A-8cK	CGGGGTACCAACTTTCCGCCAAAAAACC
pJP1115	ArpUphiFL2A-13mS	ACGCGTTCGACGAAAATACTATCTCATAGTACG
	ArpUphiFL2A-8cK	CGGGGTACCAACTTTCCGCCAAAAAACC
pJP1049	orf36phi96-9mB	CGCGGATCCATGTATAGCAAAGAGTCAAT
	orf36phi96-8cE	CCGGAATTCGTCATTTTCGTCATTTCTGTC
pJP1039	ArpUphiFL2A-9mB	CGCGGATCCGTGAGAAATATTTTCGACATAG
	ArpUphiFL2A10cS	ACGCGTTCGACAACTTTCCGCCAAAAAACC
pJP1046	orf34phi55-2mB	CGCGGATCCTTGATTGCTACTATCTTTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCCTCACTCATACTCTTCAAAGC

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP1047	orf34phi55-2mB	CGCGGATCC TTGATTGCTACTATCTTTGTG
	orf36phi96-2c	CACTTCATTTTATGTGTGCC
	orf36phi96-3m	GGCACACATAAAATGAAGTGATTATCAAGAAGATGCCTAACTC
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCCCACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1007	ArpUphiFL2A-5mS	ACGCGTCGACAAGTAAAGTGCTAATAGTGCC
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCCAAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1008	ArpUphiFL2A-5mS	ACGCGTCGACAAGTAAAGTGCTAATAGTGCC
	ArpUphiFL2A-2c	CAATTGAATCAAGTGAATCG
	ArpUphiFL2A-3m	CGATTCCACTTGATTCAATTGAAGATTGCTAGAGAAGTTGGC
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCCAAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1068	Ssui_4012-1mB	CGCGGATCC TGTGCGCAGATGAAATAGGC
	Ssui_4012-4cE	CCGGAATTCAGCTTCTTCATCGCTCAATCC
pJP1069	Ssui_4012-1mB	CGCGGATCC TGTGCGCAGATGAAATAGGC
	Ssui_4012-2c	GATAGCAAGGCATCGTTGAGCAGTTTTTCGTTTTGCATTAGC
	Ssui_4012-3m	CTCAACGATGCCTTGCTATCG
	Ssui_4012-4cE	CCGGAATTCAGCTTCTTCATCGCTCAATCC
pJP1070	Sca_0491-1mB	CGCGGATCC TACGACATCAACAGTCAGGCG
	Sca_0491-4cE	CCGGAATTC TGGTCGCGCTCTTGGATTGC
pJP1071	Sca_0491-1mB	CGCGGATCC TACGACATCAACAGTCAGGCG
	Sca_0491-2c	ATCTGCTTCTACCATATTCTG
	Sca_0491-3m	AGAATATGGTAGAAGCAGATGACATTGCATGTATCAATAGC
	Sca_0491-4cE	CCGGAATTC TGGTCGCGCTCTTGGATTGC
pJP1041	orf44phi37-5mB	CGCGGATCC GCTAAATACATCACTGAACAG
	orf44phi37-6cE	CCGGAATTC CAAGTTTTTCGCTACCTACTGC
pJP1042	orf44phi37-5mB	CGCGGATCC GCTAAATACATCACTGAACAG
	orf44phi37-2c	TTTACAGATGTCCTTCTGC
	orf44phi37-3m	GCAGAAGGACATCTGTAAAGAAACAGGATATAGTGAACAG
	orf44phi37-6cE	CCGGAATTC CAAGTTTTTCGCTACCTACTGC
pJP1118	Ssui_2757-1mB	CGCGGATCC GACTTTATCAATTCTGGGTGC
	Ssui_2757-4cE	CCGGAATTC AACTAACTGACCACATATTCC
pJP1119	Ssui_2757-1mB	CGCGGATCC GACTTTATCAATTCTGGGTGC
	Ssui_2757-2c	TATAGCCTTAGCCTTGTTAC
	Ssui_2757-3m	TGAACAAGGCTAAGGCTATATATTACCGTATCCTACGTGTG
	Ssui_2757-4cE	CCGGAATTC AACTAACTGACCACATATTCC
pJP1214	orf030phi29-3mB	CGCGGATCC TAAAATTGACAGTAAAATGACAGTTTTTGACACCTA AAAC
	orf030phi29-4cE	CCGGAATTC CTTACTCAACTCAAAGCTCG

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP1216	orf030phi29-8mB	CGCGGATCC TAAAATAAAAAAAAAAAAATGACAGTTTTTGACACCT AAAAC
	orf030phi29-4cE	CCGGAATTCC TTA CTCAACTCAAAAGCTCG
pJP1217	orf030phi29-9mB	CGCGGATCC TAAAATTGACAGTAAAAAAAAAAAAATTTTGACACCT AAAAC
	orf030phi29-4cE	CCGGAATTCC TTA CTCAACTCAAAAGCTCG
pJP1218	orf030phi29-10mB	CGCGGATCC TAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTGACACCTA AAAC
	orf030phi29-4cE	CCGGAATTCC TTA CTCAACTCAAAAGCTCG
pJP1221	orf34phi55-25mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATT
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1227	orf34phi55-27mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGT GACGATTTTTTTAATTTTTTTAGTTTTTTTGATTTTTTTACTATTTT TAACTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1223	orf34phi55-38mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGT GACGATTTTTTTAAAAATGACAGAAATGACGAAAATGACACTATT TTTAACTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1224	orf34phi55-39mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGT GACGAAAATGACAAATTTTTTTAGAAATGACGAAAATGACACTATT TTTAACTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1225	orf34phi55-40mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGT GACGAAAATGACAAAAATGACAGTTTTTTTGAAAATGACACTATT TTTAACTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1226	orf34phi55-41mB	CGCGGATCC GATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGT GACGAAAATGACAAAAATGACAGAAATGACGATTTTTTTACTATT TTTAACTGTG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCC CACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1228	ArpUphiFL2A-5mS	ACGCGTCCGACAAGTAAAGTGCTAATAGTGCC
	ArpUphiFL2A-20c	GCACTCAAATTCGTATAAAAAATTTTTCTTTTTTTTTTAAAATTTT TTTAATTATTTATATGC
	ArpUphiFL2A-21m	TTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAATATCGAAAG
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCC AAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1207	orf38phi80α-12mB	CGCGGATCC AAGGAATTAGTGAAAGTTTGTG
	orf40phi80α-5cE	CCGGAATTCC ACTTCATCGTTTAAATGGTC

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP1232	orf38phi80α-25mB	CGCGGATCCTGAAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATACCTA AAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTTGTAAGAATTATCTTA AGACG
	orf34phi55-4cE	CCGGAATTCCCACTCATACTCTTCAAAGC
pJP1234	orf34phi55-29mB	CGCGGATCCGATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGTGA CGAAAATGACAAAATGACAGAAATGACGAAAATGACACTATTTT TAAA
	orf34phi55-28m	AGAAATGACGAAAATGACACTATTTTTAACTGTGAATTAATTTTA TATAATTGACTGACTATCTTACTGCGTTTCCC
	orf40phi80α5cE	CCGGAATTCCACTTCATCGTTTTAAATGGTC
pJP1051	ArpUphiFL2A-14mS	ACGCGTCGACAAGATTGCTAGAGAAGTTGGC
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCCAAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1233	orf38phi80α-26mS	ACGCGTCGACTGAAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATACCT AAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTCAAAGAAATGGACA CATTAC
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCCAAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1235	orf34phi55-31mS	ACGCGTCGACGATGAGTTGGCAGAAAAGATTTATCTACTA CAGTGACGAAAATGACAAAATGACAGAAATGACGAAAATG ACACTATTTTTAAA
	orf34phi55-30m	AGAAATGACGAAAATGACACTATTTTTAACTGTGAATTAAT TTTATATAATTGACTCAAAGAAATGGACACATTACAC
	ArpUphiFL2A-6cB	CGCGGATCCAAATGTCCGTTCCGATACTCC
pJP1212	orf38phi80α-21mB	CGCGGATCCTGAAATTGACAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATA CCTAAAATGAG
	orf40phi80α-5cE	CCGGAATTCCACTTCATCGTTTTAAATGGTC
pJP1219	orf030phi29-5mB	CGCGGATCCTAAAATTGGCAGTAAAATGGCAGTTTTTGACACCTA AAAC
	orf030phi29-4cE	CCGGAATTCTTACTCAACTCAAAGCTCG
pJP1195	orf5phi80α-5mNh	CTAGCTAGCTTAAACACTGATGAAATAGACG
	orf38phi80α-15cP	AACTGCAGCGAGTTGCTTATGATAATTAGG
pJP1196	orf6phi80α-9mNh	CTAGCTAGCTTCTTGATAGCTCTGATTGAG
	orf38phi80α-15cP	AACTGCAGCGAGTTGCTTATGATAATTAGG
pJP1197	orf7phi80α-9mNh	CTAGCTAGCAGCCAAAGTTCTTTAGCGAAC
	orf38phi80α-15cP	AACTGCAGCGAGTTGCTTATGATAATTAGG

Cebadores utilizados para realizar qPCRs		
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
gyr-L gyr-U	CACCATGTAAACCACCAGATA TTATGGTGCTGGGCAAATACA	qPCR. Expression of <i>gyrB</i> gene
orf103phi55-3m orf16phi55-2c	AAGCTAAAGGCTACACAGTGC AGTCCTGTAATCTTGACCGTC	qPCR. Expression of ϕ 55ORF016
orf24phi55-1m orf24phi55-2c	GGCTCAACAGGGTTTCAAGCT ATCCAAATTGGCCACTGCTTTC	qPCR. Expression of ϕ 55ORF024
orf006-phi55-1m orf006-phi55-2c	GAGCAGTTGACCCATTGAAACC TGGAATCTTACCCCATGACCC	qPCR. Expression of ϕ 55 ORF006
orf013-phi55-1m orf013-phi55-2c	CTATGATGCAAGCGCAACTCG AGAGCTTCGCCAAACGCACC	qPCR. Expression of ϕ 55 ORF013
orf022-phi55-1m orf022-phi55-2c	ATATTGTCGCTCTCCAAATCGC TTCGAATTCAACAACCTGGAGCC	qPCR. Expression of ϕ 55 ORF022
orf031-phi55-1m orf031-phi55-2c	GCAGTACTAACTGGTTTAGTTGG CTTGCATTGTGCCACCTCC	qPCR. Expression of ϕ 55ORF031
Ef_GyrBm Ef_GyrBc	AAGACGTTATTTTCCCAGAGC GCCAACATGCCTTTTTTCGAC	qPCR. Expression of <i>gyrB</i> gene in <i>E. faecalis</i>
gp16phiFL2A-1m gp16phiFL2A-2c	AGGATAGGCGTAAAGGAATTGG TAATTGCTCGGTACAGTACATCG	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF16
gp20phiFL2A-1m gp20phiFL2A-2c	TCCAAGCGACATTTTTCGAAGC GTTTTTACACCATTTGCTCGCC	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF20
gp36-phiFL2A-1m gp36-phiFL2A-2c	TATGTTGGGACAGCCGGTGC TTGAGCAGTCCCTGTGTATGG	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF36
gp42-phiFL2A-1m gp42-phiFL2A-2c	TATTTGCGGCAGAACCAGACC CCCTAAGTAGTTGCTACATCC	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF42
gp48-phiFL2A-1m gp48-phiFL2A-2c	GGATCTCCAGCTCTCTTGCC TTGTTGTTGTCGTCGTGGTGG	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF48
gp61-phiFL2A-1m gp61-phiFL2A-2c	TGCTGCGTATCCTATCGATGG CCAACGCTTGATAGTCTGTTCC	qPCR. Expression of ϕ FL2A ORF61

Cebadores utilizados para realizar el RACE y EMSA		
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
gp34-phiFL2A-sp1c	GACGATCTACAACCTTCTTTTCC	RACE 5'
gp34-phiFL2A-sp2c	AAATGTCCGTTCCGATACTCC	
gp34-phiFL2A-sp3c	ATCTCGTGCCACCCTTCG	
orf38phi55-sp1c	AAGTGCTTTAGCAACTTCTGCG	RACE 5'
orf38phi55-sp2c	GAGGAATGCATCAGCTGTCCG	
orf38phi55-sp3c	TTGCTCAGCTACTTCTTGACG	
ARPUwtF	TAATTTTGGCGGTTTTTGGCGGAAAGTTGGCG GTTTTATACGAATTTGAGTGCTAATATAGTAAT ATCGAAAG	Ensayos de movilidad electroforética
ARPUwtR	CTTTTCGATATTACTATATTAGCACTCAAATTCG TATAAAAACCGCCAACCTTCCGCCAAAAAACC GCAAAATTA	
ORF34wtF	TTGGCAGAAAAGATTTATCTACTACAGTGACG AAAATGACAAAATGACAGAAATGACGAAAATG ACACTATTTTTAACTGTGAATTAATTTTATATA	Ensayos de movilidad electroforética
ORF34wtR	TATATAAAATTAATTCACAGTTTAAAAATAGTGT CATTTTCGTCATTTCTGTCAATTTTGTCAATTTTC GTCAGTGTAGTAGATAAATCTTTTCTGCCAA	

Cebadores utilizados para obtener los mutantes del módulo de empaquetamiento del fago ϕ 11		
Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP695	phi11-20mB	CGCGGATCCGAGAATGGCATCTCGGCTAC
	phi11-19cX	GCTCTAGAGTGTGGGATAAAAATAACCG
	phi11-18mP	AACTGCAGAACCAACAAAACCACACCACC
	phi11-21cBg-H	CCCAAGCTTGAAGATCTGCGACTGTGCGGATATCTAAC
pJP451	orf30phi11-1mB	CGCGGATCCGACTATCGTACTGCGTTTCCC
	orf30phi11-2c	CTTACCGCTCGAACCTCCACC
	orf30phi11-3m	TGGAGGTTGAGCGGTAAGAAGGGCTCGGTTGTACAAGGG
	orf30phi11-4cE	CCGGAATTCGCATCACTCTTGATAAACGCG
pJP458	orf32phi11-1mB	CGCGGATCCGAAGGTAGAGAAACAGAAGGC
	orf32phi11-2c	TCCGTAATTGACAATAAACGCA
	orf32phi11-3m	GCGTTTATTGTCAAGTACGGAAATTGTCGTTTCAAGATTGCGCTT
	orf32phi11-4cE	CCGGAATTCCTTTTCTGTTGGGCTACACGACG

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP452	orf33phi11-1mB	CGCGGATCCCCTGTTACGCACAATCAAGC
	orf33phi11-2c	CGGATCATCTGATTGGTCTGC
	orf33phi11-3m	CAGACCAATCAGATGATCCGCGAAAAATGTTGAGTGAAGCGG
	orf33phi11-4cE	CCGGAATTCGTAGCATTAAACCAAGTAGCC
pJP642	orf35phi11-1mB	CGCGGATCCCAATGAGAGCGTTTAAATTAGGG
	orf35phi11-2c	GGGCATGTTACCACTCCTAATT
	orf35phi11-3m	ATTAGGAGTGGTAACATGCCCGAAATAGCAAGTGTGCTGGC
	orf35phi11-4cS	ACGCGTCGACCAACTATCTTGTAGCGAATGCC
pJP643	orf36phi11-1mB	CGCGGATCCCCTGAAAATTGTAGATCCTGAAACG
	orf36phi11-2c	TAGCGTAGTCATATAACCACC
	orf36phi11-3m	GTGGTTATATGACTACGCTAACTAAAAAAGGAAGGGCTGTG
	orf36phi11-4cE	CCGGAATTCAGGGAATCCATATCCTTGTAGCG
pJP453	orf37phi11-1mB	CGCGGATCCAGTTGAACAAATACCGGAAAGG
	orf37phi11-2c	TATATTCATCAATTGACCTCTTCG
	orf37phi11-3m	GAAGAGGTCAATTGATGAATATAGCTGAACCTTTTATGTGGCCG
	orf37phi11-4cE	CCGGAATTCATCAGCTTCATGTGATAAGCC
pJP461	orf38phi11-1mB	CGCGGATCCCCTTATGATGCGATACCATGC
	orf38phi11-2c	CGGTGTCATGCTTTTATCTCC
	orf38phi11-3m	GAGATAAAAGCATGACACCGTTGCTACACACATCAGTAACG
	orf38phi11-4cE	CCGGAATTCGTGGAATCTGTATCCAGTCGC
pJP566	Prot5/6-7mB	CGCGGATCCTGCTACACACATCAGTAACG
	orf40phi11-1c	ACTTAATTCTAATGACTTTCCG
	orf40phi11-2m	GGAAAGTCATTAGAATTAAGTGAAACGGAAGAAAAACCAGCG
	orf40phi11-3cS	ACGCGTCGACTGTTTTTGAACCTTAACCTTCTGG
pJP803	orf41phi11-1mB	CGCGGATCCCCTGATTTGCAACACTACCTGAGGC
	orf41phi11-2c	TTGCTCAATAACGTTCAAATCTG
	orf41phi11-3m	AGATTTGAACGTTATTGAGCAAAGTAGCGAACGTGATGAATACG
	orf41phi11-4cS	ACGCGTCGACGCCCTGTATCTACATCAAGTCG
pJP454	orf42phi11-1mB	CGCGGATCCGGAAATCCGTTGTGATTGGC
	orf42phi11-2c	TCTTTGCACAGACTTAACCGC
	orf42phi11-3m	CGGTTAAGTCTGTGCAAAGAGGTGGAAATATAAATGCGCAAG
	orf42phi11-4cS	ACGCGTCGACCTTTCTTTTGTCTCCGCCTGC
pJP455	orf43phi11-1mB	CGCGGATCCGGTGCTGATATGATCCGTGGT
	orf43phi11-2c	GCTCCCCATTAATATACGACC
	orf43phi11-3m	GTCGTATATTAATGGGGAGCGAAGGGATCAAATAAAAGCTGG
	orf43phi11-4cS	ACGCGTCGACCTTGTATCGCCTTACCACC
pJP459	orf44phi11-1mB	CGCGGATCCCCTTAACGACAGACATAGAACC
	orf44phi11-2c	TTCTACTGGTACAGGTGCGCC
	orf44phi11-3m	CGCACCTGTACCAGTAGAAAGTGGTACAACGATACGCCGT
	orf44phi11-4cE	CCGGAATTCGAATCGGTATTCTGTGCTCG

Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP644	orf46phi11-1mB	CGCGGATCC TGCCGGATTTACCAGGTAGCG
	orf46phi11-2c	ACCGCCAGTATTAACGAATCCG
	orf46phi11-3m	GGATTCGTTAATACTGGCGGTAACAAAACAAGTACTGAGGGGG
	orf46phi11-4cE	CCGGAATTCACCACTTCACTAGCTGTGGGC
pJP625	orf46phi11-1mB	CGCGGATCC TGCCGGATTTACCAGGTAGCG
	orf47phi11-1c	CTTCATTATTTAAACGTCCCCC
	orf47phi11-2m	GGGGACGTTTAAATAATGAAGCAGGTGTAATGCTTGTGGCTTT
	orf46phi11-4cE	CCGGAATTCACCACTTCACTAGCTGTGGGC
pJP570	orf48phi11-1mB	CGCGGATCC TCAGACGGCAACGGTGGCGG
	orf48phi11-2c	AAATCCAAACATTATGCCACCC
	orf48phi11-3m	GGTGGCATAATGTTTGGATTTGGTATTTAAAGGAGGTGATTACC
	orf48phi11-4cE	CCGGAATTCGTTTTTCGAGTCGTCGATTACC
pJP626	orf49phi11-1mB	CGCGGATCC TTAAGTGGTACGTAGACAAGGG
	orf49phi11-2c	TGCTCCCATTCCAGAACCAGG
	orf49phi11-3m	CTGGTTCTGGAATGGGAGCAGCTACTGCTATAGAGTGGTGC
	orf49phi11-4cE	CCGGAATTC TTTTGTCCAGGTTGTCCCGG
pJP572	orf51phi11-1mB	CGCGGATCC GGTGATAAAGGTGAACCGGG
	orf51phi11-2c	CCATACTTGATATTTCCAGC
	orf51phi11-3m	CTGGAAATATCCAAGTATGGTCAGGATCTCCGACATTGACC
	orf51phi11-4cS	ACGCGTGCAGCAGGTTGTGCTAAGAAGTCCGG
pJP519	orf46phi11-1mB	CGCGGATCC TGCCGGATTTACCAGGTAGCG
	orf47phi11-1c	CTTCATTATTTAAACGTCCCCC
	orf47phi11-2m	GGGGACGTTTAAATAATGAAGCAGGTGTAATGCTTGTGGCTTT
	orf46phi11-4cE	CCGGAATTCACCACTTCACTAGCTGTGGGC
pJP619	orf53phi11-3mB	CGCGGATCC GGTGACAATAGAAAATGTACG
	orf53phi11-4c	CTCAGAAGTTTTCAACCACTC
	orf53phi11-5m	AGTGGTTGAAAACCTTCTGAGCAGATATTAGGTGACTTATGG
	orf53phi11-6cE	CCGGAATTC CAGTTTGTGTAATTTGG
pJP958	orf66phi11-1mB	CGCGGATCC ACAGCTCAAACAGAATTATCG
	orf66phi11-2c	GTCTCTAAGGTATTTGTCAGT
	orf66phi11-3m	TGACAAATACCTTAGAGACTCGAAATATAATGAACCTCTC
	orf33phi11-6cE	CCGGAATTC GTTCCATTTAAATGCCTCCG
pJP959	orf67phi11-1mB	CGCGGATCC CAGACATGTCTATATGAAAGGG
	orf67phi11-2c	AATAACTCTATCTTCATATCTC
	orf67phi11-3m	AGATATGAAGATAGAGTTATTACGTCATATTATATCG
	orf38phi11-6cE	CCGGAATTC GCCATTCAATATTCCTCCG
pJP652	orf32phi11-1mB	CGCGGATCC GAAGGTAGAGAAACAGAAGGC
	orf44phi80α-1c	TCCGTA CTTAACAATAAACGC
	orf44phi80α-2m	GCGTTTATTGTTAAGTACGGAATCAATTGTCGTT CAGATTGC
	orf44phi80α-3cE	CCGGAATTC CTCTTTTTCCATTTGTTCCGG

Cebadores utilizados para complementar los mutantes del módulo de empaquetamiento del fago ϕ11		
Plásmidos	Cebadores	Secuencia (5'-3')
pJP740	orf28phi11-6mB orf28phi11-5cK	CGCGGATCCGGTGATGTAAAAGTTAAAGAGCG CGGGGTACCACTGCCAATTTTCAGTCTTCCC
pJP546	orf30phi11-5mB orf30phi11-6cK	CGCGGATCCCTATTGACCACATACTAAAAG CGGGGTACCCTTTTAACATTTGTTCCCTCC
pJP547	orf32phi11-5mB orf32phi11-6cK	CGCGGATCCGCTGAAGAAATAGAACGTATATTG CGGGGTACCCGTGCATACAAAATACTTGGCC
pJP548	orf33phi11-5mB orf33phi11-6cE	CGCGGATCCGGA AAAACAGTCGACAGAC CCGGAATTCGTTCCATTTAAATGCCTCCG
pJP1121	orf35phi11-5mB orf35phi11-6cE	CGCGGATCCAGAACAGATTCAGTTCCAGGAG CCGGAATTC TAGCGTAGTCATATAACCACC
pJP575	orf36phi11-5mS orf36phi11-6cB	ACGCGTTCGACGCTTTTGAGTCACTAGAGTAGG CGCGGATCCGAAAAATAACTCTATCTTCATATC
pJP549	orf37phi11-5mB orf37phi11-6cE	CGCGGATCCCACGAAACGTCATATTATATCG CCGGAATTCGTTCCGGTGTTCATGCTTTTATC
pJP550	orf38phi11-5mB orf38phi11.6cE	CGCGGATCCGAAAGCGTTGTTTGAATAGG CCGGAATTCGCCATTCAATATTCCTCCG
pJP576	orf40phi11-5mS orf40phi11-6cB	ACGCGTTCGACTAAAAATAGGGCGTTAAGCCC CGCGGATCCCAAGTTATAACGATTCTGTCCG
pJP577	orf41phi11-6mS orf41phi11-7cB	ACGCGTTCGACCTAATAACTTACGACAGAATCG CGCGGATCCATATTCCGTCACATTAACACC
pJP569	orf42phi11-5mB orf42phi11-6cK	CGCGGATCCAATAAGCAATAGAAAGAGAGG CGGGGTACCCATATGTCCATTTGTAACCTC
pJP551	orf43phi11-5mB orf43phi11-6cE	CGCGGATCCGAGTATTACTTATAAAGGAGG CCGGAATTC TAGTTATTGTCATTCTGACAC
pJP552	orf44phi11-5mB orf44phi11-6cE	CGCGGATCCGATTTGAAATTTTATTATAAGTAGG CCGGAATTC TTTTACTCATGTTTTCTCC
pJP1122	orf49phi11-9mB orf49phi11-10cE	CGCGGATCCCAGTTAAGAGTCAGTGCTTCCG CCGGAATTCATTTTGTACATTTACACACCTC
pJP990	orf52phi11-6mB orf52phi11-7cE	CGCGGATCCTCAGGATCTCCGACATTGACC CCGGAATTCGTCCACATTGAATTGTTTTCC
pJP989	orf53phi11-11mB orf53phi11-12cE	CGCGGATCCCGGAATTAAGCGCGAAAGC CCGGAATTCACCTGCTTAAATAGACATGAC
pJP1006	orf67phi11-4mB orf67phi11-5cE	CGCGGATCCACGAGA ACTAAAAAGGAAGG CCGGAATTCGTTAACAGTGCGTCTAATCC

Cebadores utilizados para realizar Sondas de hibridación		
Cebadores utilizados en el estudio de RinA		
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
phi11-cl-7c	CCTTTAAGATGTTTGTTCGCG	Sonda Southern ϕ 11
phi11-cl-8m	TGTTTAGGAGTTCTGTACCC	
phi80 α -cl-7m	AAGACTTTGTCTTGTTCGCG	Sonda northern CI 80 α
phi80 α -cl-8c	CACAGATTCGTTTTATTTCCC	
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
orf34phi11-1m	TTAAACCACAAGTATTTAACCC	Sonda northern proteína de la cápside 80 α
orf34phi11-2c	GTTATCTTGTGTGAAGTCACC	
Cebadores utilizados en el estudio de Ltr		
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
orf54phi55-5mS	ACGCGT <u>CGACA</u> AAAGTTAGATATCAGAGTTTG	Sonda Southern ϕ 55
orf29phi55-2cN	CATGCC <u>CATGG</u> ATTTCTTCTTCGTCTATCTTC	
gp06phiFL2A-1mS	ACGCGT <u>CGACT</u> GTCACAAGACTTAGAACTTG	Sonda southern phiFL2A
gp08phiFL2A-1cN	CATGCC <u>CATGG</u> TTTGCCAAAAAATTCAGCAAC	
orf54phi55-5mS	ACGCGT <u>CGACA</u> AAAGTTAGATATCAGAGTTTG	Sonda northern cro ϕ 55
orf29phi55-2cN	CATGCC <u>CATGG</u> ATTTCTTCTTCGTCTATCTTC	
orf34phi55-19mS	ACGCGT <u>CGACG</u> AGTCAATAGTTAATATGATAG G	Sonda northern LtrC ϕ 55
orf34phi55-20cN	CATGCC <u>CATGG</u> ATAAATCTTTCTGCCAACTC	
gp06phiFL2A-1mS	ACGCGT <u>CGACT</u> GTCACAAGACTTAGAACTTG	Sonda northern cro phiFL2A
gp08phiFL2A-1cN	CATGCC <u>CATGG</u> TTTGCCAAAAAATTCAGCAAC	
gp33phiFL2A-1mS	ACGCGT <u>CGACC</u> CACAAAAGGAGCGATTCCAC	Sonda northern ArpU phiFL2A
gp33phiFL2A-2cN	CATGCCATGGTTCCGCGAATTCAATCAAAGC	
orf7phi80a-8mS	ACGCGT <u>CGACT</u> TCGATTATAGTTTGCTGTAC	Sonda northern cro 80 α
orf8phi80a-4cN	CATGCCATGGGATCATATTTCTGTTTTGACC	
orf38phi80a-10mS	ACGCGT <u>CGACT</u> CAACAGTTGAAAGTTAGAA	Sonda northern RinA 80 α
orf38phi80a-11cP	AACTGCAGGCCAATCTAGATATGATTTTC	

Cebadores utilizados en el estudio de Ltr		
Cebadores	Secuencia (5'-3')	Descripción
phi11-cl-7c	CCTTTAAGATGTTTGTGGCG	Sonda Southern ϕ 11
phi11-cl-8m	TGTTTAGGAGTTCTGTACCC	
SaPIbov1-112mE	CCGGAATTC <u>A</u> ATTGCTGAGGCAAACTTC	Sonda Southern SaPIbov1
SaPIbov1-113cB	CGCGGATCCTAATTCTCCACGTCTAAAGC	

Capítulo VI



Conclusiones

En respuesta a los objetivos planteados en el inicio de este trabajo hemos obtenido las siguientes **conclusiones**:

1. RinA controla la expresión del módulo de morfogénesis y de lisis de los ϕ 11, 80 α , ϕ 69 y phiSLT de *S. aureus*. Contrariamente a lo que se había descrito, la expresión de la integrasa del ϕ 11 no está regulada por RinA ni por RinB.

2. La familia de proteínas RinA es el prototipo de una nueva superfamilia de reguladores transcripcionales de los genes tardíos fágicos (Ltr), a la que también pertenecen otras cuatro familias de reguladores: ArpU, LtrA (Sigma 70), LtrB (DUF1492) y LtrC.

3. Las proteínas Ltr actúan como reguladores transcripcionales uniéndose directamente a la región intergénica presente entre el regulador y el gen que codifica para la terminasa pequeña (*terS*), activando la expresión de *terS* y promoviendo la transcripción del resto de genes del módulo de morfogénesis y lisis del fago.

4. En la unión de las proteínas Ltr a la región promotora de *terS* intervienen unas repeticiones de nucleótidos que varían en su número y secuencia y que son específicamente reconocidas por cada regulador. El extremo carboxi-terminal de las proteínas Ltr interviene en el reconocimiento de las repeticiones presentes en la región promotora de *terS*.

5. El mecanismo de regulación de la transcripción de los genes tardíos descrito para la superfamilia de proteínas Ltr se encuentra ampliamente distribuido en fagos de bacterias Gram positivas.

6. En la formación de las partículas fágicas y en la lisis de la bacteria intervienen solamente los genes codificados en el módulo de morfogénesis y lisis del fago.

7. Se han identificado las proteínas del fago ϕ 11 imprescindibles para la formación de partículas infecciosas. Entre ellas están la subunidad pequeña (gp29) y grande de la terminasa (gp30), la proteína portal (gp31), la proteína de andamiaje (gp33), la proteína mayoritaria de la cabeza (gp34) y del tallo (gp39), la proteína "tape measure" (gp42), proteínas del tallo y de las fibras del tallo (gp45, gp50) y las

proteínas encargadas de la lisis bacteriana: hidrolasa (gp49), holina (gp52) y amidasa (gp53).

8. Se han caracterizado el papel ejercido por algunas proteínas cuya función era desconocida en el proceso de encapsidación del fago ϕ 11: las proteínas gpp35, gp36, gp37, gp38 y gp67 actúan como proteínas conectoras interviniendo en el proceso de ensamblaje de las cápsides y los tallos, mientras que las proteínas gp40, gp41, gp43 y gp44 intervienen en el proceso de formación de los tallos.

9. La proteína gp32 del fago ϕ 11 actúa como una proteína conectora de la cabeza y el tallo, y aunque su presencia no es imprescindible para la formación de partículas viables de fago, sí que lo es para un correcto desarrollo del ciclo fágico.

10. Las SaPIs y los plásmidos de *S. aureus* utilizan el mismo mecanismo utilizado por el fago para su empaquetamiento y transferencia.

Capítulo VII

Bibliografía

- Ackermann, H.W. (1998) Tailed bacteriophages: the order caudovirales. *Adv Virus Res* **51**: 135-201.
- Aksyuk, A.A., Leiman, P.G., Kurochkina, L.P., Shneider, M.M., Kostyuchenko, V.A., Mesyanzhinov, V.V., and Rossmann, M.G. (2009) The tail sheath structure of bacteriophage T4: a molecular machine for infecting bacteria. *Embo J* **28**: 821-829.
- Aksyuk, A.A., and Rossmann, M.G. (2011) Bacteriophage assembly. *Viruses* **3**: 172-203.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Ashelford, K.E., Day, M.J., and Fry, J.C. (2003) Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Appl Environ Microbiol* **69**: 285-289.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1990) *Current protocols in molecular biology*: . New York, N.Y.: John Wiley & Sons.
- Auzat, I., Droge, A., Weise, F., Lurz, R., and Tavares, P. (2008) Origin and function of the two major tail proteins of bacteriophage SPP1. *Mol Microbiol* **70**: 557-569.
- Ayers, D.J., Sunshine, M.G., Six, E.W., and Christie, G.E. (1994) Mutations affecting two adjacent amino acid residues in the alpha subunit of RNA polymerase block transcriptional activation by the bacteriophage P2 Ogr protein. *J Bacteriol* **176**: 7430-7438.
- Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002) Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**: 1819-1827.
- Bergh, O., Borsheim, K.Y., Bratbak, G., and Heldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468.
- Berngruber, T.W., Weissing, F.J., and Gandon, S. (2010) Inhibition of superinfection and the evolution of viral latency. *J Virol* **84**: 10200-10208.
- Betley, M.J., and Mekalanos, J.J. (1985) Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* **229**: 185-187.
- Black, L.W., Showe, M.K., and Steven, A.C. (1994) *Morphogenesis of the T4 head*: Karam, J. D. Ed.
- Bolotin, A., Mauger, S., Malarme, K., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A. (1999) Low-redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 27-76.
- Botstein, D. (1980) A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann N Y Acad Sci* **354**: 484-490.
- Brondsted, L., Pedersen, M., and Hammer, K. (2001) An activator of transcription regulates phage TP901-1 late gene expression. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5626-5633.
- Bruckner, R. (1997) Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. *FEMS Microbiol Lett* **151**: 1-8.
- Brussow, H., and Hendrix, R.W. (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell* **108**: 13-16.
- Brussow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.D. (2004) Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 560-602, table of contents.
- Camacho, A., Jimenez, F., Vinuela, E., and Salas, M. (1979) Order of assembly of the lower collar and the tail proteins of *Bacillus subtilis* bacteriophage phi 29. *J Virol* **29**: 540-545.

- Campbell, A., Schneider, S.J., and Song, B. (1992) Lambdoid phages as elements of bacterial genomes (integrase/phage21/Escherichia coli K-12/ics gene). *Genetica* **86**: 259-267.
- Casjens, S., and Hendrix, R.W. (1988) *Control mechanisms in dsDNA bacteriophage assembly*. New York, USA: Calendar, R. L., Ed.
- Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* **49**: 277-300.
- Casjens, S.R. (2005) Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol* **8**: 451-458.
- Casjens, S.R. (2011) The DNA-packaging nanomotor of tailed bacteriophages. *Nat Rev Microbiol* **9**: 647-657.
- Clokier, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V., and Heaphy, S. (2011) Phages in nature. *Bacteriophage* **1**: 31-45.
- Coombs, D.H., and Arisaka, F. (1994) *T4 tail structure and function*. Washington DC, USA: Karam, J.D., Ed.; American Society for Microbiology.
- Court, D.L., Oppenheim, A.B., and Adhya, S.L. (2007) A new look at bacteriophage lambda genetic networks. *J Bacteriol* **189**: 298-304.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I., and Penades, J.R. (2001) Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **183**: 2888-2896.
- Chakraborty, A., and Nagaraja, V. (2006) Dual role for transactivator protein C in activation of mom promoter of bacteriophage Mu. *J Biol Chem* **281**: 8511-8517.
- Charpentier, E., Anton, A.I., Barry, P., Alfonso, B., Fang, Y., and Novick, R.P. (2004) Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6076-6085.
- Chen, J., and Novick, R.P. (2009) Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science* **323**: 139-141.
- Chien, Y., Manna, A.C., Projan, S.J., and Cheung, A.L. (1999) SarA, a global regulator of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*, binds to a conserved motif essential for sar-dependent gene regulation. *J Biol Chem* **274**: 37169-37176.
- Christie, G.E., Anders, D.L., McAlister, V., Goodwin, T.S., Julien, B., and Calendar, R. (2003) Identification of upstream sequences essential for activation of a bacteriophage P2 late promoter. *J Bacteriol* **185**: 4609-4614.
- Christie, G.E., and Dokland, T. (2012) Pirates of the Caudovirales. *Virology* **434**: 210-221.
- Damle, P.K., Wall, E.A., Spilman, M.S., Dearborn, A.D., Ram, G., Novick, R.P., Dokland, T., and Christie, G.E. (2012) The roles of SaP11 proteins gp7 (CpmA) and gp6 (CpmB) in capsid size determination and helper phage interference. *Virology* **432**: 277-282.
- Dearborn, A.D., and Dokland, T. (2012) Mobilization of pathogenicity islands by *Staphylococcus aureus* strain Newman bacteriophages. *Bacteriophage* **2**: 70-78.
- Deghorain, M., and Van Melderen, L. (2012) The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses* **4**: 3316-3335.
- Desiere, F., Pridmore, R.D., and Brussow, H. (2000) Comparative genomics of the late gene cluster from *Lactobacillus* phages. *Virology* **275**: 294-305.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**: 16-34, table of contents.
- Dokland, T. (1999) Scaffolding proteins and their role in viral assembly. *Cell Mol Life Sci* **56**: 580-603.
- Duda, R.L., Martincic, K., and Hendrix, R.W. (1995) Genetic basis of bacteriophage HK97 prohead assembly. *J Mol Biol* **247**: 636-647.

- Elias-Arnanz, M., and Salas, M. (1999) Functional interactions between a phage histone-like protein and a transcriptional factor in regulation of phi29 early-late transcriptional switch. *Genes Dev* **13**: 2502-2513.
- Fane, B.A., and Prevelige, P.E., Jr. (2003) Mechanism of scaffolding-assisted viral assembly. *Adv Protein Chem* **64**: 259-299.
- Faruque, S.M., Asadulghani, Kamruzzaman, M., Nandi, R.K., Ghosh, A.N., Nair, G.B., Mekalanos, J.J., and Sack, D.A. (2002) RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXphi. *Infect Immun* **70**: 163-170.
- Favre, A., Chams, V., and Caldeira de Araujo, A. (1986) Photosensitized UVA light induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Biochimie* **68**: 857-864.
- Feiss, M., and Rao, V.B. (2012) The bacteriophage DNA packaging machine. *Adv Exp Med Biol* **726**: 489-509.
- Fitzgerald, J.R., Monday, S.R., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., and Smyth, C.J. (2001) Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J Bacteriol* **183**: 63-70.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722-732.
- Ghisotti, D., Briani, F., Forti, F., Piazza, F., Polo, S., Sabbattini, P., Sturniolo, T., Terzano, S., Zangrossi, S., Zappone, M., and et al. (1995) Multiple regulatory mechanisms controlling phage-plasmid P4 propagation. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 127-134.
- Gogarten, J.P., Doolittle, W.F., and Lawrence, J.G. (2002) Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol Biol Evol* **19**: 2226-2238.
- Grambow, N.J., Birkeland, N.K., Anders, D.L., and Christie, G.E. (1990) Deletion analysis of a bacteriophage P2 late promoter. *Gene* **95**: 9-15.
- Greene, J.R., Chelm, B.K., and Geiduschek, E.P. (1982) SP01 gene 27 is required for viral late transcription. *J Virol* **41**: 715-720.
- Hansen, A.M., Lehnerr, H., Wang, X., Mobley, V., and Jin, D.J. (2003) *Escherichia coli* SspA is a transcription activator for bacteriophage P1 late genes. *Mol Microbiol* **48**: 1621-1631.
- Heller, K.J. (1984) Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23. *Virology* **139**: 11-21.
- Hendrix, R.W. (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. *Theor Popul Biol* **61**: 471-480.
- Herendeen, D.R., Williams, K.P., Kassavetis, G.A., and Geiduschek, E.P. (1990) An RNA polymerase-binding protein that is required for communication between an enhancer and a promoter. *Science* **248**: 573-578.
- Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., and Parkhill, J. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9786-9791.
- Huet, A., Conway, J.F., Letellier, L., and Boulanger, P. (2010) In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain. *J Virol* **84**: 9350-9358.
- Iandolo, J.J., Worrell, V., Groicher, K.H., Qian, Y., Tian, R., Kenton, S., Dorman, A., Ji, H., Lin, S., Loh, P., Qi, S., Zhu, H., and Roe, B.A. (2002) Comparative analysis of the genomes of the temperate bacteriophages phi 11, phi 12 and phi 13 of *Staphylococcus aureus* 8325. *Gene* **289**: 109-118.

- Johnson, J.E., and Chiu, W. (2007) DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 237-243.
- Kaneko, J., Kimura, T., Narita, S., Tomita, T., and Kamio, Y. (1998) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of the temperate staphylococcal bacteriophage phiPVL carrying Panton-Valentine leukocidin genes. *Gene* **215**: 57-67.
- Karplus, K., Barrett, C., and Hughey, R. (1998) Hidden Markov models for detecting remote protein homologies. *Bioinformatics* **14**: 846-856.
- Kassavetis, G.A., Elliott, T., and Geiduschek, E.P. (1984) Regulation of transcription in the segment of the bacteriophage T4 genome containing three of the head protein genes: plasmid-specific and phage chromosome-specific effects. *Virology* **139**: 283-294.
- Katsura, I. (1990) Mechanism of length determination in bacteriophage lambda tails. *Adv Biophys* **26**: 1-18.
- Kim, B., and Little, J.W. (1993) LexA and lambda CI repressors as enzymes: specific cleavage in an intermolecular reaction. *Cell* **73**: 1165-1173.
- King, J., Lenk, E.V., and Botstein, D. (1973) Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in *Salmonella* phage P22. II. Morphogenetic pathway. *J Mol Biol* **80**: 697-731.
- Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M., and Ohta, T. (2005) Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13272-13277.
- Kwan, T., Liu, J., DuBow, M., Gros, P., and Pelletier, J. (2005) The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5174-5179.
- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Hook, M., Etienne, J., Vandenesch, F., and Bowden, M.G. (2007) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* **315**: 1130-1133.
- Lander, G.C., Tang, L., Casjens, S.R., Gilcrease, E.B., Prevelige, P., Poliakov, A., Potter, C.S., Carragher, B., and Johnson, J.E. (2006) The structure of an infectious P22 virion shows the signal for headful DNA packaging. *Science* **312**: 1791-1795.
- Lander, G.C., Evilevitch, A., Jeembaeva, M., Potter, C.S., Carragher, B., and Johnson, J.E. (2008) Bacteriophage lambda stabilization by auxiliary protein gpD: timing, location, and mechanism of attachment determined by cryo-EM. *Structure* **16**: 1399-1406.
- LeBowitz, J.H., and McMacken, R. (1986) The *Escherichia coli* dnaB replication protein is a DNA helicase. *J Biol Chem* **261**: 4738-4748.
- Leiman, P.G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., and Rossmann, M.G. (2003) Structure and morphogenesis of bacteriophage T4. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2356-2370.
- Lhuillier, S., Gallopin, M., Gilquin, B., Brasiles, S., Lancelot, N., Letellier, G., Gilles, M., Dethan, G., Orlova, E.V., Couprie, J., Tavares, P., and Zinn-Justin, S. (2009) Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 8507-8512.
- Lindqvist, B.H., Deho, G., and Calendar, R. (1993) Mechanisms of genome propagation and helper exploitation by satellite phage P4. *Microbiol Rev* **57**: 683-702.
- Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., and Novick, R.P. (1998) The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **29**: 527-543.
- Lindsay, J.A. (2010) Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* **300**: 98-103.

- Little, J.W. (1984) Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1375-1379.
- Little, J.W., Shepley, D.P., and Wert, D.W. (1999) Robustness of a gene regulatory circuit. *Embo J* **18**: 4299-4307.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbe, J., and Penades, J.R. (2006) beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **188**: 2726-2729.
- Maiques, E., Ubeda, C., Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2007) Role of staphylococcal phage and SaPI integrase in intra- and interspecies SaPI transfer. *J Bacteriol* **189**: 5608-5616.
- Matos, R.C., Lapaque, N., Rigottier-Gois, L., Debarbieux, L., Meylheuc, T., Gonzalez-Zorn, B., Repoila, F., Lopes Mde, F., and Serror, P. (2013) *Enterococcus faecalis* Prophage Dynamics and Contributions to Pathogenic Traits. *PLoS Genet* **9**: e1003539.
- McShan, W.M., Ferretti, J.J., Karasawa, T., Suvorov, A.N., Lin, S., Qin, B., Jia, H., Kenton, S., Najjar, F., Wu, H., Scott, J., Roe, B.A., and Savic, D.J. (2008) Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**: 7773-7785.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S.N. (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**: 1629-1631.
- Miller, H.I., Abraham, J., Benedik, M., Campbell, A., Court, D., Echols, H., Fischer, R., Galindo, J.M., Guarneros, G., Hernandez, T., Mascarenhas, D., Montanez, C., Schindler, D., Schmeissner, U., and Sosa, L. (1981) Regulation of the integration-excision reaction by bacteriophage lambda. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **45 Pt 1**: 439-445.
- Mir-Sanchis, I., Martinez-Rubio, R., Marti, M., Chen, J., Lasa, I., Novick, R.P., Tormo-Mas, M.A., and Penades, J.R. (2012) Control of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island excision. *Mol Microbiol* **85**: 833-845.
- Narita, S., Kaneko, J., Chiba, J., Piemont, Y., Jarraud, S., Etienne, J., and Kamio, Y. (2001) Phage conversion of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus*: molecular analysis of a PVL-converting phage, phiSLT. *Gene* **268**: 195-206.
- Nechaev, S., and Geiduschek, E.P. (2008) Dissection of the bacteriophage T4 late promoter complex. *J Mol Biol* **379**: 402-413.
- Novick, R.P. (2003) Mobile genetic elements and bacterial toxinoses: the superantigen-encoding pathogenicity islands of *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **49**: 93-105.
- Novick, R.P., Christie, G.E., and Penades, J.R. (2010) The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* **8**: 541-551.
- Nudler, E., and Gottesman, M.E. (2002) Transcription termination and anti-termination in *E. coli*. *Genes Cells* **7**: 755-768.
- Oliveira, L., Tavares, P., and Alonso, J.C. (2013) Headful DNA packaging: bacteriophage SPP1 as a model system. *Virus Res* **173**: 247-259.
- Orlova, E.V., Gowen, B., Droge, A., Stiege, A., Weise, F., Lurz, R., van Heel, M., and Tavares, P. (2003) Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Embo J* **22**: 1255-1262.
- Paulsen, I.T., Banerjee, L., Myers, G.S., Nelson, K.E., Seshadri, R., Read, T.D., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Gill, S.R., Heidelberg, J.F., Tettelin, H., Dodson, R.J., Umayam, L., Brinkac, L., Beanan, M., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Durkin, S., Kolonay, J., Madupu, R., Nelson, W., Vamathevan, J., Tran, B., Upton, J., Hansen, T., Shetty, J., Khouri, H., Utterback, T., Radune, D., Ketchum, K.A., Dougherty, B.A., and Fraser, C.M. (2003)

- Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**: 2071-2074.
- Pedersen, M., Kilstrup, M., and Hammer, K. (2006) Identification of DNA-binding sites for the activator involved in late transcription of the temperate lactococcal phage TP901-1. *Virology* **345**: 446-456.
- Phillips, I., Culebras, E., Moreno, F., and Baquero, F. (1987) Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* **20**: 631-638.
- Poliakov, A., Chang, J.R., Spilman, M.S., Damle, P.K., Christie, G.E., Mobley, J.A., and Dokland, T. (2008) Capsid size determination by *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 involves specific incorporation of SaPI1 proteins into procapsids. *J Mol Biol* **380**: 465-475.
- Qin, L., Fokine, A., O'Donnell, E., Rao, V.B., and Rossmann, M.G. (2010) Structure of the small outer capsid protein, Soc: a clamp for stabilizing capsids of T4-like phages. *J Mol Biol* **395**: 728-741.
- Ram, G., Chen, J., Kumar, K., Ross, H.F., Ubeda, C., Damle, P.K., Lane, K.D., Penades, J.R., Christie, G.E., and Novick, R.P. (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16300-16305.
- Rao, V.B., and Feiss, M. (2008) The bacteriophage DNA packaging motor. *Annu Rev Genet* **42**: 647-681.
- Rao, V.B., and Black, L.W. (2012) Structure and assembly of bacteriophage T4 head. *Virology* **447**: 356.
- Rodriguez-Rubio, L., Quiles-Puchalt, N., Martinez, B., Rodriguez, A., Penades, J.R., and Garcia, P. (2013) The peptidoglycan hydrolase of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage 11 plays a structural role in the viral particle. *Appl Environ Microbiol*. 2013; 79 (19): 6187-90.
- Rojo, F., Mencia, M., Monsalve, M., and Salas, M. (1998) Transcription activation and repression by interaction of a regulator with the alpha subunit of RNA polymerase: the model of phage phi 29 protein p4. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **60**: 29-46.
- Rosenstein, R., Nerz, C., Biswas, L., Resch, A., Raddatz, G., Schuster, S.C., and Gotz, F. (2009) Genome analysis of the meat starter culture bacterium *Staphylococcus carnosus* TM300. *Appl Environ Microbiol* **75**: 811-822.
- Rossmann, M.G., Mesyanzhinov, V.V., Arisaka, F., and Leiman, P.G. (2004) The bacteriophage T4 DNA injection machine. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 171-180.
- Rowen, L., and Kornberg, A. (1978) Primase, the dnaG protein of *Escherichia coli*. An enzyme which starts DNA chains. *J Biol Chem* **253**: 758-764.
- Ruzin, A., Lindsay, J., and Novick, R.P. (2001) Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**: 365-377.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*.: New York: Cold Spring Harbor
- Sciara, G., Bebeacua, C., Bron, P., Tremblay, D., Ortiz-Lombardia, M., Lichiere, J., van Heel, M., Campanacci, V., Moineau, S., and Cambillau, C. (2010) Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6852-6857.
- Selva, L., Viana, D., Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Corpa, J.M., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2009) Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 1234-1238.
- Simossis, V.A., and Heringa, J. (2005) PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res* **33**: W289-294.

- Spilman, M.S., Damle, P.K., Dearborn, A.D., Rodenburg, C.M., Chang, J.R., Wall, E.A., Christie, G.E., and Dokland, T. (2012) Assembly of bacteriophage 80alpha capsids in a *Staphylococcus aureus* expression system. *Virology* **434**: 242-250.
- Steven, A.C., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L., and Conway, J.F. (2005) Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol* **15**: 227-236.
- Sun, W., Hattman, S., and Kool, E. (1997) Interaction of the bacteriophage Mu transcriptional activator protein, C, with its target site in the mom promoter. *J Mol Biol* **273**: 765-774.
- Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C., and Hiramatsu, K. (2005) Whole-genome sequencing of *Staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* **187**: 7292-7308.
- Talkington, C., and Pero, J. (1978) Promoter recognition by phage SP01-modified RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**: 1185-1189.
- Tallent, S.M., Langston, T.B., Moran, R.G., and Christie, G.E. (2007) Transducing particles of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island SaPI1 are comprised of helper phage-encoded proteins. *J Bacteriol* **189**: 7520-7524.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**: 2731-2739.
- Thomas, C.M., and Nielsen, K.M. (2005) Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**: 711-721.
- Tormo-Mas, M.A., Mir, I., Shrestha, A., Tallent, S.M., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R.P., Christie, G.E., and Penades, J.R. (2010) Moonlighting bacteriophage proteins derepress staphylococcal pathogenicity islands. *Nature* **465**: 779-782.
- Tormo-Mas, M.A., Donderis, J., Garcia-Caballer, M., Alt, A., Mir-Sanchis, I., Marina, A., and Penades, J.R. (2013) Phage dUTPases control transfer of virulence genes by a proto-oncogenic G protein-like mechanism. *Mol Cell* **49**: 947-958.
- Tormo, M.A., Ferrer, M.D., Maiques, E., Ubeda, C., Selva, L., Lasa, I., Calvete, J.J., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2008) *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J Bacteriol* **190**: 2434-2440.
- Ubeda, C., Tormo, M.A., Cucarella, C., Trotonda, P., Foster, T.J., Lasa, I., and Penades, J.R. (2003) Sip, an integrase protein with excision, circularization and integration activities, defines a new family of mobile *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Mol Microbiol* **49**: 193-210.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* **56**: 836-844.
- Ubeda, C., Barry, P., Penades, J.R., and Novick, R.P. (2007a) A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14182-14188.
- Ubeda, C., Maiques, E., Tormo, M.A., Campoy, S., Lasa, I., Barbe, J., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2007b) SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. *Mol Microbiol* **65**: 41-50.
- Ubeda, C., Maiques, E., Barry, P., Matthews, A., Tormo, M.A., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2008) SaPI mutations affecting replication and transfer and enabling autonomous replication in the absence of helper phage. *Mol Microbiol* **67**: 493-503.
- Ubeda, C., Tormo-Mas, M.A., Penades, J.R., and Novick, R.P. (2012) Structure-function analysis of the SaPI_{bov1} replication origin in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **67**: 183-190.

- Valpuesta, J.M., and Carrascosa, J.L. (1994) Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Q Rev Biophys* **27**: 107-155.
- van Wamel, W.J., Rooijackers, S.H., Ruyken, M., van Kessel, K.P., and van Strijp, J.A. (2006) The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* **188**: 1310-1315.
- Viana, D., Blanco, J., Tormo-Mas, M.A., Selva, L., Guinane, C.M., Baselga, R., Corpa, J., Lasa, I., Novick, R.P., Fitzgerald, J.R., and Penades, J.R. (2010) Adaptation of *Staphylococcus aureus* to ruminant and equine hosts involves SaPI-carried variants of von Willebrand factor-binding protein. *Mol Microbiol* **77**: 1583-1594.
- Vianelli, A., Wang, G.R., Gingery, M., Duda, R.L., Eiserling, F.A., and Goldberg, E.B. (2000) Bacteriophage T4 self-assembly: localization of gp3 and its role in determining tail length. *J Bacteriol* **182**: 680-688.
- Vinga, I., Droge, A., Stiege, A.C., Lurz, R., Santos, M.A., Daugelavicius, R., and Tavares, P. (2006) The minor capsid protein gp7 of bacteriophage SPP1 is required for efficient infection of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **61**: 1609-1621.
- Wang, J., Hofnung, M., and Charbit, A. (2000) The C-terminal portion of the tail fiber protein of bacteriophage lambda is responsible for binding to LamB, its receptor at the surface of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **182**: 508-512.
- Weisberg, R.A., and Gottesman, M.E. (1999) Processive antitermination. *J Bacteriol* **181**: 359-367.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.
- Wommack, K.E., and Colwell, R.R. (2000) Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 69-114.
- Yang, F., Forrer, P., Dauter, Z., Conway, J.F., Cheng, N., Cerritelli, M.E., Steven, A.C., Pluckthun, A., and Wlodawer, A. (2000) Novel fold and capsid-binding properties of the lambda-phage display platform protein gpD. *Nat Struct Biol* **7**: 230-237.
- Ye, Z.H., and Lee, C.Y. (1993) Cloning, sequencing, and genetic characterization of regulatory genes, rinA and rinB, required for the activation of staphylococcal phage phi 11 int expression. *J Bacteriol* **175**: 1095-1102.
- Young, R. (1992) Bacteriophage lysis: mechanism and regulation. *Microbiol Rev* **56**: 430-481.
- Young, R., and Blasi, U. (1995) Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 191-205.
- Yu, V.L., Goetz, A., Wagener, M., Smith, P.B., Rihs, J.D., Hanchett, J., and Zuravleff, J.J. (1986) *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis. Efficacy of antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med* **315**: 91-96.
- Zhao, L., Kanamaru, S., Chaidirek, C., and Arisaka, F. (2003) P15 and P3, the tail completion proteins of bacteriophage T4, both form hexameric rings. *J Bacteriol* **185**: 1693-1700.