



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Estudio de la diseminación del gen "cor-like" en bacteriófagos lambdoides
nativos: multirresistencia a la infección de bacteriófagos

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

P R E S E N T A
MARIO ALBERTO MARTÍNEZ NÚÑEZ

Director: Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe.
Codirector: Dr. Jaime García Mena.

2004





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTE TRABAJO DE TESIS FUE DESARROLLADO EN EL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LUIS KAMEYAMA KAWABE
Y EL DR. JAIME GARCÍA MENA.**

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	34
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO	45

RESUMEN

La exclusión a la superinfección de bacteriófagos se presenta en bacterias lisogenizadas por ciertos fagos. El producto del gen *cor*, proveniente en forma independiente del profago Ø80 o del N15, proporciona el fenotipo de exclusión contra los fagos Ø80, N15 y T1. El modelo propuesto para explicar el fenotipo de multirresistencia a bacteriófagos por *cor* se basa en que Cor pudiera estar interactuando con FhuA bloqueando la inyección del ADN viral. El presente estudio tuvo como objetivo rastrear la diseminación del gen "*cor-like*" mediante el uso de la PCR en una colección de fagos nativos lambdoides y no-lambdoides. El 69% (27/39) de los fagos lambdoides dieron positivo para la PCR. Los resultados de la secuenciación de 4 de ellos muestran evidencia de que los fragmentos amplificados guardan una similitud al nivel de nucleótidos $\geq 90\%$ con respecto al gen "*cor-like*" del fago lambda mEp167. Mientras que en aquellos fagos clasificados como no-lambdoides no se obtuvo amplificación positiva alguna. Por otro lado, en las pruebas de infección fágica contra las diferentes lisógenas que mostraron una amplificación de *cor* no todas excluyeron a los diferentes bacteriófagos FhuA⁻ dependientes, lo que podría indicar al menos dos cosas: la existencia de un tercer sistema de exclusión o que aunque el gen *cor* estuviese presente en el genoma podría ser gen no funcional o con baja actividad.

INTRODUCCIÓN

Los virus son agentes infecciosos desprovistos de una estructura celular propia y son parásitos intracelulares obligados ya que su desarrollo ocurre dentro de la célula huésped. Los primeros reportes de los virus fueron sobre el virus del mosaico del tabaco (Beijerinck e Ivanovski en 1898), el virus de la fiebre amarilla por Reed y Carroll y el virus de las enfermedades de la boca y de los pies por Loeffler y Frosch, (referidos en Hurst, 2000; Murphy et. al., 1995; Duckworth, 1976). El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) en su sexto reporte de 1995 los ha agrupado en 1 orden, 71 familias, 9 subfamilias, y 164 género incluyendo 24 géneros flotantes y en más de 3, 600 especies de virus (Murphy et. al., 1995).

Los virus cuyas células huésped son las bacterias son llamados bacteriófagos (o fagos). Los primeros reportes de bacteriófagos se deben a Federich Twort (1915) y a Felix d'Herelle (1917) (Duckworth, 1976). Los bacteriófagos son los más abundantes entre los grupos de virus debido a que sus hospederos, las bacterias, son los organismos más abundantes en la Tierra. Los fagos han sido clasificados por su morfotipo y también por el género de la bacteria hospedero en que se desarrollan. Actualmente están divididos en 21 morfotipos correspondiendo a 13 familias (Ackermann, 2001).

Entre los bacteriófagos, los que presentan una "cola" o "cuello" son los más abundantes. Cerca de 4,000 descripciones han sido publicadas agrupándolos en tres familias: *Myoviridae*, *Siphoviridae* y *Podoviridae*. La morfología de los viriones consiste de una cabeza (cápside), una cola, y fibras y espículas para su fijación. Las colas pueden ser largas y contráctiles o no contráctiles, o cortas presentando usualmente en la punta de la cola fibras terminales. Los viriones de estas 3 familias contienen una molécula lineal de ADN de doble cadena. Algunos autores han propuesto englobar a las tres familias de fagos con cola en un nuevo orden, el de los Caudovirales (Hurst, 2000; Murphy et. al., 1995).

Las proteínas de la cola del virión son las que determinan en forma general el tipo de hospedero a parasitar. La absorción, definida como la unión del fago al receptor celular, es proporcionada por proteínas virales específicas presentes en la superficie del virus, así como de los receptores apropiados del hospedero. La absorción aumenta con el incremento en la densidad de los receptores del huésped (Hurst, 2000; Schwartz, 1980; Wright *et. al.*, 1980).

De acuerdo a su desarrollo, los fagos pueden clasificarse en líticos y temperados. Los fagos líticos matan a la bacteria produciendo su progenie. Los fagos temperados pueden seguir el ciclo lítico o el lisógeno. En éste último, el material genético permanece dentro de la bacteria y se encuentra en una forma "cuasi-pasiva". Uno de los modelos más estudiados es el fago temperado lambda (λ), el cual pertenece a la familia *Siphoviridae*. El virión λ utiliza la proteína LamB del huésped como receptor. En la ruta del ciclo lítico, el ADN de λ se circulariza y se expresan productos de genes tempranos a partir de los promotores pL y pR, como la proteína N, la cual actúa como un antiterminador modificando a la ARN polimerasa, la cual desconoce los terminadores de la transcripción y así expresar los genes tardíos. Adicionalmente, la transcripción a partir de pR es necesaria para la replicación del genoma viral. Los productos de los genes tardíos dan origen a las proteínas estructurales las cuales conforman la cápside y el cuello. Finalmente se producen los viriones maduros y la célula se lisa liberando a estos para infectar a nuevas bacterias.

En la ruta del ciclo lisógeno la inserción del genoma de λ es llevada a cabo por el producto del gen *int* ayudado con las proteínas IHF (heterodimeric integration host factor) y Fis del huésped (Campbell, 1993); en éste ciclo el único gen expresado es el represor *ci*. El represor CI reprime la acción de los promotores pL y pR pero puede activar su propia expresión, así, es al mismo tiempo un regulador negativo y positivo de la expresión

genética (Ptashne, 1992). La lisogenia permite la conservación y la transmisión pasiva del genoma de λ . Sin embargo, hay otras formas de lisogenizar a una bacteria, como el descrito por Rybchin y Svarchevsky (1999) en el cual el genoma del fago N15 en vez de integrarse al genoma bacteriano permanece en forma de plásmido lineal. El mecanismo necesario para mantener al profago en estado de latencia es similar a los ocurridos en el fago λ .

Conversión Lisogénica

La lisogenización debida a algunos fagos cambia el fenotipo de la célula huésped; las características que derivan de este fenómeno se conocen como conversión lisogénica y generalmente acarrear cierto beneficio a la lisógena. La inserción del genoma viral al genoma bacteriano puede ir acompañada de la capacidad del profago de expresar ciertos factores de virulencia. Algunos de estos factores están codificados por genes que se encuentran en regiones denominadas Islas de Patogenicidad (PAI). Estos genes codifican proteínas que convierten al huésped en patógeno (Boyd *et al.*, 2001). Otro fenotipo que puede adquirir la bacteria es la resistencia al ataque por otros bacteriófagos. Los sistemas descritos para la resistencia a infecciones fágicas conferidos por un profago a las bacterias se han agrupado en tres: represión/inmunidad, exclusión (infección abortiva) y exclusión a superinfecciones (Desiere *et al.*, 2001; McGrath *et al.*, 2002) (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de resistencia a infecciones por bacteriófagos.

Sistema de resistencia a bacteriófagos	Fagos	Mecanismo
Represión/inmunidad	λ .	Proteínas represoras tipo CI desconectan los genes de la morfogénesis y lisis del fago.
Exclusión (infección abortiva)	λ , profago críptico e14.	Disminución del potencial de membrana del huésped, a través de un canal iónico; terminación de la traducción.
Exclusión superinfectiva	HK022, Ø80, N15, P22, Tuc2009.	Bloqueo de receptores fágicos; interrupción de la translocación del ADN al espacio citoplásmico.

Los sistemas represión/inmunidad funcionan con represores similares al CI de λ , los cuales interactúan con los operadores del ADN del virus y reprimen la acción de los promotores evitando la expresión de los demás genes (Ptashne, 1992). En los sistemas de exclusión (llamados también infección abortiva) se desencadena la disrupción del desarrollo fágico. Varios mutantes incluyendo algunos de λ , son excluidos por los productos de los genes *rex* (*rexA*, *rexB*). La proteína RexA actúa como un sensor-activador, y la proteína RexB como un regulador-respuesta, la cual genera un canal iónico que permite el paso de cationes monovalentes, con lo cual se destruye el potencial de membrana de la célula bacteriana. Otro ejemplo de exclusión son la proteína Lit (late inhibitor of T4) del profago e14, la cual interrumpe la transcripción del fago T4 y hace que ésta termine dentro de la región que codifica para las proteínas de la cabeza del virión (Snyder, 1995).

La exclusión superinfectiva - McGrath *et al.* (2002) la separan en aquella que inhibe la adsorción del fago, y en la que bloquea la inyección del ADN del virus hacia el espacio periplásmico - es un mecanismo que puede actuar en los sistemas de membrana (externa e interna) o en el espacio periplásmico del hospedero (Tabla 2). El bacteriófago temperado de *Lactococcus lactis* Tuc2009 contiene el gen *sie*₂₀₀₉, cuyo producto le

confiere un fenotipo de exclusión superinfectiva a su lisógena. El gen *sie*₂₀₀₉ se encuentra localizado entre los genes de la integrasa y el represor; tiene un tamaño de 521 pb el cual codifica para un polipéptido de 173 aminoácidos. Los ensayos realizados por McGrath *et al.*, (2002) sugieren que el fenotipo de resistencia a bacteriófagos conferido por el gen *sie*₂₀₀₉ a su lisógena es el resultado de un bloqueo de la inyección del ADN de los fagos ϕ sk1, ϕ 712 y ϕ jj50. La proteína Sie₂₀₀₉ es expresada en niveles bajos durante el ciclo lítico. Durante el ciclo lisógeno se expresa permanentemente y en altos niveles, con lo que se logra la saturación de los sitios de receptores de fagos. Secuencias disponibles en base de datos fueron exploradas para buscar homologías con *sie*₂₀₀₉ y se encontraron que las secuencias parecidas estaban situadas entre genes que codifican para la integrasa y el represor. Estas secuencias presentan homologías en una región hidrofóbica NH₃ terminal y en regiones transmembranales (span). Estas homologías presentes en diferentes fagos lisógenicos de *Lactococcus* conducen a pensar en que los sistemas de resistencia a fagos están ampliamente distribuidos (McGrath *et al.*, 2002).

La expresión del gen *sim* del fago P1 confiere a su lisógena el fenotipo de exclusión superinfectiva. Kleim y Dreiseikelmann (1989) demostraron que el producto del gen *sim* interfiere con algún paso temprano de la adsorción del fago o de la circularización del ADN inyectado. La hipótesis de estos autores es que *sim* codifica para una proteína la cual bloquea la inyección del ADN hacia el citoplasma posterior a la adsorción del fago con su receptor. El fenotipo de la inmunidad está correlacionado con la presencia de tres proteínas las cuales fueron demostradas al ser expresadas a través de un vector (Kleim y Dreiseikelmann, 1989). El producto del gen *sieA* del profago P22 de *Salmonella typhimurium* le confiere a su lisógena el fenotipo de exclusión superinfectiva contra los fagos L, MG178 y MG40. Ranade y Poteete (1993) reportaron que las dos proteínas SieA y SieB expresadas por el fago P22 presentaban dos regiones hidrofóbicas con un tamaño suficiente para considerarlos dominios transmembranales. La proteína deducida de *sieA*,

contiene un 49% de aminoácidos hidrofóbicos lo que podría implicar que fuera una proteína integral de la membrana citoplásmica. Hofer *et al.*, (1995) encontraron que SieA efectivamente es una proteína de la membrana interna. SieA bloquea la transferencia del ADN de los fagos L, MG178 y MG40, durante la inserción de su ADN hacía el espacio citoplásmico, liberando solamente su genoma al espacio periplásmico. El producto del gen *imm* del bacteriófago lítico T4 de *E. coli* le confiere a la bacteria infectada el fenotipo de exclusión superinfectiva mientras dura el desarrollo del fago. La proteína deducida de la secuenciación nucleotídica del gen muestra que contiene dos regiones hidrofóbicas extensas, las cuales pueden ser sitios de anclaje, sugiriendo que es una proteína integral de membrana citoplásmica la cual bloquea el paso del ADN viral hacía el citoplasma (Lu y Henning, 1989). Nesper *et al.*, (1999) al secuenciar 5,031pb de ADN pertenecientes a la región principal de control del fago temperado K139 de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 y O139, correlacionaron cuatro de los seis marcos de lectura abierto (ORF) a nivel de aminoácidos con las proteínas CII, CI e Int del fago P186 de *E. coli*, y Cox del fago HP1. Para los marcos de lectura *orf2* y *glo* no se encontró similitud con ninguna proteína. El producto del gen *glo* está involucrado en el fenotipo de exclusión superinfectiva. Esta proteína se localiza en forma soluble en el espacio periplásmico. La expresión de Glo en células transformadas redujo la formación de las placas fágicas y al no estar asociada a mecanismos de interrupción de la lisis esta actuaría a través de un mecanismo de exclusión superinfectiva. La comparación de la región principal de control del fago K139 mostró similitud con la de los fagos TP-134 de *Salmonella thermophilus*, HP1 de *Haemophilus influenzae* y P-186 de *E. coli* presentando equivalencia en los genes *cl*, *int* y otros marcos de lectura abierto que codifican para funciones desconocidas y las cuales podrían estar relacionadas a la exclusión superinfectiva (Nesper *et al.*, 1999).

Tabla 2. Fagos y productos de sus genes que confieren el fenotipo de exclusión a la superinfección.

Bacteriófago	Gen	Localización de la proteína
T4	<i>imm</i>	Membrana citoplásmica
P22	<i>sieA</i> (codificado en la región <i>immI</i>)	Membrana interna (citoplásmica)
Tuc2009	<i>sie₂₀₀₉</i>	Proteína con dominios transmembranales (<i>span</i>)
K139	<i>glo</i>	Soluble en el citoplasma
N15, Ø80	<i>cor</i>	Transmembranal
P1	<i>sim</i> (codificado en la región <i>immI</i>)	Localizada en el periplasma de la célula lisógena

Se ha observado que la lisogenización por los fagos Ø80 y N15 produce el mismo fenotipo de exclusión superinfectiva impidiendo el desarrollo a los fagos superinfectivos Ø80, N15 y T1. En la lisógena para Ø80 el fenotipo es producido por el producto del gen *cor*, el cual fue secuenciado por Matsumoto *et al.*, (1985, citado en Vostrov, 1996). Se ha reportado también que el fago N15 posee un gen *cor*. Análisis por computadora revelaron que la proteína Cor puede integrarse a la membrana de *E. coli* e interactuar con elementos relacionados al transporte en la membrana y evitar así las infecciones por los fagos Ø80 y N15. Se ha sugerido que la proteína Cor puede interactuar directamente con FhuA o indirectamente a través de TonB (Vostrov *et al.*, 1996). Para la adsorción de los fagos Ø80 y N15 así como en los fagos T1 y T5 se requiere de la proteína receptora/transportadora de membrana externa multifuncional FhuA. FhuA es un transportador de alta afinidad el cual media el transporte de solutos presentes en baja concentración en el exterior los cuales no pueden ser transportados por difusión (Bonhivers *et al.*, 1998). FhuA es un monómero con forma de barril ubicado en la membrana externa y conformado de 22 laminas β antiparalelas. El diámetro del barril es de 35 X 47 Å. Dentro del barril está localizado el tapón (plug) el cual separa en dos cámaras al barril. La unión de un ligando induce cambios locales y alostéricos en FhuA (Ferguson y Deisenhofer, 2002; Locher *et al.*, 1998). TonB es una proteína de membrana

interna e interactúa físicamente desde el espacio periplasmático con algunos receptores de membrana externa como FhuA. Esta interacción se logra gracias al dominio llamado caja TonB que se encuentra en FhuA (Tuckman y Osburne, 1992). TonB sirve como un factor de acoplamiento (dependiente de ATP) entre la membrana citoplásmica y la membrana externa necesario para el transporte activo aportando la energía necesaria para el proceso (Gunter, y Braun., 1990; Postle, 1990; Killmann *et al.*,2002). El sistema de transporte externo conformado por FhuA y TonB también es utilizado para la introducción del antibiótico micromicina 25, la colicina M y del hierro férrico (Killmann *et al.*, 1995). Mutaciones en FhuA le confiere resistencia a la bacteria contra las infecciones de los fagos T5, T1, Ø80 y UC-1 (Salomón y Farías, 1993). De la misma manera mutaciones en TonB hacen ineficaz el transporte de hierro en la bacteria y al igual que FhuA⁻ la vuelve inmune a la infección de los fagos Ø80 y T1, pero no al fago T5.

ANTECEDENTES

En 1999, Kameyama y colaboradores aislaron fagos a partir de heces humanas frescas. Mediante el criterio de exclusión en cepas mutantes Nus clasificaron como probables lambdoides a aproximadamente el 50% de los fagos analizados. Después de construir las lisógenas para estos fagos se analizó la inmunidad a la infección fágica para 95 de éstas lisógenas clasificándose en 20 grupos de inmunidades diferentes. Entre los nuevos bacteriófagos nombrados como fagos mEp (mexican *Escherichia coli* phage) se observó que el profago mEp167 (lambdoide) le confería a su lisógena la capacidad de resistencia a distintos fagos mEp con diferente inmunidad. El ADN del fago mEp167 fue restringido para construir una librería de ADN usando el plásmido pUC18. El plásmido recombinante pT41 con un inserto de aproximadamente 2700 pb no permitió la infección a 17 de los 20 fagos de diferentes grupos de inmunidad probados confiriéndole a la bacteria el fenotipo de superexclusión y comprobando que el gen “*cor-like*” esta involucrado en dicha

propiedad (Uc-Mass, Kameyama y cols., resultados en proceso). En el presente trabajo se propone la búsqueda de secuencias de genes "*cor-like*" que pudieran codificar para funciones de exclusión superinfectiva en los fagos lambdoides nativos mEp.

OBJETIVO GENERAL

- Análisis y búsqueda de regiones parecidas al gen *cor* con posibles funciones similares en fagos lambdaoides aislados del medio natural.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseño de oligonucleótidos para amplificación de secuencias "*cor-like*" y estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Reacción de PCR en los ADN's de los diferentes fagos.
- Prueba de fenotipo de multiresistencia a bacteriófagos para aquellos que dieron positivos en la PCR.
- Secuenciación de fragmentos obtenidos por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y Fagos usados

Las cepas de *E. coli* utilizadas durante los ensayos fueron W3110 (derivada de la cepa K-12) y C600 (*fhuA*⁻) obtenidas del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Los bacteriófagos mEp y sus lisógenas se obtuvieron de la colección aislada por Kameyama *et al.*,(1999) del mismo Departamento del CINVESTAV-IPN.

Medios de Cultivo

El medio LB sólido (1,000 ml) se preparó de la siguiente manera: en un matraz de 1,000 ml se colocaron 10 g de Bacto-triptona, 5g de Bacto-levadura, 5 g de NaCl y 15 g de Bacto-agar. Se añadió 500 ml de agua destilada y se puso en agitación constante hasta disolver los ingredientes, posteriormente se aforó a 1,000 ml con H₂O y nuevamente se puso en agitación constante por 5 minutos. Después se esterilizó el medio a 121°C durante quince minutos. Una vez esterilizado el medio y a temperatura manipulable se le agregó 10 ml de MgSO₄ (1M) y se vació en cajas petri. Terminado el proceso se dejó solidificar el medio a temperatura ambiente y se guardaron las cajas en refrigeración (5° C) para su posterior uso.

El medio LB líquido se preparó de manera similar al medio LB sólido con excepción de la adición del Bacto-agar. Posterior al proceso de la disolución de los ingredientes se vació 100 ml del contenido en botellas de 250 ml y se esterilizaron durante 15 minutos. Una vez esterilizadas se le agregó 1ml de MgSO₄ (1M) a cada una y se almacenó a temperatura ambiente para su posterior uso.

El medio TB (1,000 ml) sólido se preparó de igual manera que el medio LB sólido con la excepción de que no se le adicionó el extracto de levadura. Las cajas petri preparadas de

manera similar se almacenaron después de solidificado el medio en refrigeración (5° C) para su posterior uso.

El medio TØ suave (500 ml) se preparó de la siguiente manera: en un matraz de 500 ml se colocó 5 g de Bacto-triptona, 2.5 g de NaCl y 3.51 g de Bacto-agar se llevó a 250 ml con agua destilada y se puso en agitación constante hasta la disolución de los ingredientes. Posteriormente se aforó a 500 ml y se puso en agitación constante durante 5 minutos. Se vació 100 ml del contenido del matraz en botellas y se esterilizó durante 15 minutos posteriormente se le agregó 1.0 ml de MgSO₄ (1M) y se almacenaron estas a temperatura ambiente para su posterior uso.

El medio TB líquido se realizó de manera similar al medio LB líquido. Este medio no contiene extracto de levadura.

Sembrado y cultivo de bacterias

Se tomó con una asa de siembra una muestra del "stab" de la bacteria correspondiente, para después estriarla en una caja petri con medio sólido LB. Se puso en crecimiento durante toda la noche a 37°C una vez observadas las colonias se almacenó en refrigeración (5°C). Para un cultivo en medio líquido se tomó una colonia de las cajas petri frescas y se colocó en medio líquido LB (25 ml) posteriormente se puso en agitación constante a 37°C durante toda la noche.

Expansión y reservas de bacteriófagos

Para la expansión de bacteriófagos se utilizó el procedimiento descrito por Sambrook y colaboradores (1989). En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se colocó 0.1 ml de un cultivo a saturación de la cepa *Escherichia coli* W3110 se le agregó 20 µl de CaCl₂ (1M) y una placa del fago a expandir aislada de una caja fresca, se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 25 ml de medio líquido LB. Se incubó a

37 °C en agitación constante hasta que la lisis de las bacterias ocurrió. Se agregaron 500 µl de cloroformo y se dejó 15 minutos más en incubación, agitándose. Posteriormente se centrifugó el cultivo lisado a 9,000 r.p.m., y se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio (concentrado o "stock").

Prueba por medio de la formación de placas fágicas en cajas petri

Se gotearon diluciones del concentrado (stock) del fago deseado sobre un tapiz de *E. coli*. El tapiz celular se realizó colocando 300 µl de un cultivo de una cepa bacteriana crecida hasta saturación en un tubo de ensaye. Se le agregaron 3 ml de medio TB suave fundido al tubo y a 45 °C aproximadamente, se mezcló con un vortex el medio TB con las bacterias y se procedió a vaciarlo a una caja petri. Una vez que el medio estuvo sólido se gotearon las diluciones de los fagos (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , en medio TMG buffer).

Titulación de lisados

Se sembró una asada de la cepa *E. coli* W3110 en medio LB líquido y se dejó crecer de 12 a 16 horas en agitación constante a 37 °C. Posteriormente se hicieron diluciones de 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-8} de cada "stock" de fago en medio TMG buffer. Se realizó un tapiz bacteriano con *E. coli* W3110 utilizando medio TB suave fundido y a 45°C aproximadamente, una vez solidificado el tapiz se gotearon 10 µl de las diferentes diluciones de los fagos. Las unidades formadoras de placa (u.f.p.) se contaron de la siguiente manera:

$$\text{u.f.p./ml} = (\text{No. de placas}) (100/\text{Dilución})$$

Diseño de iniciadores ("primers")

Se realizó una búsqueda en el banco de datos MEDLINE (www.ncbi.gov) de secuencias nucleotídicas semejantes al gen tipo *cor* ("cor-like") de la clona pT41 (Uc-Mass y Kameyama, 2000, en proceso), utilizando el programa BLAST. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa "Vector NTI AlignX" para su alineación y comparación, con lo cual se obtuvo la secuencia consenso. Los "primers" fueron diseñados con base a la secuencia consenso procurando que tuvieran el menor número de errores ("mismatches") en la alineación, así como la menor posibilidad de apareamiento entre ellos (Roux, 1995; Cha y Thilly, 1995) apoyados en el programa "Oligo". La síntesis de los oligonucleótidos se realizó en el Laboratorio de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN. Las secuencias de los "primers" diseñados son: **5'-CGG GAT CCG GAT ACT TTC AAA ATG AAA AGG CTA ATT AT-3'**, y **5'-CGG GAT CCA CCC AGC GCC AGT TGA AGG GAT A-3'**.

Extracción de ADN

El ADN usado para la amplificación de las posibles secuencias "cor-like" se obtuvo centrifugando 1ml de lisado a 8,000 r.p.m. durante 5 minutos para después calentar 0.5 ml del lisado más 0.5 ml de bufer TMG (pH7.0) en agua hirviendo durante 10 minutos para desnaturalizar la cápside viral.

Estandarización de la PCR

Se analizaron diferentes concentraciones de Mg^{2+} , así como de los oligonucleótidos, para encontrar las condiciones óptimas de la amplificación (Roux, 1995; Cha y Thilly, 1995), realizándose diferentes ensayos. Otro factor evaluado fueron las condiciones de temperatura relacionadas a los ciclos del termociclador. Los ensayos fueron desarrollados en un termociclador Perkin-Elmer; los reactivos utilizados fueron obtenidos de la compañía Bio-Labs. Las condiciones óptimas finales de concentración fueron para el Mg^{2+} 1.5 mM, oligonucleótidos 0.1 μ M. Los ciclos del termociclador utilizados fueron 45, con las siguientes temperaturas: 30s 94°C, 30s 65°C, 30s 70°C.

Reacción de PCR

Los volúmenes y reactivos utilizados se muestran en la siguiente tabla (3) los cuales fueron incorporados en el orden que aparecen, y utilizados con las condiciones descritas antes.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (25μl)	Concentración final
H ₂ O	18.33	
Buffer 10X PCRII	2.5	1X
MgCl ₂	1.5	1.5mM
dNTP,s	0.4	0.2mM
Oligo	1.25	0.1 μ M
ADN molde	1	
Taq ADN Polimerasa	0.25	2.5U/100 μ l

La amplificación se visualizó en geles de agarosa 1.2% corridos a 120 volts durante 40 minutos y teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta.

Reacción de secuenciación

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación se limpiaron los productos de PCR utilizando la técnica descrita por Sambrook *et. al.* (1989). A los 20 μ l de producto de PCR se les llevó a 100 μ l con H₂O destilada para posteriormente ponerle 10 μ l de Acetato de Sodio 3M y 3 volúmenes de etanol. Se homogenizó la mezcla invirtiendo los tubos manualmente para después ponerlo en hielo seco durante 1 hr. Después de éste tiempo se centrifugó el tubo a 14, 000 r.p.m. durante 1 hr, se decantó el sobrenadante y se dejó secar el tubo en papel absorbente. Finalmente se resuspendió la pastilla en 20 μ l de H₂O. Se tomaron de 2 a 3 μ l del producto de PCR limpio dependiendo de la concentración (para los fagos mEp234 y mEp147: 2 μ l; y para los fagos mEp123 y mEp502: 3 μ l) observada durante el corrimiento de las muestras en gel de agarosa al 1.3%. Se agregaron 2 μ l del primer M676 y 8 μ l de la mezcla para secuenciación del kit Big Dye Terminator (Applied Biosystem) los cuales se llevaron a un volumen final de 20 μ l con H₂O. La reacción se llevo a cabo con las siguientes temperaturas y tiempos en el termociclador Perkin Elmer: 20s 96°C, 20s 53°C, 4min 60°C; durante 30 ciclos. El producto obtenido fue limpiado en columnas para eliminar los restos de nucleótidos que no fueron incorporados. Una vez pasados por las columnas los tubos fueron puestos en el Speed-Vac para su liofilización y llevados al Laboratorio de Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN para la secuenciación.

RESULTADOS

Búsqueda de secuencias homólogas a la secuencia cor y diseño de oligonucleótidos para la amplificación de secuencias "cor-like".

La búsqueda de similitud a nivel nucleotídico entre el gen "cor-like" del fago mEp167 y otras secuencias se realizó utilizando el programa BLAST (www.ncbi.gov), el cual comparó una secuencia de 260 bases obtenida de la clona pT41 (Uc-Mass, Kameyama *et al.*, resultados en proceso) con secuencias de organismos previamente reportadas y almacenadas en el GenBank. El porcentaje de similitud mayor al 80% se dió entre secuencias que se encuentran en los bacteriófagos Ø80 y HK022 (dato sin mostrar). El hecho de que en la búsqueda de secuencias nucleotídicas con similitud a una región de pT41 se obtuvieran secuencias reportadas en otros bacteriófagos como genes *cor*, corrobora que el gen presente en el fago lambda mEp167 confiere el fenotipo de exclusión superinfectiva a su lisógena y es un gen tipo *cor* ("cor-like"). Además de las secuencias del gen *cor* de los fagos HK022 y Ø80 en este análisis se incluyó la secuencia *cor* del fago N15, obtenida del reporte de Vostrov *et al.*, (1996). La alineación para la obtención de la secuencia consenso de las diferentes secuencias utilizadas se realizó utilizando el programa Vector NTI, Suite 5.5, Align X (Figura 1).

HK022	(18721)	CTCTGGATACTATCAAAAATGAAAGGCTAATTATCTGCATAGCGGGCGCT
N15	(180)	ACAGGGAATTTTCAAAAATGGGAAAACCATTATTGCCATTGGATTTTCG
Ø80	(309)	CTCTGGATACTATCAAAAATGAGAAAAGCTGATTATCTGCACGGCAGGCGCT
pT41	(1)	CTCTGGATACTTTCAAAAATGAAAGGCTAATTATCAGCATGGCGATCGCT
Consensus	(18725)	CTCTGGATACTTTCAAAAATGAGAAGGCTAATTATCTGCATGGCGGTTCGCT

HK022	(18771)	TTAATGCTGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACA - GAAACCGAATTT
N15	(230)	TTATTACTTTCTGGATGCTCAGGTATGCTCGAAAAGCAAGTCTCCAGTGT
Ø80	(359)	GTCAATGCTCACAGGATGCGCTGGCGTAATTGAGAAACA - GGAACCGAATTT
pT41	(51)	TTAATGCTGTCTGGTTGTGCTGGTGTACTTGAGAAACA - GGAACCGAATTT
Consensus	(18775)	TTAATGCTGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACA GGAACCGAATTT

Figura 1. Alineación de las secuencias nucleotídicas de los fagos N15, HK022, Ø80 y pT41. Las flechas indican el comienzo y la terminación de las regiones más conservadas de acuerdo a nuestro criterio.

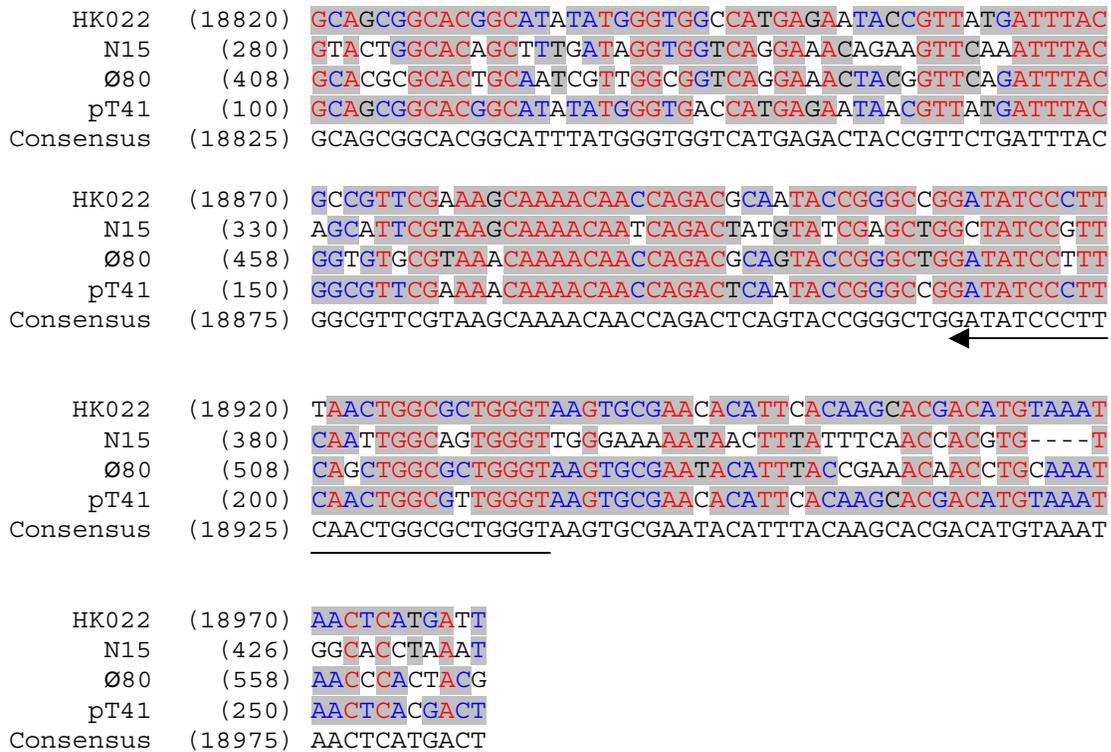


Figura 1. (Continuación). Alineación de las secuencias nucleóticas de los fagos N15, HK022, Ø80 y pT41.

Con base en la secuencia consenso obtenida, y de acuerdo a la región nucleotídica más conservada (ver las flechas en Fig.1), se diseñaron los oligonucleótidos a utilizar para la amplificación de las posibles secuencias *cor* por medio de la PCR utilizando el programa OLIGO. Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados son: **M676 5' CGG GAT CCG GAT ACT TTC AAA ATG AAA AGG CTA ATT AT 3'**, y **M677 5' CGG GAT CCA CCC AGC GCC AGT TGA AGG GAT A 3'**.

Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores ("primers") M676 y M677

Para la estandarización de las condiciones de amplificación se variaron las concentraciones de Mg^{2+} y de los oligonucleótidos. También se probaron diferentes temperaturas de alineación y tiempos en la polimerización para los ciclos. Las condiciones finales óptimas para la amplificación de nuestras cadenas nucleotídicas en particular y para una reacción con un volumen final de $25\mu l$ fueron: $[Mg^{2+}]$ 1.5 mM; [oligonucleótidos] $0.1\mu M$; con tiempo y temperatura para los ciclos de: 30s $94^{\circ}C$, 30s $65^{\circ}C$, 30s $70^{\circ}C$. Con éstas condiciones se evitaron bandas inespecíficas. Los controles utilizados durante los ensayos fueron el ADN del fago lambdaide mEp167 (control positivo), ADN del fago no-lambdaide mEp093 (control negativo) y los oligonucleótidos pero sin ADN (control negativo) (Figura 2).

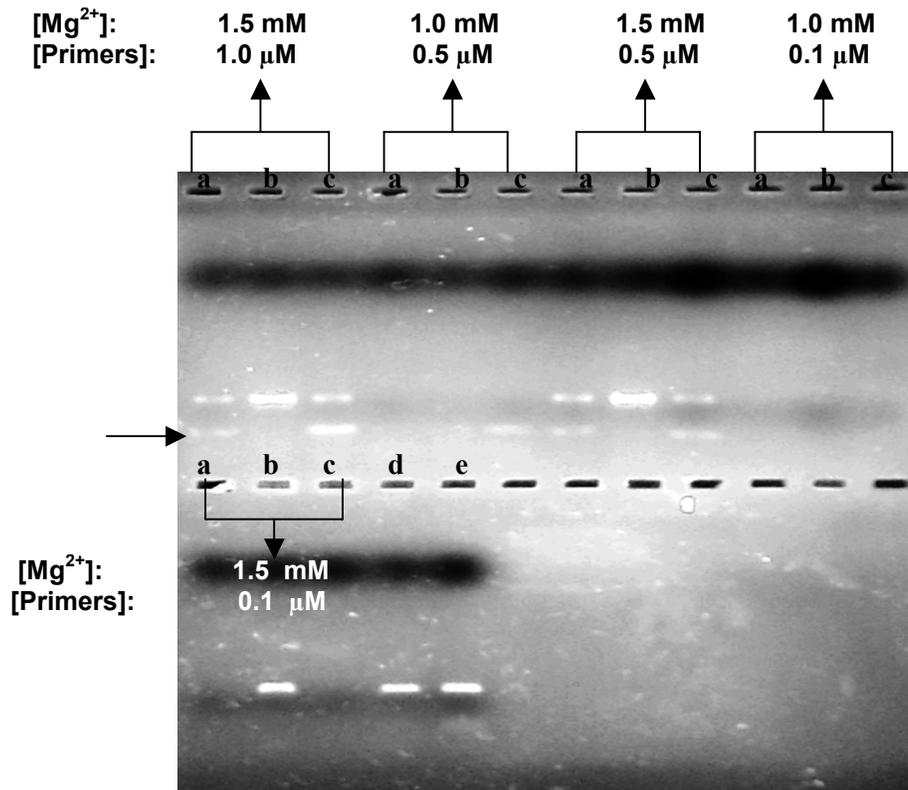


Figura 2. Gel 1.2% agarosa. Matriz de estandarización. Carriles **a**: primers sin ADN, **b**: ADN de mEp 167, **c**: AND de mEp 093, **d**: AND de HK022, **e**: AND $\emptyset 80$. Las flechas indican las bandas obtenidas; en el carril superior, la flecha inferior indica las bandas inespecíficas.

Amplificación de la secuencia *cor* en bacteriófagos lambdoides y "mayoritarios"

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la PCR se procedió a amplificar la secuencia "*cor-like*" en el caso de que las tuviesen en los bacteriófagos lambdoides. El número de fagos utilizados para este ensayo fueron 65 (Tabla 4), los cuales pertenecen a diferentes grupos de inmunidad, 27 de ellos al grupo de inmunidad I o "mayoritarios", los 37 restantes pertenecientes a los fagos denominados lambdoides y el tipo silvestre, que es el fago λ .

Tabla 4. Bacteriófagos utilizados en este estudio. El resultado de la amplificación del gen "*cor-like*" se indica como sigue: + : amplificación positiva, - : sin amplificación. El primer fago de la lista corresponde al tipo silvestre de lambda. ND: No determinado.

Bacteriófago mEp	Grupo de inmunidad	Tipo de fago	Ensayo de PCR	Bacteriófago mEp	Grupo de inmunidad	Tipo de fago	Ensayo de PCR
W-1	XVIII	Wild type	-	137	I	Mayoritario	-
003	I	Lambdaide	+	138	XX	Lambdaide	-
004	I	Mayoritario	-	144	XX	Lambdaide	-
005	I	Mayoritario	-	161	XXI	Lambdaide	-
009	I	Mayoritario	-	167	VI	Lambdaide	+
010	I	Mayoritario	-	173	VII	Lambdaide	+
011	I	Mayoritario	-	174	VIII	Lambdaide	+
013	I	Mayoritario	-	213	IX	Lambdaide	+
020	I	Mayoritario	-	226		Lambdaide	+
021	I	Mayoritario	-	234	XVIII	Lambdaide	+
023	III	Lambdaide	+	235	XVII	Lambdaide	+
024	I	Mayoritario	-	237	X	Lambdaide	+
030	I	Mayoritario	-	263	V	Lambdaide	+
033	I	Mayoritario	-	266	XIX	Lambdaide	+
034	I	Mayoritario	-	332	XVIII	Lambdaide	+
035	I	Mayoritario	-	390	XI	Lambdaide	+
038	I	Mayoritario	-	409	VII	Lambdaide	+
042	I	Mayoritario	-	410	XII	Lambdaide	+
043	IV	Lambdaide	-	414	VII	Lambdaide	-
044	I	Mayoritario	-	416	XIII	Lambdaide	+
049	I	Mayoritario	-	420	V	Lambdaide	-
050	I	Mayoritario	-	457	XIII	Lambdaide	+
054	I	Mayoritario	-	460	V	Lambdaide	-
064	V	Lambdaide	+	498	XIII	Lambdaide	-
079	I	Mayoritario	-	500	XIV	Lambdaide	+
080	I	Mayoritario	-	502	III	Lambdaide	+
087	I	Mayoritario	-	505	XVIII	Lambdaide	-
093	I	Mayoritario	-	524	VII	Lambdaide	+
109	I	Mayoritario	-	533	XVIII	Lambdaide	-
120	XVIII	Lambdoid	+	534	III	Lambdaide	-
123	XVIII	Lambdaide	+	539	VIII	Lambdaide	+
131	I	Mayoritario	-	543	III	Lambdaide	-
HK022	XIX	Lambdaide	+	550	I	Mayoritario	-
Φ80	XX	Lambdaide	+				

Los resultados de la PCR se muestran en las fotografías de los geles de las figuras 3, 4 y 5. De los fagos del grupo de inmunidad I probados, en ninguno hubo una amplificación positiva, se presentaron bandas inespecíficas en algunos casos, posiblemente por ligeras variaciones en las condiciones, por lo que éstas se descartaron como amplificaciones positivas. También se presentó una contaminación con un fago lambdaoide en el “stock” del fago mEp054 del grupo I, por lo que la banda que presentó se descartó. Entre los fagos lambdaoides mEp, no en todos se dio una amplificación, los que la presentaron fueron los bacteriófagos mEp003, 023, 064, 120, 123, 167, 173, 174, 213, 226, 234, 235, 237, 263, 266, 332, 390, 409, 410, 416, 457, 500, 502, 524, 539 y 543 (ver Tabla 1 y Figuras 3, 4 y 5).

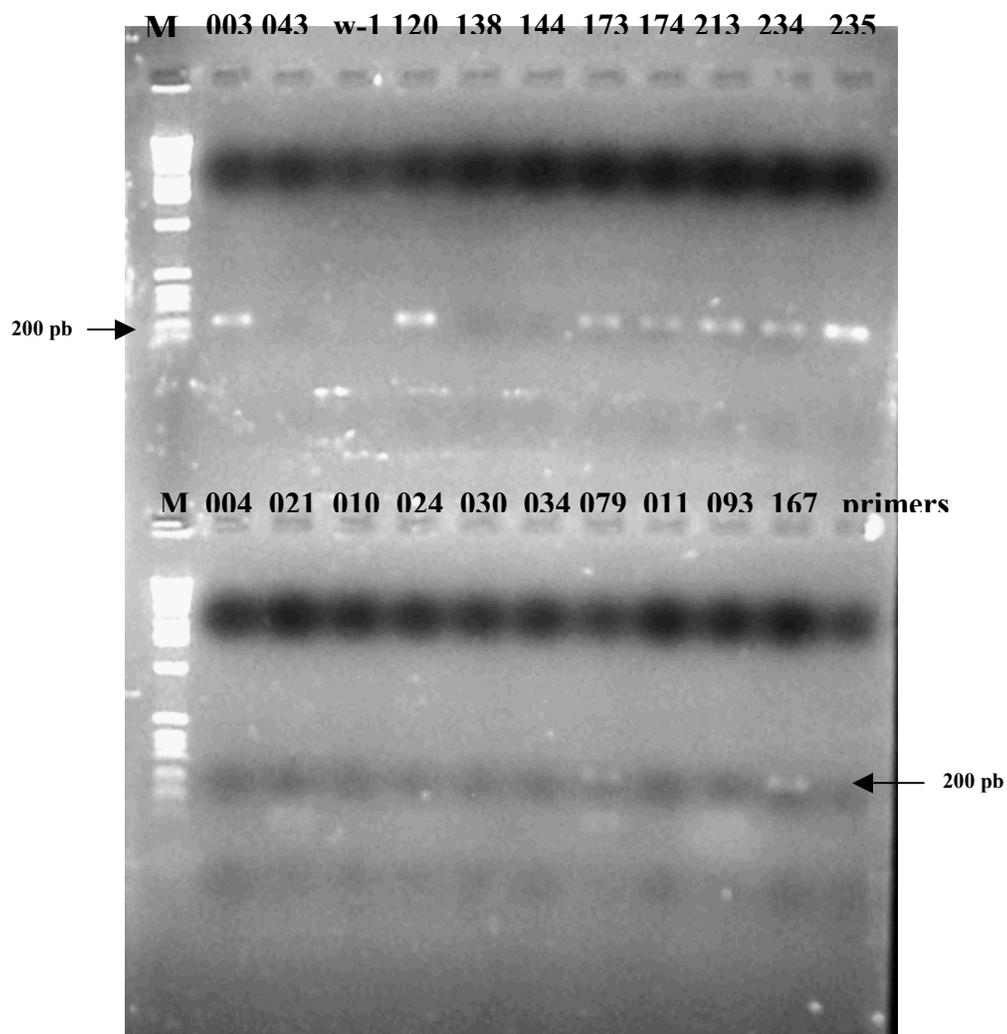


Figura 3. Gel 1.2% agarosa. Marcador Molecular: 1 kbase. Amplificación de la secuencia del gen "cor-like" en bacteriófagos lambdoides. Las flechas indican las bandas *cor* y su peso aproximado (200 pb). Los diferentes números en la parte superior de los carriles indican el ADN del fago correspondiente sometido a la amplificación por PCR (similar para las figuras 4 y 5).

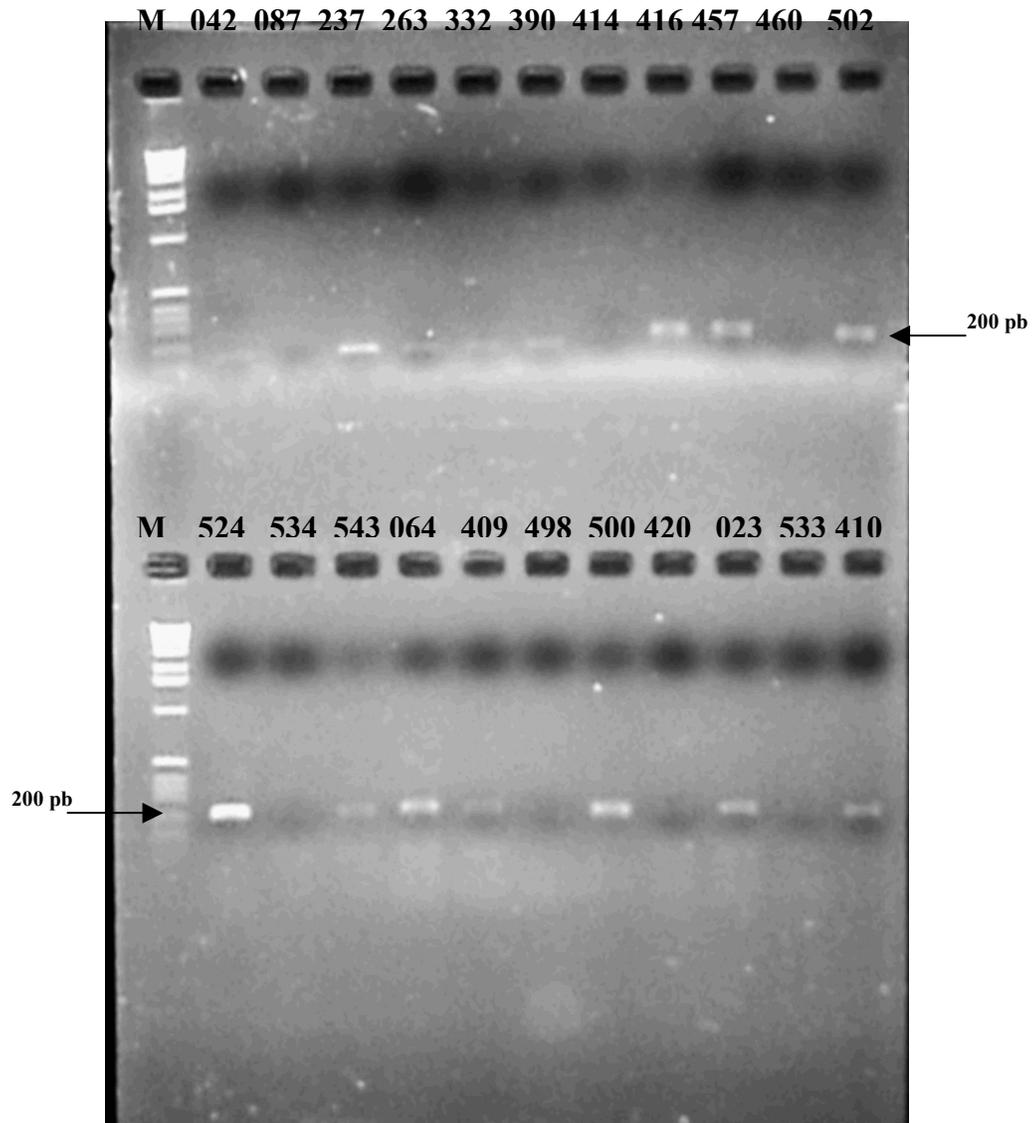


Figura 4. Gel 1.2% agarosa. Marcador Molecular: 1 kbase. Amplificación de la secuencia del gen "cor-like" en bacteriófagos lambdoides. Las flechas indican las bandas *cor* y su peso aproximado (200 pb).

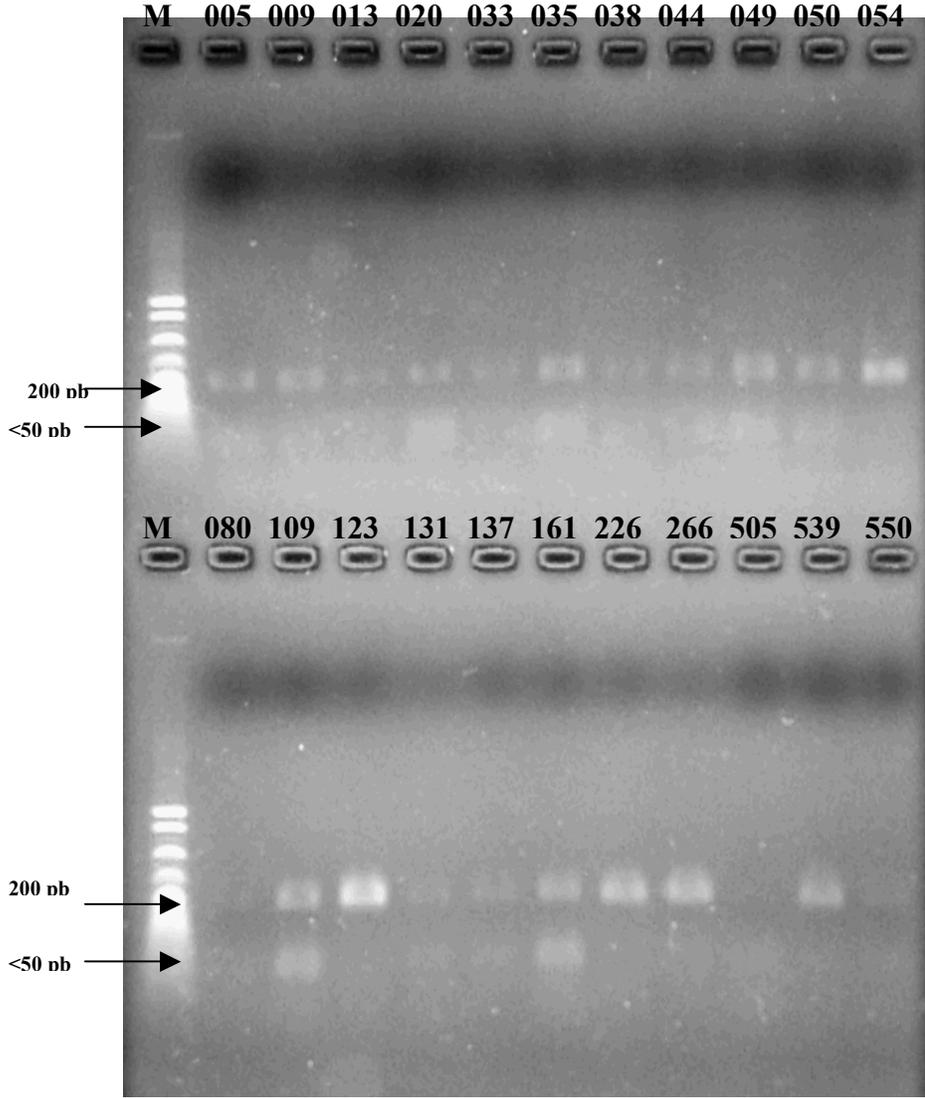


Figura 5. Gel 1.2% agarosa. Marcador Molecular: 624-147pb. Las flechas indican las bandas y su peso (200 pb y <50 pb). Las bandas < 50 pb son bandas que se descartaron (ver texto).

En la figura 3 se puede apreciar que no en todos los fagos lambdoides hubo una amplificación positiva, tampoco se dio en el tipo silvestre de λ (W-1) ya que en su secuencia reportada carece del gen *cor*. Los bacteriófagos en los que se obtuvo una amplificación presentaron una banda de aproximadamente 200 bases (flechas en Figura 3), lo cual concuerda con el tamaño esperado, ya que el fragmento de ADN proveniente de mEp167 utilizado durante la búsqueda de secuencias similares y del cual se diseñaron los oligonucleótidos (véase el primer apartado de Resultados) fue de 260 bases (Figura 1). De los fagos del grupo I, en ninguno hubo presencia de bandas que indicaran amplificación alguna. Junto con el fago mEp167, control positivo, se utilizó el fago mEp093 y los oligonucleótidos sin templete de ADN como control negativo.

En la figura 4 solamente se utilizaron dos fagos del grupo de inmunidad I, los cuales no dieron ninguna amplificación; el resto de carriles fueron ocupados por fagos lambdoides de los cuales no todos dieron una amplificación positiva; los fagos lambdoides mEp263 332 y 390 presentan bandas tenues las cuales se tomaron como amplificaciones positivas.

La figura 5 está constituida principalmente por los carriles que contienen en su mayoría las amplificaciones de los ADN's de los fagos del grupo de inmunidad I. En este gel se observa que la mayoría de carriles tuvo amplificaciones, sin embargo, estas amplificaciones son bandas inespecíficas ya que presentaron la doble banda; la primera de una longitud aproximada de 200 bases y la segunda de aproximadamente 50 bases (flechas en la Fig. 5), ya que tomando como referencia los ensayos que se realizaron con anterioridad para la estandarización de la PCR todos los carriles que presentaron una doble banda fueron inespecíficas, por lo que se descartaron como amplificaciones positivas. Las dobles bandas se deben a que los "primers" hibridan entre ellos y no con el templete como se observa en los resultados obtenidos de la estandarización de la reacción (Fig. 2). El fago mEp054, el cual pertenece al grupo I, presentó una sola banda

bien definida, posterior a este ensayo se volvió a certificar cada uno de los “stocks” utilizados encontrándose que el stock del mEp054 efectivamente se encontraba contaminado, por lo que la banda que presentó debió de ser del ADN proveniente de algún fago lambdaide por lo que se descartó como amplificación positiva. De los fagos lambdaide probados y que dieron amplificaciones en este gel el ADN proveniente del fago mEp161 fue descartado como amplificación positiva por presentar la doble banda.

Estos resultados no excluyen la posibilidad de que entre los bacteriófagos del grupo I no-lambdaides (mayoritarios) así como en los lambdaides que dieron negativo se encuentre una secuencia *cor* muy modificada por lo cual la hibridación entre los oligonucleótidos diseñados no se haya efectuado.

Ensayos de exclusión a la infección fágica

Las lisógenas de los fagos que dieron una amplificación positiva en la PCR fueron probadas contra 40 fagos mEp de diferentes grupos de inmunidad. Los fagos que no desarrollaron placas de crecimiento en la cepa bacteriana C600 (FhuA⁻) de *E. coli* fueron los elegidos para este ensayo (Tabla 5). Los resultados de los ensayos de inmunidad muestran que las lisógenas de algunos fagos que resultaron positivos en la PCR excluyen a fagos de diferentes tipos de inmunidad mientras que otros excluyen a un menor número. La formación de placas en las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} podría indicar que sitios receptores de las lisógenas no estuvieran bloqueados por Cor por lo que quedaron expuestos a la gran cantidad de fagos libres, mientras que en las diluciones menores no se formaron placas con los fagos libres (por estar en menor cantidad) ya que Cor bloqueó a los receptores. La variación en la formación de las placas en las diferentes diluciones podrían indicar que el fenotipo de exclusión superinfectiva en los fagos lambdoides nativos tiene que ver con la eficiencia de los diferentes “cor-like” para cada uno de los fagos o con los niveles de concentración de la proteína Cor, como lo sugieren los estudios realizados con la lisógena mEp167 y la clona pT41 (Uc-Mass y Kameyama, en proceso). En algunas lisógenas el nivel de concentración de Cor pudiera ser mayor lo cual no permitiría la formación de placas en ninguna dilución. Otra posibilidad es que el gen “cor-like” presente en los fagos lambda nativos que dieron amplificación positiva, lo tuviesen modificado, ya sea que el marco de lectura se encuentre alterado, lo que ocasionaría que la lectura de *cor* al ser traducida no fuese de manera correcta. Así, la proteína estaría mutada, con lo que perdería su funcionalidad.

Tabla 5. Resultados del ensayo realizado para comprobar el fenotipo de exclusión superinfectiva. Las diluciones (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) probadas se representan de izquierda a derecha. +: formación de halo lisis. -: no crecimiento. Los números representan las placas observadas en cada dilución respectiva.

Fagos ^{Bacterias}	W3110	C600 (FhuA)	W(mEp 003)	W(mEp 023)	W(mEp 054)	W(mEp 064)	W(mEp 120)	W(mEp 123)	W(mEp 167)
mEp003	+++ 8	----	----	----	+---	++ 36 -	++ 18 -	++--	+---
mEp023	+++ 27	----	+++ 24	----	++++	+++ 47	+++ 34	+++ 34	+++ 20
mEp043	+++ 22	----	+++ 22	+++ 17	+++ 16	+++ 36	+++ 23	+++ 8	+++ 20
mEp064	+++ 10	----	+++ 25	+++ 27	++++	----	+++ 41	+++ 21	+++ 30
mEp092	+++ 20	----	+ 2 --	----	++ 10 -	+++ 15	+++ 5	++--	+++ 9
mEp120	+++ 20	----	+++ 21	+++ 14	++++	+++ 30	----	----	+++ 9
mEp123	+++ 2	----	+++ 9	++ 30 -	+++ 9	+++ 6	----	----	+ 5 --
mEp138	+++ 17	----	+++ 21	+++ 10	+++ 18	+++ 35	+++ 16	+++ 21	+++ 12
mEp141	+++ 17	----	---	+++ 23	+++ 9	+++ 12	+++ 6	+++ 9	+++ 12
mEp144	+++ 20	----	+++ 21	+++ 1	++++	+++ 19	+++ 19	+++ 21	+++ 10
mEp145	+++ 15	----	+++ 20	----	++++	+++ 26	+++ 33	+++ 31	+++ 35
mEp147	+++ 27	----	----	+++ 24	++++	+++ 32	+++ 6	+++ 8	+++ 6
mEp155	+++ 35	----	+++ 30	+++ 43	++++	+++ 30	----	----	+++ 10
mEp167	+++ 5	----	+++ 2	+++ 4	++++	+++ 2	----	17---	----
mEp173	+++ 3	----	+++ 4	+++ 4	+++ 19	+++ 9	+++ 8	+++ 3	+++ 9
mEp174	+++ 40	----	+++ 23	+++ 14	++++	+++ 42	+++ 24	+++ 38	+++ 21
mEp213	+++ 2	----	+++ -	+++ 5	+++ 3	++ 30 -	+++ 27	+++ 2	++ 2 -
mEp234	+++ 16	----	+++ 7	+++ 1	+++ 9	+++ 15	----	----	+++ 11
mEp235	+++ 21	----	+++ 16	+++ 33	+++ 12	+++ 40	+++ 15	+++ 21	+++ 4
mEp237	++ 10 -	----	+++ 1	----	+++ 12	+++ 12	+++ -	+++ 3	++ 10 -
mEp263	++ 42 -	----	+++ 3	----	+++ 8	++ 3 -	----	+++ 1	+ 3 --
mEp390	++ --	----	+++ 2	+++ 2	++++	++ 8 -	+++ 1	+++ 14	++ 3 -
mEp410	+---	----	++ --	+++ 1	++++	++ 30 -	++ 35 -	+++ 2	----
mEp416	+++ 30	----	+++ 20	+++ 27	+++ 13	+++ 32	+++ 5	+++ 5	+++ 5
mEp420	+++ 12	----	+++ 9	+ 3 --	++++	+ ---	----	+++ 2	+ 3 --
mEp450	+++ 20	----	----	+++ 10	++++	+++ 18	+++ 14	+++ 16	+++ 7
mEp457	+++ 8	----	+++ 15	+++ -	++++	+++ 7	++ 1 -	+++ 8	+++ 2
mEp460	----	----	----	----	++ 3 -	++ 23 -	----	----	5---
mEp468	+++ 13	----	----	+++ 6	++++	+++ 24	+++ 22	+++ 17	+++ 15
mEp498	+++ 1	----	+++ 1	----	+++ 7	+++ 9	+++ -	++ 42 -	+---
mEp500	+++ 5	----	+++ 3	+++ 16	+++ 9	+++ 14	----	+---	+++ 13
mEp502	+++ 12	----	+++ 4	+++ 9	+++ 12	+++ 10	+++ 6	+++ 7	+++ 6
mEp504	+---	----	+++ 2	----	+++ 4	+++ 10	+++ 1	+++ 25	----
mEp506	+++ 21	----	+++ 21	+++ 16	+++ 18	+++ 40	+++ 7	+++ 16	+++ 1
mEp524	+++ 23	----	+++ 13	+++ 2	+++ 20	+++ 19	++ 25 -	+++ 18	+++ 10
mEp533	+++ -	----	+++ 1	+++ 42	++++	++ 68 -	+++ 1	+++ 7	+---
mEp534	+++ 6	----	+++ 6	----	++++	+++ 5	+++ 4	+++ 11	+++ 2
mEp539	+ 1 --	----	++ 20 -	+ 3 --	++++	+++ 5	++ 30 -	+++ 2	----
mEp543	+++ 13	----	+++ 6	----	++++	+++ 11	+++ 10	+++ 2	++--
λ	+++ 5	----	+++ 1	+++ 12	----	+++ 10	3---	----	+++ 5

Tabla 5. (continuación). Resultados del ensayo realizado para comprobar el fenotipo de exclusión superinfectiva.

Fagos ^{Bacterias}	W(mEp 173)	W(mEp 174)	W(mEp 213)	W(mEp 234)	W(mEp 235)	W(mEp 237)	W(mEp 263)	W(mEp 332)	W(mEp 390)
mEp003	+ - - -	+ + - -	+ + 48 -	+ + 21 -	+ - - -	+ - - -	+ - - -	+ + + 1	+ + 32 -
mEp023	+ + + 6	+ + + 18	+ + + 54	+ + + 25	+ + + +	+ + + 13	+ + - -	+ + + 40	+ + + 25
mEp043	+ + + -	+ + + 23	+ + + 35	+ + + 16	+ + + -	+ + + 6	+ + - -	+ + + 43	+ + + 41
mEp064	+ + - -	+ + + 30	+ + + 34	+ + + 5	+ + + +	+ + + 7	- - - -	+ + + 30	+ + + 28
mEp092	+ + - -	+ + + 4	+ + + 24	+ + + 1	+ + + +	+ + - -	+ + - -	+ + + 70	+ + + 23
mEp120	+ + - -	+ + + 24	+ + + 24	- - - -	+ + + 11	+ + + 17	+ + + 1	+ + + 1	+ + + 11
mEp123	+ + 6 -	+ + + 2	+ + + 12	- - - -	+ + + +	+ 3 - -	+ + 3 -	+ + 3 -	+ + 8 -
mEp138	- - - -	+ + + 14	+ + + 54	+ + + 18	+ + + -	+ + + -	+ + + 19	+ + + 15	+ + + 18
mEp141	+ + + 4	+ + + 18	+ + + 34	+ + + 5	+ + + -	+ + + 7	+ + + 14	+ + + 13	+ + + 9
mEp144	- - - -	+ + + 28	+ + + 15	+ + + 25	+ + + -	+ + + 8	+ + + 17	+ + + 35	+ + + 22
mEp145	+ + + 28	+ + + 22	+ + + 35	+ + + 8	+ + + -	+ + + 2	+ + + 25	+ + + 45	+ + + 38
mEp147	+ + + 11	+ + + 21	+ + + 11	+ + - -	+ + + -	+ + + 9	+ + + 6	+ + + +	+ + + 5
mEp155	+ + 2 -	+ + + +	+ + + 54	- - - -	+ + + -	+ + + 40	+ + + 20	+ - - -	+ + + 25
mEp167	+ - - -	+ + + -	+ + + -	- - - -	+ + + -	+ - - -	+ + - -	+ - - -	- - - -
mEp173	- - - -	+ + + 17	+ + + 4	+ + - -	+ + + 5	+ + + 4	+ + + 6	+ + + +	+ + + 1
mEp174	+ + + 26	- - - -	+ + + 25	+ + + 38	+ + + +	+ + + 19	+ + + 50	+ + + +	+ + + 21
mEp213	+ + 52 -	+ + 13 -	- - - -	+ + + 6	+ + + +	+ + + 35	+ + + 2	+ + + 35	+ + 45 -
mEp234	+ 40 - -	+ + + 16	+ + + 9	- - - -	+ + + +	+ + + 10	+ + 15 -	+ + 1 -	+ - - -
mEp235	+ + + 16	+ + + 14	+ + + 14	+ + + 11	- - - -	+ + + 12	+ + + 14	+ + + 21	+ + + 19
mEp237	+ + + 1	+ + + 16	+ + + 54	+ + + 1	+ + - -	- - - -	+ + + 6	+ + + 40	+ + + 2
mEp263	30 - - -	+ + + 22	+ + + 4	+ - - -	+ + + -	- - - -	- - - -	+ + + -	+ + + 1
mEp390	+ + 65 -	+ 12 - -	+ + 6 -	+ - - -	+ + + +	+ + 2 -	+ - - -	+ + + +	- - - -
mEp410	+ + 6 -	+ + + 5	+ + + 5	+ + 15 -	+ + + 1	- - - -	+ + + 1	+ + + 15	+ + 8 -
mEp416	+ - - -	+ + + 21	+ + + 44	+ + + -	+ + + -	+ + + 27	+ + + 8	+ + + +	+ + 16 -
mEp420	+ - - -	+ + + -	+ + + 9	+ - - -	+ + + -	+ + 5 -	- - - -	+ + + 35	+ 3 - -
mEp450	+ + + 12	+ + + 30	+ + + 22	+ + + 18	+ + + 3	+ + + 16	+ + + 21	+ + + 18	+ + + 3
mEp457	+ 10 - -	+ + + -	+ + + -	+ - - -	+ + + +	+ + + 19	+ + + 2	+ + + 15	+ - - -
mEp460	- - - -	3 - - -	+ 8 - -	- - - -	+ + - -	- - - -	- - - -	+ + + +	- - - -
mEp468	+ + + 9	+ + + -	+ + + 22	+ + + 12	+ + + -	+ + + 24	+ + + 20	+ + + +	+ + - -
mEp498	+ + + 3	+ + + -	+ + + 1	+ + + -	+ + + +	+ + + 5	+ + 55 -	+ + + +	+ + + 4
mEp500	+ + 16 -	+ + + 24	+ + + 8	+ - - -	+ + + +	+ + + 14	+ + + 8	+ + + +	+ + 16 -
mEp502	+ + + 7	+ + + 19	+ + + 5	+ + + 4	+ + + +	+ + + 4	+ + + 8	+ + + +	+ + + 4
mEp504	+ + - -	+ + 11 -	+ + + -	+ + 40 -	+ + + +	- - - -	+ - - -	+ + + 1	+ + 8 -
mEp506	+ + - -	+ + + 32	+ + + 30	+ + + 10	+ + + +	+ + + 15	+ + + 12	+ + + 24	+ - - -
mEp524	- - - -	+ + + 26	+ + + 11	+ - - -	+ + + -	+ + + 8	+ + + 1	+ + + 15	+ + + 2
mEp533	+ + + 1	+ + + 5	+ + + 4	+ + - -	+ + + -	- - - -	+ + + 4	+ + + 17	+ + + 5
mEp534	+ + + 7	+ + + 1	+ + + 4	+ + + 6	+ + + 5	+ + + 6	+ + + 3	+ + + 4	+ + + 8
mEp539	+ - - -	+ 12 - -	+ + - -	+ + + 1	+ + + -	+ + 1 -	+ + - -	+ + + 2	+ + 11 -
mEp543	+ + + 6	+ + + 4	+ + + 2	+ + + 4	+ + + -	+ + + 11	+ + + -	+ + + 3	+ + + 14
λ	+ - - -	+ + + 5	+ + + 17	- - - -	+ - - -	+ + + 7	+ + + 3	- - - -	+ + + 2

Tabla 5. (continuación). Resultados del ensayo realizado para comprobar el fenotipo de exclusión superinfectiva.

Fagos ^{Bacterias}	W(mEp 409)	W(mEp 410)	W(mEp 416)	W(mEp 457)	W(mEp 500)	W(mEp 502)	W(mEp 524)	W(mEp 539)	W(mEp 543)
mEp003	----	+ 12 --	++ 22 -	+++ 1	11 ---	+++ 4	+++ 1	+ ---	++ 50 -
mEp023	----	++++	+++ 30	+++ 23	+++ 17	+++ 18	+++ 35	++ 7 -	----
mEp043	+ ---	++++	+++ 24	+++ 5	+++ 20	+++ 19	+++ 6	+++ 15	+++ 14
mEp064	++ --	++++	----	----	+++ 19	+++ 16	+++ 12	+++ 22	+++ 24
mEp092	+ ---	++++	+++ 5	+++ 17	++++	+++ 13	+++ 13	++ 6 -	+++ 1
mEp120	+ ---	++++	+++ 30	++ 2 -	----	+++ 18	++ --	+ ---	----
mEp123	+ ---	++++	+++ 9	+ 30 --	----	+++ 5	++ 1 -	+ ---	----
mEp138	+ ---	++++	+++ 23	+++ 16	++++	+++ 20	----	++ 6 -	+++ 6
mEp141	+ ---	+++ 17	+++ 10	+++ 6	++ --	----	+++ 8	+ 4 --	++ --
mEp144	+ ---	++++	+++ 29	+++ 6	+++ -	+++ 17	----	++ 32 -	+++ 8
mEp145	+ ---	+++ 18	+++ 33	++ 13	+++ -	+++ 19	+++ 20	++ 11 -	----
mEp147	+ ---	++++	+++ 19	+++ 7	+++ -	+++ 30	+++ 12	+ ---	++ --
mEp155	+ ---	++++	+++ 41	+++ 9	+ ---	+++ 39	+++ 12	+ 10 --	++ --
mEp167	+ ---	++++	+++ 5	+++ -	+ ---	+++ 10	+++ 4	++ 7	+ ---
mEp173	----	++++	+++ 16	+++ 7	+ ---	+++ 7	----	----	+ ---
mEp174	+ ---	++++	+++ 32	+++ 29	++++	+++ 25	+++ 25	----	+++ 2
mEp213	+ ---	+++ 3	+++ 12	+++ 4	++++	+++ 11	+++ 7	+ 4 --	+ ---
mEp234	+ ---	+++ 13	+++ 12	++ 14 -	+++ -	++ 20 -	++ --	+ ---	+ ---
mEp235	+ ---	+++ 19	+++ 25	+++ 19	+++ -	+++ 15	+++ 23	+ ---	+ ---
mEp237	+ ---	++++	+++ 17	+++ 1	++ --	+++ 13	+++ -	+ ---	++ 35 -
mEp263	+ ---	++++	----	----	+ ---	++ 22 -	++ 2 -	----	----
mEp390	----	+++ 6	+++ 9	+++ 3	++ --	+++ 8	+++ 2	+++ 1	----
mEp410	----	----	+++ 3	++ 1 -	+++ -	----	++ --	+ 19 --	+ ---
mEp416	+ ---	++++	----	----	++ --	+++ 24	+++ 11	+ 5 --	+ ---
mEp420	+ ---	+++ -	----	----	+++ -	+++ 7	++ --	----	+ ---
mEp450	+ ---	++++	+++ 15	+++ 9	++ --	+++ 13	+++ 4	----	+ ---
mEp457	+ ---	+++ 11	----	----	+++ 7	+++ 13	++ --	+ 18 --	+ ---
mEp460	----	+ 9 --	----	----	+ 30 --	+ 12 --	----	3 ---	----
mEp468	+ ---	+++ 20	+++ 20	+++ 13	++++	+++ 13	+++ 8	----	+ ---
mEp498	----	++++	+++ 2	+++ -	+++ -	+++ 8	+++ 2	++ 12 -	----
mEp500	+ ---	++++	+++ 15	+++ 3	----	+++ 18	+++ 10	----	+++ 1
mEp502	+ ---	++++	+++ 8	+++ 5	+++ 18	----	+++ 11	+ ---	+++ 3
mEp504	----	++++	+++ 1	++ 25 -	++++	+++ 1	+++ 3	+++ 1	----
mEp506	+ ---	++++	+++ 15	+++ 14	++++	+++ 18	+++ 6	+ ---	++ --
mEp524	----	++++	+++ 9	++ 9 -	++ 11 -	+++ 8	----	+ 1 --	----
mEp533	----	++++	+++ 3	+++ 4	++ 2 -	+++ 2	+++ 6	+ 12 --	----
mEp534	----	+++ 10	+++ 10	+++ 5	++ --	+++ -	+++ 3	+++ 3	----
mEp539	+ ---	+++ 14	+++ 10	++ 17 -	+ 17 --	+ 12 -	+++ 4	----	++ 40 -
mEp543	----	++++	+++ 13	+++ 8	+++ 13	+++ 14	+++ 3	++ 40 -	----
λ	++ --	+++ 3	+++ 9	++ --	----	+++ 2	++ 60 -	+++ 3	++ --

Secuenciación de los fragmentos “*cor-like*” y alineación

Entre los fagos lambdoides que dieron una amplificación positiva en la reacción de PCR se tomaron tres para su secuenciación (mEp123, mEp234, mEp502). Se añadió también el fago mEp147 el cual dio positivo para la amplificación por PCR (dato no mostrado). La lectura de los ferogramas (ver Anexo) dada por la secuenciación automática fue posteriormente revisada para corregir los posibles errores producidos en ella. Con la corrección se obtuvieron las secuencias finales de los fragmentos de ADN tipo “*cor-like*” de los fagos lambdoides arriba mencionados. El alineamiento llevado a cabo entre la secuencia *cor* del fago mEp167 y las secuencias “*cor-like*” de los fagos mEp123, mEp147, mEp234 y mEp502 muestra que la similitud entre las bases es mayor al 90%.

La alineación de las secuencias de los fagos arriba mencionados también se llevo a cabo con las secuencias *cor* de los fagos HK022, ϕ 80 y N15. Tomando a la secuencia consenso como referencia se compararon el número de bases distintas que presentaban las diferentes secuencias alineadas con respecto al consenso (Figura 6, Tabla 6).

mEp167	(1)	CT - TTAATGC -- TGTCTGGTTG TGCTGGTGTACTTGAGAAACAGGAACCT
mEp147	(1)	CT - TTAATGC -- TGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
mEp234	(1)	CT - TTAATGC -- TGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
mEp502	(1)	CT - TTAATGC -- TGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
HK022	(1)	CT - TTAATGC -- TGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
ϕ 80	(1)	CT - GTCATGC -- TCACAGGATGCGCTGGCGTAATTGAGAAACAGGAACCA
N15	(1)	-CGTTATTAC -- TTTCTGGATGCTCAGGTATGCTCGAAAGCAGTCTCCA
mEp123	(1)	CTGTTAATGGCATGCTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
Consensus	(1)	CT TTAATGC TGTCTGGTTGCGCTGGTGTACTTGAGAAACAGAAACCG
mEp167	(48)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGACCATGAGAATAACGTTATGAT
mEp147	(48)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT
mEp234	(48)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT
mEp502	(48)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT
HK022	(48)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT
ϕ 80	(48)	GTTTGCACGCGCACTGCAATCGTTGGCGGTGAGGAACTACGGTTGAGAT
N15	(48)	GTGTGTA CTGGCACAGCTTTGATAGGTGGT GAGGAA CAGAA GTTCAAAT
mEp123	(51)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT
Consensus	(51)	ATTTGCAGCGGCACGGCATATATGGGTGGCCATGAGAATAACGTTATGAT

Figura 6. Secuencias nucleotídicas alineadas del gen “*cor-like*” de diferentes fagos y la secuencia consenso obtenida.

mEp167 (98) TTACGGCGTTCGAAAACAAAACAACAGACTCAATACCGGGCCGGATATC
 mEp147 (98) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACCGGGCCGGATATC
 mEp234 (98) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACCGGGCCGGATATC
 mEp502 (98) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACAGGCCGGATATC
 HK022 (98) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACCGGGCCGGATATC
 ϕ80 (98) TTACGGTGTGCGTAAACAAAACAACAGACGCAAGTACCGGGCTGGATATC
 N15 (98) TTACAGCATTTCGTAAAGCAAAACAATCAGACTATGTATTCGAGCTGGCTATC
 mEp123 (101) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACCGGGCCGGATATC
 Consensus (101) TTACGCCGTTCGAAAGCAAAACAACAGACGCAATACCGGGCCGGATATC

 mEp167 (148) CCTTCAACTGGCGTTGGG
 mEp147 (148) CCTTCAACTGGCGCTGGG
 mEp234 (148) CCTTCAACTGGCGCTGGG
 mEp502 (148) CCTTCAACTGGCGCTGGG
 HK022 (148) CCTTTAACTGGCGCTGGG
 ϕ80 (148) CTTTCAGCTGGCGCTGGG
 N15 (148) CGTTCAATGGCAGTGGG
 mEp123 (151) CCTTCAACTGGCGCTGGG
 Consensus (151) CCTTCAACTGGCGCTGGG

Figura 6. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen “*cor*-like” (~80%) de diferentes fagos y la secuencia consenso.

Tabla 6. En esta tabla se muestran los números de bases diferentes, las transiciones, transversiones e inserciones que presentan las secuencias alineadas comparándolas con la secuencia consenso del gen *cor*.

Fago	No. de bases distintas	Transiciones	Transversiones	Inserciones	Deleciones
mEp147	0	0	0	0	0
mEp234	0	0	0	0	0
mEp502	1	1	0	0	0
HK022	1	1	0	0	0
mEp123	5	1	1	3	0
mEp167	9	5	4	0	0
ϕ80	36	15	22	0	0
N15	53	25	29	1	1

Esta relación numérica de bases distintas a la secuencia consenso entre las diferentes secuencias se ve reflejada en el árbol filogenético generado por el método Neighbor-Joining (NJ) donde las secuencias de los fagos mEp147, mEp234, mEp502, HK022 y mEp123 son más cercanas entre sí (Figura 7).

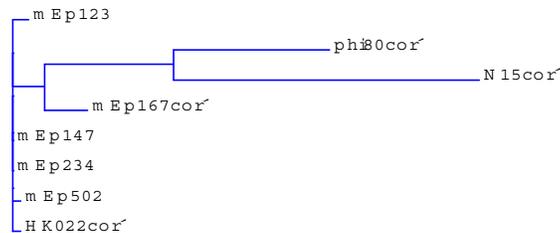


Figura 7. Árbol filogenético de las secuencias *cor* generado por el método Neighbor-Joining (NJ).

De manera global las secuencias de los fagos mEp167, ϕ 80 y N15 presentan un mayor distanciamiento con respecto al grupo formado por los fagos antes mencionados. Con respecto a los fagos HK022, ϕ 80 y N15 vemos que la distancia entre HK022 y ϕ 80 es menor que entre HK022 y N15; éste arreglo en las distancias obtenidas en nuestro árbol confirma lo reportado por Juhala *et al.*, (2000) donde compara las secuencias de aminoácidos de los genes *cor* de HK022, ϕ 80 y N15 encontrando que hay un 76% de identidad entre los fagos HK022 y ϕ 80 y un 64% de identidad entre HK022 y N15, es decir, el gen *cor* de HK022 está más relacionado al gen *cor* de ϕ 80 que al de N15.

DISCUSIÓN

De la colección de bacteriófagos nativos utilizados en este estudio, la cual fue aislada y caracterizada por Kameyama *et al.*, (1999), se obtuvieron dos grandes grupos: los fagos lambdoides y los no-lambdoides ("mayoritarios"). La mayoría de las bandas amplificadas del gen "cor-like" se obtuvieron del grupo de los fagos nativos lambdoides, mientras que en el grupo de fagos mayoritarios (inmunidad I o no-lambdoides) no se obtuvo ninguna amplificación. Los fagos "mayoritarios" tan solo comparten una característica en común con los lambdoides que necesitan de los factores Nus del huésped para su desarrollo. El grupo de fagos de inmunidad I fue propuesto como un nuevo grupo de fagos (diferentes a los lambdoides). La carencia de la amplificación de la secuencia "cor-like" en estos fagos es una evidencia más que apoya la idea de que estos fagos forman un grupo nuevo y distinto a los fagos lambdoides.

La amplificación positiva de secuencias nucleóticas idénticas a la del gen "cor-like" del bacteriófago mEp167 y a otras secuencias *cor* previamente reportadas en distintos bacteriófagos lambdoides como se muestra en los resultados es un dato más del fenómeno de conversión lisógena ampliamente extendido en sus diferentes variantes en las poblaciones de bacterias lisógenas, y que acarrear generalmente cierto beneficio a los hospederos. La resistencia mediada por represores tipo CI sólo bloquea el ataque de fagos del mismo grupo de inmunidad (homoinmunidad). La exclusión superinfectiva proporciona a la bacteria una resistencia a la infección contra fagos de inmunidad diferente. Entre los diferentes tipos de resistencia (ver Tabla 2) al ataque por bacteriófagos conferidos por el profago a la bacteria la exclusión superinfectiva tiene un espectro de acción más amplio (multirresistencia o heteroinmunidad). La exclusión superinfectiva se ha reportado que actúa generalmente a nivel de los sistemas de membrana del hospedero y del espacio periplásmico, bloqueando la inyección del ADN hacia el espacio citoplásmico de la bacteria. En el caso del gen *cor*, el producto de éste

interactúa con la proteína multifuncional FhuA, la cual es el receptor de diferentes fagos (Ø80, N15, T1, T5). Dicha interacción bloquea la inyección del ADN al interior de la bacteria. Sin embargo Vostrov *et al.* (1996) han propuesto que pudiera actuar con la proteína de membrana interna TonB bloqueando de esta manera el aporte de energía necesario para la translocación del genoma viral. Esta nueva propiedad de la bacteria le proporciona la oportunidad de poder repeler el ataque fágico, con lo cual, aumenta la posibilidad de que la población bacteriana se incremente, y así, de ésta manera, el ADN viral del profago que la bacteria replica, más que un gasto de energía, es una inversión en la adquisición de nuevas propiedades. La evidencia de que los fagos son un vehículo importante en el desarrollo y evolución de las poblaciones bacterianas han sido descritas por Cheethan y Katz (1995), Ohnishi *et al.* (2001), Ferretti *et al.* (2001).

La amplificación de secuencias *cor* en los fagos lambdoides nativos, si bien no se dio en todos los ADN de los fagos analizados, en este estudio se muestra que varios de ellos lo contienen. Los estudios de inmunidad realizados con los fagos que mostraron en la PCR la banda amplificada evidenciaron que no todos tuvieron un fenotipo *cor* funcional. ¿Por qué no todos los fagos lambdoides mEp presentaron una amplificación positiva?, y ¿por qué en aquellos que sí la dieron no todos presentaron un fenotipo de exclusión superinfectiva?. Ésto podría deberse a que como se mencionó antes los oligonucleótidos diseñados no amplificaran el genoma viral debido a la posible variación de la secuencia, es decir no hubo hibridación con los "primers". La presencia del gen *cor* en fagos mEp lambdoides podría explicarse también por una transferencia horizontal de la información genética solo entre algunos de ellos, por lo que dicho gen no estaría en todos. Hendrix *et al.* (1999) propusieron un modelo en el cual los genomas de los bacteriófagos son un mosaico de elementos que pueden intercambiarse (recombinación) entre bacteriófagos que infectan entre otros a diferentes géneros hospederos. Las vías para dicho intercambio pueden ser muy variadas. Botstein (1980) propone también un modelo en el cual el

genoma viral está conformado por unidades intercambiables que las nombra módulos. Lucchini *et al.*, (1999) han encontrado similitud en la organización del módulo lisogénico de fagos que infectan a bacterias con un bajo contenido de G-C, lo cual refuerza la hipótesis de los módulos intercambiables. Juhala *et al.*, (2000) describieron segmentos de ADN que se encuentran intercalados entre dos genes contiguos en los genomas de los fagos HK97 y HK022 los cuales presentan un promotor y terminador propios. Estos segmentos fueron nombrados morones y fueron adquiridos por intercambio e inserción en el ADN. Los morones según el modelo propuesto por Juhala *et al.* suelen expresarse durante el estadio lisogénico del fago. Así, el gen *cor* de HK022 es identificado como un moron por Juhala *et al.*, el cual lo contienen también el fago N15 y ϕ 80. Una posible explicación a por qué no en todos los fagos mEp que resultaron positivos en el ensayo de la PCR hallan dado un fenotipo de exclusión superinfectiva podría deberse a que el gen *cor* o su producto estuviera modificado o fuera no funcional. Otra explicación es que en aquellos fagos que presentan el gen *cor* y excluyen a otros fagos el mecanismo que actúa para conferir la resistencia no sea sólo *cor* sino que actúe algún otro mecanismo. ¿Cuál es entonces la importancia del fenotipo de exclusión superinfectiva para el bacteriófago, y para su hospedero obligatorio, la bacteria?. Hooper *et al.*,(1998) han descrito la importancia de la densidad de las bacterias en el tracto intestinal de los mamíferos para el desarrollo de las relaciones simbióticas entre las bacterias y su hospedero. La densidad bacteriana es un factor clave que desencadena rutas bioquímicas que llevan a la conformación (emergencia) de nuevas propiedades en el tejido del hospedero importantes para un desarrollo posterior. Así, la colonización del tracto intestinal por las diferentes bacterias que conforman la microbiota es un proceso en el cual la capacidad de reproducción de cada una de las especies es un parámetro importante en la adquisición de espacio y alimentos disponibles. El fenotipo de exclusión superinfectiva proporcionado por el gen *cor*, así como otros mecanismos de defensa contra el ataque fágico en un

lisógeno, podrían ser elementos importantes en el establecimiento de las poblaciones bacterianas en un nicho ecológico. La presencia de *cor* en fagos lambdaoides aislados en diferentes lugares geográficos (Tabla 8) nos muestra una amplia distribución lo cual robustece la hipótesis de McGrath *et al.*, (2002) de una distribución amplia de los sistemas de resistencia contra bacteriófagos.

Tabla 7. Bacteriófagos que presentan el gen *cor* y su lugar de aislamiento geográfico.

Bacteriófago	Lugar de aislamiento	Referencia
MEp167	México	Kameyama <i>et al.</i> , (1999).
N15	Moscú	Rybchin y Svarchevsky, (1999).
HK022	China	Juhala <i>et al.</i> , (2000).
φ80	Japón	Birge, 1981.

La importancia para el fago en esta relación es el mantenimiento de su genoma en un ambiente estable (la bacteria) que a su vez se establece en una comunidad estable.

BIBLIOGRAFÍA

Ackermann, H. W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.* **146**: 843-857.

Birge, E.A. (1981). Bacterial and bacteriophage genetics. Springer-Verlag. U.S.A. Pag. 158.

Bonhivers, M., L. Plançon., A. Ghazi., P. Boulanger., M. le Maire., O. Lambert., J. L. Rigaud and L. Letellier. (1998). Fhu A, an *Escherichia coli* outer membrane protein with a dual function of transporter and channel which mediates the transport of phage DNA. *Biochimie.* **80**: 363-369.

Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Annals New York Academy of Sciences.* 484-491.

Boyd, F. E., B. M. Davis and B. Hochhut. (2001). Bacteriophage-bacteriophage interactions in the evolution of pathogenic bacteria. *Trends in Microbiology.* **9**: 137-144.

Campbell, A. M. (1993). Thirty years ago in genetics: prophage insertion into bacterial chromosomes. *Genetics.* **133**: 422-438.

Cha, S. R. and W.G. Thilly. (1995). Specificity, efficiency and fidelity of PCR. En PCR primer. A Laboratory Manual. Edited por Dieffenbach W. C. and G. S. Dieckler. Cold Spring Harbor Press. USA.

Cheetham, F. B. and M. E. Katz. (1995). A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Molecular Microbiology.* **18**: 201-208.

Desiere, F., W. M. McShan, D. van Sindersen, J. J. Ferreti and H. Brüssow. (2001). Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococcus: Evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology*. **288**:325-341.

Duckworth, D. H. (1976). Who discovered bacteriophage?. *Bacteriological Reviews*. **40**:793-802.

Ferguson, A. D. and J. Deisenhofer. (2002). TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1565**: 318-332.

Ferretti, J.J., W. M. McShan, D. Ajdic, D. J. Savic, G. Savic, K. Lyon, C. Primeaux, S. Sezate, A. N. Suvorov, S. Kenton, H. S. Lai, S. P. Lin, Y. Qian, H. G. Jia, F. Z. Najjar, Q. Ren, H. Zhu, L. Song, J. White, X. Yuan, S. W. Clifton, B. A. Roe and R. McLaughlin. (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *PNAS*. **98**: 4659-4663.

Gunter, K. and V. Braun. (1990). In vivo evidence for FhuA outer membrane receptor interaction with the TonB inner membrane protein of *Escheria coli*. *FEBS*. **274**: 85-88.

Hendrix, W., R. M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford and G. F. Hatfull. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**: 2192-2197.

Hofer, B., M. Ruge and B. Dreiseikelmann. (1995). The superinfection exclusion gene (*sieA*) of bacteriophage P22: Identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. *Journal of bacteriology*. **177**: 3080-3086.

Hooper, L. V., L. Bry, P. G. Falk and J. I. Gordon. (1998). Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *BioEssays*. **20**: 336-343.

Hurst, C. J. (2000). *Viral ecology*. Academic Press. U.S.A. P.p. 4, 84.

Juhala, R.J., M.E. Ford, R.L. Duda, A. Youlton, G.F. Hatful and R.W. Hendrix. (2000). Genomic sequences of bacteriophage HK97 and HK022: Pervasive genetic mosaicism in the bacteriophages. *J. Mol. Biol.* **299**: 27-51.

Kameyama, L., L. Fernández, J. Calderón, A. Ortiz-Rojas and T. A. Patterson. (1999). Characterization of wild lambdoid bacteriophages: Deteccion of a wide distribucion of phage immunity groups and identificacion of a Nus-Dependent Nonlambdoid phage group. *Virology*. **263**: 100-111.

Killmann, H., C. Herrmann, A. Torun, G. Jung and V., Braun. (2002). TonB of *Escherichia coli* activates FhuA through interaction with the β -barrel. *Microbiology*. **148**:3497-3509.

Killmann, H., G. Videnov, G. Jung, H. Schwarz and V. Braun. (1995). Identificacion of Receptor Binding Sites by Competitive Peptide Mapping: Phages T1, T5 and \emptyset 80 and Colicin M Bind to the Gating Loop of FhuA. *Journal of Bacteriology*. **177**: 694-698.

Kliem, M. and B. Dreiseikelmann. (1989). The superimmunity gene *sim* of bacteriophage P1 causes superinfection exclusion. *Virology*. **171**:350-355.

Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch and D. Moras. (1998). Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: Crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell*. **95**: 771-778.

Lu, M. and U. Henning. (1989). The immunity (*imm*) gene of Escherichia coli bacteriophage T4. *Journal of Virology*. **63**: 3472-3478.

Lucchini, S., F. Desiere and H. Brussow. (1999). Similarly organized lysogeny modules in temperate Siphoviridae from low GC content Gram-Positive bacteria. *Virology*. **263**: 427-435.

Sambrook J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, N. Y.

McGrath, S., G. F. Fitzgerald and D. van Sinderen. (2002). Identification and characterization of phages-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Molecular Microbiology*. **43**: 509-520.

Murphy, F.A., C. M. Fauquet, D.H.L. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo and M.D. Summers (Editors). (1995). Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division. International Union of Microbiological Societies. Springer-Verlag. Austria.

Nesper, J., J. Blab, M. Fountoulakis and J. Reidl. (1999). Characterization of the major control region of *Vibrio cholerae* bacteriophage K139: Immunity, exclusion, and integration. *Journal of bacteriology*. **181**(9): 2902-2913.

Ohnishi, M., K. Kurokawa and T. Hayashi. (2001). Diversification of Escherichia coli genomes: are bacteriophages the major contributors?. *Trends in microbiology*. **9**: 481-485.

Ptashne, M. (1992). A genetic switch. Blackwell Scientific Publication & Cell Press. USA. 181 pp.

Postle, K.. (1990). TonB and the Gram-Negative dilemma. *Molecular Microbiology*. **4**: 2019-2025.

Ranade, K. and A. R. Poteete. (1993). Superinfection exclusion (*sieB*) genes of bacteriophages P22 and λ . *Journal of bacteriology*. **175**(15): 4712-4718.

Roux H. K. (1995). Optimization and Troubleshooting in PCR. En PCR primer. A Laboratory Manual. Edited por Dieffenbach W. C. and G. S. Dueksler. Cold Spring Harbor Press. USA.

Rybchin, V. N. and A. N. Svarchevsky. (1999). The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. *Molecular Microbiology*. **33**: 895-903.

Salomón, R. and R. Farías. (1993). The FhuA protein is involved in Micromicin 25 uptake. *Journal of Bacteriology*. **175**: 7741-7742.

Samsonov, V. V., V. V. Samsonov and S. P. Sineoky. (2002). DcrA and dcrB Escherichia coli genes can control DNA injection by phages specific for BtuB and FhuA receptors. *Research in Microbiology*. **153**:639-646.

Schwartz, M. (1980). Interaction of phage with their receptor proteins. En Virus Receptors. Part 1. Bacterial Viruses. Randall, L.L. y L. Philipson. (editores). Chapman and Hall. U.S.A.

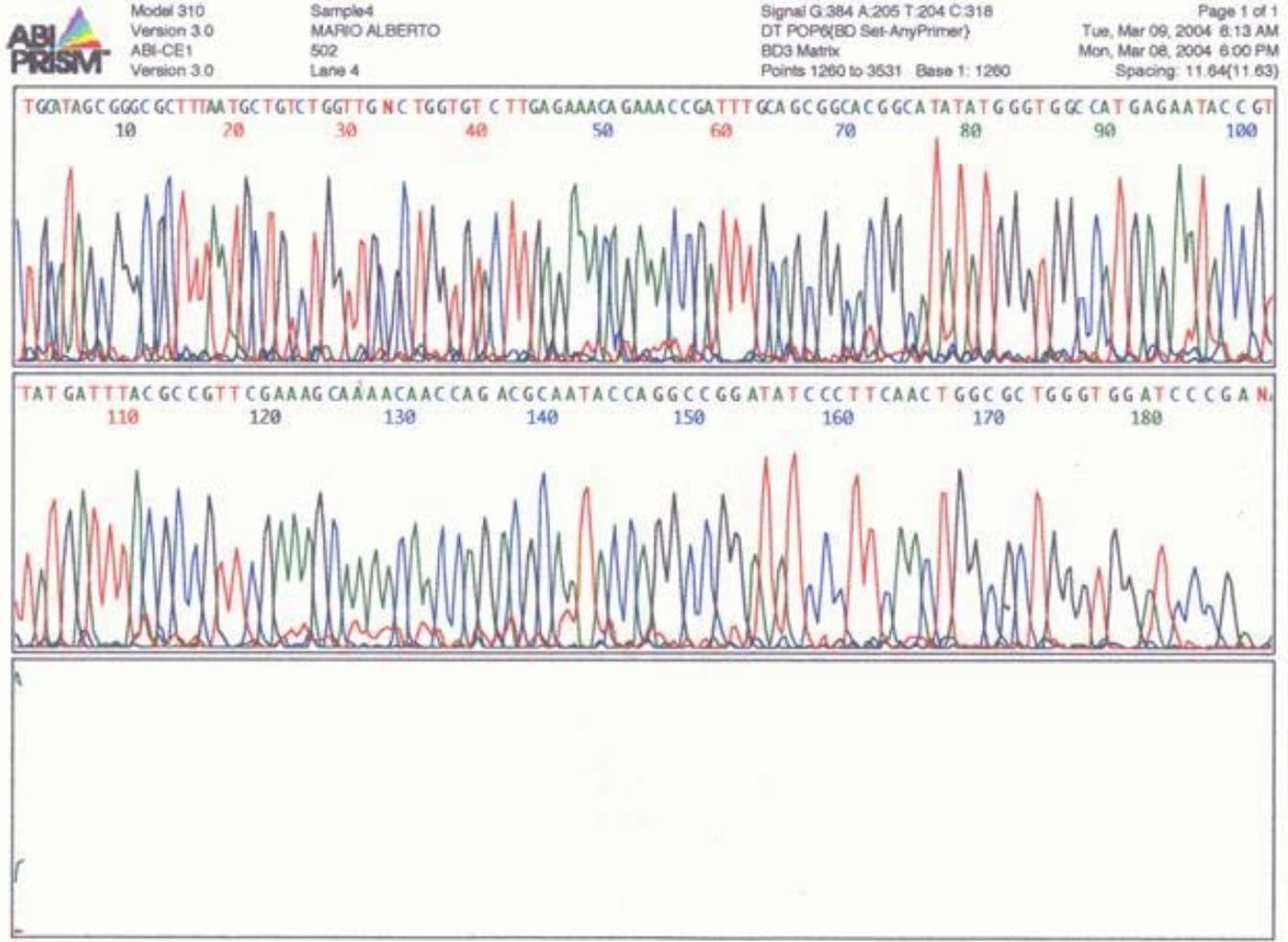
Snyder, L. (1995). Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents?. *Molecular Microbiology*. **15**: 415-420.

Tuckman, M. and M. S. Osbourne. (1992). *In vivo* inhibition of TonB-Dependent processes by a TonB Box consensus pentapeptide. *Journal of Bacteriology*. **174**: 320-323.

Uc-Mass, A. , L. Kameyama *et al.* (2004). "Cor-like gene product of mEp167 prophage could be involved in multiple lambdoid phage exclusion". En preparación. CINVESTAV-IPN. México.

Vostrov, A. A., O. A. Vostrukhina, A. N. Svarchevsky and V. N. Rybchin. (1996). Proteins Responsible for Lysogenic Conversion Caused by Coliphages N15 and Ø80 are Highly Homologous. *Journal of Bacteriology*. **178**(5): 1484-1486.

Wright, A., M. McConnell and S. Kanegasaki. (1980). Lipopolysaccharide as a bacteriophage receptor. En: Virus Receptors. Part 1. Bacterial Viruses. Randall, L.L. and L. Philipson. (editores). Chapman and Hall. U.S.A.



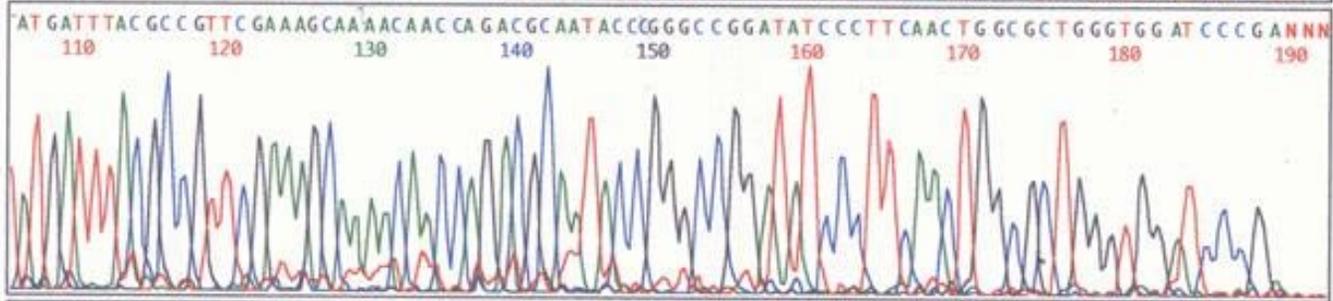
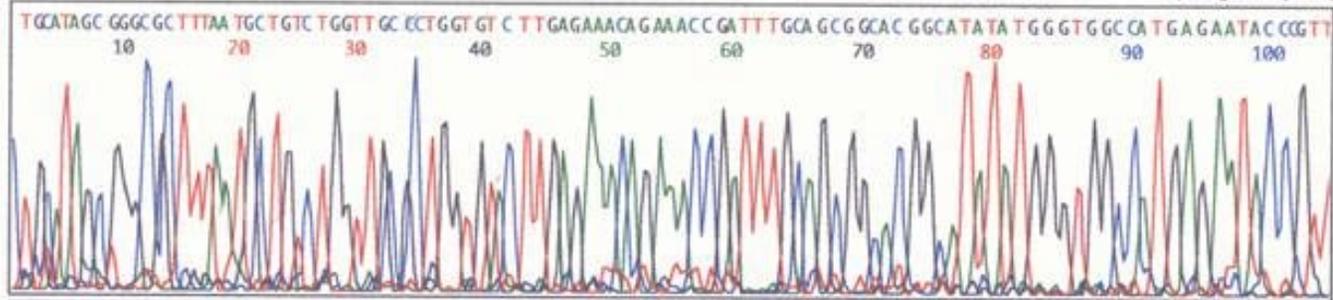


Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

Sample3
MARIO ALBERTO
234
Lane 3

Signal G 288 A 156 T 150 C 280
DT POP(BD Set-AnyPrimer)
BDG Matrix
Points 1265 to 3567 Base 1: 1265

Page 1 of 1
Tue, Mar 09, 2004 6:12 AM
Mon, Mar 08, 2004 5:14 PM
Spacing: 11.77(11.77)



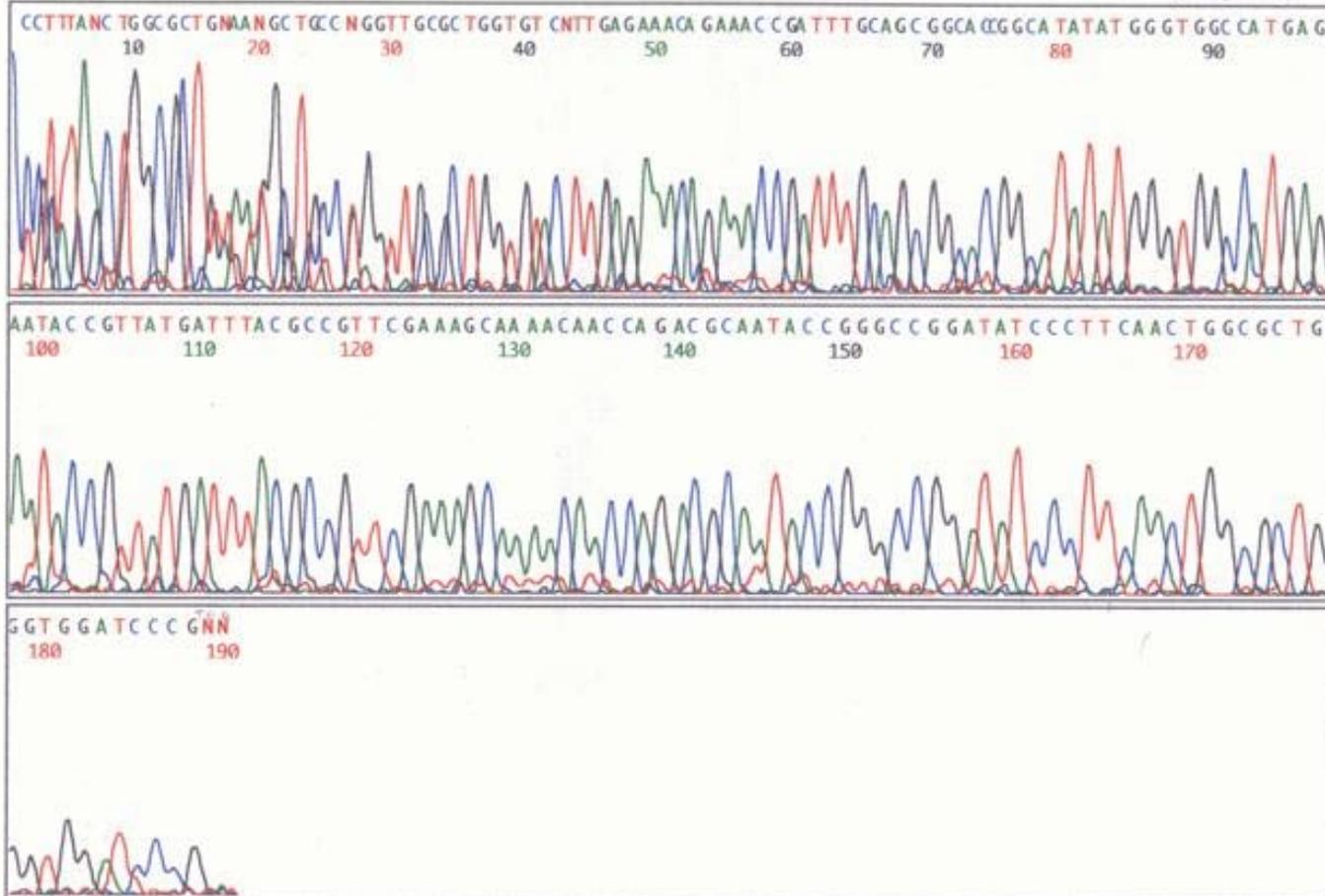


Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

Sample1
MARIO ALBERTO
123
Lane 1

Signal G:233 A:142 T:142 C:229
DT POP6(BD Set-AmyPrimer)
BD3 Matrix
Points 1251 to 3533 Base 1: 1251

Page 1 of 1
Tue, Mar 09, 2004 8:11 AM
Mon, Mar 08, 2004 3:46 PM
Spacing: 11.91(11.90)





Model 310
Version 3.0
ABI-CE1
Version 3.0

Sample2
MARIO ALBERTO
147
Lane 2

Signal G:305 A:168 T:162 C:326
DT POP6(BD Set-AryPrimer)
BD3 Matrix
Points 1152 to 3580 Base 1: 1152

Page 1 of 1
Tue, Mar 09, 2004 8:12 AM
Mon, Mar 08, 2004 4:27 PM
Spacing: 11.91(11.90)

