

EL BACTERIÒFAG LAMBDA, UN MODEL DE DECISIÓ GENÈTICA

MAITE MUNIESA

Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Adreça per a la correspondència: Maite Muniesa. Departament de Microbiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 645. 08028 Barcelona. Tel.: 934 039 386. Adreça electrònica: mmuniesa@ub.edu.

RESUM

El bacteriòfag lambda (fag λ) és un virus que, com indica el seu nom (*bacteriòfag*, 'que menja bacteris') infecta el bacteri intestinal *Escherichia coli*. El fag λ s'ha utilitzat històricament com a organisme model per a l'estudi de la multiplicació de virus i, sobretot, per comprendre la regulació gènica. Per *regulació gènica* entenem on i quan han de funcionar els gens, decisió cabdal que fa que, per exemple, les cèl·lules de la nostra sang siguin molt diferents de les de l'ull, tot i dur els mateixos gens: la diferència és quins es troben actius. El fag λ és, doncs, el paradigma per entendre la regulació gènica, ja que té dos cicles de vida diferents, anomenats cicles *lític* i *lisogènic*; per triar quin manarà s'utilitza un sistema senzill (i alhora complex) de regulació genètica. Si el fag tria el cicle lític, es multiplica dins del bacteri fins a lisar-lo i alliberar els fags descendents. Si, en canvi, tria el cicle lisogènic, el DNA del fag s'integra dins del DNA del bacteri i roman latent (profag), com un fragment més de genoma bacterià. Això no mata el bacteri, que continua dividint-se. El DNA del fag es replica juntament amb el DNA del bacteri, que expressa els seus gens i els del fag. La lisogènia pot mantenir-se estable o revertir envers el cicle lític si hi ha certs factors ambientals que afectin la viabilitat del bacteri. El fag λ s'ha utilitzat també com a eina en biologia molecular, entre altres aplicacions, per produir DNA recombinant, aprofitant les capacitats dels seus enzims d'integrar fragments de DNA dins del genoma bacterià.

Paraules clau: bacteriòfag, transferència genètica, lisi, lisogènia, microbiologia.

THE BACTERIOPHAGE LAMBDA

SUMMARY

The bacteriophage lambda (phage λ) is a virus that infects the intestinal bacteria *Escherichia coli*. Phage λ has been historically used as a model microorganism on the study of virus multiplication, and moreover for the genetic regulation of its multiplicative cycles. Phage λ has two different multiplicative pathways, called *lytic* and *lysogenic* cycles, and can choose among both cycles by a complex system of genetic regulation. If the lytic cycle is selected, λ multiplies within the bacteria generating new phages. The new phages release outside the bacteria by lysis, which causes the death of the cell. If the lysogenic cycle is selected, the phage DNA is integrated within the bacterial DNA and remains in a latent state (prophage) as a part of the bacterial genome. This cycle does not kill the bacterial cell, that can continue its replication together with the replication of the phage DNA. This allows the bacterium to express its own genes and those of the phage. Lysogeny can remain stable or revert towards the lytic cycle, if there are certain environmental factors that affect viability of the bacteria. Phage λ has also been applied as a tool for diverse molecular biology applications. Among others, the production of recombinant DNA, using the abilities of their enzymes to integrate DNA fragments within the bacterial genome.

Key words: bacteriophage, genetic transfer, lysis, lysogeny, microbiology.

El bacteriòfag o fag lambda, anomenat normalment amb la lletra grega λ , va ser descobert fa més de mig segle, el 1950, per la microbiòloga Esther M. Zimmer Lederberg (1922-2006) (Lederberg, 1950, 1951). Els bacteriòfags o fags són virus que tenen la capacitat d'infectar bacteris. La doctora Lederberg va aïllar el fag λ a partir de la infecció del bacteri d'origen intestinal *Escherichia coli*, soca K-12. Com tots els virus, l'estructura del fag λ és molt simple. Consisteix en un cap, que té la forma d'un prisma icosaèdric, fet de subunitats de proteïna, amb un diàmetre de 55 nm. A l'interior d'aquest cap hi ha el material genètic, DNA de doble cadena, que conté més de quaranta gens, amb la informació necessària per generar-ne l'estructura i per dur a terme la infecció. A més, el fag λ posseeix una cua de 150 nm, també composta per proteïnes, que li serveix per unir-se al bacteri i infec-

tar-lo (vegeu la figura 1) (Hendrix *et al.*, 1983).

La utilitat dels bacteriòfags es basa en la facilitat de creixement del seu hoste, per la qual cosa han esdevingut models per a l'estudi dels virus. El fag λ ha estat un dels bacteriòfags més ben estudiats i s'utilitza encara avui dia com a model de regulació genètica i d'infecció vírica. Facilita aquesta tasca el fet que λ no és cap virus patògen, que no necessita cultius cel·lulars complexos per propagar-se i que estudiar-lo no és excessivament car. El fet que el seu bacteri hoste sigui *E. coli* ha estat determinant, ja que aquest és un bacteri fàcil de manipular, molt estudiat i àmpliament utilitzat en el laboratori (vegeu el capítol sobre *E. coli*). Així doncs, λ és un virus model que infecta un bacteri model.

Tanmateix, l'elecció del fag λ com a model es recolza en la complexa i interessant

regulació del seu circuit genètic. En efecte, els seus mecanismes de regulació gènica són dels més ben coneguts i estudiats (Little, 2006; Oppenheim *et al.*, 2005) i moltes de les característiques generals de la regulació genètica que considerem evidents avui dia van tenir la seva descoberta en λ . El fag té un cicle vital molt més complex que la majoria d'altres virus bacterians, i això crea un ampli rang de comportaments i una regulació genètica molt interessant. Hi ha tres aspectes del comportament de λ que requereixen una atenció especial: primer, λ fa una tria, just després d'infectar la cèl·lula, entre dos cicles vitals diferents (cicle lític o lisogènic); segon, si segueix el cicle lisogènic, el DNA del fag s'integra en l'hoste i reprimeix el cicle lític; i tercer, un cop en l'estat lisogènic, pot canviar d'opinió i tornar un altre cop a l'estat lític. Tots aquests cicles els porta a terme mitjançant una acurada regulació dels seus gens, reprimint l'expressió d'alguns i promovent l'activació d'altres, en un delicat equilibri de decisions a escala molecular. A continuació veurem què ens ha ensenyat λ i coneixerem els seus cicles en detall.

MODEL D'INFECCIÓ VÍRICA

La infecció del fag λ , com la d'altres fags, té lloc quan aquest troba el receptor d'una cèl·lula del seu bacteri hoste, en aquest cas *E. coli*. El fag λ utilitza la cua per unir-se a una proteïna de la superfície del bacteri, la proteïna LamB. LamB forma part de l'estructura proteica d'un porus que es forma a la paret d'*E. coli* i que fa servir el bacteri per captar un sucre, la maltosa. El model de λ i el seu receptor de la maltosa va generar elegants experiments que descrivien que l'expressió d'aquest receptor afavoria o inhibia la infecció del fag λ (Lederber, 1955) i han servit de base per estudiar els

receptors d'altres virus. Un cop unit a LamB, i a través de la cua, el fag injecta el seu DNA dins del bacteri (vegeu la figura 2). Aquest és el primer pas de la infecció de la majoria de bacteriòfags amb cua. La cadena lineal de DNA del fag travessa la paret del bacteri i arriba al seu interior, on immediatament es tanca sobre ell mateix formant una molècula de DNA circular. Aquesta circularització és possible gràcies a uns extrems cohesius en el seu DNA que s'uneixen per uns enzims del bacteri, les lligases. La circularització és necessària per evitar que certs enzims degradadors de DNA (endonucleases) del bacteri, que actuen generalment sobre DNA lineal, no tallin i degradin el DNA del fag (Heskowitz i Hagen, 1980).

MODEL DE LISOGÈNIA

Un cop injectat el seu DNA dins d'*E. coli*, el fag pot triar dues opcions a l'hora de replicar-se: el cicle lític i el lisogènic, i pren la decisió depenent de l'ambient i les circumstàncies en què es troba (Hersko-

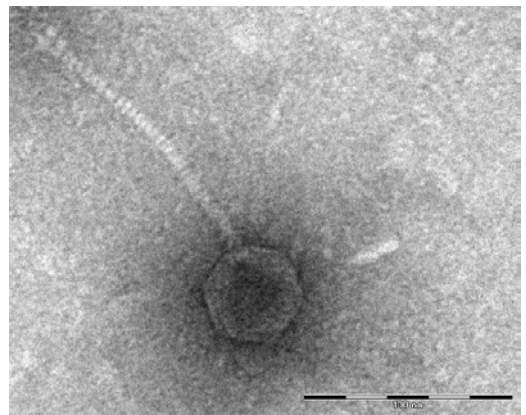


FIGURA 1. Micrografia electrònica del bacteriòfag λ . Tinció negativa amb molibdat amònic.

witz i Hagen, 1980; Oppenheim *et al.*, 2005).

Primera alternativa: cycle lític

Si λ segueix el seu cycle lític, aleshores el primer que es produeix és la replicació del seu DNA. Com tots els virus, el fag λ no té la maquinària necessària per replicar-se i ha de manllevar la de la cèl·lula bacteriana, com a perfectes paràsits que són (vegeu la figura 2). Quan el fag λ segueix el cycle lític es comporta com un virus virulent. Per tal d'aconseguir la replicació del seu DNA, el fag λ utilitza els enzims de replicació del DNA del bacteri i els fa treballar per a ell. El bacteri atura les seves funcions pròpies en haver de treballar per al fag. El DNA del fag es replica nombroses vegades a fi que es formin còpies de DNA per als nous fags que es formaran. Una sèrie de protei-

nes primerenques produïdes pel fag mateix ajudaran en aquesta tasca. Un cop hi ha prou còpies del DNA del fag, aquest mateix DNA aporta la informació necessària per sintetitzar les proteïnes que han de conformar la càpsida i la cua dels futurs nous fags. Amb aquest sistema, nombroses proteïnes estructurals del fag, incloent-hi les de la cua, es formen i són encaixades. Finalment, cada còpia de DNA del fag es col·loca a dins de cada nova càpsida formada i es generen noves partícules completes de fag λ a l'interior del bacteri. Un darrer grup de proteïnes tardanes del fag, les lisines, causaran la lisi i mort de la cèl·lula bacteriana per tal de permetre l'alliberament dels nous fags a l'exterior.

Però no és pel cycle lític pel qual λ és un organisme famós: la seva característica especial és la capacitat de seguir una segona alternativa, o de triar entre totes dues.

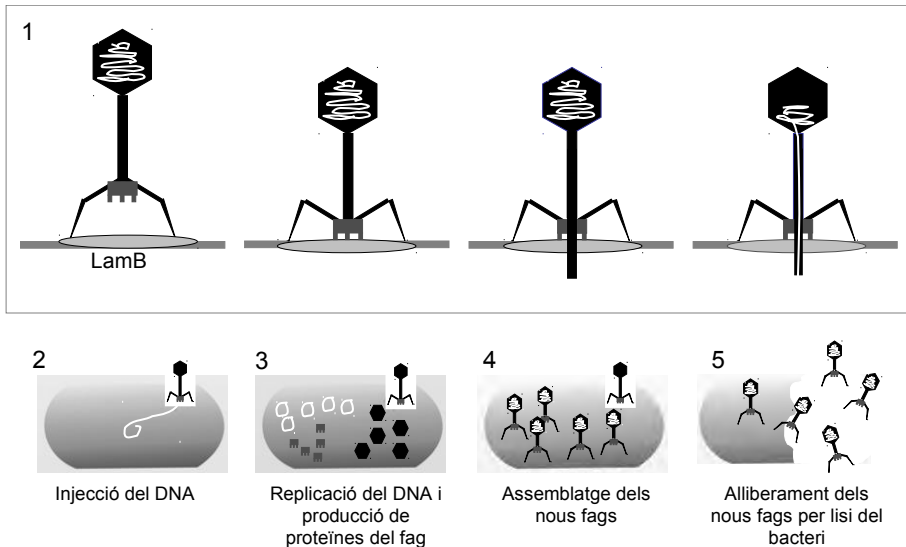


FIGURA 2. Mecanisme d'infecció del fag λ i desenvolupament del cycle lític. 1 i 2. Adsorció i injecció del DNA per la cua del fag i penetració a l'interior del bacteri. 3. Replicació del DNA del fag i síntesi de proteïnes fàgiques. 4. Assemblatge dels capsides dels nous fags i introducció del DNA a dins les capsides. 5. Alliberament dels nous fags per lisi del bacteri mitjançada per lisines.

Segona alternativa: cicle lisogènic

Algunes vegades el fag pot seguir el cicle lisogènic. És sobretot en aquest cicle en què el fag λ apareix com el principal model i és a partir dels estudis fets amb λ quan es va començar a entendre com es prenen les decisions de regulació genètica a escala molecular. No tots els fags són capaços de seguir aquesta segona alternativa, i això fa que λ sigui tan especial.

A diferència del cicle lític, aquest cicle no causa la mort bacteriana. Per contra, el genoma del virus, un cop introduït dins del bacteri, s'integra en el cromosoma del bacteri hoste (vegeu la figura 3). Aquest meca-

nisme va ser estudiat per un col·lega i amic d'Esther Lederberg, el microbiòleg Allan Campbell, el 1962. La integració del DNA del fag dins del bacteri té lloc gràcies a una proteïna del fag, la integrasa. Aquesta permet que el genoma del fag s'insereixi en un lloc concret del genoma del bacteri (vegeu la figura 3) (Heskowitz i Hagen, 1980; Willey *et al.*, 2008). Un cop integrat el DNA del fag, el cicle lisogènic es manté gràcies a una acurada regulació a escala genètica, que és altament estable. En l'estat lisogènic, el DNA de λ s'anomena *profag*, i roman resident dintre del genoma del bacteri sense causar-li cap dany aparent. El fag capaç de seguir el cicle lisogènic, com λ , s'anome-

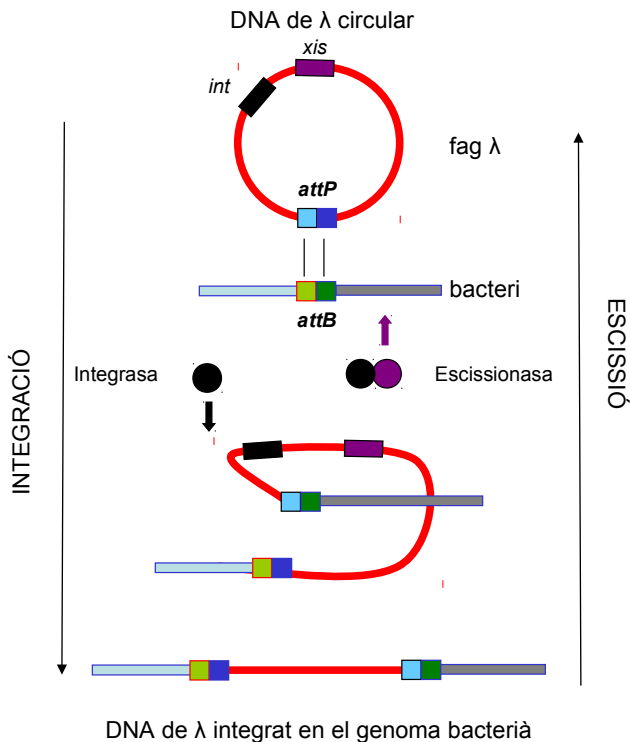


FIGURA 3. Cicle lisogènic del fag λ . Esquema d'integració del DNA del fag en el cromosoma bacterià mitjançant la integrasa (*int*) i els llocs *att*. El pas contrari, l'escissió del DNA del fag en cas d'inducció del cicle lític, es produeix mitjançant l'escissionasa (*xis*).

na *fag temperat*, i el bacteri que té un fag temperat al seu interior, *lisogen*. La lisogènia estudiada en λ fa que aquest fag hagi servit també com a model de transferència genètica, tal com veurem més endavant.

MODEL GENÈTIC DE DECISIÓ

La decisió lisi-lisogènia no es pren de qualsevol manera, sinó que es basa en una regulació a escala molecular que ha estat molt ben caracteritzada. La base de la regulació recau en dues proteïnes: la proteïna CRO, que activa el cicle lític (la formació de nous fags) i la lisi cel·lular, i la proteïna CI, que manté el cicle lisogènic (manté el DNA del fag integrat en el genoma bacterià) (vegeu la figura 4). El desco-

briment dels gens que codifiquen aquestes proteïnes de decisió va ser tan rellevant que en els sistemes que s'han estudiat després de λ es té la tendència a cercar els gens homòlegs que facin les funcions de *cro* o *cI*.

CRO i CI són proteïnes que funcionen unint-se a determinades regions promotores del DNA del fag. Tot i que el model mecànic d'aquesta regulació és força complex, de manera sintètica direm que en unir-se totes dues proteïnes estimulen o bloquegen la transcripció dels gens que provocaran un cicle o l'altre. La base d'aquesta decisió és, doncs, una lluita basada en la concentració de cada una d'aquestes proteïnes: quan la concentració d'una superi l'altra, es determina la decisió envers un cicle o l'altre. Permeteu-me una

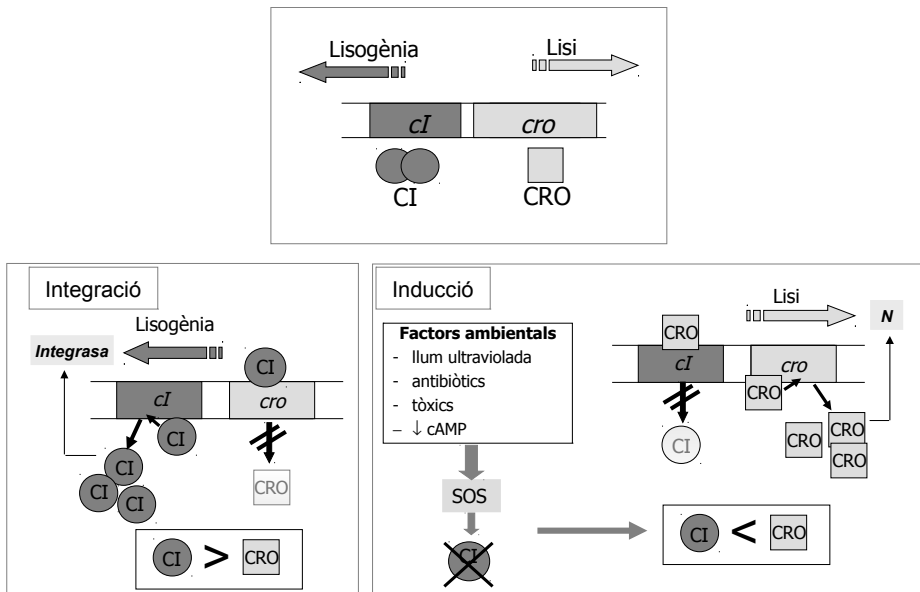


FIGURA 4. Regulació del cicle lític-lisogènic del fag λ . El producte del gen *cro* regula el cicle lític i el producte del gen *cI* regula la lisogènia. Si la concentració de CI és més gran que la de CRO, s'inhibeix CRO, s'estimula la síntesi de CI i s'estableix la lisogènia. Si, per contra, determinats factors ambientals causen l'activació de la resposta SOS, això produeix l'eliminació de CI, que baixa en concentració respecte a CRO. Aleshores s'estimula la síntesi de CRO i s'inhibeix la de CI. L'augment de CRO porta a la inducció del cicle lític de λ .

aproximació simplificada al que té lloc en cada un dels supòsits:

Progressió a cicle lític: en aquest cas hi ha més producció de proteïna CRO i menys de CI. En unir-se CRO, estimula la seva expressió pròpia i, a més, l'expressió dels gens implicats en la via lítica. A més, inhibeix la producció de CI, amb la qual cosa continua mantenint el nivell més alt de CRO i més baix de CI (Heskowitz i Hagen, 1980; Oppenheim *et al.*, 2005). En expressar-se CRO, s'activen altres gens: gens encarregats de la síntesi de la càpsida i la cua del fag, de l'encaix i, finalment, de l'expressió dels gens de lisi.

Progressió a cicle lisogènic: en aquest cas, els nivells de CI són superiors als de CRO. Els alts nivells de CI causen, en primer lloc, més expressió del CI mateix i, també, bloquegen l'expressió de CRO, reprimint els gens de la càpsida, els gens per a l'assemblatge i els de les proteïnes de lisi (Friedman i Court, 2001; Oppenheim *et al.*, 2005). A més, la presència de CI activa l'expressió de la integrasa del fag, que, tal com s'ha comentat, permetrà la integració del DNA del fag dins del genoma bacterià (vegeu la figura 4). Així estant, l'estat lisogènic es mantindrà sempre que CI es mantingui a una concentració superior a CRO. L'estat lisogènic és afavorit quan hi ha molts virus, o si hi ha molts ions bivalents al medi (Adams, 1959).

Tercera alternativa: tornar a activar el cicle lític

El fag en estat lisogènic pot tornar a activar el cicle lític mitjançant un canvi que s'anomena *inducció del fag*. Aquesta alternativa implica que les decisions moleculars que poden semblar irreversibles poden tenir un nivell de complexitat superior que en permeti la reversió si canvien les condi-

cions ambientals. Aquesta senzilla observació en un petit fag té grans implicacions que han estat la base d'estudis genètics posteriors en altres organismes i han condicionat la nostra comprensió de les decisions a escala molecular. La decisió que dona com a resultat l'inici del cicle lític a partir de la lisogènia involucra un sistema regulador que s'anomena *resposta SOS*. La resposta SOS és un conjunt de canvis que es produeixen en els bacteris com a resposta davant de certs factors ambientals que comporten estrès. Això activa el fag λ , cosa que molts autors interpreten com una resposta del fag, que se sent «amençat» per factors externs que podrien perjudicar-lo. Així es pren la decisió de «sortir» del bacteri. S'inicia aleshores un procés invers al descrit per a l'establiment del cicle lisogènic, i que té com a objectiu la creació i disseminació de nous fags. L'activació de la resposta SOS activa la proteïna RecA, que degrada CI i en redueix la concentració. Com a conseqüència, la concentració de CRO augmenta i s'indueix el cicle lític. Aleshores, es dona l'escissió del DNA del fag des del cromosoma bacterià i el profag resultant (vegeu la figura 3) forma nous fags λ , que són alliberats fora del bacteri.

MODEL EVOLUTIU DE TRANSFERÈNCIA GENÈTICA HORIZONTAL

Tal com s'ha comentat més amunt, l'especial cicle vital de λ té d'altres implicacions. En integrar-se dins del genoma d'un bacteri, λ és capaç d'introduir-hi els seus gens. En l'estat lisogènic, el DNA de λ (o profag) roman resident dintre del genoma del bacteri. El bacteri que té un fag al seu interior (lisogen) es continua dividint i provoca la duplicació del DNA del fag en cada nova divisió. Els gens de λ integrats

al cromosoma bacterià poden ser, per tant, expressats pel bacteri. Quan un bacteri integra un fag en un lloc concret del seu genoma i expressa els gens del fag, diem que aquests gens han estat transduïts. Aquest mecanisme és un dels tres mecanismes de transferència genètica horitzontal descrits en bacteris: conjugació, transformació i transducció. La transducció fàgica és el mecanisme pel qual els bacteris es transfereixen DNA transportat mitjançant un fag. La transducció pot ser generalitzada o especialitzada. El fag λ és el típic exemple de fag temperat que fa transducció especialitzada: el fag s'integra en un lloc específic del cromosoma bacterià.

El model de λ ha permès també l'estudi d'altres fags que «s'assemblen» a λ . S'anomenen *fags lambdoides*, i tenen una estructura genètica força similar, malgrat que presenten certes diferències. Les seqüències completes del fag λ i d'altres fags lambdoides s'ha determinat en els darrers anys. La comparació d'aquestes seqüències ha donat una nova perspectiva a temes d'estudi tan rellevants com l'evolució dels virus i l'evolució dels bacteris (Canchaya *et al.*, 2004).

Evolució dels virus

L'estructura genètica dels fags és com un mosaic, en què diferents fags comparteixen els mateixos gens o grups de gens. Això implica que els fags s'intercanvien aquests fragments entre si, probablement per recombinació. El tipus de recombinació de λ permet la recombinació de fragments molt petits, i aquesta activitat tan potent té un paper important en aquests fenòmens de recombinació entre fragments de DNA, tot i que no siguin idèntics. Imaginem diversos fags integrats com a profags dins del genoma d'una mateixa cèl·lula bacteriana.

Aquests diversos fags es poden (de fet ho fan) intercanviar fragments de DNA entre si entrecreuant-se els fragments entre zones homòlogues. Quan aquests fags activen posteriorment el seu cicle lític, els nous fags generats no són idèntics als seus progenitors, sinó que han incorporat o perdut fragments de DNA: han evolucionat. La recombinació entre fags, iniciada amb λ , continuada amb fags lambdoides, és extensible a virus de la mateixa família o entre fags molt diversos, que poden infectar bacteris diferents (*E. coli* o *Streptomyces*, per exemple). Aquest fet explica per què es troben fags filogenèticament molt distants entre si, però que per contra comparteixen regions de DNA exactament iguals. Dins de la seqüència de λ , hi ha fragments que no s'han identificat, trossos de DNA que no se sap per a què serveixen. S'han anomenat *morons*, i es creu que podrien ser fragments recentment transferits des d'un altre fag (Hendrix *et al.*, 1999, 2000).

No es coneix quin pot ser el benefici concret obtingut pels virus en incorporar (o perdre) nous fragments de DNA, però sens dubte, la incorporació de nous gens incrementa la variabilitat genètica dels organismes i aquesta sempre és benvinguda, atesos els avantatges selectius que pot proporcionar.

Evolució dels bacteris

La sospita del paper de λ i els fags lambdoides en l'evolució bacteriana s'inicia amb el descobriment de Freeman el 1951 en què es va descriure que els fags poden estar relacionats amb la virulència bacteriana. Freeman va provar que un fag de *Corynebacterium* portava el gen de la toxina diftèrica. Esther Lederberg, el 1956, va potenciar aquest paper en estudiar la transducció del fag λ en *E. coli* K-12 (Morse *et al.*, 1956),

i va provar la importància d'aquest fet, no solament per explicar la transferència de resistència bacteriana, sinó també com un important mecanisme d'evolució bacteriana. Posteriorment es va veure que altres fags lambdoides també porten gens que codifiquen factors de virulència. L'exemple més significatiu és el dels fags Stx, que porten el gen de la toxina Shiga, una toxina molt similar a una toxina de *Shigella*, però produïda per *E. coli* (O'Brien *et al.*, 1984; Muniesa *et al.*, 2009). Aquestes toxines són importants en la virulència d'algunes soques d'*E. coli*, anomenades *enterohemorràgiques*, perquè causen diarrea amb sang i complicacions més greus. De la mateixa manera que els fags Stx, el fag λ mateix transporta gens relacionats amb la virulència bacteriana. El gen *bor*, que confereix al bacteri lisogenitzat per λ resistència al sèrum animal, i el gen *lom*, que s'expressa en la membrana externa del bacteri lisogenitzat i pot ajudar a la unió dels bacteris amb cèl·lules de mamífers (Barondess i Beckwith, 1990; Waldor *et al.*, 2005). Els gens de virulència transportats per fags són els més estudiats, per raons obvies, però altres gens relacionats amb el metabolisme o l'adherència bacteriana també s'han observat en el genoma d'alguns fags (Canchaya *et al.*, 2004).

La conseqüència de tot això és que els fags que incorporen en el seu DNA gens bacterians i que després infecten bacteris poden transferir els gens a aquests bacteris (transducció), la qual cosa fa canviar el DNA del bacteri infectat. Aquest fet va ser àmpliament estudiat en el fag λ (Lederberg, 1956). A vegades aquests gens no perduren si el fag activa de nou el seu cicle lític, la qual cosa farà que el bacteri es lisi i es perdi el nou gen incorporat. Però de vegades observem coses curioses tot just abans de produir-se aquesta lisi. Per exemple, si considerem un fag que transporta i

transdueix el gen d'una toxina en un bacteri, el fet interessant és que, quan s'activa el cicle lític dels fags, augmenta dràsticament la producció de toxina d'aquestes soques. Això succeeix just abans que el bacteri es lisi per causa dels nous fags induïts. Aquests descobriments porten a la idea que el fag, més que ser un mer vehicle de transport de gens de virulència, té un paper important en la regulació mateixa de l'expressió de la toxina (Canchaya *et al.*, 2004; Muniesa *et al.*, 2009). A més, l'estudi d'aquest model genera una interessant paradoxa: per què una cèl·lula bacteriana augmenta la seva virulència tot just abans de ser lisada per un fag? Quin sentit té que es torni més virulent si, al cap i a la fi, acabarà morint quan els fags en surtin? Tot i que encara no hi ha una resposta definitiva a aquesta pregunta, molts autors han proposat una solució molt elegant a aquesta paradoxa. Es pensa que potser dintre de la població d'*E. coli*, una subpoblació augmenta la seva virulència, i augmenta la producció de toxina i la generació de nous fags que la transporten, malgrat que això representa la mort d'aquesta subpoblació, una espècie de suïcidi altruista. Paral·lelament, una altra subpoblació roman intacta, sense activar la lisi del fag i sense generar fags nous. No es torna més virulent, però continua existint. Amb aquest mecanisme, el global de la població d'*E. coli* pot perdre i alhora ser més virulent. A més, es generen nous fags alliberats a l'exterior que serien capaços de tornar a infectar altres bacteris i transferir-los el gen de la toxina per transducció fàgica (Wagner *et al.*, 1999; Canchaya *et al.*, 2004; Serra-Moreno *et al.*, 2008).

Encara hi ha més observacions interessants que expliquen el paper de fags en l'evolució bacteriana. De vegades, després de moltes divisions bacterianes, el fag (o, més correctament, el profag) perd la seva capa-

citat de revertir el seu estat lisogènic i d'activar el cicle lític. Això s'ha observat amb λ i amb altres fags. El fag es queda literalment atrapat en la seva forma de DNA dins del genoma del bacteri i deixa de ser un profag, per passar a ser el que s'anomena un *fag defectiu*. D'aquests se'n localitzen en gran quantitat dins els genomes bacterians que s'han anat seqüenciant (Canchaya *et al.*, 2004). Alguns fags defectius es creu que són de tipus lambdaoide, i d'altres no. Segurament se'n seguiran trobant en altres genomes bacterians que se seqüencien en el futur. Així, el bacteri que transporta un profag defectiu ha incorporat definitivament els gens d'aquest sense possibilitat de perdre'ls, almenys per activació del cicle lític. El bacteri ha adquirit material genètic nou, ha evolucionat.

UNA EINA MOLT ÚTIL A MÉS D'UN MODEL: APLICACIONS DE λ EN BIOLOGIA MOLECULAR

El coneixement sobre el fag λ ha proporcionat eines molt útils per aplicar-les en ciència. En concret, en la disciplina de la biologia molecular, en la qual s'estudia el funcionament biològic dels sistemes a escala molecular.

Una de les aplicacions més simples del fag és aprofitar el seu DNA, fàcil d'extreure i de seccionar, com a marcador de pesos moleculars. Efectivament, el DNA del fag λ , un cop tallat amb enzims de restricció, que tallen en determinades zones del DNA, genera fragments de mida coneguda. Aquest patró de bandes del DNA del fag (de mida coneguda) es fa servir de manera comparativa per verificar la mida dels fragments de DNA amb els quals es treballa. Nombrosos laboratoris on es fan tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzen marcadors basats en el

DNA del fag λ per comprovar la mida dels fragments amplificats amb PCR.

A més, diversos fragments i gens del fag λ s'han fet servir per construir vectors, elements genètics que serveixen per clonar gens a la manera d'una màquina de replicació que, un cop introduïda dins d'un bacteri, ens genera nombroses còpies del gen en estudi. Entre aquests gens tenim zones per on λ comença a copiar el seu DNA (origen de replicació), zones d'homologia amb el cromosoma del bacteri, zones de recombinació, etc.

Diversos processos han aprofitat el coneixement sobre el genoma de λ i la seva capacitat per introduir el seu DNA en el genoma del bacteri. El descobriment de les funcions de recombinació de λ ha portat a generar noves estratègies per aprofitar aquestes funcions. Enzims propis de λ s'utilitzen en aquests processos. Entre d'altres, integrases, de les quals hem parlat en les seccions anteriors, i recombinases. D'aquestes destaca la Red-recombinasa, una proteïna de λ que produeix la recombinació dels fragments de DNA lineal amb DNA bacterià utilitzant zones homòlogues del DNA, i que aconsegueix integrar-lo (Datsenko i Banner, 2000). Això permet introduir de manera artificial fragments del genoma que es vol estudiar dins d'un determinat bacteri. Majoritàriament, s'ha treballat amb *E. coli*, però recentment s'ha adaptat el sistema a altres bacteris (Friedman i Court, 2001). Aquestes característiques recombinatòries ja s'havien provat amb *Saccharomyces cerevisiae*, però ha resultat que, gràcies a la utilització de la recombinació mitjançant λ , ara es pot aconseguir que *E. coli* faci el mateix, però amb molta més eficiència que *Saccharomyces*. Aquest sistema s'ha desenvolupat i ha arribat a tenir un nom propi, *recombineering*, que prové de la fusió dels termes anglesos *recombination* ('recombinació') i *engineering*

(‘enginyeria’). Es podria traduir com a *enginyeria de recombinació*. En aquesta enginyeria són possibles moltes aproximacions: fragments linears molt curts, variacions d’un sol nucleòtid i incorporació de fragments amplificats amb PCR, entre d’altres.

El fag λ també s’ha utilitzat com a vehicle per transportar gens. Utilitzant partícules del fag en què s’han modificat algunes proteïnes de la càpsida s’ha aconseguit que aquest infecti i transfereixi el seu DNA a cèl·lules animals (Lankes *et al.*, 2007). Una altra aplicació relacionada és la utilització del fag λ per presentar proteïnes en la seva càpsida. Aquesta metodologia rep la denominació de *phage display* en anglès, i consisteix a introduir el gen de la proteïna que volem presentar dins d’un gen d’una proteïna de la càpsida del fag. Quan genera la seva càpsida, el fag incorpora la proteïna en estudi associada a les proteïnes de la seva càpsida; aleshores diem que «presenta» la proteïna en estudi en la seva superfície. El *phage display* és una tecnologia que ha tingut èxit en diverses aplicacions durant els darrers anys, tant per a l’estudi de processos biològics com per aïllar molècules amb un valor pràctic (Garufi *et al.*, 2005). El *phage display* presenta una vessant interessant del fag com a vehicle potencial per a vacunes. Els estudis duts a terme indiquen que el sistema immunitari del subjecte reacciona contra el fag. Si la proteïna del fag es modifica de manera que s’assembli, posem per cas, a la proteïna d’un virus de la grip, podríem estar generant una vacuna amb fag λ com a vehicle, en principi innocu per a l’individu, capaç de presentar la proteïna del virus de la grip al sistema immunitari i generar un augment de les defenses envers el virus (Lankes *et al.*, 2007).

Finalment, un altre ús dels fags que està incrementant la seva importància els darrers anys és la teràpia fàgica. Això és l’ús

de fags lítics per eliminar bacteris. Es presenta com una alternativa als antibiòtics i el van desenvolupar per a ús clínic ja fa molts anys diversos grups d’investigació de l’Europa de l’Est i dels Estats Units. Ara torna a ressorgir com a alternativa per tal d’evitar les resistències bacterianes als antibiòtics (Brüssow, 2005). La major part de la recerca en teràpia fàgica s’ha fet amb fags lítics que infecten *E. coli*. Aquests són fags de tipus T i tipus λ . Malgrat tot, el fet que alguns fags puguin fer el cicle lisogènic com λ pot tenir implicacions no desitjades d’intercanvi de DNA amb els bacteris i pot ser un inconvenient per utilitzar-los per a teràpia fàgica.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. H. (1959). *Bacteriophages*. Nova York: Interscience Publishers.
- BARONDESS, J. J.; BECKWITH, J. (1990). «A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda». *Nature*, 346: 871-874.
- BRÜSSOW, H. (2005). «Phage therapy: the *Escherichia coli* experience». *Microbiology*, 151: 2133-2140.
- CAMPBELL, A. (1962). «Episomes». *Adv. Genetics*, 11: 101-145.
- CANCHAYA, C.; FOURNOUS, G.; BRUSSOW, H. (2004). «The impact of prophages on bacterial chromosomes». *Mol. Microbiol.*, 53: 9-18.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. (2000). «One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6640-6645.
- FREEMAN, V. J. (1951). «Studies on the virulence of bacteriophages infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*». *J. Bacteriol.*, 61: 675-688.
- FRIEDMAN, D. I.; COURT, D. L. (2001). «Bacteriophage lambda, alive and well and still doing its thing». *Curr. Opin. Microbiol.*, 4: 201-207.
- GARUFI, G.; MINENKOVA, O.; LO PASSO, C.; PERNICE, I.; FELICI, F. (2005). «Display libraries on bacteriophage lambda capsid». *Biotechnol. Annu. Rev.* 11: 153-190.
- HENDRIX, R. W.; LAWRENCE, J. G.; HATFULL, G. F.; CASJENS, S. (2000). «The origins and ongoing evolution of viruses». *Trends Microbiol.*, 8: 504-508.

- HENDRIX, R. W.; ROBERTS, J. W.; STAHL, F. W.; WEISBERG, R. A. (1983). *Lambda II*. Nova York: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- HENDRIX, R. W.; SMITH, M. C.; BURNS, R. N.; FORD, M. E.; HATFULL, G. F. (1999). «Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage». *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 96: 2192-2197.
- HERSKOWITZ, I.; HAGEN, D. (1980). «The lysis-lysogenic decision of phage λ : explicit programming and responsiveness». *Annu. Rev. Genet.*, 14: 399-345.
- LANKES, H. A.; ZANGHI, C. N.; SANTOS, K.; CAPELLA, C.; DUKE, C. M.; DEWHURST, S. (2007). «In vivo gene delivery and expression by bacteriophage lambda vectors». *J. Appl. Microbiol.*, 102: 1337-1349.
- LEDERBERG, E. (1950). «Lysogenicity in *Escherichia coli* strain K-12». *Microbial Genet. Bull.*, 1: 5-8.
- (1951). «Lysogenicity in *E. coli* K-12». *Genetics*, 36: 560.
- (1955). «Pleiotropy for maltose fermentations and phage resistance in *E. coli* K12». *Genetics*, 40: 580-581.
- LITTLE, J. W. (2006). «Gene regulatory circuitry of phage lambda». A: CALENDAR, R. [ed.]. *The bacteriophages*. Nova York: Oxford university press, p. 74-82.
- MORSE, M.; LEDERBERG, E.; LEDERBERG, J. (1956). «Transduction in *Escherichia coli* K-12». *Genetics*, 41: 121-156.
- MUNIESA, M.; SERRA-MORENO, R.; JOFRE, J. (2009). «Bacteriophages within the Bacterial genomes: Contribution to bacterial variability». A: HORACE, T. A. [ed.]. *Contemporary Trends in Bacteriophages Research*. Nova York: Nova Science Publishers, p. 47-78.
- O'BRIEN, A. D.; NEWLAND, J. W.; MILLER, S. F.; HOLMES, R. K.; SMITH, H. W.; FORMAL, S. B. (1984). «Shiga like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea». *Science*, 226: 694-696.
- OPPENHEIM, A. B.; KOBILER, O.; STAVANS, J.; COURT, D. L.; ADHYA, S. (2005). «Switches in bacteriophage lambda development». *Annu. Rev. Genet.*, 39: 409-429.
- SERRA-MORENO, R.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. (2008). «The CI repressors of Shiga toxin-converting prophages are involved in coinfection of *Escherichia coli* strains, which causes a down regulation in the production of Shiga toxin 2». *J. Bacteriol.*, 190: 4722-4735.
- WAGNER, P. L.; ACHESON, D. W.; WALDOR, M. K. (1999). «Isogenic lysogens of diverse shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxin». *Infect. Immun.*, 67: 6710-6714.
- WALDOR, M. K.; FRIEDMAN, D. I.; ADHYA, S. L. (2005). *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington DC: ASM Press.
- WILLEY, J. M.; SHERWOOD, L. M.; WOOLVERTON, C. J. (2008). *Principios de Microbiología de Prescott*. Madrid: McGraw-Hill, p. 427-446.