

A adsorção reversível de SPP1 a glicopolissacáridos na parede celular de *Bacillus subtilis* precede a adsorção irreversível ao receptor membranar YueB

Cândida Trindade, Luís Domingues, M^a Daniela Feijão e Nuno Domingues

Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed.C2, 1749-016 Lisboa, Portugal

Entregue a 8 de Janeiro de 2010

YueB na membrana de *Bacillus subtilis* é o receptor necessário para a adsorção irreversível do fago SPP1. Para além disso ocorre adsorção reversível a polissacáridos, quando estes se encontram glicosilados. Neste trabalho pretendeu-se averiguar a adsorção irreversível do fago à bactéria, através da inativação de vários genes do operão Y_{ukE} e avaliação do impacto destas inserções mutacionais na adsorção irreversível. Posteriormente avaliou-se o efeito de mutações em genes que têm papel nas vias biossintéticas de polissacáridos da parede celular, com papel na sua glicosilação e ainda do híbrido 168/W23, com os genes *tag* substituídos pelos genes *tar*. Apesar de *yueB* ser o único gene do operão necessário à adsorção irreversível do fago, os resultados obtidos não o corroboram, pois o mutante *yueB* adsorveu eficazmente. O papel das enzimas envolvidas na glicosilação dos receptores reversíveis foi observado, tendo a adsorção reversível diminuído quando estas não eram produzidas, ou na ausência do principal ácido teicóico, poli(Gro-P), no caso do híbrido 168/W23 que expressa poli(Ribitol-P). Embora a adsorção reversível não seja necessária para ocorrer adsorção irreversível em SPP1, estes dados revelam a importância dos glicopolissacáridos na ligação do fago à parede de *B. subtilis*, sendo um mecanismo que facilitará o reconhecimento de YueB, para injeção do DNA viral.

INTRODUÇÃO

Bacillus subtilis é uma bactéria Gram positiva, cuja soberba receptividade genética e tamanho relativamente grande disponibilizaram as ferramentas adequadas para a investigar de todos os aspectos possíveis. A pesquisa em *B. subtilis* tem estado na vanguarda da biologia molecular e da citologia, sendo o organismo um modelo para a diferenciação, regulação gene/proteína e eventos do ciclo celular bacteriano (Grauman, 2007).

O bacteriófago de *Bacillus subtilis*, SPP1, pertence à família *Siphoviridae*, sendo um vírus com DNA de cadeia dupla de 45.1 Kbp e uma cápside isométrica de 60 nm de diâmetro e 191 nm de comprimento, de cauda não contráctil (Calendar, 1998). Foi descrito primeiramente por Riva *et al.* e foi utilizado para estudar a transfecção e a transdução, geral e plasmídica. O genoma de SPP1 foi caracterizado tanto em termos estruturais como genéticos e o fago tem

sido utilizado como vector de clonagem em *Bacillus subtilis* (Santos *et al.*, 1986). Até recentemente desconhecia-se o receptor na parede celular desta bactéria que permite o reconhecimento viral e injeção do seu genoma.

Para haver adsorção do fago e injeção do DNA é necessário haver receptores específicos à superfície das bactérias. Esses receptores permitem a adsorção viral por interações reversíveis e/ou irreversíveis. Os fagos adsorvidos reversivelmente podem ser libertados das células como partículas infecciosas por diluição, no entanto, as ligações do fago irreversíveis não permitem a libertação do fago, levando à injeção do DNA viral no hospedeiro (Baptista *et al.*, 2008). YueB é o receptor chave envolvido na adsorção irreversível de SPP1. A inativação insercional do *yueB* e dos genes que o rodeiam indica que o *yueB* faz parte de um operão que inclui pelo menos os genes a jusante *yukE*, *yukD*, *yukC* e o *yukBA*. No entanto apenas YueB parece ser

necessário para a ligação do fago (São-José *et al.*, 2004). A disrupção de qualquer destes genes no operão permite uma adsorção irreversível, dado que a expressão de *yueB* não seja interrompida. Sob estas condições, contudo, são produzidas pequenas placas, um fenótipo que é particularmente notado nas estirpes mutantes *yukE* (São-José *et al.*, 2004). Os receptores para a adsorção reversível que precede a ligação ao receptor irreversível YueB são os ácidos teicóicos glicosilados da parede celular, sendo a interacção reversível com estes polímeros essencial para o reconhecimento eficiente do receptor YueB.

Os ácidos teicóicos são polissacáridos fosfatados ligados ao péptidoglicano em bactérias Gram positivas (Bahvsar *et al.*, 2004), sendo *B. subtilis* um dos modelos estudados para a elucidação da organização genética, regulação transcricional e a função dos enzimas intervenientes na sua biossíntese. Os ácidos teicóicos, os ácidos lipoteicóicos (quando estão também associados a lípidos da membrana plasmática) e ainda outros açúcares associados ao péptidoglicano, actuam na recepção de bacteriófagos nestas bactérias (Baptista *et al.*, 2008), aquando da sua glicosilação por glucosiltransferases.

Com este trabalho, pretendeu-se analisar a adsorção irreversível do fago SPP1 a *B. subtilis*, através de mutações insercionais nos vários genes do operão. Analisou-se ainda a adsorção reversível ao nível dos glicopolissacáridos da parede celular, ou não-glicosilados no caso dos mutantes *tagE* e *gtaC*, com mutações nos genes intervenientes na glicosilação dos polissacáridos da parede, de modo a inferir sobre a adsorção do fago à superfície de *B. subtilis*, que precede e parece favorecer a adsorção irreversível.

MATERIAL E MÉTODOS

A.O operão YukE de *Bacillus subtilis* e a sua sensibilidade/resistência a SPP1

Bactérias, plasmídios e condições de crescimento. Partiu-se de 6 culturas-mãe de *B. Subtilis*, 5 com um gene do operão YukE inactivado, por integração com derivado de pMutin4 (pCBM8) e como controlo a estirpe selvagem (Wt) L16611, possuindo o gene *erm*, que confere resistência ao antibiótico

eritromicina, no locus *amyE*. Cada uma das culturas foi usada em duplicado, crescidas em meio LB, uma na presença de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) e a outra sem IPTG. Inicialmente leu-se a densidade óptica (DO₆₀₀) no espectrofotómetro, a partir de 1 mL de cada uma das culturas. Os fagos SPP1 foram mantidos em tampão TBT até à experiência.

Ensaio de β -galactosidase. Utilizando as culturas sem IPTG, centrifugou-se (centrífuga de Beckman), a 10 000 rpm durante 5 min e a 4°C, 10 mL de cada cultura, exceptuando no caso do integrante em *yukE* em que se utilizou apenas 1 mL de cultura. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células em 1 mL de tampão Z suplementado com 0.25% de β -mercaptoetanol, que funciona como agente redutor. Como controlo usou-se 1 mL de tampão Z sem células. Adicionou-se 50 μ L de SDS a 0.1% e 100 μ L de clorofórmio, agitou-se durante 20 s no vórtex e deixou-se evaporar durante 10 min parte do clorofórmio. Juntou-se então o substrato (200 μ L ONPG a 4 mg/mL) para dar início às reacções. Após aparecimento de cor amarela, adicionou-se 0,5 mL de NaCO₃ 1M para parar a reacção. Centrifugou-se em microcentrifuga para eliminar as células. Recolheu-se o sobrenadante e leu-se a DO a 420 nm. Calcularam-se as Unidades de Miller (U.M. = $1000 \times (DO_{420nm} / T \times V \times DO_{600nm})$).

Adsorção irreversível de SPP1. Para a adsorção do fago, adicionou-se 20 μ L de lisado de SPP1 a cada cultura. Agitou-se em vórtex e deixou-se à temperatura ambiente. Depois de 5, 10 e 15 min retirou-se 10 μ L da mistura fagos/bactérias e diluiu-se em 1 mL de tampão TBT + 100 μ L de CHCl₃, agitando-se em vórtex. Com os fagos não adsorvidos fizeram-se diluições de 10⁻¹ e 10⁻² em TBT. Procedeu-se aos plaqueamentos colocando-se 100 μ L de estirpe indicadora *B. Subtilis* L16611 e 100 μ L de lisado. Adicionou-se 7 mL de meio LB semi-sólido suplementado com CaCl₂ 15 mM, mantido a 45°C. Incorporou-se os inóculos, deixou-se gelificar e incubou-se 37°C. Calculou-se as constantes de adsorção $K_{ads} = \ln(P_0/P) / (Abs_{600} \cdot \Delta t)$, em que P₀ é o título fágico inicial e P o título fágico após o intervalo de tempo Δt . K_{ads} é a razão entre as taxas de adsorção e a biomassa bacteriana, aqui medida pela densidade óptica (D.O.) a 600 nm.

Eficiência de plaqueamento. Titulou-se a suspensão de SPP1 em ambas as culturas (com e sem IPTG) para o Wt e cada gene inativado. Fizeram-se diluições até 10^{-6} em TBT e plaquearam-se 100 μ L das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . Calculou-se a eficiência de plaqueamento (E.D.P.) através da razão entre o título fágico de cada estirpe com e sem IPTG e o título do Wt com e sem IPTG, respectivamente.

B.Interacção de SPP1 com células em que o receptor membranal YueB foi inativado

Leu-se a absorvância das culturas de *B. subtilis* a 600 nm. Pasteurizou-se as células utilizando 10 mL da estirpe selvagem L16611, 3 mL de mutante *gtaC*, 5 mL de mutante *tagE* e 3 mL da estirpe híbrida 168/W23, incubou-se durante 20 min a 80°C e deixou-se arrefecer. Centrifugou-se 2 mL de cada estirpe durante 5 min à velocidade máxima e ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de meio LB suplementado com 15 mM de $MnCl_2$. Adicionou-se 20 μ L de SPP1 a $2,18 \times 10^7$ pfu/mL (P_0), incubou-se 500 μ L a temperatura ambiente e 500 μ L a 0°C em gelo. Aguardou-se 30 min para que se atingisse o equilíbrio entre fagos adsorvidos (P_0 -P) e não adsorvidos (P). Centrifugou-se durante 5 min à velocidade máxima e recolheu-se o sobrenadante para novo tubo. Diluiu-se sucessivamente até 10^{-4} em diluições de 1:10 em tampão TBT e plaqueou-se 100 μ L de cada diluição (incluindo 10^0) com 100 μ L de *B. subtilis* 168 e 7 mL de LB semi-sólido suplementado com 15 mM $CaCl_2$. Calculou-se K_{eq} (A_{600}^{-1}) = $(P_0 - P) / (P \cdot A_{600})$, em que P_0 é o título fágico inoculado, P é a fracção de fagos livres no estado de equilíbrio e A_{600} é a biomassa bacteriana.

RESULTADOS

I.Adsorção irreversível

A adsorção irreversível dá-se quando o fago se liga ao receptor YueB na membrana plasmática de *B. subtilis*, injectando de seguida o DNA para o interior do hospedeiro. Para analisar este fenómeno calcularam-se as constantes de adsorção (K_{ads}) em meios com

IPTG e sem IPTG, no Wt L16611 e mutantes com plasmídios pCBM8, variante do vector pMutin-4 inseridos nos vários genes do operão *yukE*, inactivando-os (*knockout*) e não produzindo assim a proteína correspondente de cada gene. A transcrição a 5' de cada gene dá-se através dos seus promotores até à sequência terminadora que se encontra no fim do plasmídio a jusante do promotor P_{spac} . Assim é transcrita a β -galactosidase que servirá como medida da expressão do gene. O promotor P_{spac} , localizado no final do plasmídio inserido, é funcional na presença de IPTG, que funciona como indutor deste promotor actuando sobre o seu repressor, *lacI*. Assim há a transcrição a montante do plasmídio e logo os restantes genes do operão são transcritos. Pode-se então inferir sobre a importância de cada gene do operão na adsorção irreversível.

Analisou-se então a adsorção do fago a cada estirpe, Wt e mutantes, inoculadas com fago SPP1 e calculou-se as $K_{ads} = \ln(P_0/P) / (Abs_{600} \cdot \Delta t) \cdot U_{DO}^{-1}$, respectivas eficiências de plaqueamento e as unidades de Miller para quantificar relativamente a expressão dos vários genes do operão (Fig. 1). O P_0 utilizado foi a média dos títulos fágicos dos meios com IPTG obtidos para o cálculo da eficiência de plaqueamento ($3,15 \times 10^7$).

O gene *yukE* mostra ser mais transcrito através das Unidades de Miller (Fig. 1), comparado com todos os outros analisados. Isto poderá ter ocorrido devido à existência de uma sequência de repetição invertida entre *yukE* e *yukD*, que poderá formar uma estrutura secundária *hairpin* que atenuaria a transcrição *read-through* iniciada na região intergénica entre *yukF/yukE*. Esta limitação da transcrição só se dará quando o gene se encontra intacto, sem ter sido inativado, havendo uma transcrição não controlada no mutante. Nas culturas sem IPTG dos mutantes não se deveriam observar placas, visto o IPTG não actuar sobre *lacI*, que iria reprimir a ligação da RNA polimerase II ao promotor P_{spac} . Sendo assim os genes a montante não seriam transcritos e não haveria transcrição do gene *yueB* e consequente tradução para receptor, não ocorrendo adsorção do fago.

Estirpe	Estrutura do DNA	K _{ads} (min ⁻¹ .U _{DO} ⁻¹)		E.D.P.		β-gal (U.M.)
		- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG	- IPTG
Wt L16611		7,39	6,74	1,00	1,00	1,24
<i>yukE</i> ΩpCBM6		1,93	3,65	0,52	(*)	99,05
<i>yukD</i> ΩpCBM7		1,67	3,83	(*)	0,77	1,96
<i>yukC</i> ΩpCBM8		1,73	4,30	0,43	0,93	1,95
<i>yukBA</i> ΩpCBM9		1,71	4,12	(*)	>1(**)	0,64
<i>yueB</i> ΩpCBM10		1,94	4,82	(*)	(*)	2,09

Figura 1 – Valores da K_{ads}, eficiência de plaqueamento (E.D.P.) e actividade de β-galactosidase (unidades de Miller) medidos para as estirpes Wt L16611 e nos diferentes mutantes na presença e ausência de IPTG. Esquemas dos genes retirados de São-José *et al.*, 2004. Os valores de K_{ads} aqui descritos referem-se à média das K_{ads} para Δt=5, 10 e 15. A E.D.P. corresponde à razão entre o título fágico entre cada estirpe mutante com e sem IPTG e o Wt com e sem IPTG. (*) representa plaqueamentos onde não se formaram placas e; (**) plaqueamentos de *yukBA* que formaram placas a mais do que seria possível, se os métodos utilizados tivessem sido realizados sem erros laboratoriais.

No entanto, observaram-se placas nas culturas sem IPTG, indicando que o meio não devia ser o correcto, talvez possuindo IPTG ou qualquer outro contaminante, ou que talvez as estirpes utilizadas não fossem de facto os mutantes pretendidos ou que houve troca na inoculação dos meios com e sem IPTG. No meio com IPTG seria de esperar a transcrição dos genes a montante do interrompido com o vector, visto lacI não reprimir o promotor P_{spac}, permitindo a transcrição. Comparando os valores de K_{ads} da Fig.1, calculados a partir das K_{ads} para t=5, t=10 e t=15, vê-se que são mais elevados para as estirpes crescidas com IPTG do que para as crescidas sem IPTG. Para além disso observa-se uma maior K_{ads} no Wt (6,74 relativamente a todos os mutantes, pois possui todos os genes do operão que permitirão uma adsorção mais eficiente. Os valores são semelhantes para Wt crescido com e sem IPTG (6,74 e 7,39 min⁻¹.U_{DO}⁻¹) pois não necessita de IPTG para ocorrer transcrição.

A eficiência de plaqueamento indica a quantidade de fagos que formam placas por adsorção a YueB relativamente ao máximo possível que seria o do Wt por ser mais eficiente na adsorção. No caso das culturas sem IPTG não deveria haver placas formadas, contrariamente ao que foi observado para os mutantes *yukE* e *yukC*, ocorrendo estes valores devido aos erros mencionados anteriormente, como plaqueamentos da estirpe errada (Fig.1). Há a possibilidade da identificação dos meios ter sido trocada (meio com IPTG com o meio sem IPTG) em *yukE*, visto que *yukE* crescido com IPTG não formou placas.

Observando as constantes de adsorção para Δt = 5, 10 e 15 minutos, verifica-se que K_{ads} diminui com o tempo de interacção bactéria-fago (Fig. 2).

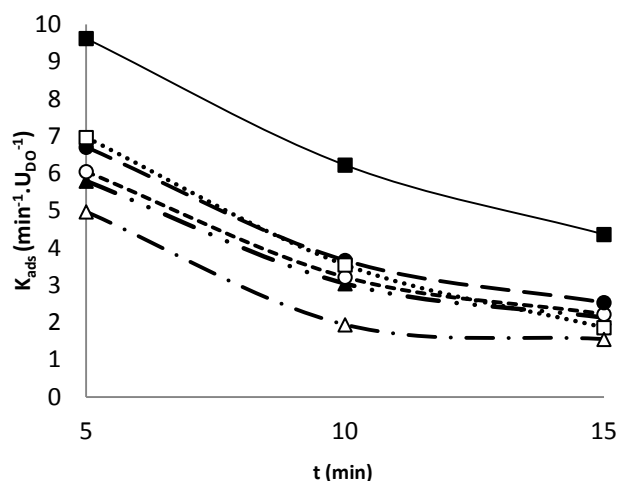


Figura 2 – K_{ads} ($\text{min}^{-1} \cdot U_{DO}^{-1}$) de SPP1 às paredes das estirpes Wt (—■—) e mutantes (—▲—, *yukE*; —○—, *yukD*; —●—, *yukC*; —□—, *yukBA* e —△—, *yueB*) em meio com IPTG (+), ao longo de 15 minutos. Apenas se fez as curvas de adsorção ao longo do tempo para as culturas com IPTG, visto ser nestas apenas que era esperada adsorção, e portanto será válida para a sua análise.

O Wt, possuindo todos os genes do operão Yuke, era de esperar que tivesse uma adsorção mais eficiente, facto que foi observado. O mutante *yueB*, pelo contrário deveria ter tido uma constante de adsorção nula, visto o receptor não ser transcrito. Mais uma vez os resultados embora não os esperados, poderão dar uma ideia da importância de cada gene na adsorção irreversível de SPP1 a *B. subtilis*. A constante de adsorção desce ao longo do tempo (Fig. 2), pois os receptores com o tempo vão ficando saturados com os fagos adsorvidos, havendo menor adsorção por haver menos receptores livres.

II. Adsorção reversível

SPP1 liga-se reversivelmente a glicopolissacáridos à superfície de *B. subtilis*. Para estudar a adsorção reversível utilizaram-se estirpes com o receptor YueB inativado por disrupção membranar e desnaturação proteica a 80°C, de modo a se analisar exclusivamente a adsorção reversível: a estirpe Wt, um híbrido 168/W23 e mutantes *tagE* e *gtaC*, genes que codificam uma glucosiltransferase e α -fosfoglucomutase, respectivamente. TagE transfere grupos glucosil da UDP-Glucose (UDP-Glc) para os ácidos teicóicos e ainda para um exopolissacárido envolvido na formação de biofilme (Baptista *et al.*, 2008). A

mutação *gtaC* do gene *yhxB* afecta a composição dos diferentes polímeros da parede celular, por ser quebrada a síntese de UDP-Glc, visto que YhxB cataliza a transferência do grupo fosfato do carbono 6 da glucose para o carbono 1, e de seguida GtaB tranfere um grupo uridilil para a glucose 1-P para formar UDP-Glc. Sem estas enzimas serão esperados diferentes níveis de adsorção reversível aos glicopolissacáridos ligados aos péptidoglicanos da parede celular.

Testaram-se então as constantes de equilíbrio, plaqueando-se o sobrenadante onde se encontravam os fagos não-adsorvidos reversivelmente. Através da equação ($K_{eq} (A_{600}^{-1}) = (P_0 - P) / (P \cdot A_{600})$), que indica os complexos bactéria-fago formados, através dos fagos que ficaram livres e seu plaqueamento para titulação, obtivemos as K_{eq} para cada uma das estirpes, de modo a ver o efeito na adsorção, das mutações e no híbrido 168/W23, que possui uma substituição dos genes *tag* (*tagABDEFGHO*) pelos genes *tar* (*tarABIJKLDF*), sendo derivado da estirpe 168 (Bahvsar *et al.*, 2004; Baptista *et al.*, 2008). Ambos os operões codificam para a maquinaria biossintética dos ácidos teicóicos (Bahvsar *et al.*, 2004), *tag* origina poli(glicerol fosfato), poli(Gro-P) (Mauël *et al.*, 1994) e *tar* origina poli(Ribitol-P).

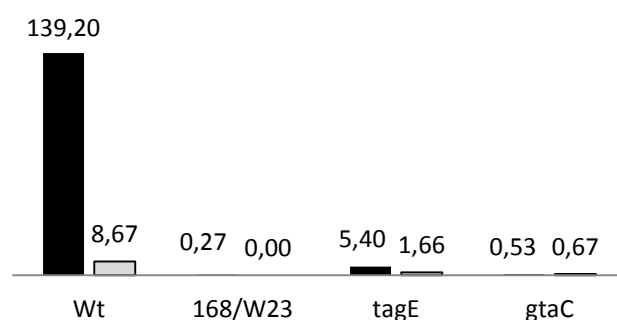


Figura 3 – Valores de $K_{eq} (A_{600}^{-1})$ representando o efeito da temperatura na adsorção reversível de SPP1 a estirpes de *Bacillus subtilis* Wt, híbrido 168/W23 e mutantes *tagE* e *gtaC*. As barras a preto correspondem a $T = 0^\circ\text{C}$ e a cinzento a T ambiente.

Os valores registados estão em concordância com Baptista *et al.*, 2008, havendo uma redução dos complexos fago-bactéria com o aumento da temperatura, que favorece a dissociação dos fagos. Esta dissociação permitirá a ligação dos fagos ao receptor YueB,

para haver injeção do DNA viral no hospedeiro.

TagE é a glucosiltransferase que glicosila o principal ácido teicóico da parede celular, poli(Gro-P). Não havendo glicosilação de poli(Gro-P), que possui a maior actividade receptora dos fagos nas paredes bacterianas, fica impossibilitada a sua acção como receptor. Ocorre um ligeiro aumento do valor de K_{eq} em relação aos outros mutantes ($K_{eq} = 5,40 A_{600}^{-1}$ para $T=0^\circ$ e $K_{eq} = 1,66 A_{600}^{-1}$ para T ambiente), por ocorrer a glicosilação de outras moléculas que actuam como receptores reversíveis de fagos, poli(glucosil N-acetilgalactosamina fosfato), a forma glicosilada do componente do péptidoglicano e o ácido lipoteicóico glucosil-1,2-diacilglicerol.

Para *gtaC* observou-se uma K_{eq} muito reduzida ($K_{eq} = 0,53 A_{600}^{-1}$ para $T=0^\circ$ e $K_{eq} = 0,67 A_{600}^{-1}$ para T ambiente), que deriva da mutação na enzima intermédio para a formação de UDP-Glc, não havendo glicosilação de nenhum dos ácidos teicóicos receptores, impossibilitando a adsorção reversível dos fagos. Os valores não nulos poderão ser explicados por uma possível actuação de outras moléculas membranares com alguma actividade receptora.

A estirpe 168 produz predominantemente poli(Gro-P) e a estirpe W23 poli(Ribitol -P). O híbrido 168/W23 produz predominantemente poli(Ribitol-P) produzido pelos genes *tar* de W23 e ácido lipoteicóico da estirpe 168. Os resultados quase nulos dos complexos bactéria-fago ($K_{eq} = 0,27 A_{600}^{-1}$ para $T=0^\circ$ e $K_{eq} = 0$ para T ambiente), indicam que poli(Ribitol-P) glicosilado não funciona como receptor, não substituindo poli(Gro-P) nesta função.

DISCUSSÃO

Embora segundo Baptista *et al.*, 2008 a adsorção irreversível não se dê em mutantes *B.subtilis* em que *yueB* foi inactivado, os resultados obtidos sugerem o contrário. Uma explicação seria a estirpe utilizada, L16611, sendo diferente da utilizada 168 em São-José *et al.*, 2004 (L16601), possuir outro receptor funcional para o fago, para além de YueB, que neste caso seria menos eficiente, pois sem YueB a adsorção decresce bastante (Figs.1 e 2).

Esta explicação não é no entanto a mais credível, visto L16611 possuir como diferença apenas uma inserção do gene *erm* que codifica a proteína que confere resistência à eritromicina, no locus *amyE*, que por sua vez codifica a α -amilase, que não é essencial à viabilidade da bactéria.

A disrupção por inserções mutacionais com o vector nos outros genes do operão *yukE* que não *yueB* não afectaram muito a adsorção irreversível, mas tornaram-na menos eficiente. Destes outros genes, deverão haver alguns que possivelmente formam complexos necessários a uma ligação eficaz do fago e para dirigir o DNA viral através da membrana (YukB, YukC e YukBA). Os outros (YukE e YukD) poderão contribuir para a estabilidade destes complexos (São-José *et al.*, 2004). A função destes genes necessita no entanto de investigação para confirmação e especificação destas funções.

Precedendo e facilitando a adsorção irreversível do fago, vários polissacáridos glicosilados permitem a ligação reversível dos fagos SPP1 à parede celular de *B. subtilis*, uns com maior afinidade que outros, funcionando como um meio do fago mais eficientemente reconhecer o receptor YueB, de modo a se ligar irreversivelmente e infectar o hospedeiro. Este mecanismo dar-se-á a condições de temperatura ambiente, em que os fagos actuam apenas momentaneamente com os receptores reversíveis, ligando-se e desligando-se destes. Isto poderá possibilitar o deslocamento do fago pela superfície da parede até reconhecer o receptor YueB. Estirpes que não possuam enzimas responsáveis pelo sucesso da glicosilação dos ácidos teicóicos e outros receptores reversíveis, não permitirão esta estratégia, como revelado pelos valores dos complexos fago-bactéria reduzidos para *tagE* e *gtaC*. Para além disso poli(Ribitol -P) não é substituto de poli(Gro-P) enquanto receptor reversível, como demonstrado pela K_{eq} obtida para o híbrido 168/W23. Ao contrário de outros fagos no entanto, a adsorção reversível aos ácidos teicóicos não é essencial para o reconhecimento de YueB pelo fago, sendo sugerido por Baptista *et al.*, 2008 como um processo que apenas o deverá facilitar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baptista, C., Santos, Mário A., and São-José, C. 2008. Phage SPP1 Reversible Adsorption to *Bacillus subtilis* Cell Wall Teichoic Acids Accelerates Virus Recognition of Membrane Receptor YueB. *Journal of Bacteriology*. **190**: 4989–4996.

Bhavsar, A., Erdman, L.K., Schertzer, J.W. e Brown, E.D. 2004. Teichoic Acid Is an Essential Polymer in *Bacillus subtilis* That Is Functionally Distinct from Teichuronic Acid. *Journal of Bacteriology*. **186**: 7865-7873.

Calendar, R. 1998. *The bacteriophages*. New York: Oxford University Press.

Grauman, P. 2007. *Bacillus: Celular and Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press.

Mauël, C., Young, M., Monsutti-Grecescu, A., Marriott, S.A. e Karamata, D. (1994) Analysis of *Bacillus subtilis tag* gene expression using transcriptional fusions, *Microbiology*. **140**: 2279-2288.

Santos, M. A., Almeida, J., Lencastre, H. d., Morelli, G., Kamke, M., and Ttrautner, T. A. 1986. Genomic Organization of the Related *Bacillus subtilis* Bacteriophages SPP1, 41c, p15, and SF6. *Journal of Virology*. **60**: 702-707.

São-José, C., Baptista, C., and Santos, M. A. 2004. *Bacillus subtilis* Operon Encoding a Membrane Receptor for Bacteriophage SPP1. *Journal of Bacteriology*. **186**: 8337–8346.

