



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

**“Aislamiento y caracterización molecular de micobacteriofagos; sus aplicaciones
al estudio y diagnóstico de micobacterias patógenas”**

Presentada por Jorgelina Judith Franceschelli

Rosario, Argentina

2014

“Aislamiento y caracterización molecular de micobacteriofagos; sus aplicaciones al estudio y diagnóstico de micobacterias patógenas”

Jorgelina Judith Franceschelli

Lic. en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Rosario), durante el período comprendido entre el mes de abril de 2010 y noviembre de 2014, bajo la dirección del Dr. Héctor Ricardo Morbidoni.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Morbidoni, por haberme dirigido en este trabajo, por la confianza, por algunos “retos” a tiempo y por sus ganas inagotables de alcanzar nuevos objetivos. Gracias doc!

A todos y cada uno de los que formaron parte de este lab que crece día a día...los que me acompañaron desde el principio Juan, Emma, Marian, Sabri y VirF, y los que se fueron sumando en el camino Cristian, Ana, Cari, Nora, Nati, VirA y Ale, gracias por su aguante, por la ayuda desinteresada, por los consejos en el momento justo, por las picadas, las tortas y tantos mates compartidos...gracias por su amistad!

A la vida que me regalo en cada etapa una amiga incondicional que con el tiempo se fue transformando en hermana del alma... En esta etapa fuiste vos Vir Buchieri, gracias por estar en los momentos más feos y por compartir los más lindos, te quiero y te extraño hermana!

A mis hermanos, Clari y Juampi, gracias por quererme tanto y hacerme la vida más feliz con sus locas ocurrencias, los adoro! A mis otras hermanas del alma, a vos Gi porque me aguantas y me conoces como nadie, y a vos Ale gracias por aparecer en mi vida, las dos son un sostén para mí, las quiero y las necesito tanto!

A mis amigas todas! A Gabi, mi amiga de la infancia, a las del cole...la Jor, Vale, Gabi, Cin y la Ro..., las de la facu Ana y Flor, también a Marie y a Vale, gracias por alentarme siempre, por aguantar mis risas, mis lágrimas y mis monólogos! Las quiero!

A mi familia, mis primos, mis tíos, a cada uno de los Franceschelli, los Coviello, los Micheletti y los Álvarez, gracias por tanto cariño!

A ellos, las personas que hicieron que hoy sea quién soy...a mi mamá, mi papá y a mis abuelos, los elegiría una y mil veces porque son los mejores, sin duda alguna! Gracias por tanto amor, por tanto aguante y por la familia hermosa que somos!

A vos Pablito, gracias por ser mi amigo, mi consejero, mi compañero, mi cómplice, mi amante, mi todo! Gracias por tu paciencia infinita y por quererme así tan fuerte! Te necesito cerca, te amo tanto!

Gracias a Dios por la fuerza y por haberme rodeado de tanta gente linda!

A todas las personas que no nombré y también colaboraron conmigo para que mi Tesis hoy sea realidad, muchas gracias!

*A mi abuelo Cacho que me acompaño
cada día de este camino, desde algún lugar,
desde todos lados...*

1. <i>Abreviaturas</i>	1
2. <i>Introducción</i>	4
2.1 <i>Bacteriofagos</i>	5
2.1.1 <i>Generalidades</i>	5
2.1.2 <i>Descubrimiento y aplicaciones</i>	6
2.1.3 <i>Interacciones bacteriofagos-bacterias</i>	8
2.1.4 <i>Genómica</i>	10
2.2 <i>Micobacteriofagos</i>	11
2.2.1 <i>El hospedador: Género Mycobacterium</i>	11
2.2.2 <i>El huésped: Los micobacteriofagos</i>	12
2.2.3 <i>Aplicaciones: Estudio y lucha contra micobacterias patógenas</i>	14
3. <i>Objetivos</i>	17
3.1 <i>Objetivos Generales</i>	18
3.2 <i>Objetivos Particulares</i>	18
4. <i>Materiales y Métodos</i>	20
4.1 <i>Cepas Bacterianas, Vectores y Micobacteriofagos</i>	21
4.2 <i>Condiciones, Medios de Cultivo y Soluciones</i>	22
4.2.1 <i>Medios de cultivo para E. coli</i>	23
4.2.2 <i>Medios de cultivo y soluciones para micobacterias y sus bacteriofagos</i>	23
4.3 <i>Aislamiento, manipulación y caracterización de micobacteriofagos</i>	25
4.3.1 <i>Procesamiento de muestras</i>	25
4.3.2 <i>Infección de micobacterias</i>	25
4.3.3 <i>Detección de la presencia de fagos</i>	25
4.3.4 <i>Amplificación de los fagos</i>	25
4.3.5 <i>Titulación de los fagos</i>	26
4.3.6 <i>Influencia de la temperatura en la lisis</i>	26
4.3.7 <i>Determinación del tamaño genómico</i>	26
4.3.8 <i>Determinación de la morfología y tamaño de los viriones</i>	27
4.3.9 <i>Requerimiento de cationes</i>	27
4.3.10 <i>Rango de hospedador</i>	27
4.3.11 <i>Estudio de la naturaleza lítica-lisogénica</i>	27
4.3.12 <i>Análisis de la capacidad de realizar transducción generalizada</i>	28
4.4 <i>Manipulación de ADN y clonado de genes</i>	29
4.4.1 <i>Extracción de ADN cromosomal</i>	29
4.4.2 <i>Extracción de ADN para la realización de PCR de colonia</i>	29
4.4.3 <i>Preparación de ADN plasmídico</i>	29

4.4.4 Extracción de ADN de micobacteriofagos	30
4.4.5 Reacciones de PCR y cebadores utilizados	30
4.4.6 Clonado de productos de PCR	32
4.4.7 Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasas alcalinas	32
4.4.8 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa	33
4.4.9 Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa	33
4.4.10 Secuenciación de ADN	33
4.5 Preparación y uso de células electrocompetentes	33
4.5.1 <i>E. coli</i>	33
4.5.2 <i>M. smegmatis</i>	34
4.6 Análisis bioinformático de genomas de micobacteriofagos	34
4.7 Construcción de mutantes de <i>M. smegmatis</i> y sus bacteriofagos mediante recombineering	35
4.8 Caracterización de mutantes resistentes a bacteriofagos	36
4.8.1 Morfología de las colonias	36
4.8.1 Curvas de crecimiento	36
4.8.2 Preparación y análisis de lípidos extraíbles:	37
4.9 Análisis de posibles mecanismos de resistencia	37
4.9.1 Electroporación con fagos	37
4.9.2 Ensayo de adsorción	38
4.9.3 Curva de crecimiento de fagos	38
4.9.4 Ensayo de infección con el agregado FAS	39
5. Resultados y discusión	40
5.1 Capítulo 1: Aislamiento, caracterización y posibles aplicaciones de nuevos micobacteriofagos	41
5.1.1 Caracterización fenotípica de los nuevos micobacteriofagos	41
5.1.2 Análisis genómico de micobacteriofagos	51
5.1.3 Discusión	68
5.2 Capítulo 2: Caracterización de mutantes de <i>M. smegmatis</i> resistentes a micobacteriofagos	74
5.2.1 Mutantes espontáneas resistentes a distintos micobacteriofagos	75
5.2.2 Actividad oligoribonucleasa y replicación de bacteriofagos	80
5.2.3 Discusión	89
6. Conclusiones	95
7. Resumen	98
8. Referencias bibliográficas	100

1. Abreviaturas

ADS: albúmina-dextrosa-sal

Ap: ampicilina

CRISPR: regiones palindrómicas regularmente espaciadas

DO: densidad óptica

EFP: eficiencia de formación de placas de lisis

FAS: sulfato ferroso amónico

G+C: guanina-citosina

Gm: gentamicina

GPLs: glicopeptidolípidos

kb: kilobase

Km: kanamicina

MAB: 7H9 agar blando

Mbp: mega pares de bases

MNT: micobacteriano tuberculosa

MOI: multiplicidad de infección

ORF: marco abierto de lectura

ORN: oligoribonucleasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PFGE: electroforesis en campo pulsante

pb: par de base

PI: placa indicadora

p/v: peso en volumen

RDF: factor de direccionalidad

rpm: revoluciones por minuto

SEF: solución de elución de bacteriofagos

Sr: estreptomycin

UFP: unidad formadora de placa

v/v: volumen en volumen

7H9A: 7H9-ADS sólido

7H9B: 7H9 sólido para micobacteriofagos

7H9 ADS-GT: 7H9 líquido con el agregado de ADS, glicerol y tween

7H9 ADS-GCa: 7H9 líquido con el agregado de ADS, glicerol y calcio

7H9 GCa: 7H9 líquido con el agregado de glicerol y calcio

7H9 ST: 7H9 líquido con el agregado de succinato y tween.

v/v: volume en volumen

2. Introducción

2.1 Bacteriofagos

2.1.1 Generalidades

Los bacteriofagos o fagos son las entidades más abundantes y diversificadas sobre la tierra, dada su condición de parásitos obligados de sus hospedadores bacterianos, se encuentran en todos los ecosistemas poblados por bacterias, alcanzando una cifra cercana a 10^{31} en la biosfera [Breitbart y Rohwer, 2005]. Son capaces de infectar numerosos géneros de los dominios Eubacteria y Archaea, por lo que pueden definirse como “virus de procariotas” [Ackermann, 2001, 2012]. Diversos reportes dan cuenta de su presencia desde el suelo y los ambientes acuáticos [Jia *et al.*, 2007; Bergh *et al.*, 1989; Angly, 2006] hasta el tracto gastrointestinal de los humanos [Breitbart *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2013]. Estos organismos son extremadamente heterogéneos en cuanto a sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y biológicas; los viriones pueden presentar cola, ser poliédricos, filamentosos o pleomórficos. Las colas, formadas por módulos proteicos repetitivos, generan un canal a través del cual pasa el material genético, poseen estructuras terminales tales como fibras, espículas o una placa basal encargadas del reconocimiento y adsorción a la bacteria blanco. Las cápsides o cabezas están organizadas en capsómeros, ensamblados de 5 o 6 subunidades proteicas, y algunas presentan también componentes lipídicos [Ackermann, 2003]. La función de las mismas es resguardar el material genético, que para la gran mayoría de los virus procariotas consiste de una única molécula de ADN doble hebra, aunque un grupo más reducido de especímenes contienen en su lugar ADN simple hebra, ARN simple hebra o ARN doble hebra. A fines prácticos y de acuerdo a su morfología y tamaño, los bacteriofagos han sido clasificados en diferentes categorías, que incluyen 1 orden, 13 familias y 31 géneros. Según Ackermann hasta el momento se han analizado por microscopía electrónica más de 6300 bacteriofagos, 96% de los cuales presentan viriones con cola, constituyendo el orden *Caudovirales*. El mismo está integrado por 3 familias que se diferencian por las características que poseen las colas de los viriones, (i) *Myoviridae*, cuyos miembros poseen colas largas y contráctiles; (ii) *Podoviridae*, sus integrantes presentan colas cortas y no contráctiles; y (iii) *Siphoviridae*, la familia más numerosa cuya particularidad es que tienen colas largas y no contráctiles [Ackermann y Prangishvili, 2012].

Los bacteriofagos del orden *Caudovirales* pueden ser líticos o temperados, según el ciclo de vida que lleven a cabo; los primeros conocidos también como virulentos, sólo realizan el ciclo lítico, durante el cual el bacteriofago manipula a su hospedador de manera que éste disponga su metabolismo para replicar y ensamblar nuevas partículas fágicas. Una vez alcanzado un número umbral de viriones, éstos son liberados gracias a la acción de enzimas líticas (endolisinas) codificadas en el genoma fágico [Young, 2014]. Este proceso puede ser fácilmente observado cuando las bacterias están creciendo en medio sólido, ya que áreas claras (placas de lisis) aparecen donde hay grupos de células lisadas. Este mismo proceso puede ser ejecutado también por los fagos temperados pero sólo bajo ciertas circunstancias, ya que ellos son capaces de establecer una condición conocida como *lisogenia* durante la cual el ácido nucleico del bacteriofago se integra en el genoma de la bacteria hospedadora o se mantiene como un episoma estable

que se replica junto con el cromosoma bacteriano. En este estado, se expresan sólo unos pocos genes necesarios para mantener esta condición, mientras que la expresión del resto de los genes fágicos es reprimida [Ansaldi, 2012]. Los bacteriofagos temperados, que constituyen más del 50% del orden *Caudovirales*, pueden conferirle propiedades novedosas a la bacteria infectada, un fenómeno conocido como *conversión lisogénica*. Por otro lado, han sido reportados ciclos alternativos a los ordinarios de lisis o lisogenia, conocidos como *pseudolisogenia* y *estado de portador*. Si bien hay discrepancias entre ambos, el primero implicaría un estado de inestabilidad del genoma fágico en la célula hospedadora, mientras que en el segundo se establece un equilibrio estable entre bacterias y bacteriofagos. En este estado una proporción de bacterias son resistentes, pero siempre existe una cantidad de bacterias sensibles que garantizan la sucesión de los bacteriofagos [Ripp y Miller, 1997; Bastías *et al.*, 2010; Siringan *et al.*, 2014]. En todos los casos nombrados anteriormente el inicio de la infección para un dado bacteriofago requiere de la interacción específica entre la cola del mismo y receptores en la superficie de la célula hospedadora. Posteriormente esta unión altamente específica y reversible, se hace irreversible posibilitando la interacción del virión con la membrana celular para la translocación del material genético al citoplasma bacteriano. Diferentes estructuras en la envoltura celular de bacterias Gram positivas y negativas han sido descritas como probables receptores, entre ellas cápsulas, flagelos y pilis celulares [Ansaldi, 2014]; la disponibilidad de las mismas es una de las principales limitaciones en la determinación del rango de hospedador. Existen bacteriofagos capaces de infectar cepas, especies y hasta géneros bacterianos diferentes, mientras que otros tienen rangos más estrechos replicándose únicamente en una determinada especie. Algunos bacteriofagos tienen la habilidad de modificar los potenciales hospedadores a los que pueden infectar, ya que debido a mutaciones o al intercambio génico inter e intra-especie adquieren la capacidad de reconocer nuevos receptores. Este fenómeno juega un rol importante en la ecología de las interacciones fago-hospedador, modelando la diversidad microbiana en diferentes nichos [Sime-Ngando, 2014].

2.1.2 Descubrimiento y aplicaciones

Insólitamente los bacteriofagos fueron descubiertos dos veces a principios del siglo XX de manera independiente, Frederick Twort en 1915 y Félix d'Hérelle dos años después dieron cuenta de su existencia. Fue éste último quién acuñó el término *bacteriofago* que significa literalmente “que come bacterias” e ideó varias de las técnicas básicas para trabajar con estos virus que siguen vigentes hasta la actualidad. Además postuló la multiplicación intracelular de los mismos e introdujo la terapia fágica para el tratamiento de distintas enfermedades infecciosas. Sin embargo la naturaleza vírica de estas entidades biológicas pudo ser reconocida recién en 1940 gracias a la invención de la microscopía electrónica [Duckworth, 1976; Luria y Anderson, 1942]. Desde su descubrimiento han sido utilizados en varios campos de la investigación básica y aplicada, en un principio el interés por los mismos estuvo ligado a su uso como agentes terapéuticos [Brüssow, 2005, Kropinski, 2006], aunque con el advenimiento de los antibióticos fueron perdiendo terreno. Sin embargo, en la década del 50 se recobró el interés por estas entidades biológicas, ya que fueron utilizadas como organismos modelo en los estudios que permitieron

elucidar procesos celulares vitales como la replicación, transcripción y traducción de la información genética; y sentar las bases de una nueva disciplina, la Biología Molecular [Brenner *et al.*, 1961; Crick *et al.*, 1961; Jacob y Monod, 1961; Ellis y Delbrück, 1939; Luria y Delbrück, 1943; Hershey y Chase, 1952; Summers, 1999]. Debido a su habilidad para transmitir genes mediante *transducción*, años más tarde los fagos comenzaron a utilizarse para el mapeo cromosómico de genes, la combinación de alelos mutantes y finalmente para el desarrollo de vectores de clonado; ya sea a partir de fagos como λ que permite reemplazar pequeñas zonas no esenciales de su genoma con ADN exógeno, como también utilizando señales de reconocimiento fágicas para encapsidar construcciones genéticas en viriones [Zinder y Lederberg, 1953; Bertani y Weigle, 1953; Dussoix y Arber, 1962; Meselson y Weigle, 1961; Campbell, 1962; Signer y Weil, 1968]. Por otro lado los fagos han provisto una vasta cantidad de enzimas modificadoras de ADN, incluyendo polinucleótido quinasas, ADN ligasas, ADN polimerasas, ARN polimerasas, endo y exonucleasas entre otras, que son ampliamente utilizadas hoy en día como herramientas en el campo de la Biología Molecular [Zimmerman *et al.*, 1967, Gilbert y Dressler, 1968; Gottesman *et al.*, 1973; Humphries *et al.*, 1974; Rosenberg y Studier, 1987].

A pesar de los numerosos beneficios asociados a la investigación de bacteriofagos, los mismos transitaron nuevamente un período de poco interés académico hasta hace un tiempo. En los últimos años los estudios sobre bacteriofagos se han reanudado con fuerza, probablemente debido a que varios hallazgos demuestran que estos virus son importantes no sólo como elemento modelo para la investigación biológica básica sino que también juegan un rol ecológico preponderante y ofrecen potenciales aplicaciones en medicina y biotecnología. Los viriones enteros o sus proteínas derivadas han sido propuestos como vehículos de transporte en terapia génica, como alternativas a los antibióticos, y como herramientas para la búsqueda de proteínas y la detección de bacterias patógenas; siendo ésta última una de las prácticas más prometedoras [O'Flaherty *et al.*, 2009; Thyagarajan *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2007; Sabah *et al.*, 2013; Clark y March, 2006]. Además, dada la gran especificidad con la que los fagos reconocen a sus bacterias hospedadoras, han sido usados desde el comienzo para la tipificación de bacterias [Wassermann y Saphra, 1955; Hamilton y Brown, 1972]. Un procedimiento clásico, denominado tipificación mediada por fagos, que consiste en exponer a la bacteria o aislamiento en cuestión a una batería de fagos y luego analizar el patrón de lisis, es utilizado aún en la actualidad en estudios epidemiológicos [Roldgaard *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2014]. También numerosas estrategias diagnósticas han sido desarrolladas explotando todas las facetas de la interacción fago-bacteria hospedadora. Algunas dependen del reconocimiento y unión inicial del fago a la bacteria, mientras que otras requieren la expresión del material genético fágico dentro de la célula, o la propagación y liberación de la progenie hasta lisis la misma [Petty *et al.*, 2006; Ripp, 2009]. Entre los sistemas más difundidos se encuentran los fagos reporteros que llevan en su genoma genes codificando proteínas fluorescentes, como por ejemplo el sistema genético *lux* basado en la expresión de la enzima luciferasa derivada de *Vibrio harveyi*. Una vez dentro de la bacteria hospedadora, la proteína reportera es expresada y así la bacteria puede ser detectada mediante una señal fluorescente; de este modo han podido

identificarse exitosamente células de *Listeria monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales; entre otros patógenos [Loessner *et al.*, 1996]. Los bacteriofagos ofrecen ventajas con respecto a otros sistemas biológicos que generan interacciones específicas, como los anticuerpos, ya que los primeros son más resistentes a condiciones fisicoquímicas adversas y su producción es más económica. Además, los bacteriofagos líticos presentan una función dual capturando y destruyendo al patógeno en cuestión, confiriéndole seguridad biológica a las nuevas tecnologías. En los últimos tiempos ha sido propuesto el desarrollo de superficies funcionalizadas con bacteriofagos, no sólo para la producción de biosensores sino también para su uso recubriendo dispositivos médicos como prótesis o apósitos [Hosseinidoust, *et al.*, 2014]. Otra de las prácticas exitosas con bacteriofagos, implica mayormente el uso de fagos filamentosos en el diseño de una tecnología conocida como *phage display*, que ha jugado un rol preponderante en el desarrollo de péptidos antígeno específicos [Petty *et al.*, 2006]. Mediante esta técnica actualmente se están llevando a cabo desde la producción de anticuerpos recombinantes, como alternativa mejorada a los anticuerpos monoclonales, hasta la posibilidad de utilizar al bacteriofago M13 modificado genéticamente como material de partida para la regeneración de tejidos [Shukra *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2014]. Además las recombinasas codificadas por bacteriofagos que han sido usadas en un principio para la construcción de vectores de clonado, hoy en día se están utilizando para manipular genomas de organismos superiores, por ejemplo desarrollos recientes utilizan integrasas de los bacteriofagos PhiC31 y Bxb1 en la expresión de transgenes en células de mamífero [Keravala *et al.*, 2008]. Sin embargo, una de las aplicaciones más prometedoras de estas enzimas fágicas parece estar ligada al desarrollo de la biología sintética, una disciplina emergente cuyo objetivo es determinar el comportamiento de diferentes organismos y sus partes, para luego modificarlas y combinarlas manera de optimizar el desarrollo de tareas específicas como por ejemplo la búsqueda de nuevas drogas [Citorik *et al.*, 2014]. Por último otra de las proteínas codificadas por bacteriofagos, cuyas aplicaciones biotecnológicas parecen ventajosas, son las holinas. Estas proteínas forman poros en las membranas plasmáticas de las células procariotas actuando de manera concertada con las endolisinas, que de este modo pueden alcanzar la pared celular donde llevan a cabo su actividad hidrolítica que concluye con la lisis de la bacteria. La utilización potencial de las mismas en terapia génica contra el cáncer está siendo estudiada dado que ha sido probado que la holina codificada por el fago λ tiene efectos citotóxicos en células tumorales. Por otro lado, muchos microorganismos que son usados para producir diversos compuestos como drogas y biocombustibles, no cuentan con sistemas activos de eflujo para la liberación efectiva de los mismos, en estos casos la lisis mediada por holinas resulta una alternativa válida para superar dicho impedimento [Saier *et al.*, 2014].

2.1.3 Interacciones bacteriofagos-bacterias

Actualmente la comunidad científica ha aceptado sin controversias que la abundancia de virus es más alta que el total de la comunidad bacteriana en prácticamente todos los ecosistemas, aunque este fenómeno ha sido analizado con más profundidad en ambientes acuáticos [Jiang *et al.*, 2003; Mizuno *et al.*, 2013]. Este avance ha sido posible en gran parte debido al desarrollo de la metagenómica, que

implica el estudio del conjunto de genomas de un determinado entorno directamente a partir de muestras de ese ambiente, sin necesidad de aislar y cultivar especies [Rodríguez-Valera *et al.*, 2014]. Esto ha permitido también descubrir que gran parte de las bacterias están infectadas con bacteriofagos, por eso las interacciones entre ambas partes, bacteria-bacteriofago, y el rol de estos últimos en los nichos que integran han sido materia de estudio en los últimos tiempos. Si bien es relativamente poco lo que se conoce hasta el momento, hay evidencias que certifican que los fagos ejercen una presión significativa sobre su entorno controlando la densidad y la diversificación de sus potenciales hospedadores, principalmente mediante transferencia horizontal de genes [Weinbauer, 2004; Brüssow y Hendrix, 2002; Fuhrman y Schwalbach, 2003; Petersen y Dubilier, 2014]. Se ha encontrado, en un número creciente de bacterias patógenas, que los bacteriofagos juegan un rol bastante claro en la virulencia de las mismas, entre ellas *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum* y *Escherichia coli*; lo que pone en evidencia la importancia evolutiva de la relación virus-hospedador. Muchos fagos codifican en su genoma factores de virulencia como toxinas, por ejemplo la toxina del cólera es codificada por el fago filamentoso CTXphi [Abedon y Lejeune, 2005]; también pueden regular la expresión de ciertas toxinas como se demostró para *Clostridium difficile* [Govind *et al.*, 2009]. En la mayoría de los hábitats naturales una enorme cantidad de bacterias y sus virus están en un ciclo constante de co-evolución, durante el cual aparecen clones insensibles a ciertos bacteriofagos lo que ayuda a mantener los distintos linajes bacterianos. Al mismo tiempo emergen nuevos virus que intentan contrarrestar estos cambios e infectar a sus hospedadores modificados; así los bacteriofagos y los mecanismos de resistencia desarrollados por sus hospedadores juegan un rol clave en el control de las poblaciones bacterianas [Labrie *et al.*, 2010; Abeles y Pride, 2014; Chaturongakul y Ounjai, 2014]. Los problemas de salud pública relacionados al incesante aumento de cepas resistentes a antibióticos, especialmente para los géneros englobados bajo el acrónimo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*, junto con *Mycobacterium tuberculosis*, han colaborado en la re-emergencia de la terapia fágica y el uso de bacteriofagos o sus derivados como antimicrobianos [Howard, 2012; Drulis-Kawa, 2012; Lu y Koeris, 2011]. La principal ventaja de su uso radica en la especificidad de los mismos, la cual permite erradicar la bacteria patógena en cuestión evitando la disbiosis provocada inevitablemente por los antibióticos. En el caso de la terapia fágica, las ventajas y desventajas han sido y continúan siendo sujeto de estudio y debate, dado que hay detractores de su utilización especialmente cuando se considera su aplicación en humanos; siendo una de las críticas más relevantes la aparición de cepas resistentes a bacteriofagos [Jassim y Limoges, 2014]. Si bien una de las soluciones planteadas es el uso de cócteles de bacteriofagos, también se ha generado un interés por el entendimiento de los mecanismos de resistencia puestos en juego por los virus y sus respectivos hospedadores. Las bacterias pueden inhibir la propagación de un determinado bacteriofago en diferentes puntos del ciclo, (i) previniendo la adsorción; (ii) bloqueando la entrada de ADN mediante mecanismos de exclusión ; (iii) previniendo la replicación y/o integración por mecanismos de inmunidad a la superinfección llevados a cabo por profagos; (vi) degradando el ADN fágico por acción de los sistemas

de Restricción-Modificación (RM) y por un sistema descrito más recientemente basado en la agrupación de pequeñas regiones palindrómicas regularmente espaciadas distribuidas ampliamente en el genoma de las bacterias, denominado CRISPR (del inglés **C**lusters of **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**egions); y (v) bloqueando la replicación, transcripción, traducción y/o ensamblado de las partículas víricas por la acción de sistemas abortivos toxina-antitoxinas [Labrie *et al.*, 2010]. El mecanismo más común de resistencia a la infección por fagos es debido a la pérdida o enmascaramiento de los receptores, bloqueando el primer paso requerido para iniciar la infección. La participación de estos mecanismos es relevante en la determinación del rango de hospedador como se mencionó anteriormente para las distintas estructuras celulares que pueden actuar como receptores.

2.1.4 Genómica

Desde la publicación de la secuencia genómica del bacteriofago phiX174 en el año 1978 y a pesar de las nuevas tecnologías *high-throughput* en la actualidad las secuencias completas de bacteriofagos no alcanzan un gran número (1500 genomas), siendo mayoritarias las del género *Mycobacterium* y *Enterobacteriaceae* [Grose y Casjens, 2014; Hatfull, 2014]. Sin embargo, en los últimos tiempos y con la llegada de la metagenómica este número ha aumentado, se han detectado por ejemplo virus que infectan organismos no cultivables, y como consecuencia del Proyecto de Microbioma Humano se han encontrado inesperadamente un número importante de bacteriofagos en muestras de materia fecal [Yoshida *et al.*, 2013; Rodríguez-Valera *et al.*, 2014; Roux *et al.*, 2014; Dutilh *et al.*, 2014]. El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas no sólo ha revelado una gran diversidad genética, sino la presencia de un gran número de marcos abiertos de lectura (ORFs, del inglés **O**pen **R**eadin**G** **F**rames) sin homología alguna con el repertorio de proteínas presente en las bases de datos [Rohwer y Edwards, 2002; Yin y Fischer, 2008]. En general los fagos de la familia *Siphoviridae*, presentan características comunes en la arquitectura de sus genomas, ya que los genes se agrupan de acuerdo a sus funciones en bloques definidos. Por un lado se encuentran los genes estructurales que incluyen aquellos codificantes para las subunidades de cola y cápside, y los genes implicados en las funciones de ensamblado y lisis; junto con las subunidades de la terminasa; mientras que los genes involucrados en la replicación, regulación, recombinación e integración se ubican próximos entre sí [Casjens, 2005]. Otro rasgo sobresaliente en la genómica de bacteriofagos es la estructura en mosaico, es decir que cada genoma puede ser considerado una combinación única de módulos o mosaicos intercambiables entre la población de virus. Si bien esta particularidad no es exclusiva de bacteriofagos, ya que las bacterias adquieren información genética mediante transferencia horizontal de genes (transformación, transducción y conjugación), podría decirse que el mosaicismo en fagos es excesivo, y puede ser alcanzado por diferentes vías entre ellas la recombinación ilegítima [Hendrix, 2002].

Estos hallazgos hacen a los bacteriofagos atractivos desde todo punto de vista, más allá de sus potenciales aplicaciones tecnológicas en diferentes campos [Petty *et al.*, 2006]. Teniendo en cuenta que según distintas investigaciones han sido muestreados < 0,0002 % del *fagoma* o población de

bacteriofagos global, probablemente los mismos conformen el reservorio más grande de genes no explorados, cuyos productos podrían tener un alto impacto biotecnológico en los años próximos. En las últimas décadas los estudios sobre micobacteriofagos, fagos específicos del género *Mycobacterium*, han ayudado enormemente al entendimiento de la genética y fisiología de sus hospedadores como se describe en las siguientes secciones. Indudablemente estos virus seguirán proporcionando herramientas de incalculable valor para profundizar el conocimiento de este género bacteriano, que incluye especies de gran relevancia en salud pública como *M. tuberculosis*.

2.2 Micobacteriofagos

2.2.1 El hospedador: Género *Mycobacterium*

La familia *Mycobacteriaceae*, se encuentra incluida taxonómicamente en el orden Actinomycetales, clase Actinomycetes y está formada por un único género: *Mycobacterium*. Una de las características mínimas que debe poseer una especie para pertenecer a este género [Vincent Lévy-Frébault y Portaels, 1992], es la característica tintorial de ácido alcohol resistencia, es decir la resistencia de las células micobacterianas a la decoloración con ácido-alcohol luego de ser teñidas. Esta propiedad es producto de la presencia de los ácidos micólicos en su pared celular, ácidos grasos complejos que poseen entre 60 y 90 átomos de carbono. Las micobacterias son bacilos aerobios, ligeramente curvos o rectos (0,2-0,6 x 1,0-10 μm), no esporulados e inmóviles [Lengeler, et al., 1999]. Pueden ser bacterias saprófitas de vida libre, patógenas o potencialmente patógenas (oportunistas). *Mycobacterium smegmatis* es una de las especies utilizadas como modelo de estudio del género, se considera no patógena ya que raramente causa enfermedad, mientras que *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis humana, es responsable del mayor número de muertes por año a nivel mundial causadas por una infección bacteriana [Kontoghiorghie et al., 2014]. Dentro de las especies denominadas oportunistas, *Mycobacterium avium* se ha transformado en un serio problema para los sistemas de salud pública debido a un aumento en su incidencia de infección en pacientes inmunocomprometidos. Además se han descrito numerosos patógenos animales, como es el caso de *Mycobacterium marinum* que infecta peces cebra y es patógeno oportunista en humanos [Bonamonte et al., 2013]. Las distintas especies tienen diferencias marcadas en el tiempo de duplicación, el rango de temperatura y la temperatura óptima de crecimiento; pudiendo ser tan extremas como en el caso de *M. tuberculosis*. Esta última presenta un tiempo de duplicación de 18 a 24 horas a su temperatura óptima de 37°C y un rango de temperatura de crecimiento que va desde los 36 a los 41°C, mientras que *M. smegmatis* se duplica en 3 horas a su temperatura óptima de 42°C y puede crecer en un rango de temperaturas más amplio, entre 18 y 55°C [Shinnick y Good, 1994]. Una característica común a todas las micobacterias es su alta resistencia intrínseca a drogas, debida en gran parte a la envoltura celular rica en lípidos complejos y ácidos grasos. Los constituyentes principales de dicha envoltura son el esqueleto formado por las moléculas de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos; y los lípidos y glicanos extraíbles, unidos no covalentemente que estarían dispuestos como se muestra en la figura 2.1 [Daffé y Drapper, 1998]. Los glicolípidos que forman parte de la capa más

externa de esta compleja estructura les confieren a las micobacterias distintas características superficiales. La mayoría de las micobacterias no tuberculosas (MNT), como *M. smegmatis*, producen diferentes tipos de glicopeptidolípidos (GPLs). Estas moléculas comparten un core lipopeptídico que está glicosilado en distintos restos de aminoácidos, siendo el patrón de glicosilación el responsable de la naturaleza polar o apolar de los distintos GPLs. También se encuentran modificaciones sobre la cadena de ácidos grasos de los GPLs, pudiendo existir restos hidroxilados o metoxilados. Los genes involucrados en la biosíntesis de GPLs están organizados en grupos y son conservados en las MNT, ocupando un *locus* de alrededor 65 kb en *M. smegmatis*. Dado que ellos son un interesante blanco para el desarrollo de nuevas drogas contra el género *Mycobacterium*, han sido y continúan siendo extensamente estudiados. De esta manera se ha establecido que estos genes son responsables desde la síntesis del core peptídico y las cadena de ácidos grasos, incluyendo las modificaciones mencionadas más arriba, hasta el ensamblado de distintas enzimas sintetizadoras en la membrana celular y la exportación de los GPLs a la parte más externa de la envoltura [Billman-Jacobe, 2004].

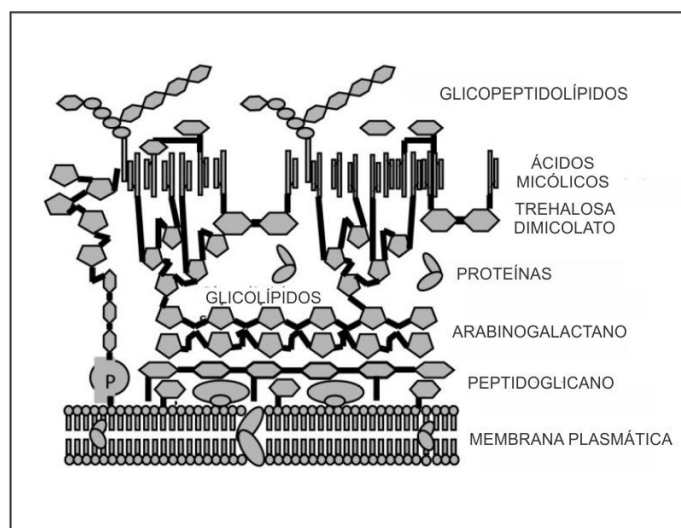


Figura 2.1. Esquema de la envoltura celular micobacteriana. (Adaptado de Fujiwara, 2012).

A pesar de los numerosos reportes que estudian la biogénesis de la gran cantidad de moléculas de envoltura, entre ellas GPLs, aún hay controversias sobre la disposición tridimensional de las mismas. A partir de imágenes de la envoltura celular de *M. smegmatis* obtenidas mediante tomografía crioelectrónica, se ha propuesto que la capa más externa de esta compleja envoltura se asemejaría a una bicapa lipídica; de esta manera las micobacterias tendrían una envoltura similar en morfología a la pared celular de la bacterias Gram negativas [Hoffmann *et al.*, 2008].

2.2.2 El huésped: Los micobacteriofagos

En 1947 fue aislado el primer micobacteriofago [Gardner, 1947] y desde entonces más de 5000 han sido identificados, aunque relativamente pocos habían sido estudiados en detalle hasta hace dos décadas, cuando el laboratorio dirigido por el Dr. Graham Hatfull emprendió un análisis minucioso

sobre estos virus [Pedulla *et al.*, 2003; Hatfull, 2014]. A partir del mismo, se conoce que la mayoría de los micobacteriofagos poseen ADN doble hebra como material genético, tienen una cabeza icosaédrica, y sus colas pueden ser rígidas o flexibles y de largo variable; de acuerdo a sus características morfológicas aproximadamente el 70% de ellos pertenecen a la familia *Siphoviridae* [Hatfull *et al.*, 2010]. Recientemente se ha publicado un estudio detallado de la estructura del micobacteriofago Araucaria, mediante ensamblado de imágenes obtenidas por microscopía electrónica y de fuerza atómica han podido observarse las estructuras involucradas en la adsorción y reconstruir la morfología completa del virión [Sassi *et al.*, 2013]. La primera secuencia nucleotídica completa de un bacteriofago ADN doble hebra infectante de un hospedador diferente a *E.coli* fue la correspondiente al micobacteriofago L5 [Hatfull y Sarkis, 1993]; en la actualidad los bacteriofagos de micobacterias son el grupo de virus con más genomas depositados en Genbank [Hatfull, 2014]. Al momento de la escritura del presente trabajo de Tesis existe información disponible a cerca de las secuencias génicas de 690 micobacteriofagos, de las cuales más de 400 se encuentran en Genbank [www.phagesdb.org]. Mediante un análisis de las mismas, Hatfull y colaboradores han establecido en primer lugar, la gran diversidad existente entre los miembros de este grupo, característica que no es exclusiva de los micobacteriofagos. Existen en la literatura análisis para otros bacteriofagos, entre ellos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, y de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, y también resultaron heterogéneos entre sí [Grose, 2014a; Grose *et al.*, 2014b]; contrariamente, en un estudio similar para catorce bacteriofagos del género *Propionibacterium*, se encontraron similitudes en términos de tamaño genómico, contenido G+C y porcentaje de identidad nucleotídica [Marinelli *et al.*, 2012]. Por otro lado, han realizado una categorización de los aislamientos analizados de acuerdo al porcentaje de similitud nucleotídica entre ellos. De esta manera si los genomas de dos o más micobacteriofagos presentan una coincidencia a nivel ADN igual o mayor al 50% pertenecen a la misma categoría o *cluster*, así han definido 21 *clusters* (A-U) y 9 *singletons*, definiendo como *singleton* a aquellos virus que no presentan similitudes con el resto [Hatfull, 2014]. Los integrantes de una misma categoría presentan características comunes no sólo a nivel de la secuencia nucleotídica, también en general, presentan medidas génomicas y morfométricas similares, un mismo comportamiento lítico-lisógeno y exhiben una alta homología en la organización de sus genes que es comparable para la mayoría de los *clusters* a la descrita en la sección 2.1.4. El contenido de G+C varía entre los diferentes *clusters* entre 56 y 69%, valores esperables considerando que los fagos en general presentan un contenido de G+C similar al de sus potenciales hospedadores [Hatfull 2010]. Los *clusters* A y B son los más populosos y el A es uno de los más diversos, sus integrantes han sido categorizados en más de 10 subgrupos o *subclusters* [www.phagesdb.org]. A pesar de que el género *Mycobacterium* comprende un gran número de especies que ocupan diversos nichos ecológicos, los micobacteriofagos aislados hasta el momento se han encontrado utilizando *M. smegmatis* como hospedador, con algunas excepciones como TM4 y DS6A [Timme y Brennan, 1984; Redmond y Carter, 1960]. Este último presenta un rango de hospedador estrecho ya que sólo es capaz de replicarse en *M. tuberculosis*, mientras que el micobacteriofago D29 es capaz de hacerlo tanto en micobacterias de crecimiento lento, como *M.*

tuberculosis y *Mycobacterium ulcerans*, y en otras de rápido crecimiento [Rybniker *et al.*, 2006; Jacobs-Sera *et al.*, 2012]. De la vasta cantidad de micobacteriofagos descritos sólo una pequeña fracción es capaz de infectar *M. tuberculosis*, y éstos pertenecen a un grupo reducido de *clusters*, entre ellos miembros del *cluster* K y algunos pertenecientes al *cluster* A (*subcluster* A2 y A3). Si bien existen varios mecanismos potenciales determinantes del rango de hospedador, poco se sabe de las barreras responsables de este comportamiento en micobacteriofagos. Éstas pueden residir desde diferencias en la envoltura celular que impliquen por ejemplo ausencia de receptores específicos, hasta en la imposibilidad de un cierto micobacteriofago de dirigir la síntesis de su ácido nucleico y proteínas, por diversas causas. Una de ellas podría ser producto de un mecanismo conocido como inmunidad a la superinfección conferido por la existencia de profagos en el genoma de la bacteria hospedadora; aunque esta condición es poco probable ya que *M. tuberculosis* H37Rv y sus derivados presentan dos secuencias de profagos “incompletos” que no codificarían para ningún represor [Cole *et al.*, 1998; Hendrix *et al.*, 1999]. Además, y a pesar de que *M. tuberculosis* contiene dos o tres loci CRISPR, las secuencias espaciadoras detectadas no coinciden con ningún fragmento de las secuencias genómicas de la colección de micobacteriofagos [He *et al.*, 2012]. Por último, no hay evidencias de la presencia de sistemas de restricción-modificación en *M. tuberculosis*; en cambio si existen en su genoma numerosos sistemas toxina-antitoxina aunque su potencial función en la resistencia a bacteriofagos no ha sido estudiada aún para este género bacteriano [Sala *et al.*, 2014].

Dentro de los puntos sobresalientes que se desprenden del análisis ambicioso impulsado por Hatfull, se encuentra la identificación de enzimas noveles con acción hidrolítica sobre componentes de la envoltura micobacteriana. Estas enzimas forman parte de los cassettes de lisis de la mayoría de los micobacteriofagos descritos, y tienen una actividad hidrolítica sobre la unión arabinogalactano- ácido micólico que le permiten a los nuevos viriones lisar a la bacteria en cuestión para liberar su progenie [Payne *et al.*, 2010]. Por otro lado, se han encontrado enzimas con actividad recombinogénica, a partir de las cuales se ha desarrollado un sistema de inactivación génica que permite reemplazar fragmentos en el cromosoma bacteriano como se describe en la siguiente sección [van Kessel y Hatfull, 2007].

2.2.3 Aplicaciones: Estudio y lucha contra micobacterias patógenas

Una de las primeras aplicaciones prácticas de los micobacteriofagos fue en microbiología clínica - los fagos de micobacterias han sido largamente usados para realizar tipificación de cepas-, sin embargo el mayor impacto desde su descubrimiento ha sido el papel que jugaron en el desarrollo de la genética micobacteriana [Mc. Nerney, 1999]. El avance en la comprensión de la fisiología de las micobacterias requirió del desarrollo de herramientas que permitieran la manipulación genética de este género; la utilización de tecnologías de ADN recombinante ha tenido un progreso lento con respecto a otros organismos; ya que por ejemplo los métodos usados para introducir ADN foráneo en bacterias como *E. coli* fueron impracticables en micobacterias de crecimiento lento. Esto es debido, por un lado a las dificultades en el transporte del ADN a través de la compleja envoltura celular descrita anteriormente; y

por el otro a la inestabilidad de la integración del ADN exógeno en el genoma micobacteriano. Los primeros desarrollos se basaron en un plásmido aislado de *Mycobacterium fortuitum* (pAL5000), el cual fue utilizado como vector para expresión de genes; más tarde un plásmido conteniendo una mutación que confería sensibilidad a alta temperatura fue utilizado como soporte para el clonado de transposones [Guilhot *et al.*, 1992; 1994]. Sin embargo, es con la introducción de micobacteriofagos como plataformas para construcción de vectores cuando los estudios adquieren facilidad, velocidad y éxito. Una de las características más sobresalientes de los bacteriofagos como herramientas genéticas es la eficiencia con la que pueden introducir ADN en las células bacterianas. Si el fago está presente en una relación fago-bacteria cercana a 3:1, cada bacteria dentro del cultivo será infectada; alcanzando una eficiencia más alta en comparación con métodos como electroporación o conjugación. El uso de mutantes temperatura-sensibles de los fagos L5 y TM4 permitió desarrollar sistemas de transposones de gran eficacia [Bardarov *et al.*, 1997]; más aún, utilizando estos fagos modificados genéticamente para acomodar cósmidos con insertos de gran tamaño de ADN cromosómico, se pudieron construir bibliotecas genómicas de alta representatividad de *M. tuberculosis* que permitieron secuenciar el genoma este patógeno [Cole, 1999]. La misma base técnica fue utilizada para eliminar genes del cromosoma de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*; lo que permitió la identificación de genes esenciales en estas bacterias [Bardarov *et al.*, 2002]. Más recientemente se han identificado mecanismos mediados por enzimas fágicas para la reparación y unión de ADN no homólogo, y las secuencias que definen los sitios de integración de fagos temperados al cromosoma. Esto último ha llevado a la construcción de nuevos vectores integrativos que permiten insertar en múltiples sitios del cromosoma copias únicas de más de un gen para estudios de regulación de la expresión génica [Gong *et al.*, 2005, Huff *et al.* 2010]. Por otro lado, a partir del descubrimiento de enzimas homólogas a RecE y RecT en el micobacteriofago Che9c se ha desarrollado la técnica de *recombineering* para micobacterias. Este sistema promueve la recombinación homóloga y hace más eficaz el intercambio alélico a partir de sustratos lineales en cepas micobacterianas de crecimiento lento y rápido, y también en micobacteriofagos [van Kessel y Hatfull, 2007; Marinelli *et al.*, 2012]. Recientemente Hatfull y colaboradores han aumentado la eficacia de esta técnica con la incorporación de ciertas modificaciones que evitan la electroporación de ADN; introduciendo el sustrato recombinogénico en la célula por medio de transducción especializada [Tufariello *et al.*, 2014].

Los micobacteriofagos también han sido fundamentales como herramientas diagnósticas en la identificación de *M. tuberculosis*, la enfermedad producida por este patógeno lejos de ser erradicada, está re-emergiendo principalmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo. La aparición de cepas multi- y extremadamente resistentes a drogas, así como también el incesante aumento de enfermos asociado a la pandemia causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH); exigen la implementación de métodos de detección rápidos y capaces de establecer el perfil de susceptibilidad a drogas del aislamiento clínico en cuestión [Laserson y Wells, 2007; Lawn y Wilkinson, 2006]. Recientemente, se han informado en Irán e India la detección de cepas resistentes a todas las drogas de primera y segunda línea en uso lo que agrava aún más la situación [Velayati *et al.*, 2009; Udwardia *et al.*,

2011]. Debido a su largo tiempo de duplicación la detección bacteriológica de *M. tuberculosis* por métodos convencionales necesita como mínimo de un mes para obtener el cultivo primario y de otro para determinar su resistencia a drogas. Los fagos son una alternativa válida para detectar la presencia y el patrón de resistencia a drogas de este microorganismo, reduciendo considerablemente los tiempos. Uno de los micobacteriofagos más utilizados para fines diagnósticos es D29. Como se mencionó anteriormente, este fago presenta un amplio rango de hospedador, de manera que *M. smegmatis* puede ser usada como bacteria indicadora para detectar la propagación de dicho fago en *M. tuberculosis*. Esta es la base técnica del ensayo conocido como PhaB (del inglés **phage-amplified biologically assay**), que permite acortar el tiempo de análisis del perfil de susceptibilidad a drogas de 40 a 4 días y abaratar considerablemente los costos, ya que no requiere equipos ni insumos sofisticados [McNerney, 2004]. Este sistema ha sido implementado para el análisis de resistencia a Rifampicina en el Instituto Nacional de Microbiología “Carlos G. Malbrán” así como también en este laboratorio; en ambos casos se obtuvieron excelentes resultados [Símboli *et al.*, 2005; de la Iglesia *et al.*, 2009; Stella *et al.*, 2009]. Los micobacteriofagos TM4 y L5 también han sido utilizados en la construcción de herramientas diagnósticas más complejas. Estos fagos a partir de una modificación genética tienen la habilidad de expresar el gen de la enzima luciferasa, encontrada normalmente en luciérnagas. En presencia del sustrato para esta enzima, luciferina, una bacteria infectada por alguno de los fagos recombinantes emitirá luz que podrá ser detectada por un luminómetro o un film fotosensible [Sarkis *et al.*, 1995; Hazbón *et al.*, 2003]. Hatfull y colaboradores han construido un derivado del fago TM4 que expresa la enzima GFP (del inglés **Green Fluorescent Protein**), lo que permite una eficaz detección de *M. tuberculosis* y un rápido análisis de su resistencia a drogas [Piuri *et al.*, 2009]. Recientemente estos autores introdujeron colas de afinidad en la cápside del nombrado micobacteriofago, lo cual facilita la purificación de las partículas fágicas y la captura de los complejos fago-bacteria necesarios para posteriores aplicaciones diagnósticas [Rondón *et al.*, 2013].

Si bien es sorprendente la información recabada en los últimos años sobre los fagos de micobacterias, son muchos los interrogantes pendientes especialmente en cuanto a la fisiología de estas entidades y la relación con sus hospedadores. Seguramente existan muchas facetas a explorar en la biología de los micobacteriofagos, especialmente su uso como partículas susceptibles de manipulación genética y química que abran las puertas al desarrollo de tecnologías innovadoras. La construcción de biosensores que mejoren la detección de micobacterias de importancia en salud humana y animal, así como también el diseño de nuevos sistemas que enriquezcan la investigación del género *Mycobacterium* están ligados indudablemente a la búsqueda y caracterización de nuevos bacteriofagos.

3. Objetivos

3.1 *Objetivos Generales*

Como objetivo general de este proyecto de Tesis Doctoral se planteó aumentar el número de aislamientos locales de micobacteriofagos a partir de muestras ambientales y continuar el estudio de los mismos, mediante su caracterización bioquímica y genética a través de secuenciación genómica, y análisis de las mismas utilizando herramientas bioinformáticas. Se estudiarán tanto los nuevos aislamientos como un grupo de micobacteriofagos aislados previamente en el laboratorio, entre ellos: First, 20ES, 21AM, 21AS, 32HC, 40AC, 40BC, 41HC, Mine, 19ES y 39HC. Además se evaluará el posible uso de estos nuevos virus para la construcción de vectores y/o herramientas de aplicación diagnóstica en la detección rápida de *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis humana. Por otro lado, se analizarán mutantes resistentes a micobacteriofagos locales para comenzar a desentrañar los mecanismos de resistencia puestos en juego por el género *Mycobacterium*. Además dado que una búsqueda de mutantes transposicionales resistentes a micobacteriofagos llevada a cabo por el Dr. Carlos Martín (Universidad de Zaragoza, España) arrojó que el gen *MSMEG_4724* estaría involucrado en este fenotipo, se plantea la construcción y análisis de la cepa de *M. smegmatis* mc²155 delecionada en dicho gen.

3.2 *Objetivos Particulares*

- 1- Aislar micobacteriofagos de suelo y agua utilizando *M. smegmatis* mc²155 como bacteria indicadora, determinando las características de ciclo (lítico o lisogénico) y la capacidad transductora de los nuevos aislamientos.
- 2- Analizar el rango de hospedador y definir la naturaleza lítica/temperada de los nuevos aislamientos capaces de infectar *M. tuberculosis* H37Rv, y aislar clones lisógenos para aquellos fagos que resulten temperados en dicha bacteria.
- 3- Caracterizar los micobacteriofagos obtenidos analizando la morfología de las placas de lisis generadas por los nuevos bacteriofagos a distintas temperaturas, determinar sus tamaños genómicos, y analizar estructuralmente sus viriones mediante microscopía electrónica.
- 4- Realizar la secuenciación genómica de los nuevos aislamientos, llevar a cabo el análisis bioinformático de los micobacteriofagos secuenciados mediante asignación de ORFs y relación evolutiva de los micobacteriofagos aislados por este grupo con respecto a la base de datos. Utilizar la información arrojada por la secuenciación en la identificación de componentes de potencial valor biotecnológico presentes en los nuevos micobacteriofagos.
- 5- Analizar mutantes de *M. smegmatis* mc²155 resistentes micobacteriofagos locales, para comenzar a elucidar los posibles mecanismos de resistencia e identificar receptores fágicos en esta especie.

- 6- Construir y analizar una mutante delecional de *M. smegmatis* mc2155 en el ORF *MSMEG_4724*, denominada Δ orn en el marco de una colaboración establecida con el Dr C. Martín; quién plantea que la ausencia de dicho gen genera resistencia a micobacteriofagos.
- 7- Hacer extensivo a todos los micobacteriofagos en estudio el análisis del comportamiento de los mismos sobre la mutante Δ orn.

4. Materiales y Métodos

4.1 Cepas Bacterianas, Vectores y Micobacteriofagos

Para la realización de este trabajo de tesis se utilizaron los vectores y micobacteriofagos detallados en las tablas 4.1 y 4.2, respectivamente y las siguientes cepas bacterianas:

- *E. coli*:

DH5 α : F-, Δ (argF-lac)169, ϕ 80dlacZ58(M15), Δ phoA8, glnV44(AS), λ -, deoR481, rfbC1?, gyrA96(NalR), recA1, endA1, thiE1, hsdR17

- *M. smegmatis*:

mc²155: mutante de alta eficiencia de transformación de plásmidos (fenotipo ept, del inglés efficient plasmid transformation) derivada de la cepa *M. smegmatis* mc²6 [Snapper *et al.*, 1990].

mc²155Sm^R: mutante espontánea resistente a estreptomicina aislada en el laboratorio.

Δ MSMEG_2630: mutante que presenta la inserción de un transposón en el gen *MSMEG_2630* [Kumar *et al.*, 2014].

Bio⁻4.4: mutante auxótrofa tiene los genes para biotina *bioA*, *bioF* y *bioD* por un cassette de resistencia higromicina [Stella, Tesis Doctoral 2014]

12-RI3/10-RBxz1/3-R20ES/2-R21AM/3-R21AS/6-RBahia1/2-R40AC: mutantes espontáneas resistentes a micobacteriofagos [Taselli, Tesina de grado 2011]

Myc55: mutante transposicional en el gen *MSMEG_0398* [Sondén *et al.*, 2005]

- *M. tuberculosis* H37Rv cepa de referencia perteneciente al cepario del laboratorio.
- *M. kansasii*
- *M. fortuitum*
- *M. abscessus*

Las MNT distintas a *M. smegmatis* fueron cedidas por la Dra. Lopez (ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”)

Vector	Descripción	Fuente o referencia
pCR®-BluntII-TOPO®	Vector de clonado (Km ^r)	Invitrogen
pLitmus28i	Vector de clonado (Ap ^r)	NEB
pAPA3	Contiene el cassette que confiere resistencia a gentamicina (Gm ^r)	Parish <i>et al.</i> , 2007
pJV53	Vector que contiene los genes gp60 y gp61 del micobacteriofago Che9c expresados bajo un promotor inducible por acetamida (Km ^r).	Van kessel y Hatfull, 2007
pMV361	Vector integrativo en micobacterias, permite la expresión simple copia de genes (Km ^r).	Stover <i>et al.</i> , 1991
pMV261	Vector replicativo en micobacterias ((Km ^r).	Stover <i>et al.</i> , 1991

Tabla 4.1. Plásmidos utilizados en este trabajo de Tesis.

Micobacteriofago	Fuente o referencia
D29	Ford <i>et al.</i> , 1998
TM4	Ford <i>et al.</i> , 1998
I3	Kozloff <i>et al.</i> , 1972
Bxz1	Lee <i>et al.</i> , 2004
Bxb1	Mediavilla <i>et al.</i> , 2000
Che9c	Gomathi <i>et al.</i> , 2007
Che9d	Gomathi <i>et al.</i> , 2007
Che12	Gomathi <i>et al.</i> , 2007
Che8	Gomathi <i>et al.</i> , 2007
L5	Oyaski y Hatfull, 1992
21AM/21AS/20ES/19ES/40AC/ 40BC/41HC/Mine/First/32HC/39HC	Stella, Tesis de Doctorado, 2013
21E/ACor1 a 5	Aislados recientemente en el laboratorio, sin caracterizar

Tabla 4.2. Micobacteriofagos utilizados en este trabajo de Tesis.

4.2 Condiciones, Medios de Cultivo y Soluciones

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) líquido o sólido. Para la preparación de células electrocompetentes se utilizó el medio Glucosa- Extracto de levadura- Triptona (GYT del inglés Glucose-yeast extract-triptone) [Sambrook y Russel, 2001].

Las distintas especies micobacterianas se cultivaron rutinariamente en medio Middlebrook 7H9 líquido o sólido, en ambos casos con o sin el agregado del suplemento ADS (albúmina, dextrosa, cloruro de sodio) utilizado al 10 % V/V. En los experimentos de inducción de la técnica de *recombineering* se utilizó medio 7H9 succinato-acetamida líquido, sin el agregado de ADS. Dado que las micobacterias poseen una notoria capacidad de agregación, a los medios de cultivo líquidos se les adicionó el tensioactivo Tween 80 en concentraciones que variaron entre 0,02-0,8 % V/V dependiendo de la especie micobacteriana utilizada.

Los antibióticos y concentraciones empleados para el crecimiento de las cepas que así lo requerían se detallan en la tabla 4.3 y fueron preparados según Sambrook y Russell, 2001. Las soluciones acuosas de antibiótico y el ADS se esterizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,22 µm; mientras que se utilizó esterilización por calor húmedo mediante autoclave para el resto de los medios y soluciones.

Antibiótico	Concentración µg/ml	
	<i>E.coli</i>	<i>M.smegmatis</i>
Ampicilina	100	---
Kanamicina	20	20
Gentamicina	10	5
Estreptomicina	---	20
Higromicina	50	150

Tabla 4.3. Concentraciones de antibiótico utilizadas.

A continuación se describe la formulación de los medios de cultivo y soluciones utilizadas.

4.2.1 Medios de cultivo para *E. coli*

Luria-Bertani (LB)

Agua destilada	1000 ml
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g

Medio GYT (para preparación de células electrocompetentes)

Agua destilada	900 ml
Glicerol	100 ml
Extracto de levadura	1,25 g
Triptona	2,5 g

4.2.2 Medios de cultivo y soluciones para micobacterias y sus bacteriofagos

Caldo Middlebrook 7H9, (composición en g/l)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,500
Na ₂ (HPO ₄)	2,500
K(H ₂ PO ₄)	1,000
Citrato de sodio	0,100
MgSO ₄	0,050
CaCl ₂	0,005
ZnSO ₄	0,001
CuSO ₄	0,001
Citrato férrico amónico	0,040
Acido l-glutámico	0,500
Piridoxina	0,001
Biotina	0,0005

ADS (composición en g/l)

Agua destilada	950 ml
Albúmina	50
Dextrosa	20
NaCl	8,1

Preparación de un litro de medio 7H9 ADS sólido (7H9A):

Agua destilada	890 ml
7H9	4,7 g
ADS	100 ml
Glicerol 50%	10 ml
Agar	15 g

Preparación de un litro de medio 7H9 sólido base para micobacteriofagos (7H9B):

Agua destilada	990 ml
7H9	4,7 g
Glicerol 50%	10 ml
CaCl ₂	2 ml
Agar	12 g

Preparación de un litro de medio Middlebrook 7H9 agar blando para micobacteriofagos (MAB):

Agua destilada	990 mL
Middlebrook 7H9	4,7 g
Glicerol 50% V/V	10 mL
CaCl ₂ 1 M	2 mL
Agar	6 g

Preparación de un litro de medio Middlebrook 7H9 ADS-glicerol-Tween 80 (7H9 ADS-GT):

Agua destilada	880 ml
7H9	4,7 g
ADS	100 ml
Glicerol 50% v/v	10 ml
Tween 80 20%	10 ml

En ciertos ensayos con bacteriofagos este medio fue suplementado con cloruro de calcio 2mM (7H9 ADS-GCa), sin el agregado de tensioactivo ya que esta reportado que el tween inhibe la adsorción de los micobacteriofagos a la célula blanco [Gadagkar RR y Gopinathan, 1978]. Cuando el ADS tampoco fue adicionado el medio se denominó 7H9-GCa.

Preparación de un litro de medio líquido 7H9 Succinato Tween 80 (7H9 ST):

Agua destilada	970 ml
7H9	4,7 g
Succinato 20% v/v	10 ml
Tween 80 20% v/v	10 ml

Este medio se adicionó con el inductor : acetamida 20% p/v.

Solución de Elución de Fagos (SEF), composición por litro:

Agua destilada	790 ml
NaCl 1 M	150 ml
Tris HCl 1 M pH 7,6	50 ml
MgSO ₄ 1 M	10 ml
CaCl ₂ 1 M	2 ml

4.3 Aislamiento, manipulación y caracterización de micobacteriofagos

4.3.1 Procesamiento de muestras

La búsqueda de nuevos fagos se realizó a partir de 30 muestras de suelo de distintas regiones del país, para ello se realizaron mezclas tomando 1 g de tierra procedente de cinco muestras distintas, los 5 g reunidos fueron resuspendidos en SEF. Las 6 muestras finales fueron agitadas mecánicamente con suavidad por 12 h, luego centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos y sus sobrenadantes filtrados por filtros esterilizantes de 0,2 μm de tamaño de poro; estos últimos fueron conservados a 4°C.

4.3.2 Infección de micobacterias

En todos los casos donde se utilizaron micobacterias para su posterior contacto con micobacteriofagos, estas fueron lavadas dos veces con Solución de Elución de Fagos (SEF) antes de incluirlas en el MAB o de ponerlas en contacto con la dilución apropiada de fago. De esta manera se elimina el tensioactivo evitando que se inhiban los pasos de infección de micobacteriofagos

Para lograr la infección de las micobacterias antes de incluirlas en el MAB, 100 μL de la micobacteria en cuestión se pusieron en contacto con la dilución adecuada de fago y se dejaron sin agitación por 30 minutos a temperatura ambiente. Para la preparación de placas indicadoras (PI), 4 mL de medio MAB mezclado con 100 μL de la micobacteria correspondiente fueron volcados sobre una placa 7H9B y una vez solidificados las placas estuvieron listas para su uso en la titulación de fagos.

4.3.3 Detección de la presencia de fagos

La presencia o no de fagos en cada muestra fue evidenciada mezclando 500 μL del eluido obtenido como se describe en el apartado 4.3.1 con 100 μL de cultivos estacionarios de *M. smegmatis*, agregando 4 mL de MAB mantenido a 56°C y vertiendo esta mezcla sobre placas de medio 7H9B. Las placas fueron incubadas a 30°C por tres días, pasado este período de tiempo se realizó la inspección visual de las mismas. En los casos donde se observó lisis, una placa de lisis de cada muestra fue clonada mediante remoción del agar del centro de la placa de lisis con palillos estériles y resuspensión en SEF. Luego de su elución por 4 h la muestra se centrifugó en microcentrífuga a 12.000 rpm y se filtró por filtros de esterilización de 0,2 μm .

4.3.4 Amplificación de los fagos

Los micobacteriofagos fueron propagados mediante adsorción de 10 μL de diluciones 1/10 V/V en SEF del eluido correspondiente y 100 μL de un cultivo logarítmico tardío de *M. smegmatis* o la micobacteria correspondiente. Luego de treinta minutos a temperatura ambiente, se agregaron 4 mL de MAB, se mezcló suavemente por inversión del tubo y se volcó sobre placas de medio 7H9B. Las placas fueron incubadas a 37 o 30°C, dependiendo del fago por 48 h con observación a las 24 y 36 h. En aquellas placas que mostraron lisis cuasi-confluyente los fagos fueron eluidos mediante el agregado de 4 mL de SEF por placa de Petri, dejándolos en contacto a 4°C con agitación suave por 12 h; luego de este tiempo

se removió el eluido y se filtró por filtros de esterilización de 0,2 μm . En estas condiciones se alcanzan títulos de fagos iguales o mayores a 10^{10} UFP/ml, utilizándose ésta como solución concentrada de fago las cuales son conservadas a 4°C.

4.3.5 Titulación de los fagos

La titulación se realizó por medio de gotas (*spot test*) de diluciones seriadas; las suspensiones de los fagos fueron diluidas 1/10 V/V en SEF y alícuotas (5 μL) fueron depositadas como gotas en la superficie de PI conteniendo la micobacteria correspondiente. Luego de incubación por 48 h, el título (Unidades Formadoras de Placa, UFP/mL) de la suspensión original de fagos se calculó de la siguiente manera: número de placas observada a la dilución más alta x factor de dilución x 200.

4.3.6 Influencia de la temperatura en la lisis

Para analizar la influencia de la temperatura en la replicación fágica, se realizó el ensayo de infección antes descrito utilizando diluciones de fagos apropiadas para obtener placas de lisis aisladas. Las placas fueron incubadas a tres temperaturas distintas (30, 37 y 42°C) y observadas cada 12 h con una lectura final a 48 h.

4.3.7 Determinación del tamaño genómico

La determinación del tamaño genómico de los fagos aislados se llevó a cabo mediante Electroforesis por campo pulsante en gel de agarosa (del inglés Pulse Field Gel Electrophoresis). La muestra de fago fue tratada dentro de tacos de agarosa ultra pura obtenidos mezclando 400 μL de muestra de fago con 400 μL de agarosa fundida 1,4% (P/V) en buffer TE 0,5X. Luego, 80 μL de la mezcla fueron colocados dentro del molde para permitir la formación de los tacos, que una vez solidificados fueron removidos para su posterior tratamiento. Los mismos fueron incubados a 55°C durante toda la noche en buffer de lisis (1% (P/V) N-lauril sarcosina, 0,2% (P/V) SDS) con el agregado de Proteinasa K (0,1 mg ml⁻¹). Se realizaron lavados sucesivos en buffer de lavado (20 mM Tris:HCl; 50 mM EDTA a pH 8.0) y por último los tacos fueron resuspendidos en 2 ml de buffer TE. El gel se realizó en agarosa 1% (P/V), y la corrida del mismo en buffer TBE (0,45M Tris borato, 0,01M EDTA) con los siguientes parámetros: 6 V cm⁻¹, 18 h, 2 s de ST (“switch time”) inicial, 10 s de ST final, con corriente menor 300 mA. En los casos donde se observó formación de concatémeros, los tacos de agarosa fueron tratados antes de ser colocados en las calles del gel durante 10 min a 80°C, e inmediatamente enfriados para su posterior corrida. Esta técnica se llevo a cabo en el Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar utilizando un equipo Chef- DR II, Biorad.

4.3.8 Determinación de la morfología y tamaño de los viriones

Se realizó microscopía electrónica de transmisión en los servicios ofrecidos por el Instituto de Biotecnología de INTA-Castelar y el CCT-Bahía Blanca (Conicet). Brevemente, una suspensión de viriones fue colocada sobre una grilla de nitrocelulosa recubierta con carbono y teñida con 2% (P/V) de acetato de uranilo o ácido fosfotungsténico para su posterior observación con los equipos Jeol 1200 EX II TEM o a TEM Jeol 100CXII a un voltaje de 85 KV, dependiendo del servicio. Las observaciones se hicieron utilizando aumentos de 50.000x y 140.000x.

4.3.9 Requerimiento de cationes

Para analizar el requerimiento de Ca^{2+} y/o Mg^{2+} durante la adsorción de los fagos aislados, se realizó un *spot test* utilizando las placas 7H9B y el MAB suplementados con diferentes concentraciones de cationes. Se ensayaron 4 condiciones; control (sin cationes), 10mM CaCl_2 , 10mM Mg Cl_2 y 10mM $\text{CaCl}_2/\text{Mg Cl}_2$. Las placas fueron incubadas a 30 o 37°C, dependiendo del fago en estudio, y observadas cada 12 h con una lectura final a 48 h.

4.3.10 Rango de hospedador

Para determinar la capacidad de cada fago de infectar y lisar distintas especies de micobacterias se procedió a crecer *M. smegmatis* mc²155 (utilizada como control), *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis* H37Rv en medio 7H9 ADS-GT hasta fase logarítmica tardía. Alícuotas de 500 μL de los cultivos fueron utilizadas como cepas indicadoras en el MAB; y posteriormente se colocaron 2 gotas de 5 μL conteniendo 10^3 y 10^7 fagos respectivamente por cada fago a probar. D29 fue utilizado como fago control. Las placas fueron incubadas por tres días para *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. kansasii*; y por quince días para *M. tuberculosis* H37Rv a 30 o 37°C, dependiendo de los fagos ensayados, con observaciones diarias en todos los casos. La interrupción del crecimiento de las micobacterias utilizadas luego del contacto con los fagos evidencia la infección y lisis bacteriana. Cuando los micobacteriofagos incapaces de replicarse a temperaturas mayores a 30°C fueron ensayados sobre *M. tuberculosis* H37Rv, las placas se incubaron a 30°C en una primera etapa y luego a 37°C para permitir el crecimiento de esta micobacteria.

4.3.11 Estudio de la naturaleza lítica-lisogénica

Se llevaron a cabo infecciones en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* con los fagos correspondientes de manera de obtener placas de lisis aisladas a partir de las cuales obtener células. Treinta placas de morfología similar de cada muestra fueron picadas con palillos estériles y transferidas a placas de medio 7H9A para permitir el crecimiento de las células supervivientes. Las placas de Petri fueron incubadas a 37°C por cinco días para *M. smegmatis* y un mes para *M. tuberculosis*, las colonias que crecieron fueron re aisladas mediante varios re piques en el mismo medio, y luego inoculadas en medio líquido 7H9 ADS-GT y crecidas a 37°C hasta fase logarítmica tardía. Los distintos clones aislados en *M. smegmatis* fueron

agrupados en (i) no sensibles al fago; (ii) sensibles al fago; y (iii) lisógenos para el fago mediante pruebas sencillas que se describen a continuación. Para diferenciar (i) y (ii) los clones fueron confrontados con el fago utilizado. Para ello se depositó una alícuota de 50 μ L de suspensión de cada fago en placas de medio 7H9B de forma tal de cubrir el diámetro de la placa de Petri. Una vez que la alícuota de fago se haya adsorbido, se cruzó una estría con 10 μ L de cada cultivo líquido, previamente lavados y resuspendidos en SEF, de manera tal que luego de la incubación se viera crecimiento bacteriano hasta la estría del fago y lisis o disminución del crecimiento luego de la misma como indicativo de sensibilidad al fago. Se conservaron aquellos clones que mostraron crecimiento en toda la estría aun después de haber entrado en contacto con el fago. Para determinar la naturaleza lisogénica de estos clones, alícuotas (30 μ L) de los diferentes cultivos de los posibles clones lisógenos, previamente lavadas, fueron sometidos a luz UV durante 60 s. Pasado este tiempo, cada alícuota fue depositado sobre PI, y posteriormente incubadas a la temperatura permisiva para el bacteriofago en cuestión, durante 24- 36 h para detectar la presencia de halos de lisis, en el caso de que el clon ensayado fuese lisógeno. Alícuotas de cultivos de *M. smegmatis* sin contacto previo a los fagos fueron irradiados de la misma manera y sirvieron de control de letalidad del tratamiento por UV, los ensayos para cada clon fueron realizados por triplicado.

El protocolo utilizado para *M. tuberculosis* H37Rv fue diferente ya que no se utilizaron cultivos líquidos de los posibles clones lisógenos, sino que a partir de los clones crecidos como parches sobre una placa de medio 7H9A se realizó el tratamiento con luz UV durante 60s. Pasado este tiempo se volcó MAB con células de *M. smegmatis* sobre los parches irradiados, las placas fueron incubadas a 37°C durante dos días para permitir el crecimiento de las células de *M. smegmatis* y evidenciar la presencia de placas de lisis.

4.3.12 Análisis de la capacidad de realizar transducción generalizada

4.3.12.1 Mediante pasaje de genes desde una bacteria dadora a una aceptora

Aquellos fagos que de acuerdo a sus características morfológicas resultaran potenciales transductores fueron propagados en la cepa Bio $\bar{4}$.4 (cepa dadora), y luego utilizados para realizar la infección de la cepa salvaje *M. smegmatis* mc²155 (cepa aceptora). Brevemente, la infección fue realizada a una MOI de 1 utilizando aproximadamente 10⁸ célulasceptoras resuspendidas en SEF, la mezcla fue incubada durante 4hs en agitación suave (60 rpm) a la temperatura permisiva para el fago en cuestión. Pasado este tiempo la mezcla fue centrifugada a 12.000 rpm, y el pellet resuspendido en medio 7H9-ADS-GT y posteriormente sembrado en placas 7H9A suplementadas con higromicina y biotina 100nM para permitir el crecimiento, si hubiere, de células transductantes.

4.3.12.2 Mediante detección por PCR de genes del hospedador en el ADN fágico

De acuerdo al protocolo diseñado por Sander y Schmieger, 2001; se utilizaron 10 ng de ADN fágico libres de ADN bacteriano como molde para llevar a cabo reacciones de PCR utilizando como cebadores dos ORFs del genoma de *M.smegmatis*.

4.4 Manipulación de ADN y clonado de genes

4.4.1 Extracción de ADN cromosomal

Las extracciones de ADN cromosomal de *M. smegmatis* se realizaron de acuerdo al protocolo publicado por Jacobs y Hatfull (2000). Se centrifugaron 10 ml de un cultivo saturado de la bacteria a 4000 rpm durante veinte minutos. El pellet obtenido se transfirió a un tubo eppendorf y se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (GTE, 50mM glucosa, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA y 5 lisozima mg/ml). A esta mezcla se le agregaron 50 µl de una solución 10 mg/ml de Lisozima y luego se incubó a 37°C durante toda la noche. Una vez realizada la incubación se adicionaron 100 µl de SDS al 10% p/v y 50 µl de una solución 20 mg/ml de proteinasa K, se mezcló por inversión y se incubó a 55°C entre 20- 40 minutos. Luego se adicionaron 300 µl de una solución 6M de NaCl (o bien 0,12 gr de la droga sólida), se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se le agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 v/v, se mezcló y luego se centrifugó durante 5 minutos a 10000.

4.4.2 Extracción de ADN para la realización de PCR de colonia

La técnica de PCR de colonia se realizó para la confirmación de clones transformantes tanto en *E.coli* como en *M. smegmatis*. Se tomó la colonia crecida en medio sólido mediante ansa estéril y se colocó en un tubo eppendorf al que previamente se le habían agregado 100 µl de agua deionizada estéril. Se homogeneizó la mezcla agua-colonia y se llevó el tubo a incubación en baño termostático a 100°C durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos y luego se tomó del sobrenadante la alícuota necesaria para la reacción de PCR (entre 5 y 10 µl).

4.4.3 Preparación de ADN plasmídico

Para las extracciones de ADN plasmídico en pequeña escala de *E. coli* se siguió el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001). Se inoculó una colonia de *E. coli* en 2,5 ml de medio LB en un tubo de 15 ml con el antibiótico adecuado. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Se tomaron 2 ml de la suspensión en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 12.500 rpm por 1 minuto. Se removió el sobrenadante y se centrifugó a la misma velocidad por 2 segundos, descartando el exceso de líquido. Se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis GTE (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8 25 mM), se agitó mecánicamente por 5 segundos e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregaron 400 µl de solución alcalina fresca (0,2 N NaOH, 1% v/v SDS), se mezcló por inversión 5 veces y se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7,5 M helado (pH 7.6) a la solución, se mezcló por inversión suave 5 veces y nuevamente se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la

mezcla a 12500 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de acetato de amonio 2 M (pH 7,4) al pellet, se agitó mecánicamente y se incubó en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol 70% v/v. Se removió el etanol por centrifugación y se dejó secar el pellet. Finalmente, se disolvió el pellet en 50 µl de agua destilada. Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para las reacciones de secuenciación se obtuvieron a partir del equipo provisto por Promega (Wizard Kit, Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante.

4.4.4 Extracción de ADN de micobacteriofagos

Para llevar a cabo la extracción de ADN los micobacteriofagos se amplificaron como se detalla en el punto 4.3.4 utilizando agarosa en lugar de agar para la preparación de las placas 7H9B y el MAB. Se tomaron 4 mL del lisado obtenido ($\sim 10^{10}$ UFP/ml), fueron centrifugados a 14.000 rpm durante 1h. El sobrenadante fue descartado y se agregaron al precipitado 600 mL de TE, la resuspensión se llevó a cabo sin agitación durante 2 h a temperatura ambiente, pasado este tiempo se realizó un tratamiento con la enzima DNase I a 37°C por 2 h para eliminar los ácidos nucleicos de *M. smegmatis*. Luego se adicionaron SDS a una concentración final de 15mg/mL y proteínasa K a 20µg/ml, la mezcla se incubó a 56°C por 2 h. Se realizaron extracciones sucesivas con fenol-cloroformo (50:50), y finalmente una extracción con cloroformo:alcohol isoamilico (24:1). Se midió el volumen de la fase acuosa resultante y se precipitó el ADN por agregado de un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó la mezcla toda la noche a -20°C. Por último se centrifugó a 4°C por 20 min a 14.000 rpm y se descartó el sobrenadante, el pellet fue lavado dos veces con etanol 70% V/V, secado y posteriormente el ADN fue resuspendido en 200 µl de agua miliQ incubado por 4 h a 37°C, para su posterior uso para PCR, secuenciación o transformación como se detalla más adelante.

4.4.5 Reacciones de PCR y cebadores utilizados

Las reacciones de PCR fueron utilizadas para la obtención de secuencias de ADN para distintas finalidades entre ellas: (i) amplificar ORFs determinados para su posterior secuenciación, (ii) determinar secuencias en los extremos de los genomas fágicos y (iii) clonar genes en los diferentes vectores de clonado utilizados. La mezcla general de reacción utilizada en 50 µl finales fue la siguiente:

- 2,5 µl de DMSO
- 1,0 de dNTPs (stock 10 mM)
- 5,0 µl de Taq buffer (stock 10X)
- 1,5 µl de MgCl₂ (stock 50 mM)
- 1,0 µl de oligo Fw (stock 30 pmol x µl⁻¹)
- 1,0 µl de oligo Rv (stock 30 pmol x µl⁻¹)
- 0,2 µl de Taq polimerasa (stock 5 U x µl⁻¹)

En el caso de las reacciones de PCR llevadas a cabo con enzimas PFU (PB-L) o Pfx (Invitrogen) no fue necesaria la adición de MgCl₂ a la mezcla de reacción dado que las soluciones buffer de estas enzimas contienen MgSO₄.

Los oligonucleótidos que se utilizaron para las diferentes reacciones de PCR se diseñaron a partir del banco de datos de la secuencia completa de *M. smegmatis* mc²155 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=mycobacterium+smegmatis+mc2+155>) o de las secuencias genómicas fágicas obtenidas en el presente trabajo. Se tuvieron en cuenta una serie de parámetros que se relacionan con su especificidad y eficiencia según Sambrook y Russell (2001) y el diseño se llevo a cabo mediante la utilización del software Clone Manager suite (Sci-Ed Software Software for the Molecular Biologist).

Cuando fue necesario, los oligonucleótidos fueron modificados agregando sitios de corte para enzimas de restricción en su extremo 5'; los mismos fueron sintetizados por IDT (Integrated ADN Technologies, EE.UU) y se detallan en la tabla 4.4

Oligonucleótidos	Secuencia	Descripción
Msmeg 4676Fw	CTGCTCGACTGTGCTCTTCACC	chequeo integración de pMV361-MSMEG_4724 y amplificación del ORF MSMEG_4676
Msmeg4676 Rv	ACGACGAGCGCGACCAAGACC	chequeo integración de pMV361-MSMEG_4724 y amplificación del ORF MSMEG_4676
Msmeg0392 Fw1	CCACGTCGTCGTCTTTCAG	amplificación y secuenciación del ORF MSMEG_0392
Msmeg 0392Fw2	CCCCTACTGGAACGATAC	secuenciación del ORF MSMEG_0392
Msmeg 0392Rv	ACGAGTGGCGATGGACGAG	amplificación y secuenciación del ORF MSMEG_0392
First Fw	TAAGCTGCTCACTATCGCATCG	completar la secuencia genómica de dicho micobacteriofago
First Rv	GTGTGGTAGCTCACGGATGAC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
32HCFw	GCTCTGACCTGCAATGATG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
32HCRv	ATCAGACGCCGATTCTCG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
Jolie2 Fw	TCTTGGCCGGCTTGGGAG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
Jolie2 Rv	GCGAACACGGCAACTGGATG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
41HC Fw	AAGCGTCACCGGAATCGGTC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
41HC Rv	TCCTCGAATGGGAGTTCATC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
40ACFw	CGGCTCGAGCATCCTTG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
40ACRv	TCCGGTGCCTTGACATCTCC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
20ESFw	TCGAGCATGCGTGCTGTTAG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
20ESRv	GACGACGACCACAGCATGAG	terminación la secuencia genómica de dicho micobacteriofago

CRB1Fw	CATTGTGGCCGGCTAATGCG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
CRB1Rv	CCGACTCTCCGATCGACTTG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
19ESFw	CGGCGGCGACACCGTATTC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
19ESRv	TCCAACCTCGGCGGCAAC	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
19ESRv2	ACAAGTACCCACCACTAGG	terminación secuencia genómica de dicho micobacteriofago
FirstFw-XbaI	<u>TCTAGATGCCTTCAGGTGTGCGATT</u> C	construcción mutante First Δ Par-PacI
FirstRv-PacI	<u>TTAATTAAGTCCCGTACAAATGACGAAGC</u>	construcción mutante First Δ Par-PacI
FirstFw-PacI	<u>TTAATTAAGAGCGCGATCATCGAAGAGC</u>	construcción mutante First Δ Par-PacI
FirstRv-AflII	<u>CTTAAGGTGCCACCTAACTACATAGC</u>	construcción mutante First Δ Par-PacI
4724UPFw	<u>GAATTC</u> CGGTTTGGCCAGCCCGGACAG	construcción mutante Δ orn y amplificación del ORF MSMEG_4724 para clonar en pMV361
4724UPRv	<u>TCTAGATGAGGTCCGCATCGGTCACCAG</u>	construcción mutante Δ orn
4724DNFw	<u>TCTAGACCACGGCGTTCGTCCCGCAG</u>	construcción mutante Δ orn
4724DNRv	<u>CTTAAGGAGTCGCGCGGTGTCGACTC</u>	construcción mutante Δ orn y amplificación del ORF MSMEG_4724 para clonar en pMV361
4724delFw	CTACCGGATGATCGACGTCAG	chequeo delección del ORF MSMEG_4724
4724delRv	TGGTACGGAATTGCGCTTATGG	chequeo delección del ORF MSMEG_4724
KanaFw	ATCTCTGATGTTACATTGCAC	chequeo presencia de plásmidos en <i>M. smegmatis</i>
KanaRv	TTCAACAAAGCCGCGTCCC	chequeo presencia de plásmidos en <i>M. smegmatis</i>

Tabla 4.4. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. En la tabla se describe la utilidad de cada cebador y su secuencia, sobre la cual se muestran subrayados los sitios de restricción cuando corresponde.

4.4.6 Clonado de productos de PCR

Para el clonado de productos de PCR se utilizó el sistemas de clonado TA de Promega en el plásmido pGEM-T-Easy, o el sistema de clonado para extremos romos de Invitrogen en el plásmidos pCR2.1 ZERO blunt TOPO. La ligación de los productos de PCR purificados, al vector, se realizó siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes (Promega o Invitrogen). Los productos de esta ligación fueron utilizados para transformar células competentes de E.coli DH5 α . Los clones que contenían los productos de PCR generaron colonias blancas en placas indicadoras de LB ampicilina, suplementadas con IPTG y X-gal.

4.4.7 Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasas alcalinas

Las digestiones con diferentes endonucleasas de restricción, ligaciones y tratamientos con fosfatasa alcalina de ADN plasmídico y genómico se realizaron en las condiciones recomendadas por los fabricantes (Invitrogen, Thermo, Promega y NEB).

4.4.8 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa

El ADN se mezcló con buffer de carga (6:1 v/v) tipo III y se depositó en los pocillos de un gel, sumergido en una cubeta con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8). El gel se preparó con agarosa al 0,8-1,5 % (p/v), según el tamaño del fragmento a separar, en TAE 1X. La electroforesis horizontal de ADN se realizó entre 50 y 100 voltios. Posteriormente el gel se tiñó en solución de Bromuro de etidio y se visualizó por exposición del gel a luz ultravioleta (260 nm). El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando como patrón el ADN del fago λ , digerido por restricción enzimática con HindIII o EcoRI/HindIII [Sambrock y Russel, 2001] o marcadores comerciales como 100 pb (PB-L). La concentración del ADN se estimó por comparación visual de las fluorescencias obtenidas para las muestras, con la obtenida para el marcador de peso molecular.

4.4.9 Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos de las digestiones enzimáticas y de las reacciones de PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.10 Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN de plásmidos y de fragmentos amplificados por PCR fueron determinadas en el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, ME, EE.UU. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqManII (DNASTAR Inc.).

La secuenciación de genomas completos de micobacteriofagos se realizó en la plataforma de Genómica y Bioinformática del INDEAR, la cual se encuentra equipada con el sistema de secuenciación de alto rendimiento 454 GS FLX+ Roche. El análisis de las mismas se llevó a cabo con las herramientas detalladas en el apartado 4.6.

4. 5 Preparación y uso de células electrocompetentes

4.5.1 *E. coli*

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se siguió el protocolo publicado por Sambrook y Russell (2001). Se inocularon 25 ml de medio LB con una colonia de *E. coli* y se incubó durante toda la noche a 37°C. Luego, estos 25 ml de cultivo se diluyeron en 500 ml de LB fresco que se incubaron hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,35-0,4. En este punto el cultivo se colocó en hielo por 15 minutos. A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó 15 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 500 ml de agua (volumen de cultivo de partida). Se centrifugó 20 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 250 ml de glicerol 10% v/v (mitad del volumen de cultivo de partida). Se centrifugó durante 20 minutos a 1000 g, se repitió el paso anterior utilizando 10ml de glicerol 10%. Por último, el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio GYT frío. Se midió la DO_{600nm} de una dilución 1 en 100 de esta última solución de células y se llevó a una

DO600nm de 80-120 en caso de ser necesario. La mezcla resultante se fraccionó en alícuotas de 40 μ l en tubos eppendorf que fueron mantenidos a -20°C para su posterior utilización. Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 10 a 100 ng de ADN en un volumen de 2 μ l. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad), fijando el pulso programado EC2 (2,5 kV). Luego de realizado el pulso se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalizada la incubación las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de medio, los cuales fueron sembrados en placas de medio LB sólido con los antibióticos correspondientes e incubados a 37°C durante toda la noche.

4.5.2 *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se realizó según Jacobs y Hatfull (2000). Se inocularon 50 ml de medio 7H9 ADS-GT con un volumen de cultivo saturado de la bacteria tal que luego de ser incubado durante toda la noche a 37°C se encuentre a una DO600nm de 0,5-1. En este punto el cultivo se colocó en hielo entre 10 minutos y 2 horas. A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C . Se centrifugó 15 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 50 ml (volumen de partida) de glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repitió dos veces. Por último, el pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de glicerol 10% y la solución fraccionó en alícuotas de 400 μ l en tubos eppendorf que fueron mantenidos a -20°C para su posterior utilización. Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 100 ng a 1 μ g de ADN en un volumen que no superó los 10 μ l. La electroporación se llevó a cabo en electroporador de Bio-Rad fijando el pulso de 2,5V y 25 μ F, con una resistencia de 1000 Ω . Inmediatamente después de realizado el pulso, se agregaron en la cubeta 2 ml de medio 7H9 ADS-GT que se trasvasaron a un tubo de 15ml. El tubo se incubó posteriormente con agitación durante 2 a 4 horas a 30°C o 37°C dependiendo de las condiciones del experimento. Pasado este tiempo se recuperaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de medio que se sembraron en placas de 7H9A con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 30 o 37°C durante 3 a 5 días. Cuando se utilizó para la electroporación ADN fágico las condiciones de siembra y recuperación fueron diferentes como se explica más adelante.

4.6 Análisis bioinformático de genomas de micobacteriofagos

Las secuencias fágicas provistas por INDEAR fueron analizadas con distintos programas bioinformáticos entre ellos: (i) Gepard, permite comparar secuencias nucleotídicas de genomas enteros; (ii) DNAMaster (disponible en <http://cobamide2.bio.pitt.edu>), herramienta para anotar genomas fágicos, el mismo incluye otros programas ampliamente utilizados (GeneMark, Glimmer, Aragorn and tRNA Scan SE); (iii) HHPred y PFAM permiten asignar funciones probables a las secuencias aminoácidas; (iv) HMMER, ClustalW y MEGA5 fueron utilizados para llevar a cabo estudios filogenéticos; (v) Tandem Repeat Finder program, utilizado para buscar secuencias repetitivas; (vi) BLAST, permite comparar

secuencias nucleotídicas y aminoacídicas y; (vii) TMHMM Server v2.0, utilizado para detectar dominios transmembrana.

4.7 Construcción de mutantes de *M. smegmatis* y sus bacteriofagos mediante recombineering

El sistema de recombineering descrito en la Introducción del presente trabajo permite aumentar la frecuencia de recombinación homóloga en micobacterias mediante la expresión de las proteínas recombinantes del micobacteriofago Che9c por medio de un sistema inducible. El protocolo publicado por Van Kessel (2008) consiste en: (i) preparación de la cepa recombinogénica; (ii) generación del sustrato recombinogénico (zona flanqueante del gen de interés río arriba- marcador de resistencia- zona flanqueante del gen de interés río abajo); y (iii) electroporación del sustrato en la cepa recombinogénica.

Para la preparación de la cepa recombinogénica se transformaron con el plásmido pJV53 (portador de las proteínas del fago Che9c, cuya expresión se encuentra bajo control de un promotor inducible por acetamida) las cepas de *M. smegmatis* a recombinar, según el protocolo de preparación de electrocompetentes y transformación descrito en la sección 4.5.2. La selección de clones transformados se realizó en placas de 7H9A suplementadas con kanamicina. Posteriormente se comprobó la presencia del plásmido mediante PCR del gen codificante para la resistencia. El sustrato recombinogénico se construyó de acuerdo con el tipo de mutante que se buscaba obtener. En este trabajo de tesis se planteó la construcción de las siguientes mutantes:

- *M. smegmatis* mc²155Δorn: para la construcción de la cepa delecional en el gen MSMEG_4724: (i) se amplificaron aproximadamente 500 pb corriente arriba y 500 pb corriente abajo de dicho ORF a partir de la cepa salvaje *M. smegmatis* mc²155; (ii) los fragmentos se clonaron a ambos lados de un marcador de resistencia para gentamicina en el vector soporte pLitmus28G; (iii) la construcción se digirió con enzimas de restricción y por electroforesis en geles de agarosa y posterior elución de la banda de ADN se separó el sustrato de recombinación; (iv) este fragmento fue utilizado para electroporar la cepa recombinogénica.
- FirstΔpar-Pac: para la construcción del micobacteriofago delecional en las regiones codificantes para los genes *parA* y *parB* con el agregado de un sitio de restricción para enzima PacI: (i) se amplificaron aproximadamente 200 pb corriente arriba y 200 pb corriente abajo de la zona a deleccionar del genoma de First; (ii) los fragmentos se clonaron sucesivamente en el vector soporte pLitmus28G generando el sitio de restricción PacI; (iii) la construcción se digirió con enzimas de restricción y por electroforesis en geles de agarosa y posterior elución de la banda de ADN se separó el sustrato de recombinación; (iv) este fragmento fue utilizado para electroporar la cepa recombinogénica junto al ADN salvaje de First.

La preparación de células electrocompetentes de las diferentes cepas portando el vector pJV53 se realizó según Jacobs y Hatfull (2000) con las modificaciones introducidas a partir del protocolo de *recombineering* (Van Kessel, 2008). Se inocularon 50 ml de medio 7H9 STw con un volumen de

cultivo saturado de la bacteria tal que luego de ser incubado durante toda la noche a 37°C se encuentre a una DO_{600nm} de 0,5. En este punto se adicionó acetamida y el cultivo se incubó a 37°C durante 3 hs para la inducción de las proteínas de recombinación. Transcurrido este tiempo se colocó en hielo por un mínimo de 10 minutos (sin exceder las 2 horas) y luego el cultivo fue tratado como se describe en 4.5.2 para obtener las alícuotas necesarias para la transformación. Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 500 ng a 1 μ g de ADN en un volumen que no superó los 10 μ l. La electroporación se llevó a cabo en electroporador de Bio-Rad fijando el pulso de 2,5V y 25 μ F, con una resistencia de 1000 Ω . Inmediatamente después de realizado el pulso, se agregaron en la cubeta 2 ml de medio 7H9 ADS-GT en la construcción de Δ orn, que se trasvasaron a un tubo de 15ml. El tubo se incubó posteriormente con agitación durante 4 horas a 30°C o 37°C dependiendo de las condiciones del experimento. Pasado este tiempo las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100ul de medio que se sembraron en placas de 7H9A con el agregado de gentamicina. Las placas fueron incubadas a 30 o 37°C hasta la aparición de colonias visibles. Cuando el ensayo de *recombineering* se realizó con micobacterifagos el sustrato recombinogénico fue electroporado junto con el ADN fágico, y la mezcla de transformación recuperada por dos horas a 37°C en medio 7H9 ADS-GCa, y luego combinada con MAB y células de *M. smegmatis* mc²155. Esta mezcla fue colocada sobre placas con medio 7H9B e incubadas hasta la aparición de placas de lisis, las cuales fueron chequeadas por PCR para detectar la mutación deseada. Se ensayaron además variaciones en las concentraciones relativas de células y ng de ADN fágico-sustrato recombinogénico utilizadas para la transformación.

4.8 Caracterización de mutantes resistentes a bacteriofagos

4.8.1 Morfología de las colonias

La cepa parental *M. smegmatis* mc2 155, las cepas resistentes espontáneas y la mutante obtenida por *recombineering* fueron crecidas en medio sólido 7H9A en presencia del colorante Rojo Congo (RC), a una concentración final de 100 μ g/ml. Las placas fueron incubadas por 5 días a 30 y 37°C, las colonias fueron estudiadas mediante la observación de las mismas utilizando una lupa ZEISS (modelo Stemi 2000) a diferentes aumentos.

4.8.1 Curvas de crecimiento

Se analizó el crecimiento en medio líquido 7H9 ADS-GT de la mutante obtenida por *recombineering* y de su cepa parental *M. smegmatis* mc2155. Se inocularon medios frescos con cultivos saturados de las cepas en estudio y fueron incubados a 37°C a 150 rpm hasta una Densidad Óptima (D.O) a 600nm inicial= 0,1 para analizar la transición de fase de latencia a fase exponencial de crecimiento y de un cultivo de D.O600nm= 0,8 para la transición de fase exponencial a fase estacionaria, y se siguió el crecimiento mediante medición de D.O600nm, tomando alícuotas cada tres horas (tiempo de duplicación

de la cepa parental), durante 12 hs cada uno. Las curvas se realizaron por triplicado observándose la misma tendencia en todas las repeticiones.

4.8.2 Preparación y análisis de lípidos extraíbles:

Las cepas analizadas fueron crecidas en 100 ml de medio 7H9 GCa en agitación máxima hasta saturación. Se centrifugaron las muestras a temperatura ambiente a 4500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, y el pellet con el menor contenido de líquido posible, fue guardado a 4°C para su posterior utilización. La extracción de lípidos a partir del pellet celular se llevó a cabo con igual volumen de mezcla de solventes que el volumen del cultivo de partida. Se realizaron 3 extracciones sucesivas, aumentando la hidrofobicidad del medio, de la siguiente forma:

- Primera extracción: Metanol/cloroformo 2:1
- Segunda extracción: Metanol/cloroformo 1:1
- Tercera extracción: Metanol/cloroformo 1:2

Luego de la incorporación de cada mezcla de solventes con agitación manual continua, se procedió a la incubación estática durante 12 horas a temperatura ambiente bajo campana y posterior secado en evaporador rotatorio. La cromatografía en capa delgada fue realizada utilizando placas de vidrio previamente activadas mediante incubación a 80°C por 20 min, siendo la fase estacionaria sílica G 60 y la fase móvil cloroformo/metanol 90:10 o cloroformo/metanol/agua 60:12:2. El revelado se llevó a cabo con α -naftol e incubación a 120°C de 15 a 30 min o hasta aparición de color.

4.9 Análisis de posibles mecanismos de resistencia

4.9.1 Electroporación con fagos

Las células electrocompetentes preparadas y transformadas con 100 ng de ADN fágico como se describió anteriormente, fueron recuperadas en medio líquido 7H9ADS-GCa en agitación a 150 rpm durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se procedió a mezclar todo el volumen de electroporación con 100 μ l de células de *M. smegmatis* mc2155 Sm^R previamente lavadas y resuspendidas en SEF, y con el MAB, incorporando luego la mezcla a placas de medio 7H9B suplementadas con estreptomicina. El agregado de células resistentes a estreptomicina y sensibles a micobacteriofagos es clave en este ensayo para independizarse de los pasos posteriores a la inyección de ADN en la replicación fágica, ya que cada célula que haya incorporado artificialmente ADN fágico y sea capaz de soportar la replicación de ADN fágico y los pasos posteriores del ciclo dará lugar a la formación de un centro infeccioso visible. En el caso de la mutante Δ orn cuando se llevo a cabo la electroporación de la misma la mezcla de transformación fue separada en dos alícuotas, una de las cuales se puso en contacto con *M. smegmatis* mc²155 Sm^R mientras que la otra se mezcló con células frescas de la mutante Δ orn y se sembró en placas sin antibiótico. Es válido aclarar que para confirmar la posibilidad de que las cepas resistentes utilizadas fueran

transformables, en todos los casos se llevo a cabo la electroporación de las mismas con el plásmido pMV261 como control.

4.9.2 Ensayo de adsorción

La cepa mutante analizada junto con la cepa control fueron crecidas en medio 7H9-ADS-GT, una vez alcanzada la saturación se largó un cultivo hasta $D.O_{600nm} = 1$, el mismo fue lavado para la eliminación del Tween 80, y diluído hasta una $D.O_{600nm} = 0.1$ utilizando el medio 7H9 GCa, los mismo se recuperaron en agitación a 150 rpm a 37°C por 1-2 hs. A partir de 5 ml de los cultivos obtenidos se llevó a cabo la infección con el fago correspondiente (utilizando la cantidad adecuada de fago para alcanzar una MOI igual a 0.0005). Se realizaron dos controles, uno con el fago sin agregado de células, para determinar la estabilidad del mismo en el medio de infección, y el control de adsorción del fago con la cepa *M. smegmatis* mc²155. Se tomaron alícuotas (600 ul) cada 10 minutos durante 40 minutos totales; estas fueron centrifugadas durante 1 min a 12000 rpm para lograr la separación de los fagos no adsorbidos de los que se han adsorbido y quedan en el pellet celular. Del sobrenadante obtenido en cada punto se tomaron alícuotas de 50 ul que fueron sembradas con ansas descartables sobre una PI. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 hs, hasta observación de placas de lisis, se procedió al recuento de UFP, y se graficó % de fagos no adsorbidos vs. Tiempo. El análisis se realizó por triplicado, obteniendo la misma tendencia en las repeticiones.

4.9.3 Curva de crecimiento de fagos

Para determinar los tiempos de latencia y el tamaño de estallido de micobacteriofagos en distintas se realizaron curvas de crecimiento, para ello se crecieron las células correspondientes en medio 7H9ADS GT hasta una $DO_{600nm}=0,6$, luego fueron lavadas y resuspendidas en medio 7H9 GCa. Una alícuota de las mismas fue utilizada para llevar a cabo la infección con el micobacteriofago ensayado a una MOI de 0,1 en 500 µl finales, la mezcla fue incubada a la temperatura permisiva para el fago en cuestión sin agitación durante 40 minutos. Pasado este tiempo se agrego sulfato ferroso amónico (FAS) a una concentración final de 30mM, se dejo actuar durante 1 minuto e inmediatamente la mezcla fue colocada en 100 ml de medio 7H9 GCa e incubada a la temperatura correspondiente en agitación suave (60 rpm). A partir de este momento, considerado tiempo cero, se tomaron alícuotas de 100µl a intervalos de tiempo entre 15-30 minutos, las mismas o sus diluciones correspondientes fueron sembradas con ansas descartables sobre PI e incubadas a la temperatura indicada hasta observación de placas de lisis. Se procedió al recuento de UFP, y se graficaron las UFP/ml en función del tiempo. El análisis se realizó por triplicado, obteniendo la misma tendencia en las repeticiones para los micobacteriofagos ensayados. La sal FAS actúa como virucida, así todos los fagos que no se hayan adsorbido e inyectado su material genético en una célula serán eliminados, y no influyen en el recuento de UFP.

4.9.4 Ensayo de infección con el agregado FAS

Se llevó a cabo la infección de micobacterias a una MOI de 0,12 en medio líquido 7H9 GCa, para ello se pusieron en contacto la cepa salvaje *M. smegmatis* mc²155 o la mutante en estudio con la dilución adecuada de fago y se incubaron sin agitación por 40 minutos a la temperatura permisiva para el micobacteriofago en cuestión. Pasado este tiempo se agregó FAS a una concentración final de 30mM, se dejó actuar durante 1 minuto e inmediatamente la mezcla fue separada en dos alícuotas. Ambas fueron mezcladas con MAB conteniendo 100 μ L de la cepa salvaje para una de ellas y 100 μ L de la cepa mutante para la otra, las mezclas fueron luego volcadas sobre una placa con medio 7H9B e incubadas hasta la aparición de placas de lisis, para el posterior recuento de las mismas.

5. Resultados y discusión

5.1 Capítulo 1: Aislamiento, caracterización y posibles aplicaciones de nuevos micobacteriofagos

Los bacteriofagos pueden ser aislados a partir de muestras ambientales en las cuales estén presentes su hospedador correspondiente o especies relacionadas, generalmente pertenecientes al mismo género bacteriano. Dado que existen en la naturaleza numerosas especies de micobacterias saprófitas, sus virus hospedadores pueden aislarse fácilmente a partir de muestra provenientes de suelo o agua, utilizando *M. smegmatis* mc²155 como cepa indicadora. En el laboratorio se han realizado búsquedas sucesivas de micobacteriofagos en el marco de otros trabajos [Stella Tesis Doctoral 2014, Franceschelli Tesina de Grado 2010]. Cuando los aislamientos arrojados por la primera búsqueda, denominados First, 20ES, 21AM, 21AS, 32HC, 40AC y 19ES fueron analizados en función de la temperatura, se observó que las placas de lisis que originaban presentaban mayor tamaño a temperaturas menores a 37°C, temperatura utilizada en la búsqueda. Considerando que algunos bacteriofagos generan placas de lisis muy pequeñas, difíciles de visualizar sobre un césped de bacterias se ha implementado una temperatura de 30°C para las búsquedas futuras. Así en una segunda ronda pudieron encontrarse los micobacteriofagos 40BC, Mine, y 39HC, que sorprendentemente fueron incapaces de replicarse a temperaturas mayores a 30°C. El uso de esta simple estrategia fue de gran utilidad, ya que ha permitido incrementar el número de aislamientos, dado que de otro modo ciertos micobacteriofagos no hubiesen sido detectados.

5.1.1 Caracterización fenotípica de los nuevos micobacteriofagos

En el presente trabajo se analizaron 30 muestras de suelo de diferentes regiones del país recogidas en lugares donde hubiera materia orgánica en descomposición. Las muestras fueron agrupadas según su región de procedencia, y tratadas para la detección de micobacteriofagos utilizando 30°C como temperatura de búsqueda y *M. smegmatis* mc²155 como bacteria indicadora. En cuatro de los seis grupos analizados se detectó la presencia de placas de lisis, en tres de estos grupos se observaron placas de lisis homogéneas en tamaño, mientras que en el restante se vieron morfologías de placas claramente diferentes; debido probablemente a la mezcla de bacteriofagos o a la presencia de un fago que genere placas heterogéneas. Cada una de estas placas fue purificada mediante clonado de placas de lisis y posterior propagación; así se obtuvieron siete micobacteriofagos que fueron denominados como Hosp, Jolie1, Jolie2, CRB1, CRB2, Bahia1 y Bahia2. En la tabla 5.1 se describen las características de las placas de lisis de los nuevos aislamientos a 30°C. De acuerdo a la turbidez de las mismas, la mayoría de estos fagos serían virulentos en *M. smegmatis* mc²155. Algunos de ellos generaron placas de lisis que presentan un halo más turbio rodeando a un centro más claro o lítico, esto podría estar indicando la presencia de enzimas líticas producidas por el fago, que son liberadas durante la lisis celular y difunden alcanzando células más alejadas que no son activamente infectadas. Un fenómeno común entre

bacteriofagos causado probablemente por dichas enzimas, es la aparición de halos alrededor de las placas de lisis aún cuando las células que forman el césped han entrado en fase estacionaria. En este sentido, cuando las placas de Petri fueron incubadas a 30°C durante 15 días no se observaron cambios en el tamaño de las placas de lisis para ninguno de los fagos aislados, indicando que presentan un comportamiento similar al de la gran mayoría de los micobacteriofagos, ya que la expansión de halos sobre células que no están creciendo activamente ha sido reportada sólo para el micobacteriofago Bxb1 [Mediavilla, 2000].


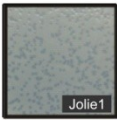
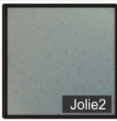
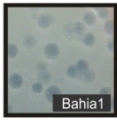



Placas de lisis a 30°C	Descripción
	placas claras, homogéneas en tamaño (diámetro 1,5mm)
	placas claras homogéneas en tamaño (diámetro 2mm)
	placas turbias homogéneas en tamaño (diámetro 1 mm diámetro)
	placas heterogéneas en turbidez, tamaño homogéneo (diámetro 6mm)
	placas claras, tamaño muy pequeño (diámetro menor a 1mm)
	placas turbias no homogéneas en tamaño (diámetro entre 1 y 1,5 mm)
	placas no homogéneas en tamaño (diámetro entre 4-5mm), presentan un centro más claro rodeado de un halo turbio

Tabla 5.1 Descripción de las placas de lisis generadas por los nuevos aislamientos a 30°C.

5.1.1.1. Influencia de la temperatura en la propagación de micobacteriofagos

Como se mencionó anteriormente los micobacteriofagos encontrados en búsquedas previas realizadas en el laboratorio, mostraron que la morfología de las placas de lisis que originaban se veía modificada por la temperatura, la mayoría de ellos fueron capaces de producir placas de lisis a 37°C aunque de menor tamaño que las generadas a 30°C, y ninguno de ellos produjo placas a 42°C. Se

procedió entonces a estudiar este fenómeno en el nuevo grupo de micobacteriofagos, realizando la infección de *M. smegmatis* mc²155 con cada fago a temperatura ambiente e incubando posteriormente las placas a 30, 37 y 42°C por 24- 48 h. Los resultados obtenidos indican que estos nuevos fagos presentan un comportamiento similar a los anteriores frente a la temperatura, ya que sólo dos produjeron placas de lisis a 37°C (CRB1 y Bahía1), mientras que ninguno fue capaz de lisar *M. smegmatis* mc²155 a 42°C. La figura 5.1 muestra la morfología de las placas de lisis a las diferentes temperaturas para los fagos Bahía1 y Jolie2; las placas formadas por Bahía1 a 37°C son claramente más pequeñas, mientras que Jolie2 es incapaz de replicarse a temperaturas mayores a 30°C.

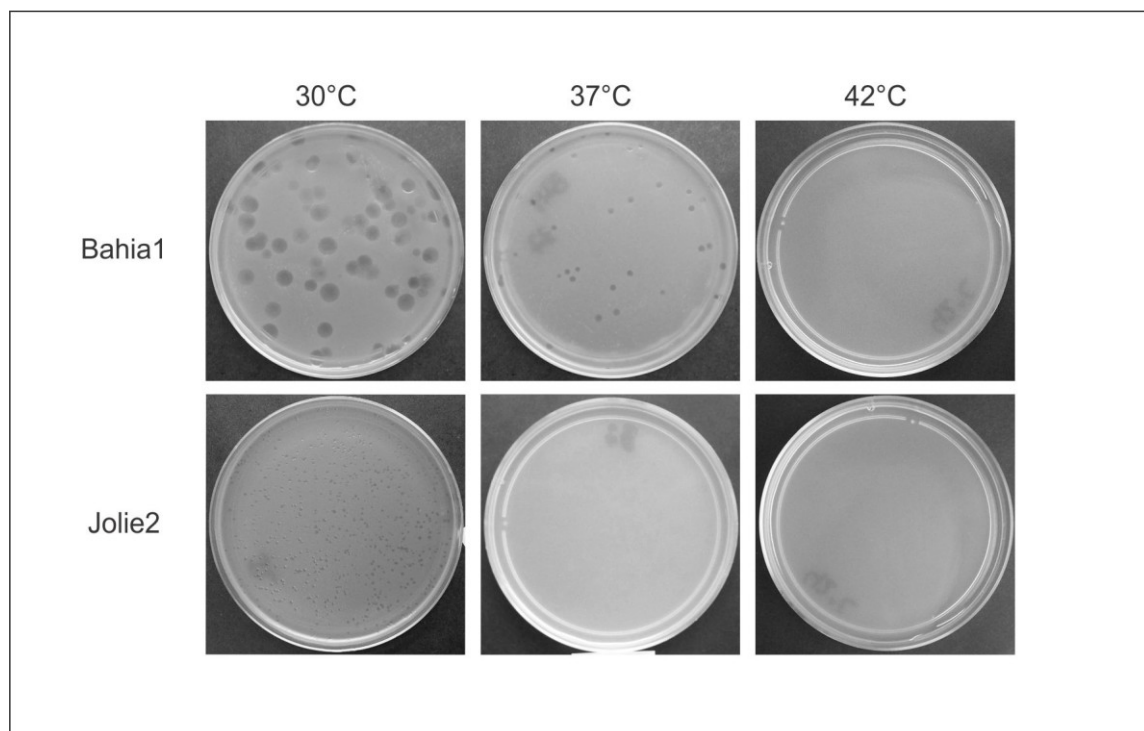


Figura 5.1. Morfología de placas de lisis a distintas temperaturas para los micobacteriofagos Bahía1 y Jolie2. Los mismos fueron propagados a 30, 37 y 42°C en *M. smegmatis*.

Durante la formación de las placas de lisis, los principales determinantes del tamaño de placa son las características intrínsecas a cada fago: período de latencia, tamaño de explosión, velocidad de adsorción y difusión. También juegan un rol importante las características del cultivo y las condiciones de siembra [Abedon, 2009]. Es claro, por ejemplo, que la concentración de agar usada en el MAB afecta considerablemente la movilidad del fago de manera que si la concentración es alta, el fago difundirá menos y las placas de lisis serán más pequeñas. El efecto de la temperatura no es tan sencillo de describir, ya que es multicausal. Por un lado los cambios de temperatura podrían modificar cinéticamente los parámetros del fago antes mencionados, y/o generar cambios cuali- o cuantitativos en el entorno del receptor o en la concentración de las diferentes moléculas que forman la compleja envoltura celular de las micobacterias y que actúan como receptores para micobacteriofagos. Además es bien conocido que si las

bacterias crecen más lentamente -por ejemplo por limitación de nutrientes o exposición a temperaturas muy distintas de las temperaturas óptimas de crecimiento- la propagación de bacteriofagos tiende a aumentar. Si bien esto justificaría los cambios de tamaño de las placas de lisis a 30 y 37°C, no explica la imposibilidad que presentan la mayoría de los micobacteriofagos aislados de generar placas a 37°C y de todos ellos de formar placas a 42°C. Es importante señalar que este ensayo fue realizado por triplicado, y además se llevó a cabo con lisados de fagos provenientes de diferentes amplificaciones. Es decir que los diferentes fagos fueron propagados varias veces usando *M. smegmatis* mc²155 como hospedador en el transcurso de este trabajo. Si bien las morfologías de las placas de lisis fueron estables para la mayoría de los aislamientos, dos de ellos, Jolie1 y Bahial mostraron morfologías claramente diferentes después de las sucesivas propagaciones. El micobacteriofago Jolie1 cuando fue aislado y durante la primera amplificación originó placas de lisis turbias de aproximadamente 4 mm de diámetro, y luego de las sucesivas propagaciones en *M. smegmatis* mc²155 el tamaño de las placas se redujo a 2 mm de diámetro y las mismas fueron más claras a 30°C. Los cambios en las placas de lisis para el micobacteriofago Bahial fueron más drásticos; mientras que las placas originadas en los primeros ensayos fueron claras y de 4 mm de diámetro; después se obtuvieron placas de lisis de mayor diámetro -aproximadamente 6mm- y heterogéneas en turbidez -turbias y claras- a 30°C, como puede observarse en la figura 5.1. Además Bahial no generó placas a 37°C durante los primeros ensayos. Según estos resultados, es probable que *M. smegmatis* mc²155 no sea el hospedador “natural” para algunos de los fagos aislados, y que durante las sucesivas amplificaciones se hayan seleccionado aquellas poblaciones de micobacteriofagos que han adquirido alguna mutación que les permita una replicación más exitosa en esta cepa. Sin embargo debido a razones económicas no se ha realizado el análisis de las variaciones en los genomas fágicos a través de las sucesivas amplificaciones.

Durante el presente trabajo de Tesis se llevó a cabo el análisis de micobacteriofagos aislados previamente (First, 20ES, 21AM, 21AS, 32HC, 40AC, 41HC, 19ES, Mine ,40BC y 39HC) y de los nuevos aislamientos denominados Hosp, Jolie1, Jolie2, CRB1, CRB2, Bahial, Bahial2.

5.1.1.2 Morfometría y tamaño genómico de micobacteriofagos

Con el propósito de analizar la morfología de los viriones de los nuevos aislamientos se realizó microscopía electrónica de transmisión. En la figura 5.2 se muestran las microscopías correspondientes a los bacteriofagos analizados; la mayoría de los mismos tienen un largo total en el rango de 190–350 nm, exceptuando a los fagos CRB2, Mine y 40BC que están entre 400–450 nm, sus colas son flexibles y no contráctiles y las cápsidas icosaédricas oscilan entre 50 y 80 nm. Según las características morfológicas estos nuevos aislamientos pertenecen a la familia *Shiphoviridae*, lo cual concuerda con lo publicado en la literatura [www.phagesdb.org; Hatfull *et al.*, 2010).

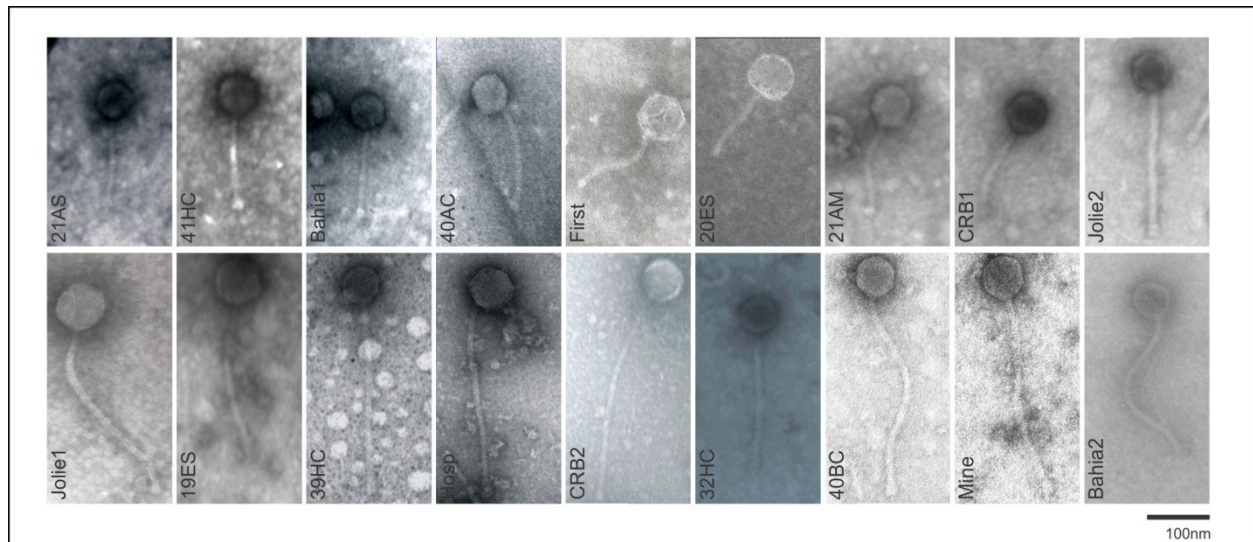


Figura 5.2. Microscopía electrónica de los aislamientos en estudio. En el margen inferior derecho se ubica la barra correspondiente a 100 nm.

Por otro lado, se determinaron los tamaños genómicos mediante PFGE, la mayoría de los micobacteriofagos (12 de 18) presentaron genomas comprendidos entre 42–55 kbp, mientras que seis de ellos, Hosp, Jolie1, 40BC, 39HC, Mine y CRB2 estuvieron en el rango 62–70 kbp. Es interesante destacar que los genomas correspondientes a estos últimos generaron una única banda durante la corrida electroforética; mientras que para el resto se observaron al menos dos bandas, cuyos pesos resultaron múltiples entre sí, a excepción del micobacteriofago 19ES que generó una única banda tenue. Este fenómeno fue revertido cuando las muestras fueron calentadas a 80°C durante diez minutos previo a la siembra, concluyendo que la formación de concatémeros es responsable del comportamiento descrito. En la figura 5.3, se muestra a modo de ejemplo el patrón de corrida para los micobacteriofagos Jolie, Mine y 41HC. Estos resultados no sólo permitieron estimar los tamaños genómicos, información útil para encarar un proyecto de secuenciación genómica, sino también inferir el mecanismo que utilizan estos virus para empaquetar el material genético. Los bacteriofagos que mostraron bandas únicas y más anchas (debido a que todas las moléculas de ADN no tienen el mismo largo) poseen extremos redundantes, por lo que es muy probable que utilicen un sistema de empaquetamiento conocido como *headful packaging* y sean capaces de realizar transducción generalizada [Casjens 2009]. Además, teniendo en cuenta que el tamaño de las cápsides en general se relaciona con el tamaño genómico, es razonable que las cápsides de estos 18 aislamientos presenten distintos diámetros [Hatfull, 2010].

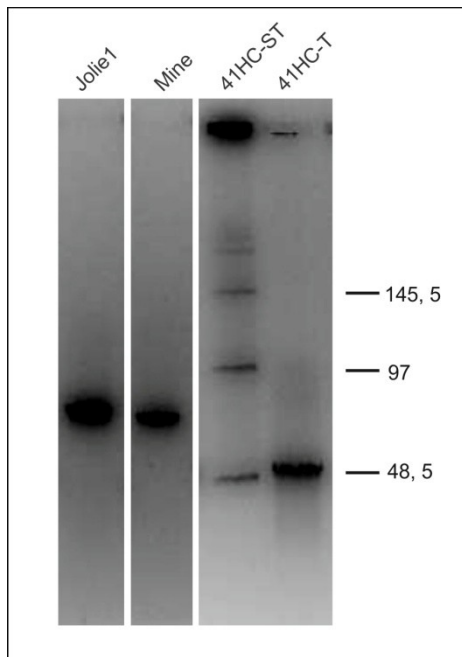


Figura 5.3. PFGE para los micobacteriofagos Jolie, Mine y 41HC. Corrida de los ADN correspondientes a Jolie1, Mine y 41HC sin tratamiento (ST) o tratado (T) a 80°C por 10 minutos y enfriado inmediatamente previo a la siembra. Los pesos moleculares patrón (kb) se indican a la derecha.

5.1.1.3 Requerimiento de cationes en la adsorción y rango de hospedador para los micobacteriofagos en estudio

Con el objetivo de determinar el rango de hospedador para los micobacteriofagos aislados, se estudió el requerimiento de cationes durante la infección de los mismos para así establecer el rango de concentraciones donde la estabilidad y la adsorción son óptimas. En los ensayos descritos anteriormente para micobacteriofagos (aislamiento e influencia de temperatura) se utilizaron sales de calcio a una concentración de 2 mM, en la literatura hay reportes que dan cuenta que la habilidad de algunos fagos de infectar ciertas especies micobacterianas depende de la adición de calcio al medio de siembra [Fullner y Hatfull, 1997]. Por consiguiente se estudió la capacidad de este nuevo grupo de bacteriofagos de producir la lisis de *M. smegmatis* mc²155 en presencia de diferentes concentraciones de cationes divalentes. Las sales ensayadas fueron 10mM CaCl₂, 10mM MgSO₄, 10mM CaCl₂/ MgSO₄ y el control sin cationes. En la tabla 5.2 se indica para cada fago la cantidad mínima de UFP que fueron suficientes para producir lisis en cada condición. Sólo el fago 19ES mostró la misma EFP en las cuatro condiciones ensayadas, es decir que fue capaz de adsorberse y consecuentemente propagarse aún en ausencia de ambos cationes, mientras que el resto de los micobacteriofagos, incluyendo los fagos control D29 y TM4, requirieron la presencia de al menos uno de estos cationes para multiplicarse y lisar a las células hospedadoras cuando las diluciones más altas de fagos fueron sembradas. La mayoría de estos fagos no mostraron preferencia por ninguno de los cationes usados, excepto los fagos 20ES, 21AM, 40AC, 41HC y CRB1, para los cuales la eficiencia fue de varios órdenes mayor en presencia de calcio.

Micobacteriofago	Cantidad mínima de UFP requerida para la formación de placas de lisis			
	sin cationes	Mg ²⁺ (a)	Ca ²⁺ (a)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ (a)
19ES	10	10	10	10
Jolie1	10 ³	10	10	10
Hosp/Mine	10 ⁵	10	10	10
Bahia1/21AS/CRB2/39HC	10 ⁷	10	10	10
Bahia2/Jolie2/40BC/First/32HC	10 ⁵	10	10	10
21AM	10 ⁷	10 ⁵	10	10
20ES/40AC/41HC	10 ⁵	10 ³	10	10
CRB1	10 ⁵	10 ⁵	10	10

Tabla 5.2. Requerimiento de cationes en la propagación de micobacteriofagos. Se indican las UFP mínimas que depositadas sobre un césped de *M. smegmatis* generaron placas de lisis en cada condición.

La figura 5.4 muestra el requerimiento de cationes para los fagos 19ES y Mine, en la misma puede observarse como 19ES fue capaz de replicarse eficientemente aún en ausencia del agregado de cationes divalentes al medio utilizado. El hecho de que estos fagos requieran calcio para propagarse no debería ser llamativo ya que fueron aislados a partir de muestras de suelo. Los bacteriofagos naturalmente encuentran a las bacterias en ambientes donde la concentración de calcio libre está entre 1 y 100mM y es suficiente para la infección [Mitsui *et al.*, 1997]. A pesar del escaso conocimiento sobre las moléculas de la envoltura celular micobacteriana que actuarían como receptores de fagos, hay reportes que dan cuenta del requerimiento de calcio para una infección productiva y además prueban que el mismo es necesario en el primer paso de la infección, la adsorción. Aparentemente el calcio afecta directamente la interacción fago-hospedador provocando cambios en las propiedades de la envoltura celular de la micobacteria. La unión del calcio a la bacteria aumentaría la estabilidad de la superficie celular permitiendo que el fago reconozca y se una a su/s receptor/es [Fullner y Hatfull, 1997].

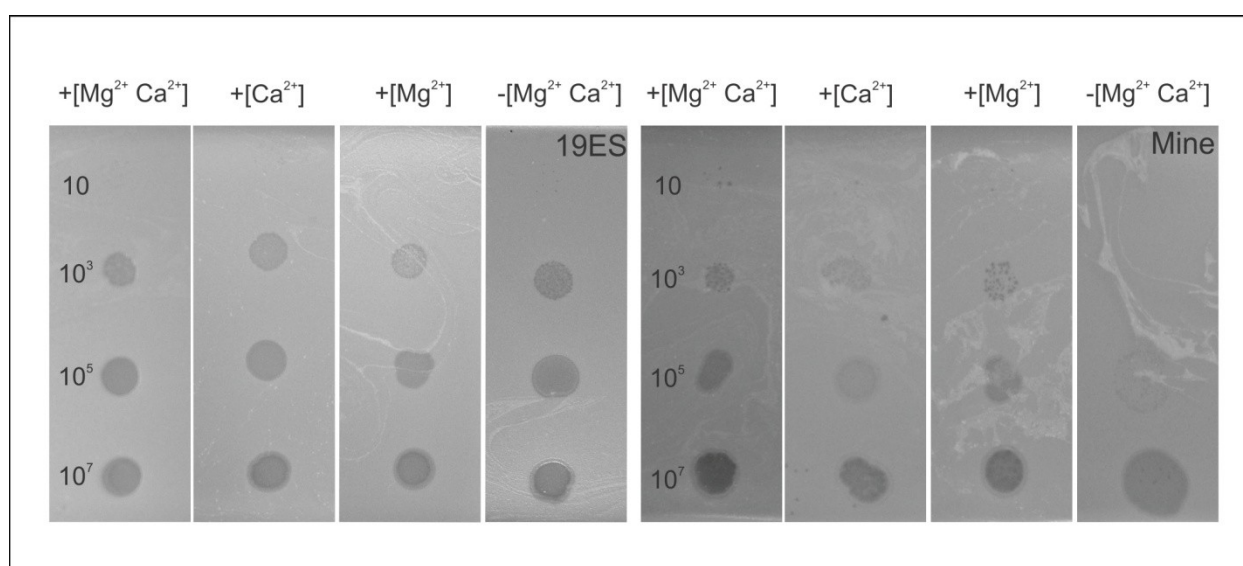


Figura 5.4 Propagación de los fagos 19ES y Mine con diferentes concentraciones de cationes. En el margen izquierdo de cada panel se indica el número de UFP depositadas en la gota.

Teniendo en cuenta los resultados antes descriptos, se llevó a cabo la determinación del rango de hospedador para cada uno de los micobacteriofagos variando los parámetros de infección: se ensayaron diferentes concentraciones de cationes divalentes y distintas cantidades de fagos (10^3 y 10^7 UFP por gota). Se utilizaron además del control *M. smegmatis* mc²155, las especies micobacterianas *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. abscessus* y *M. tuberculosis* H37Rv. La aparición de lisis cuando alícuotas de la dilución más alta de fago fueron depositadas sobre el MAB fue señal de infección productiva; el fago D29 fue utilizado como control dada su capacidad de lisar un amplio rango de especies micobacterianas [Rybniker *et al.*, 2006]. Ninguno de los nuevos micobacteriofagos fue capaz de generar lisis productiva en las MNT ensayadas (*M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. abscessus*). Sobre *M. fortuitum* diez de los fagos entre ellos First, 20ES, 21AM, 21AS, 40AC, 41HC, CRB1, Bahía1, Bahía2 y CRB2 mostraron un halo tenue cuando 10^7 fagos fueron colocados sobre el MAB, mientras que se observó un comportamiento similar para First, 20ES, 21AM, 21AS y CRB1 sobre *M. kansasii*. El patrón de lisis para *M. tuberculosis* H37Rv, fue diferente, ya que seis de los nuevos micobacteriofagos pudieron replicarse en esta micobacteria. En la figura 5.5 pueden observarse los halos de lisis que produjeron los fagos D29, First, 20ES, 21AM, 21AS y 41HC sobre un césped de *M. tuberculosis* H37Rv.

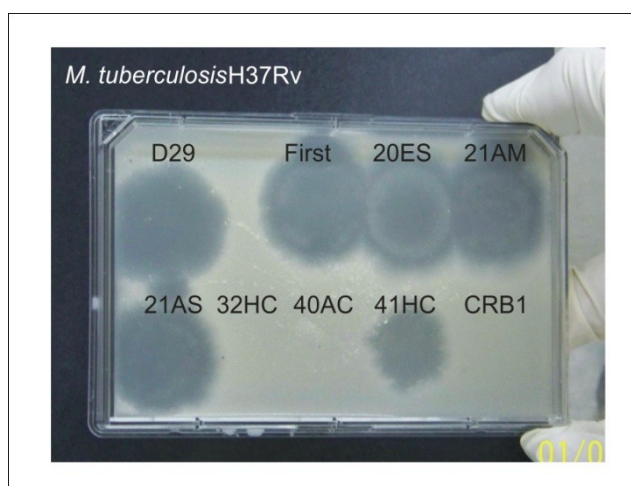


Figura 5.5. Propagación de First, 20ES, 21AM, 21AS, 32HC, 40AC, 41HC y CRB1 sobre *M. tuberculosis* H37Rv. Diluciones conteniendo 10^3 UFP fueron utilizadas para cada micobacteriofago, D29 fue utilizado como control.

El micobacteriofago CRB2 también fue capaz de infectar productivamente *M. tuberculosis*, el ensayo para este fago y para aquellos aislamientos que no pueden replicarse a temperaturas mayores a 30°C se realizó en dos etapas. En primer lugar, las placas fueron incubadas a 30°C durante 5 días, y luego a 37°C por 10 días lo que permitió el desarrollo de *M. tuberculosis*, que tiene un rango de temperatura de crecimiento restringido. Para cada micobacteriofago sólo fue considerada lisis productiva la observación de halo cuando la dilución más alta de fago fue colocada sobre el MAB; ya que la aparición de halos de lisis que tiene lugar a las diluciones más bajas se debe a un efecto conocido como *killing from without* [Abedon, 2009]. Este fenómeno ocurre cuando el número de fagos supera ampliamente al de bacterias provocando la lisis de las células sin producción de nuevas partículas fágicas.

Teniendo en cuenta que se han descrito micobacteriofagos cuya eficiencia de formación de placas de lisis (EFP) es considerablemente menor en *M. tuberculosis* con respecto a la cepa *M. smegmatis* mc²155 [Sampson *et al.*, 2009], se analizó este comportamiento para aquellos micobacteriofagos que dieron lisis productiva en *M. tuberculosis*. Se realizó la titulación de los micobacteriofagos First, 20ES, 21AM, 21AS y CRB2 en ambas cepas obteniéndose títulos comparables. Por otro lado, estos fagos se amplificaron utilizando *M. tuberculosis* como cepa indicadora, y los títulos resultantes para cada uno fueron similares en ambas cepas, sugiriendo que los mismos tienen la misma capacidad para replicarse tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis* mc²155. Sorprendentemente el micobacteriofago CRB2 una vez amplificado en *M. tuberculosis* fue capaz de replicarse en *M. smegmatis* a temperaturas mayores a 30°C. Es altamente probable que el pasaje por *M. tuberculosis* haya permitido la selección de alguna población de dicho fago que posea modificaciones en su genoma que le permitan replicarse en un rango más amplio de temperaturas.

5.1.1.4 Analisis de la naturaleza lítica/ lisogenica de los nuevos micobacteriofagos

De acuerdo al análisis visual de las placas de lisis generadas por los micobacteriofagos aislados, la mayoría de ellos serían virulentos en *M. smegmatis*. Para confirmar la naturaleza lítica o temperada de estos fagos fue necesario aislar células de *M. smegmatis* que hubieran sobrevivido a la infección y en las cuales los fagos hubieran entrado en el ciclo lisogénico, integrándose al cromosoma de la bacteria en forma de profago estable. Para diferenciar entre células lisógenas “inmunes” y mutantes espontáneas resistentes a cada uno de los fagos, se extrajeron 30 placas de lisis de cada fago y se sembraron en placas con medio 7H9A para permitir el desarrollo de bacterias. Las placas fueron incubadas a 37°C por cinco días y las colonias luego de varios re aislamientos enfrentadas al fago que las originó. Este procedimiento se basa en que clones lisógenos o mutantes resistentes para un fago (aunque por distintos mecanismos) no permitirían la replicación del mismo. De esta manera, se simplifica el análisis eliminando las células de *M. smegmatis* que siendo sensibles al fago, nunca entraron en contacto con él. Finalmente, las subpoblaciones lisógena y resistente al fago de *M. smegmatis* fueron separadas mediante tratamiento con luz UV de alícuotas de cada cultivo líquido; esto enciende la respuesta SOS, provocando la inducción de profagos. Siguiendo este procedimiento, se obtuvieron clones lisógenos para 9 de los 18 fagos en estudio, como se muestra en la tabla 5.3. Los micobacteriofagos CRB2, Bahia1, Bahia2, Hosp, Jolie1, Jolie2, 39HC, Mine, 40AC y 40BC fueron considerados líticos ya que a pesar de haberse chequeado casi 100 colonias para cada uno de ellos, no se logró obtener células lisógenas de *M. smegmatis*.

Fago temperado	Número de colonias analizadas	Número de clones lisógenos	Frecuencia (expresada en %)
First	100	1	1
CRB1	50	3	6
19ES	50	6	12
21AM	25	6	24
20ES	25	7	28
21AS	25	8	32
41HC	25	8	32
32ES	25	13	52

Tabla 5.3: Frecuencia de lisogenización de fagos temperados. Se indican el número de colonias analizadas en cada caso.

Debido a que uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue el desarrollo de vectores integrativos que sean capaces de replicarse en micobacterias de crecimiento rápido y lento, fue relevante conocer la naturaleza lítica/temperada de aquellos micobacteriofagos que fueron capaces de replicarse en *M. tuberculosis* (ver 5.1.1.3); y mostraron un comportamiento temperado en *M. smegmatis*. Para ello se extrajeron muestras de 20 placas de lisis de cada fago propagado en *M. tuberculosis*; una vez aislados los posibles clones lisógenos fueron purificados mediante re-aislamiento en medio sólido fresco e incubados durante 30 días a 37°C. Ocho clones correspondientes a cada fago fueron crecidos en parches sobre medio sólido e irradiados con luz UV por 60 segundos para inducir la respuesta SOS y la consecuente generación de nuevos viriones. Los mismos fueron evidenciados colocando bacterias indicadoras de *M. smegmatis* mc² 155 en el MAB (ver Materiales y Métodos sección 4.3.11). Los micobacteriofagos First, 21AM, 21AS, 20ES y 41HC resultaron lisógenos en esta micobacteria, mientras que no se han recuperado clones lisógenos para CRB2. En la figura 5.6 se observa la lisis generada por clones lisógenos para el micobacteriofago First sobre un césped de *M. smegmatis*. Será necesario establecer los sitios de integración para estos nuevos micobacteriofagos, si los mismos fuesen diferentes a los ya descritos [Hatfull, 2010] se llevará a cabo la construcción de vectores integrativos (ver más adelante).

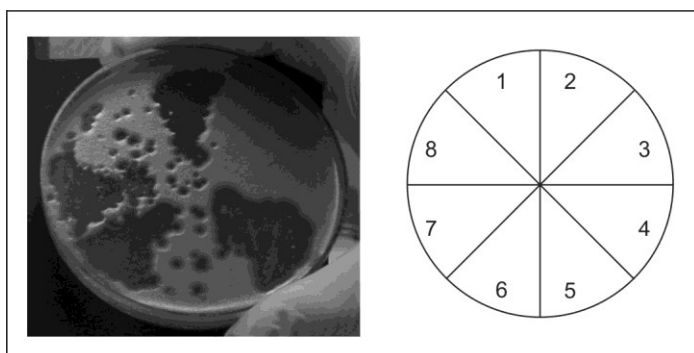


Figura 5.6. Clones lisógenos para First en *M. tuberculosis*. Celúlas de *M. smegmatis* fueron colocadas sobre 8 clones *M. tuberculosis* post-tratamiento con luz UV. Los clones 1, 4, 5, 6, 7 y 8 resultaron lisógenos para el fago en estudio.

5.1.1.5 Análisis de la capacidad de realizar transducción generalizada

Como se mencionó en la Introducción, hay escasos fagos transductores en *M. smegmatis*, los cuales además son incapaces de llevar a cabo transducciones en *M. tuberculosis* [Lee et al., 2004]. Se analizó la posibilidad de realizar este tipo de transferencia genética para los micobacteriofagos 40BC, Hosp, CRB2, 39HC, Mine y Jolie1. Los mismos, de acuerdo a las características de sus extremos genómicos, serían posibles transductores generalizados. La búsqueda se abordó en primer lugar realizando la propagación de dichos fagos en una cepa mutante de *M. smegmatis* mc²155 Bio⁻ 4.4 (cepa dadora), en esta mutante tres genes del operón responsable de la síntesis de biotina en micobacterias han sido reemplazados por un cassette que confiere resistencia a higromicina [Stella, EJ, Tesis Doctoral 2013]. Luego se realizó la infección de la cepa salvaje *M. smegmatis* mc²155 (cepa aceptora) con los micobacteriofagos propagados en la cepa dadora. Cuando alícuotas de las infecciones provenientes de cada fago fueron crecidas en medio suplementado con higromicina y biotina, no hubo crecimiento de posibles transductantes. El micobacteriofago Bxz1 fue utilizado como control, para el mismo hubo desarrollo de transductantes que fueron incapaces de crecer en medio sin biotina confirmando la auxotrofia y validando la metodología elegida. A pesar de ello, se decidió ensayar una búsqueda mediante PCR de distintos ORFs de *M. smegmatis* mc²155, utilizando ADN fágico libre de ADN micobacteriano como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados fueron nuevamente negativos, no han podido amplificarse ninguno de los fragmentos elegidos utilizando ADN fágico como molde. Teniendo en cuenta que de la vasta cantidad de micobacteriofagos conocidos sólo dos, Bxz1 e I3, son transductores generalizados, no es sorprendente el comportamiento observado para este nuevo grupo.

5.1.2 Análisis genómico de micobacteriofagos

5.1.2.1 Secuenciación genómica y comparación de las secuencias nucleotídicas

Como se mencionó anteriormente, los micobacteriofagos son el grupo de fagos más estudiados con más de 5000 aislamientos, y 690 secuenciados completamente [www.phagesdb.org]. El análisis de estas secuencias realizado por Hatfull y su grupo ha revelado una enorme diversidad, reflejada en los 21 *clusters* (A-U) y los 9 *singletons* descriptos hasta el momento. Durante el presente trabajo se ha llevado a cabo la secuenciación genómica de los dieciocho micobacteriofagos estudiados en detalle en el mismo. La metodología empleada fue *whole genome shotgun sequencing* utilizando el equipo GS-FLX 454 (INDEAR, Argentina). Doce de los genomas secuenciados fueron resueltos en una única secuencia consenso de ADN a partir de un set de segmentos solapados, y éstas comparadas generando *dotplots* con la herramienta bioinformática Gepard [Krumisiek et al., 2007]. De acuerdo a los gráficos que pueden observarse en la figura 5.7, los nuevos aislamientos pudieron ordenarse en cuatro grupos, el primero integrado por los micobacteriofagos First, CRB1, 20ES, 40AC y 41HC, el segundo compuesto por 40BC,

Hosp, Mine, Jolie1 y 39HC, el tercer grupo por Jolie2 y el cuarto por el micobacteriofago 32HC (panel A, figura 5.7). Cuando estos genomas fueron comparados contra la base de datos pudieron incluirse dentro de los clusters ya conocidos, a excepción del micobacteriofago 32HC que no mostró similitud con los integrantes de ninguno de los grupos descriptos, estableciéndose una nueva categoría o *singleton* (panel B, figura 5.7). La mayoría de estos micobacteriofagos pertenecen a los *cluster A* y B, mientras que Jolie2 presenta una alta similitud nucleotídica con los miembros del *cluster G*.

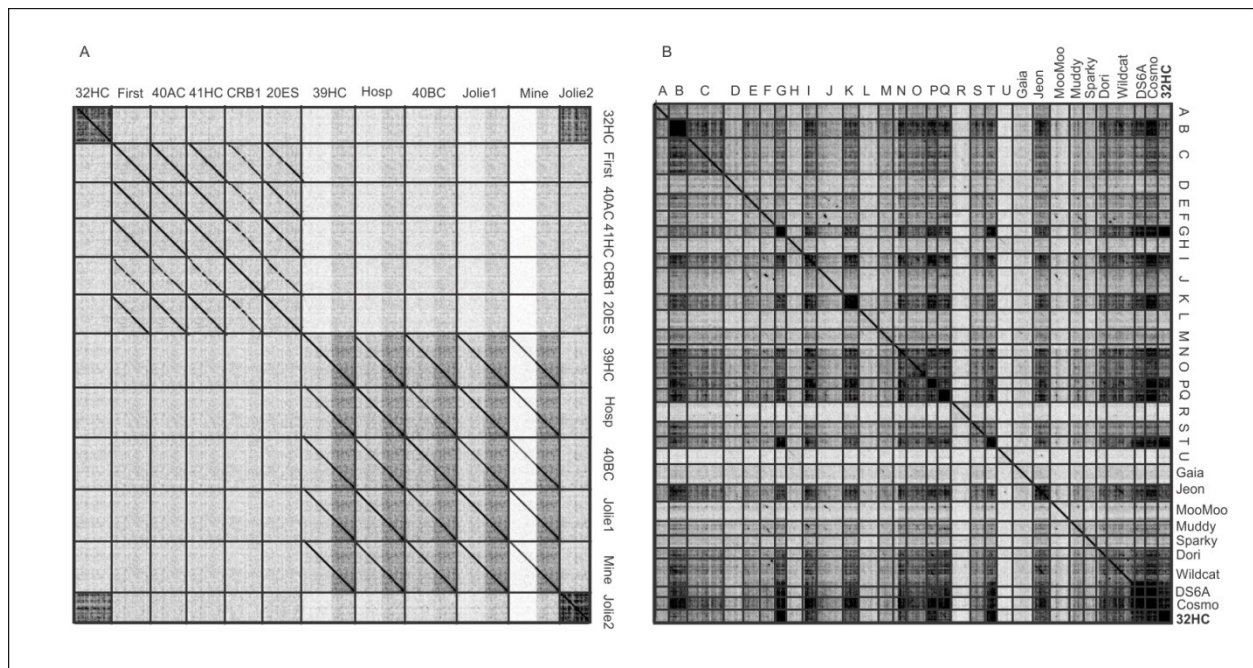


Figura.5.7 Comparación de secuencias genómicas de fagos. Mediante la herramienta Gepard se generaron los dotplots comparando 12 de los micobacteriofagos locales (panel A) y el micobacteriofago 32HC con los *clusters* y *singletons* descriptos. Se utilizaron los siguientes micobacteriofagos como representantes de cada cluster: Alma(A), KayaCho (B), Nappy (C), Adjutor (D), Murphy (E), Spartacus (F), Angel (G), Barnyard (H), Brujita (I), Omega(J), Adephagia (K), Lebron(L), Bongo (M), Charlie (N), Firecracker (O), Bignuz (P), Giles (Q), Papyrus (R), Marvin (S), Bernal13 (T) y Patience(U).

5.1.2.2 Anotación de genomas fágicos

Los datos arrojados por la secuenciación genómica analizados mediante el programa DNAMaster (<http://cobamide2.bio.pitt.edu>) permitieron determinar un número tentativo de ORFs y ARNs de transferencia (tARN) para cada uno de los micobacteriofagos. Por otro lado, mediante el diseño de primers complementarios a los extremos de los genomas para los micobacteriofagos First, 41HC, 40AC, 20ES, CRB1, 32HC y Jolie2, y posterior secuenciación del producto de PCR pudieron definirse el largo y la secuencia completa para estos aislamientos. Además, diez genomas fueron analizados más minuciosamente utilizando distintos programas bioinformáticos, entre ellos HHPred y PFAM; y sus secuencias fueron depositadas en Genbank [Stella *et al.*, 2013; Franceschelli *et al.*, 2014]. La tabla 5.4 resume las características genómicas de los micobacteriofagos analizados, incluyendo el contenido de GC, el *cluster* al cual pertenecen según la clasificación establecida en la literatura [Hatfull, 2014] y los números de acceso a Genbank en el caso que corresponda.

Fago	tamaño (pb)	N° ORFs	tARN	Extremos	%GC	Cluster	N° acceso Genbank
First	53028	95	1	10pb 3'	63.42	A	JX899358.1
41HC	52943	99	1	10pb 3'	63.34	A	-
40AC	53396	90	0	10pb 3'	63.34	A	KJ192196.1
20ES	53114	96	1	10pb 3'	63.43	A	KJ410132.1
CRB1	52953	94	1	10pb 3'	63.23	A	KJ410134.1
Mine	71591	99	0	CP	69.36	B	-
32HC	50768	86	0	13pb 3'	65.73	Singleton	KJ028219.1
Hosp	70667	97	0	CP	69.98	B	KJ433974.1
Jolie1	71058	98	0	CP	69.88	B	KJ433976.1
39HC	71565	100	0	CP	70	B	KJ433973.1
40BC	71565	97	0	CP	70	B	KJ433975.1
Jolie2	44296	62	0	10pb 3'	68	G	KJ410133.1

Tabla 5.4. Características genómicas de los nuevos aislamientos. Se indican el número de bases desapareadas probables para aquellos micobacteriofagos que poseen extremos cohesivos, CP: circularmente permutados.

En las secciones siguientes se analizan con mayor profundidad las propiedades genómicas para los micobacteriofagos 20ES, Jolie1, Jolie2 y 32HC como representantes de las diferentes categorías en las que pudieron ordenarse los nuevos aislamientos.

5.1.2.3 Cluster A. Presencia de proteínas de partición

Considerando que la mayoría de los micobacteriofagos que integran el *cluster* A aislados en el presente trabajo fueron capaces de infectar y lisogenizar *M. tuberculosis*, se realizó un estudio detallado

de los ORFs del micobacteriofago 20ES orientado a la búsqueda de los genes responsables del comportamiento temperado del mismo -genes *int*, *xis* y sitio attP-. La organización genómica de dicho micobacteriofago, representada en la figura 5.8, muestra que los genes se disponen siguiendo un patrón similar al de los micobacteriofagos pertenecientes al cluster A; terminasa, proteína portal, proteasa de maduración de cápside, proteína *scaffold*, subunidad principal de cápside, chaperonas de ensamblado de cola, subunidad principal de cola, proteína *tape measure* y subunidad minoritaria de cola. Además, 20ES comparte otras características con los integrantes del cluster mencionado como la presencia de genes no estructurales entre la terminasa y el extremo izquierdo del genoma, donde se encuentran los genes del cassette de lisis; y la existencia de un corrimiento traduccional localizado entre los ORFs 24 y 25, los cuales codifican para chaperonas de ensamblado. [Hatfull, 2012]. Este fenómeno no es exclusivo de los fagos que infectan el género *Mycobacterium*, sino que está conservado en la mayoría de los bacteriofagos que poseen colas, cuyo largo es controlado por acción de la proteína *tape measure* [Xu *et al.*, 2004]. Como muchos otros micobacteriofagos 20ES codifica para proteínas que estarían involucradas en el metabolismo de nucleótidos como timidilato sintasa y ribonucleótido reductasa. Por otro lado, la mayoría de los micobacteriofagos del *cluster A* descritos en la literatura, presentan los genes responsables de la integración -genes *int*, *xis* y sitio attP- en el centro de sus genomas [Hatfull, 2012]. Sin embargo, no han podido detectarse en el genoma de 20ES sitios attP putativos, ni secuencias con homología a integrasas y/o excisionasas, a pesar de la obtención de clones lisógenos que probarían la naturaleza temperada de dicho fago. Sorprendentemente mediante un análisis manual de la secuencia con diversas herramientas bioinformáticas, se encontraron en su lugar genes homólogos a proteínas ParA y B. Los genes *parA* y *B* forman parte, junto con secuencias de ADN específicas, de los sistemas de partición codificados por muchos plásmidos de bajo número de copia y cromosomas bacterianos para asegurar la correcta segregación del material genético durante la división celular [Gerdes *et al.*, 2000]. Existen reportes en la literatura que dan cuenta de la presencia de dichos genes en bacteriofagos de los géneros *Leptospira* y *Escherichia*, así como también en algunos micobacteriofagos [Girons *et al.*, 2000; Grigoriev *et al.*, 2001; Bourhy *et al.*, 2005; Hatfull, 2012].

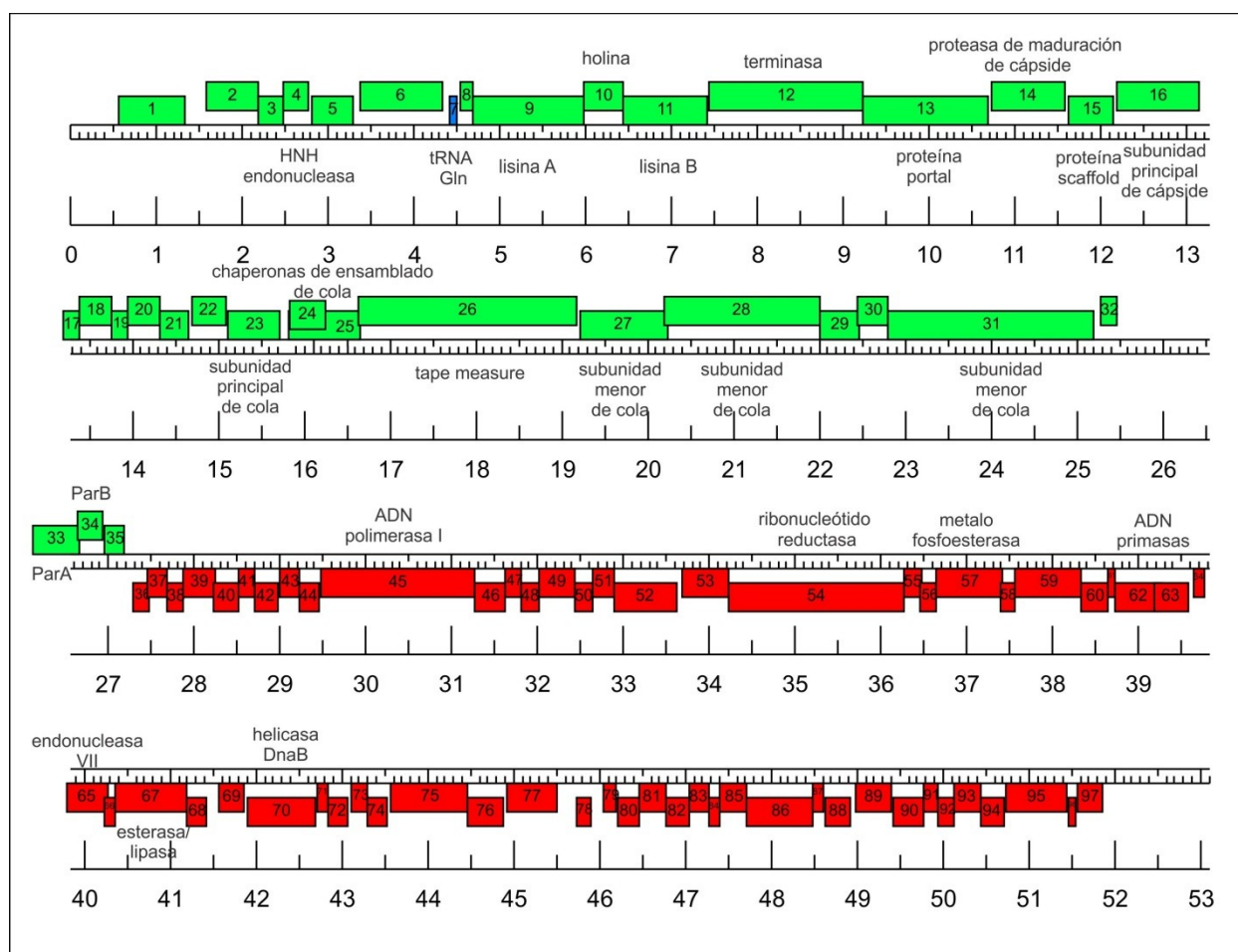


Figura 5.8. Organización genómica del micobacteriofago 20ES. El esquema muestra en verde los genes transcritos en dirección directa, y en rojo aquellos transcritos en dirección inversa. Se indica la función probable para los ORFs en donde la misma pudo ser asignada. Los genes 24 y 25 se presentan superpuestos debido al corrimiento traduccional (-1).

Cuando se realizó una búsqueda de los genes *parA* y *B* en los nuevos aislamientos, se detectó la presencia de los mismos en la mayoría de los micobacteriofagos descritos como “temperados” pertenecientes al *cluster A*. Secuencias codificantes para proteínas ParA hipotéticas pudieron ser identificadas no sólo en 20ES, sino también en los micobacteriofagos First, 40AC, 41HC, CRB1, 21AS y 21AM; mientras que secuencias homólogas a ParB fueron encontradas en los genomas de todos los fagos mencionados excepto en 40AC, un micobacteriofago de naturaleza lítica (característica que justificaría dicho comportamiento). Este hallazgo puede ser un indicio importante acerca de la participación de dichas proteínas en la herencia de estos virus, los cuales se replicarían autónomamente como plásmidos en lugar de integrarse en el cromosoma de la célula hospedadora. En este punto cabe aclarar, que si bien no se contaba con la secuencia completa para los micobacteriofagos 21AM y 21AS, los mismos pudieron incluirse dentro del *cluster* en cuestión considerando los resultados arrojados mediante comparación de las proteínas *tape measure*. Smith y colaboradores (2013) han probado la relación *cluster*-secuencia

aminoacídica para un alto número de micobacteriofagos utilizando un gen ubicuo y bastante conservado como el de la proteína *tape measure* [Smith *et al.*, 2013].

En un primer intento de dilucidar la funcionalidad de las proteínas Par, se llevó a cabo un análisis *in silico* de los tres componentes que integran los sistemas de segregación. Además de las proteínas ParA y B, es fundamental la presencia de un elemento que actúa en *cis*, denominado centrómero o ParS, sobre el cual se forma un complejo nucleoproteico mediante la unión de ParA y B. Éstas son codificadas por un mismo operón, donde el gen corriente arriba codifica para una ATPasa-ParA-, mientras que el otro codifica para la proteína responsable de la unión al centrómero-ParB-. Se han descrito distintos sistemas de partición, según la organización que dispongan para los elementos mencionados y el tipo de ATPasa que codifiquen [Gerdes *et al.*, 2000]. El apilamiento de las secuencias aminoacídicas de las hipotéticas ParA presentes en estos nuevos aislamientos, incorporando además las ParA codificadas por micobacteriofagos depositados en GenBank por otros grupos de investigación permite observar los residuos conservados que forman parte de los motivos denominados Walker A y Walker B *box*, típicos de las ATPasas de los sistemas de partición de tipo I.

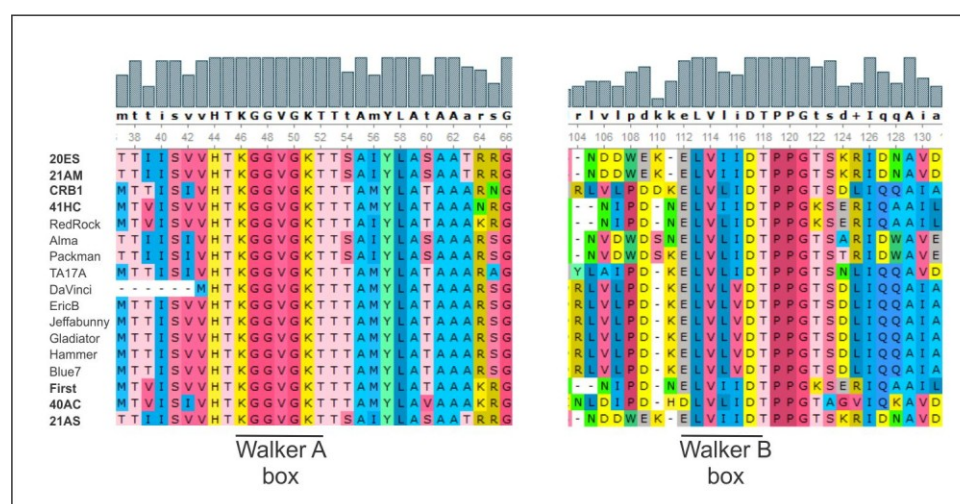


Figura 5.9. Alineamiento de los motivos Walker A y B presentes en las proteínas ParA de diferentes micobacteriofagos del *cluster* A. Además de los aislamientos locales se incluyeron los siguientes especímenes ya descritos en la literatura: Blue7, Alma, Packman, TA17A, DaVinci, EricB, Gladiator, Jeffabunny, Hammer y RedRock.

Con el objeto de reforzar la idea de funcionalidad de estos sistemas en micobacteriofagos, se realizó un análisis filogenético de las proteínas ParA y ParB encontradas en los mismos. Además en el estudio se incluyeron bacteriofagos de otras especies y algunos plásmidos, para los cuales los sistemas de partición han sido ampliamente estudiados [Gerdes *et al.*, 2000]. En la figura 5.10 se muestran los

árboles filogenéticos que relacionan las proteínas ParA y ParB (paneles A y B respectivamente), a partir de los mismos se puede inferir que los cambios sufridos durante la evolución parecen ser simultáneos para las proteínas ParA y B, ya que sus posiciones relativas dentro de ambos árboles se mantienen. Por otro lado la proteína ParA hipotética codificada por el micobacteriofago 40AC, el cual ha perdido el gen *parB*, es la más divergente entre los micobacteriofagos; lo cual sería esperable dada la naturaleza lítica del mismo. La asociación existente entre las proteínas ParA y sus pares ParB, junto con la imposibilidad del micobacteriofago 40AC de heredarse en micobacterias, demostrarían que dichas proteínas serían indispensables para el funcionamiento de este novel mecanismo de herencia en micobacteriofagos [Stella *et al.*, 2013].

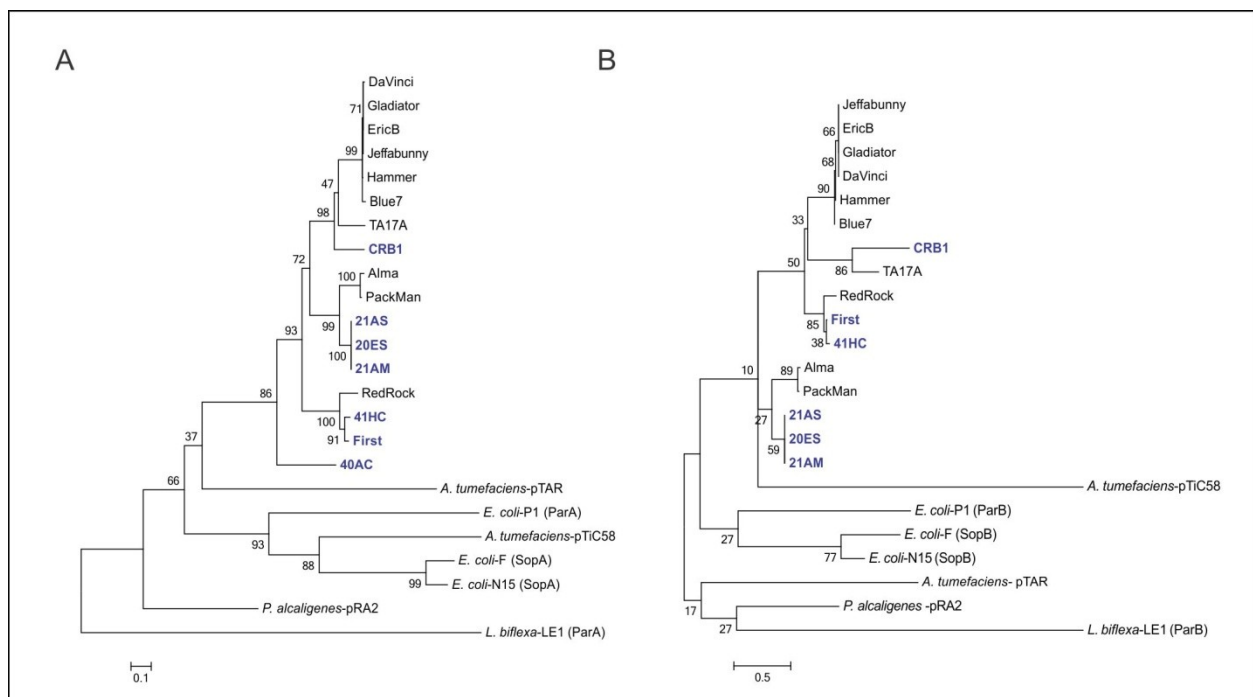


Figura 5.10. Análisis filogenético de las proteínas de partición presentes en micobacteriofagos, plásmidos (pTAR,pTIC58,F,pRA2) y bacteriofagos de otras especies (P1, N15, LE1). Los árboles fueron realizados con el programa MEGA5 utilizando el método de *neighbourjoining* a partir de un alineamiento realizado en ClustalW. Se muestran los valores de *bootstrap* correspondientes a 1000 iteraciones para las proteínas ParA (panel A) y ParB (panel B).

Como se mencionó anteriormente, los distintos sistemas de partición presentan una organización distintiva de sus elementos constituyentes ParA, ParB y ParS. Generalmente los loci del tipo Ib presentan corriente arriba de los genes *par*, secuencias repetitivas múltiples que conforman el centrómero o ParS. Se realizó la búsqueda de repeticiones en tándem con distintas herramientas bioinformáticas, entre ellas con el programa Tandem Repeat Finder, y pudieron detectarse para los micobacteriofagos 20ES, First y 41HC repeticiones corriente arriba de los genes *par*. Este dato avalaría la hipótesis de que estos sistemas actúen como verdaderos sistemas de partición en micobacteriofagos temperados que no siguen la vía tradicional

de herencia en micobacterias integrándose al cromosoma. La tabla 5.5 resume las características de herencia para los nuevos aislamientos pertenecientes al *cluster* A, y en la figura 5.11 se muestran esquemáticamente la ubicación de los distintos elementos en los genomas fágicos analizados.

Micobacteriofago	ParA/ParB coordenadas	ubicación de las repeticiones en tandem ^a	Represor ^c
First	26162- 26993	26102-26159	+
41HC	46559-47390	47399-47444	+
20ES	26076-26925	26020-26062	+
CRB1	26655-27597	ND ^b	+
21AM [#]			ND ^b
21AS [#]			ND ^b

Tabla 5.5. Herencia de micobacteriofagos temperados. (#)Secuencias genómicas no resueltas en un único fragmento, por lo tanto no se informan las coordenadas para los fagos 21AM y 21AS. (a) Repeticiones corriente arriba de ParA que actuarían como posibles centrómeros. (b) No detectado bioinformáticamente. (c) Detectado bioinformáticamente.

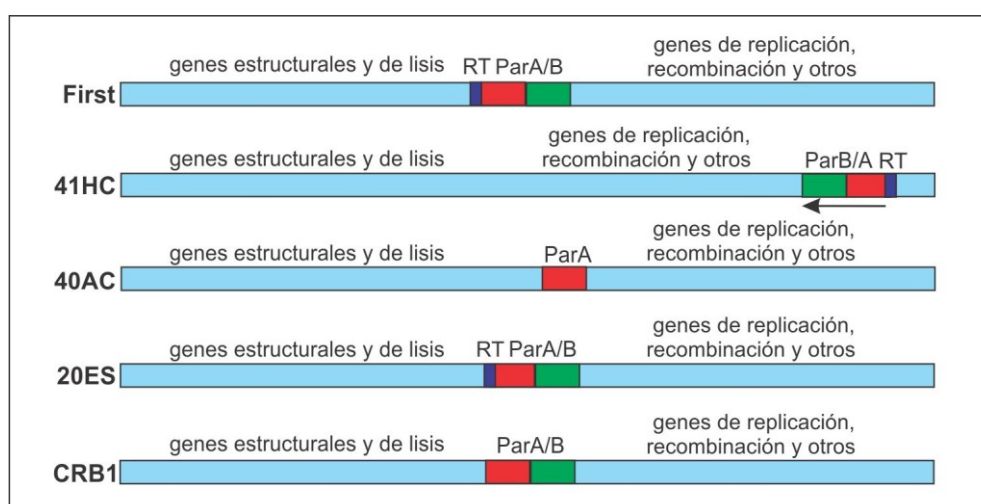


Figura 5.11. Ubicación de los loci de partición. Se representan esquemáticamente los genomas de los micobacteriofagos mostrando la ubicación de las proteínas de los genes *parA* y *parB* hipotéticos, y las repeticiones en tandem (RT) que actuarían como centrómeros. Se indican con una flecha los genes transcritos en dirección reversa.

5.1.2.4 Cluster B. Jolie1

No fue sorprendente que 5 de 12 de los nuevos aislamientos presenten características compatibles con el *cluster* B, dado que éste es el segundo grupo más numeroso entre los descritos en www.phagesdb.org (120 de 690). Los micobacteriofagos Mine, 39HC, 40BC, Hosp y Jolie1 presentaron extremos redundantes y circularmente permutados, tamaños genómicos de 70 kpb en promedio, y un alto contenido de G+C al igual que los micobacteriofagos del *cluster* B [Hatfull, 2010]. Para los bacteriofagos cuyos extremos son redundantes, la elección del extremo izquierdo es arbitraria, generalmente se designa como primera a la base correspondiente al inicio del gen codificante para la probable subunidad pequeña

de la terminasa, como en el caso del micobacteriofago Hosp [Franceschelli et al., 2014]. En otros genomas, como el de Jolie1, existen genes superpuestos corriente arriba, por lo tanto se designa como ORF 1, al primer gen a la izquierda de la terminasa donde exista un espacio no codificante. Exceptuando mínimas diferencias los micobacteriofagos Mine, 39HC, 40BC, Hosp y Jolie1 mostraron un patrón génico similar entre sí y con los miembros del *cluster* B, como puede observarse en la figura 5.12 para este último micobacteriofago. En la región izquierda del genoma se encuentran los genes codificantes para proteínas estructurales y de ensamblado, entre ellos se destacan el gran tamaño del gen correspondiente a la proteína *tape measure* de más de 5,9 kb, característica que se ve reflejada en la gran longitud de la cola- 320 nm- para Jolie1, y todos los micobacteriofagos del cluster en cuestión; y las chaperonas de ensamblado de cola que en este caso no son codificadas mediante un corrimiento traduccional. Además, en esta zona hay varios ORFs transcritos en dirección inversa, como el ORF 5 que codifica para RuvC proteína relacionada con la resolución de las uniones de Holliday [Hatfull, 2010]. En la parte central se encuentra el cassette de lisis, integrado por los genes *lysA*, *lysB* y *holina*; y hacia el extremo derecho sólo a unos pocos ORFs vinculados con el metabolismo de ADN se les ha podido asignar una función probable; en esta zona existen también un grupo de genes que son transcritos en sentido inverso, y que es probable que formen parte de un mismo operón (ORFs 60 a 71). Jolie1, al igual que otros miembros del *cluster* B descritos en la literatura, codificaría para una ribosil-transferasa encargada de incorporar la base modificada queuosina en tARNs, la cual es comúnmente encontrada en bacterias aunque los genes necesarios para su síntesis no se han registrado en micobacterias [Hatfull, 2010]. Por otro lado, resultó interesante analizar el producto codificado por el ORF 90, el mismo presenta dominios del tipo PE-PPE, denominados así debido a la presencia de motivos conservados Pro-Glu (PE) y Pro-Pro-Glu (PPE) [Ekiert et al., 2014]. Éstos han sido encontrados en proteínas de todas las especies de micobacterias, pero sólo en un micobacteriofago previamente descrito (KayaCho), aunque están presentes en los cinco nuevos aislamientos pertenecientes al *cluster* B analizados en el presente trabajo.

Por último, no se han podido aislar lisógenos estables para este grupo de micobacteriofagos, ni detectar bioinformáticamente genes con homología a funciones de partición, integrasas o represores. Si bien muchos de ellos presentan en su genoma proteínas similares a ParB, las mismas podrían actuar como reguladores transcripcionales y no estarían involucradas en la herencia [Hatfull, 2010]; por lo tanto Jolie1 y los aislamientos relacionados tendrían una naturaleza lítica, otra propiedad común a los micobacteriofagos del *cluster* B.

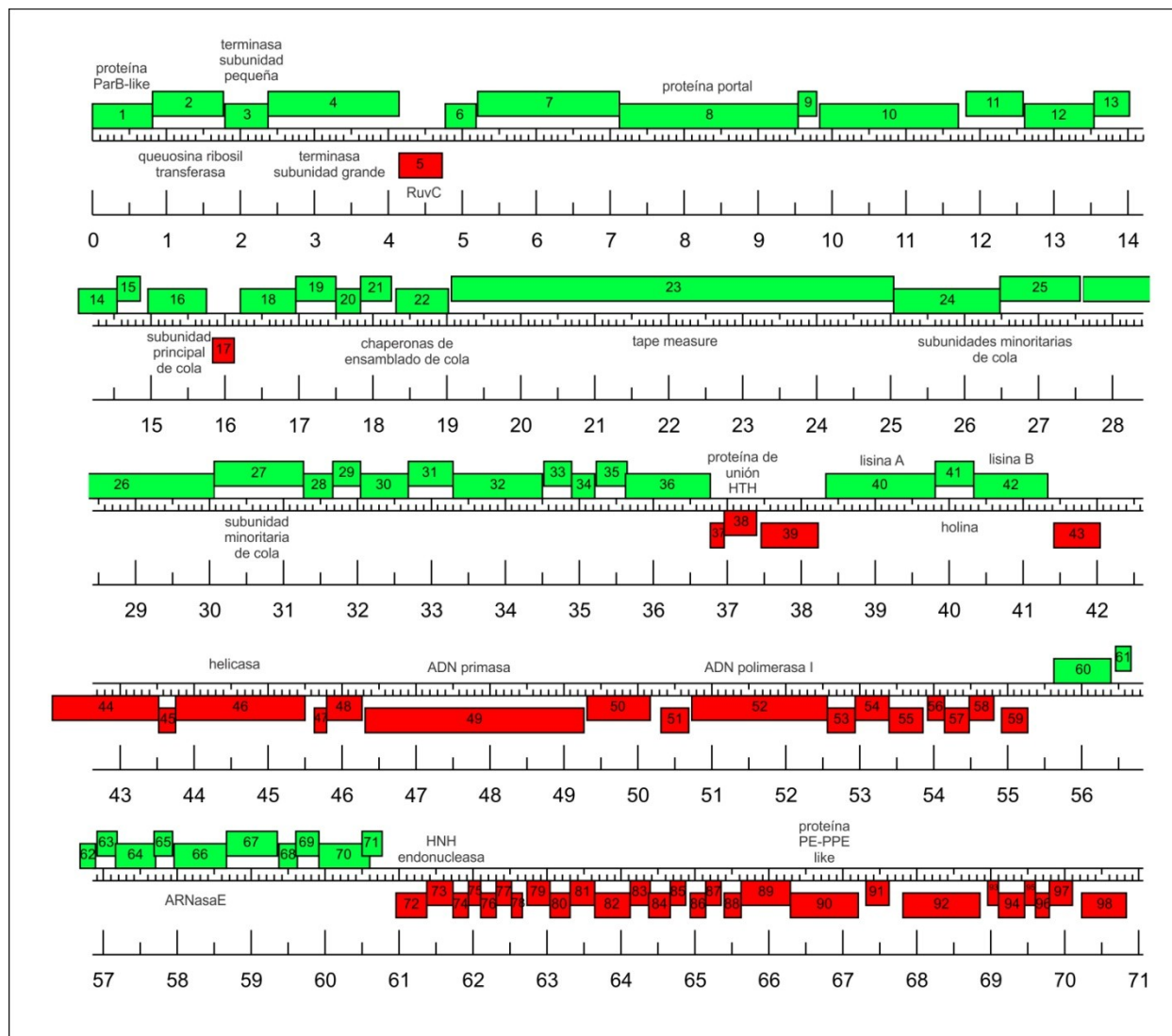


Figura 5.12. Organización genómica del micobacteriofago Jolie1. El esquema muestra en verde los genes transcritos en dirección directa, y en rojo aquellos transcritos en dirección inversa. Se indica la función probable para los ORFs en donde pudo ser asignada.

5.1.2.5 Cluster G. *Jolie2*

Como se describió anteriormente en la tabla 5.4, el micobacteriofago *Jolie2* mostró una composición nucleotídica propia de los miembros del Cluster G según la clasificación de Hatfull. En la figura 5.13 se presenta el orden que exhiben los genes, desde el ORF1 hasta el 26 se encuentran los genes correspondientes a las proteínas estructurales y de ensamblado, seguidos de los genes *lysA*, *lysB* y *holina* que conforman el cassette de lisis. La mayoría de los ORFs ubicados sobre la parte derecha del genoma no presentaron homología con proteínas conocidas cuando sus secuencias aminoácidas fueron comparadas mediante blastp contra la base de datos no redundante [Schäffer *et al.*, 2001]. De esta manera se les pudo

asignar una función probable sólo a los ORFs 32 (RDF), 42 (RecE), 43 (RecT), 51 (RuvC), y 61 (HNH endonucleasa). A diferencia de los miembros del *cluster* G analizados en la literatura Jolie2 codifica para una proteína con dominios PE-PPE excepcionalmente encontrados en micobacteriofagos como se mencionó anteriormente (ORF 59). Otra característica sobresaliente es la ausencia, en el centro del genoma, de los genes responsables de la integración-integrasa y represor- que son transcritos en dirección reversa; y seguidos por el gen de la proteína RDF (del inglés **R**ecombination **D**irectionality **F**actor) [Sampson et al., 2009]. Llamativamente, Jolie2 codifica para una proteína RDF hipotética, aunque no han podido detectarse bioinformáticamente genes con homología a integrasas y/o represores, lo cual explicaría la naturaleza lítica del aislamiento en cuestión.

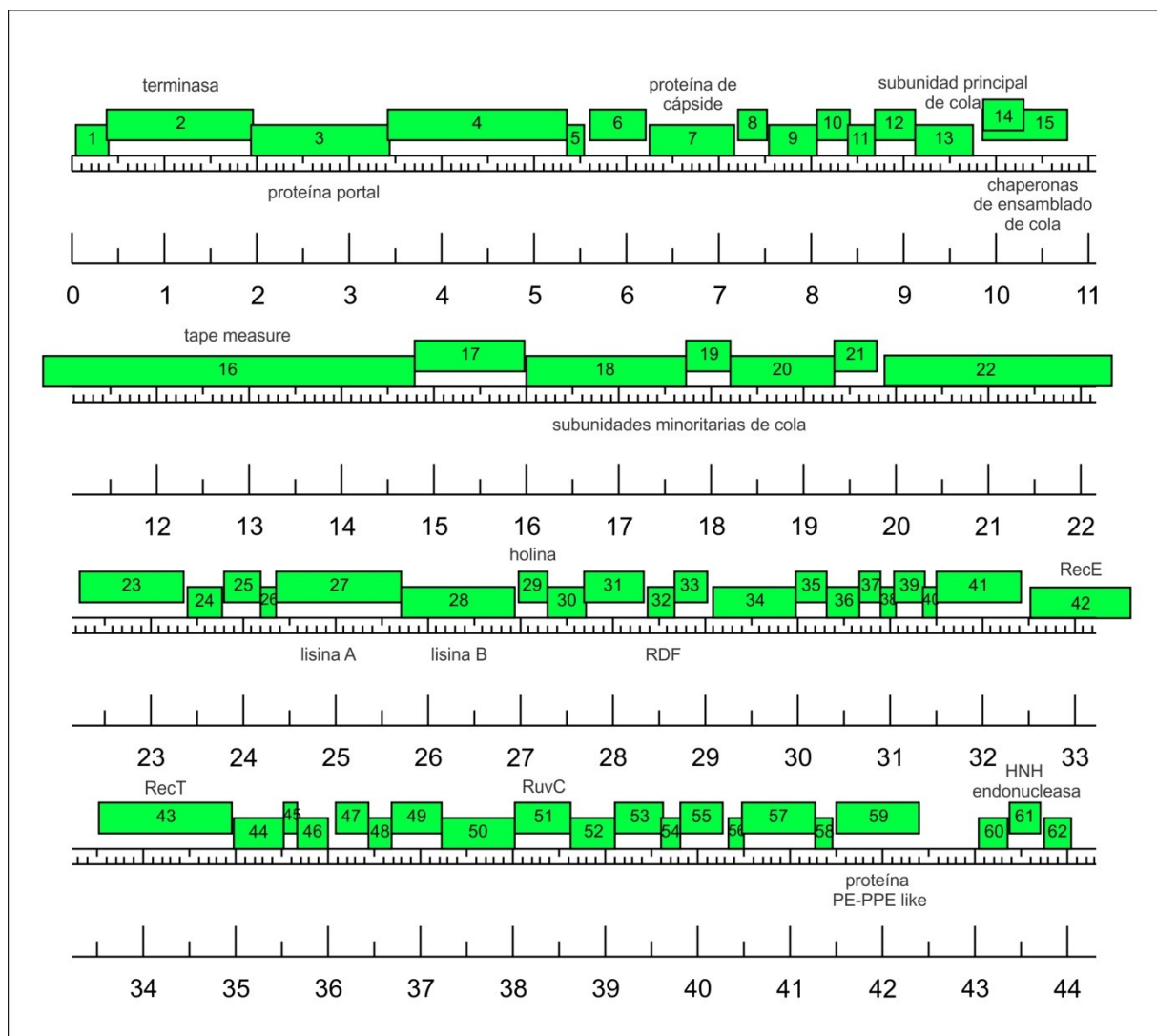


Figura 5.12. Organización genómica del micobacteriofago Jolie2. El esquema muestra en verde los genes transcritos en dirección directa. Se indica la función probable para los ORFs en donde la misma pudo ser asignada. Los genes 14 y 15 se presentan superpuestos debido al corrimiento traduccional (-1).

5.1.2.6 Singletons. *Micobacteriofagos integrativos 32HC y 19ES*

Teniendo en cuenta que de los 690 genomas finalizados al momento de la escritura del presente trabajo, sólo nueve de ellos presentaron secuencias nucleotídicas que no pudieron agruparse en los 21 *clusters* conocidos, podría asumirse que la probabilidad de encontrar nuevos *singletons* analizando 18 aislamientos era baja [www.phagesdb.org]. Sorpresivamente, se han encontrado al menos dos micobacteriofagos que no pudieron vincularse con los ya descritos, como se mencionó anteriormente en la sección 5.1.2.1 para el micobacteriofago 32HC. La figura 5.14 muestra el mapa de la organización genómica del mismo, 32HC codifica para las subunidades mayor y menor de la terminasa, estando esta última a 200 pb del extremo izquierdo del genoma. Inmediatamente contiguos, se encuentran un grupo de genes transcritos en dirección reversa y para los cuales no se ha podido inferir una probable función, a excepción del ORF 7, que codificaría para una proteína de unión a ADN ya que posee dominios hélice-giro-hélice [Hatfull, 2010]. Los genes estructurales comienzan a partir del ORF 10 con el correspondiente a la proteína portal, y luego aquellos para la proteasa de maduración de cápside, proteínas del virion, subunidad principal de cola, proteína *tape measure* y subunidad minoritaria de cola. En la región derecha se ubica el cassette de lisis constituido por los genes *lysA* y *lysB*, si bien no han podido encontrarse genes con homología a holinas, un análisis del ORF adyacente a *lysB* mediante la herramienta TMHMM reveló la presencia de dos dominios transmembrana [Krogh *et al.*, 2001]. El ORF 47 codificaría para una integrasa perteneciente a la familia de las tirosina recombinasas, enzimas que catalizan la integración del genoma fágico utilizando tARNs como sitio attB. Si bien la integración requiere una identidad de pocas pb (7-8) entre los sitios attB-attP, la región de homología suele extenderse hasta 45 pb de manera de reconstruir el tARN para que sea funcional; así mediante una búsqueda en blastn se ha identificado al gen *MSMEG_5758* (tARN-Lys) como posible sitio attB para 32HC. Generalmente el sitio attP se encuentra cerca de la integrasa en una región intergénica, sin embargo en este caso se ubica entre las coordenadas 33.764 y 33.802, dentro del ORF 48 que codificaría para el represor. Este fenómeno no es infrecuente en la regulación de la inmunidad en micobacteriofagos ya que ha sido descrito para integrantes de diferentes *clusters* [Hatfull, 2014]. Además, la parte derecha del genoma incluye unos pocos genes, cuyas funciones pudieron predecirse bioinformáticamente, y que estarían involucrados en el metabolismo y replicación del ADN, entre ellos el ORF 74 que codifica para un probable regulador transcripcional de la familia WhiB, proteínas reguladoras propias de actinomicetes [Agarwal *et al.*, 2006; Rybniker *et al.*, 2010]. Como se observa en la tabla 5.6 muchos de los genes sobre esta zona no presentaron homología alguna, cuando sus productos génicos fueron comparados contra la base de datos no redundante. Otra particularidad que se desprende de la tabla es que más de la mitad de las proteínas codificadas por 32HC tienen homología con proteínas de *M. abscessus*, sin embargo las dos cepas clínicas ensayadas de esta especie no han podido ser infectadas por el fago en cuestión.

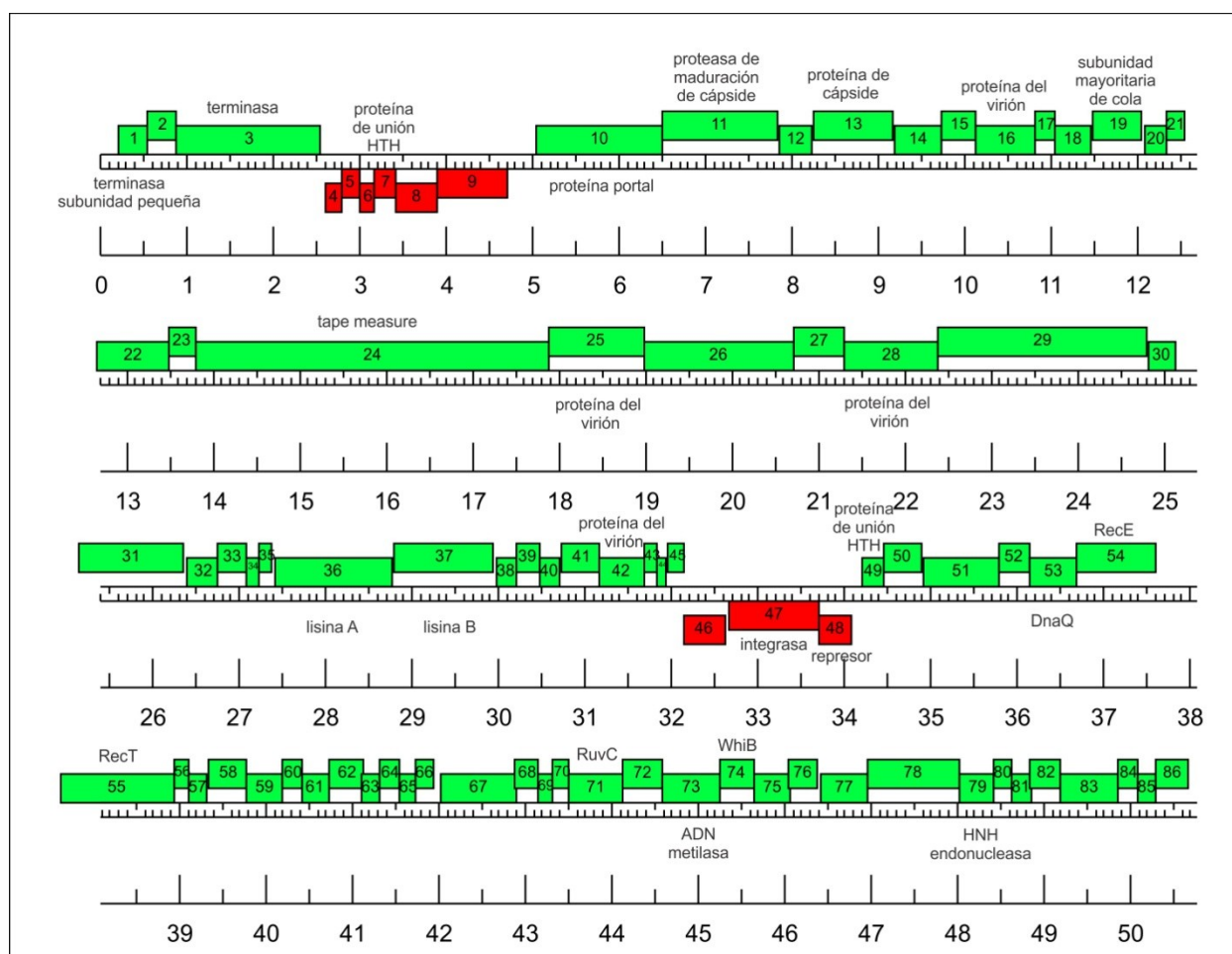


Figura 5.14. Organización genómica del micobacteriofago 32HC. El esquema muestra en verde los genes transcritos en dirección directa, y en rojo aquellos transcritos en dirección inversa. Se indica la función probable para los ORFs en donde la misma pudo ser asignada.

ORF	Base de datos virus	Base de datos genoma <i>Mycobacterium abscessus</i>	Base de datos NR	Función probable
1	gp1 MB Jebeks (AEN70225.1) (3e-10)	HP (WP_017207605.1) (2e-08)	-	terminasa subunidad pequeña
2	NC	NC	NC	gp2
3	gp5 MB Giles (YP_001552334.1) (8e-143)	HP (WP_016892122.1) (5e-145)	-	terminasa
4	NC	HP (WP_005061676.1) (5e-09)	-	gp4
5	gp72 MB BigNuz (AEL98234.1) (4e-28)	HP (WP_005122020.1) (3e-14 46%)	-	gp5
6	gp71 MB Fishburne] (2e-19) (YP_008051296.1)	NC	-	gp6
7	gp32 MB Butters (1e-27) (YP_007869843.1)	HP (YP_008017294.1) (2e-14)	HP <i>Mycobacterium thermoresistibile</i> (2e-33) WP_003925151.1	proteína de unión HTH

ORF	Base de datos virus	Base de datos genoma <i>Mycobacterium abscessus</i>	Base de datos NR	Función probable
8	NC	NC	NC	gp8
9	gp55 MB Liefie (1e-130) (AEL98527.1)	NC	-	gp9
10	gp3 MB BigNuz (1e-138) (AEL98654.1)	HP (1e-157) (WP_005109848.1)	-	proteína portal
11	protease MB Fishburne (YP_008051229.1) (1e-68)	peptidasa S14 (1e-93) (WP_005104666.1)	-	proteasa de maduración de cápside
12	NC	HP (8e-62) (WP_005123192.1)		gp12
13	HP <i>Microbacterium</i> fago Min1 (4e-10) (YP_001294801.1)	HP (2e-180) (WP_005087326.1)	-	proteína de cápside
14	NC	HP (5e-05) (WP_005061721.1)	HP <i>Mycobacterium</i> sp. 155 (6e-12) (WP_018599666.1)	gp14
15	gp11 MB Giles (7e-11) (YP_001552340.1)	HP (7e-06) (WP_005123194.1)	HP <i>Gordonia</i> sp. (3e-16) (WP_020794763.1)	gp15
16	gp12 MB Giles (4e-49) (YP_001552341.1)	HP (5e-38) (WP_016895913.1)	-	proteína del virión
17	gp13 MB Giles (4e-09) (YP_001552342.1)	HP (6e-19) (WP_016895914.1)		gp17
18	gp14 MB Giles (1e-18) (YP_001552343.1)	HP (6e-20) (WP_016892113.1)	-	gp18
19	gp15 MB Giles (5e-80) (YP_001552344.1)	HP (6e-70) (WP_017554897.1)	-	subunidad mayoritaria de cola
20	NC	NC	NC	gp20
21	NC	NC	NC	gp21
22	gp17 MB Giles (6e-47) (YP_001552346.1)	HP (4e-47) (WP_016895919.1)	-	gp22
23	NC	HP (1e-04) (WP_017554895.1)	HP <i>Nocardiopsis alba</i> (9e-05) (WP_017536243.1)	gp23
24	gp15 MB Che9c (NP_817692.1)(2e-74)	HP (WP_005061739.1)(3e-66)	HP <i>Rhodococcus ruber</i> (8e-90) (WP_01782403.1)	tape measure
25	gp21 MB Giles (1e-162) YP_001552350.1	HP (8e-169) (WP_017207590.1)	-	proteína del virión
26	gp22 MB Giles (0.0) (YP_001552351.1)	HP (0.0) (WP_016892106.1)		gp26
27	gp23 MB Giles (1e-09) (YP_001552352.1)	HP (3e-19) (WP_017207588.1)	-	gp27
28	gp24 MB Giles (2e-142) (YP_001552353.1)	HP (2e-125) WP_016895925.1	-	proteína del virión
29	gp20 MB BigNuz (6e-104) (AEL98183.1)	HP (2e-34) WP_005089730.1		gp29
30	gp21 MB BigNuz (2e-41) (AEL98184.1)	HP (4e-40) (WP_005089729.1)	-	gp30
31	HP MB L5 (1e-34) (NP_039696.1)	HP (1e-34) (WP_005083805.1)	-	gp31
32	gp21 MB ShiLan (1e-05) AEJ93214.1	HP (1e-10) WP_005083803.1	HP <i>Gordonia</i> sp. (4e-30) (EMP12495.1)	gp32

ORF	Base de datos virus	Base de datos genoma <i>Mycobacterium abscessus</i>	Base de datos NR	Función probable
33	NC	HP (3e-11) WP_005083801.1	-	gp33
34	NC	NC	NC	gp34
35	NC	NC	NC	gp35
36	gp48 MB Vortex] (5e-132) (AEJ95624.1)	NC	-	lisina A
37	gp53 MB Marvin (1e-59) (AEJ95337.1)	proteína de unión a peptidoglicano (3e-175) (WP_005101019.1)	-	lisina B
38	gp28 MB BigNuz (9e-09) AEL98191.1	NC	-	gp38
39	HP MB Muddy (2e-15) YP_008408915.1	HP (6e-14) WP_005103015.1	-	gp39
40	NC	NC	NC	gp40
41	HP MB Jabbawokkie (9e-26) YP_008410714.1	HP (7e-39) WP_005121805.1	-	gp41
42	gp36 MB Giles (5e-19) YP_001552365.1	HP (3e-36) WP_017554890.1	-	proteína del virion
43	NC	NC	NC	gp43
44	NC	NC	NC	gp44
45	NC	NC	NC	gp45
46	gp59 MB Omega (2e-10) NP_818360.1	NC	HP <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (2e-24) YP_950888.1	gp46
47	gp34 MB Charlie (5e-108) AEL19988.2	recombinasa (6e-102) YP_008021208.1	-	integrasa (tirosina recombinasa)
48	represor <i>Staphylococcus</i> fago JS01 (4e-04) YP_008239509.1	XRE regulador transcripcional (6e-07) WP_005083996.1	HP <i>Mycobacterium avium</i> (1e-07) WP_016705884.1	represor
49	NC	regulador transcripcional (2e-04) WP_005064968.1	-	proteína de union HTH
50	NC	NC	NC	gp50
51	gp51 MB Giles (2e-19) YP_001552380.1	HP (4e-20) WP_005137031.1	HP <i>Gordonia</i> (5e-25) YP_006668145.1	gp51
52	NC	NC	NC	gp52
53	gp61 MB Giles (2e-33) YP_001552390.1	HP (3e-40)WP_005109813.1	-	DnaQ
54	gp52 MB Giles (2e-90) YP_001552381.1	HP (2e-94) WP_005087397.1	-	RecE
55	recombinasa cianobacteriofago PSS2 (4e-10) YP_003084246	HP (6e-83) WP_017554924.1	-	RecT
56	NC	NC	NC	gp56
57	NC	HP (6e-83) WP_017554924.1	-	gp57
58	gp56 MB Giles (3e-04) YP_001552385.1	HP (6e-22) WP_017554923.1	-	gp58
59	NC	NC	NC	gp59
60	NC	NC	NC	gp60
61	NC	NC	NC	gp61

ORF	Base de datos virus	Base de datos genoma <i>Mycobacterium abscessus</i>	Base de datos NR	Función probable
62	gp59 MB Giles (4e-16) YP_001552388.1	HP (3e-07) WP_017207825.1	-	gp62
63	NC	NC	NC	gp63
64	NC	HP (2e-18) WP_005099889.1	HP <i>M. avium</i> (4e-23) WP_019738582.1	gp64
65	NC	NC	NC	gp65
66	NC	HP (8e-07) WP_017554917.1	-	gp66
67	HP MB Jebeks (6e-22) AEN70283.1	HP (3e-36) WP_017554913.1	-	gp67
68	NC	NC	NC	gp68
69	NC	NC	NC	gp69
70	NC	HP (1e-04) WP_016895898.1	-	gp70
71	gp67 MB Giles (8e-23) YP_001552396.1	HP (5e-31) WP_005121748.1	-	RuvC
72	gp69 MB Che9c (3e-17) NP_817746.1	HP (6e-23) WP_017555358.1	HP <i>Actinopolymorpha alba</i> (4e-43) WP_020580175.1	gp72
73	gp76 MB Che9d (3e-67) NP_818049.1	ADN metiltransferasa(5e-68) YP_008017189.1	-	AND metilasa
74	gp68 MB Giles (3e-04) YP_001552397.1	regulador transcripcional (6e-07) WP_016892133.1	-	WhiB
75	NC	NC	NC	gp75
76	NC	NC	NC	gp76
77	NC	NC	NC	gp77
78	NC	NC	NC	gp78
79	<i>Rhodococcus fago</i> REQ2 (6e-25) YP_005087126.1	HP (5e-33) WP_016892126.1	-	HNH endonucleasa
80	gp72 MB Fishburne (7e-37) YP_008051297.1	NC	-	gp80
81	NC	NC	HP <i>Mycobacterium thermoresistibile</i> (3e-06) WP_003925158.1	gp81
82	NC	NC	NC	gp82
83	NC	NC	NC	gp83
84	NC	HP (6e-20) WP_005129489.1	-	gp84
85	gp42 <i>Gordonia fago</i> GTE7 (8e-07) YP_004934743.1	NC	-	gp85
86	NC	NC	NC	gp86

Tabla 5.6. ORFs designados para el micobacteriofago 32HC. Se indican los valores (E value), y los números de acceso arrojados por blastp, para las diferentes bases de datos utilizadas. (NR) No redundante. (NC) La búsqueda no arrojó coincidencias. (-) Corresponde el resultado obtenido cuando la comparación se realizó utilizando como base *M. abscessus* y/o la totalidad de los virus presentes en la base de datos. (HP) Proteína hipotética.

Como se estableció anteriormente, los genomas de seis de los micobacteriofagos secuenciados no han podido resolverse de manera completa. Sin embargo, teniendo en cuenta los tamaños genómicos arrojados por PFGE se estimó que los diferentes fragmentos cubrirían la mayor parte del genoma para los micobacteriofagos 21AM, 21AS, Bahía1, Bahía2 y 19ES. Cuando los genomas parciales de dichos micobacteriofagos fueron comparados mediante *dotplot* con integrantes de los *clusters* y *singletons* actuales, se pudo agrupar a los cuatro primeros en el *cluster* A, mientras que 19ES no mostró ninguna

similitud nucleotídica con la base de datos utilizada. Es relevante destacar que estos resultados fueron confirmados al comparar, también mediante *dotplot*, las secuencias aminoacídicas de las proteínas *tape measure*. Además se compararon las secuencias nucleotídicas de 32HC y 19ES para descartar la posibilidad de que ambos sean parte de una nueva categoría o *cluster*.

Habiendo corroborado la singularidad del micobacteriofago 19ES, se diseñaron cebadores para tratar de completar la secuencia nucleotídica del mismo, que a juzgar por el tamaño del fragmento más grande (52.486), de otro más pequeño de 900 pb, y de los resultados obtenidos mediante PFGE el tamaño completo sería cercano a las 53-54 kpb. A pesar de varios intentos, no se han obtenido productos de PCR utilizando distintas condiciones de ciclado y combinaciones de cebadores. Por otro lado, la secuenciación de los extremos utilizando cebadores diseñados sobre los mismos, no ha permitido resolver el problema; ya que las señales de los cromatogramas correspondientes decaen abruptamente permitiendo una lectura correcta de fragmentos cortos, de no más de 200 pb. Este micobacteriofago, tiene un contenido de G+C inusualmente alto (70%), lo cual podría explicar la dificultad encontrada para cerrar su genoma. A pesar de ello, se realizó el análisis genómico, a partir del cual se obtuvo la siguiente información. En primer lugar, utilizando el programa DNAMaster se establecieron 85 ORFs, transcritos en su mayoría en la misma dirección, entre los cuales se destacan genes estructurales, genes de lisis y de empaquetamiento de ADN, y la presencia de un gen que codifica para la chaperona DnaJ, una proteína inusual en bacteriofagos [Champ *et al.*, 2011]. Una particularidad es la disposición de dichos genes sobre el genoma de 19ES, *lysA* y *lysB* se ubicarían sobre el extremo izquierdo mientras que los genes estructurales lo harían sobre el derecho; y los codificantes para las subunidades mayor y menor de la terminasa en la zona central del mismo. La subunidad mayor de la terminasa no sólo es uno de los genes más conservados dentro de los bacteriofagos del orden *Caudovirales*, sino que a partir del conocimiento de su secuencia aminoacídica se puede inferir la estrategia de empaquetamiento, y de ahí el tipo de extremos que presenta el genoma fágico [Casjens y Gilcrease, 2009]. Al realizar un análisis bioinformático del producto del gen de la subunidad mayor para este aislamiento, se pudo determinar que el mismo presenta dominios conservados compatibles con la familia PF03354. Considerando lo expuesto anteriormente, el micobacteriofago 19ES tendría extremos cohesivos; sin embargo como se mencionó en la sección 5.1.1.2, la corrida de PFGE para este fago no siguió el patrón característico para los aislamientos con este tipo de extremos. Por último, aunque se han detectado genes que serían responsables de la naturaleza temperada de este micobacteriofago, como los codificantes para una integrasa del tipo tirosina recombinasas, un represor y el RDF; no han podido localizarse bioinformáticamente los posibles sitios attP y attB.

5.1.2.7 Aplicaciones

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue construir nuevos vectores plasmídicos integrativos utilizando micobacteriofagos temperados capaces de infectar *M. tuberculosis*. Teniendo en cuenta que los

nuevos aislamientos que cumplen con esta condición, infectar y ser temperados en *M. tuberculosis*, no se integrarían al genoma de dicha micobacteria sino que utilizarían el nuevo sistema de herencia descrito anteriormente [Stella *et al.*, 2013], se ha planteado un nuevo objetivo con el propósito de usar estos fagos modificados como herramientas diagnósticas. Los genes de partición no serían esenciales, ya que su pérdida generaría fagos incapaces de heredarse pero no de replicarse y llevar a cabo su ciclo lítico [Bourhy *et al.*, 2005]. Considerando la dificultad, expresada por otros autores, para incorporar fragmentos mayores a 1kb en el genoma del micobacteriofago D29, ésta sería una estrategia válida para minimizar dicho problema [da Silva *et al.*, 2013]. Para llevarla a cabo en el micobacteriofago First, se siguió el esquema representado en la figura 5.15 para la generación del micobacteriofago First Δ Par-PacI, donde se plantea en forma simultánea a la delección de los genes *parA* y *parB* mediante *recombineering*, el agregado del sitio de restricción PacI (TTAATTAA). Dicho sitio se encuentra ausente en el genoma de First y de micobacterias por su alto contenido G+C ofreciendo la posibilidad de clonar en el mismo cualquier gen de interés. A pesar de numerosos intentos que incluyeron modificaciones en el protocolo de “recombineering” como se detalla en Materiales y Métodos, y de haberse chequeado la ausencia de los genes delecionados en más de 800 placas de lisis no ha podido obtenerse el micobacteriofago modificado.

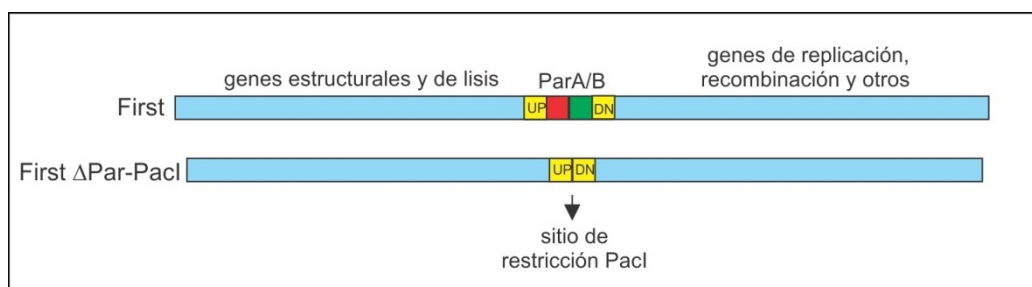


Figura 5.15. Esquema de la estrategia utilizada en la generación del micobacteriofago First Δ Par-PacI. Se indican en amarillo los fragmentos utilizados para realizar la delección mediante el método de *recombineering*.

5.1.3 Discusión

La vasta cantidad de información proporcionada por Hatfull en la última década, no sólo ha permitido avanzar en la genética de micobacterias sino que también ha revelado la enorme diversidad expuesta por los bacteriofagos de dicho género. La categorización de micobacteriofagos en *cluster* y *singletons* es dinámica, dada la abundancia de fagos encontrados y secuenciados continuamente; y dada la heterogeneidad que aumenta con el número de aislamientos. Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, la búsqueda de nuevos micobacteriofagos no es una materia infructuosa, la evidencia de ello se desprende del análisis de los resultados obtenidos durante el presente trabajo. Durante el mismo, se han aislado siete micobacteriofagos a partir de muestras ambientales utilizando *M. smegmatis* mc²155 como

bacteria indicadora y 30°C como temperatura de trabajo. Búsquedas anteriores llevadas a cabo en el laboratorio dan cuenta de la importancia de la temperatura elegida, ya que varios micobacteriofagos aislados previamente fueron incapaces de replicarse a temperaturas mayores. Así mismo, sólo los aislamientos denominados CRB1 y Bahía1 pudieron replicarse a 30 y 37°C, mientras que los restantes encontrados durante la ejecución de la presente Tesis Doctoral sólo generaron placas de lisis a 30°C; y ninguno pudo replicarse a 42°C. Esto es llamativo ya que una búsqueda bibliográfica reveló la ausencia de estudios sobre el rango de temperaturas apto para la propagación de bacteriofagos de bacterias mesófilas como es el caso de *M. smegmatis*. Además, sólo ha sido reportado la dependencia del desarrollo con la temperatura para el micobacteriofago Anaya, un miembro del *cluster* K, que no estaría relacionado con los aislamientos analizados [Pope *et al.*, 2011]. Es probable que los hospedadores usuales de estos fagos tengan características diferentes a la cepa indicadora *M. smegmatis*, especialmente en cuanto a la temperatura de crecimiento, como se mencionó en la sección 5.1.1.1. Es importante destacar que este comportamiento no pareciera deberse a la incapacidad de los fagos de adsorberse a la célula hospedadora a diferentes temperaturas, dado que se observó el mismo fenotipo independientemente de la temperatura a la cual se creció la cepa *M. smegmatis* [Taselli, Tesina de Grado 2011]. Dado el continuo proceso de búsqueda de nuevos fagos de micobacterias llevado a cabo en el laboratorio, durante este trabajo se han analizado en detalle dieciocho aislamientos, entre ellos 21AS, 21AM, First, 40AC, 32HC, 20ES, 40BC, 19ES, 39HC, Mine y 41HC encontrados anteriormente. Se llevó a cabo la caracterización fenotípica de los nuevos aislamientos analizando, entre otros aspectos, la dependencia entre su replicación y la presencia de cationes divalentes y el rango de hospedador de los mismos. Este análisis permitió agrupar a los micobacteriofagos aislados en diferentes categorías, aquellos que requieren la presencia de algún catión divalente, los que necesitan preferentemente calcio y el fago 19ES que es capaz de propagarse en un medio sin el agregado extra de cationes. Es probable que los fagos que pertenecen a un mismo grupo tengan un tipo de receptores en común y utilicen mecanismos de infección similares. Dado que las propiedades fenotípicas mostradas por los micobacteriofagos están condicionadas por sus genes y por lo tanto por el *cluster* que integran no resultó llamativo que 19ES conforme una nueva categoría. Para los micobacteriofagos descritos en la literatura existe una correlación entre la preferencia por hospedadores diferentes a *M. smegmatis* mc²155 y el tipo de *cluster/subcluster* que integran. A pesar del enorme número de especímenes aislados casi exclusivamente por Hatfull, sólo unos pocos fueron capaces de infectar óptimamente un hospedador diferente a *M. smegmatis*; entre ellos algunos pertenecientes a los *subcluster* A2 y A3 y miembros del *cluster* K fueron capaces de replicarse en *M. tuberculosis*. Considerando las distancias evolutivas entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* que implican por ejemplo diferencias muy marcadas en los tiempos de crecimiento (tiempo de duplicación de 3 hs y 24 hs, respectivamente) y en los tamaños genómicos (7.0 Mbp y 4.4 Mbp, respectivamente), no es sorprendente que sólo algunos micobacteriofagos puedan infectar eficientemente ambas cepas [Jacobs-Sera *et al.*,

2012]. Si bien los aislamientos analizados en el presente trabajo de Tesis mostraron un comportamiento similar no pudiendo replicarse efectivamente en el grupo de MNT ensayadas, 6 de 18 micobacteriofagos fueron capaces de infectar *M. tuberculosis* H37Rv; entre ellos First, 20ES, 21AM, 21AS, 41HC y CRB2. Este último no pudo agruparse a partir de su secuencia nucleotídica en ninguna de las categorías definidas en la literatura, mientras que los cinco restantes serían miembros del *cluster* A, ya que presentan una composición nucleotídica y la organización canónica de los genes compatibles con los miembros del *cluster* mencionado [Hatfull, 2010]. Dado que a partir de estos cinco aislamientos pudieron obtenerse clones lisógenos de *M. tuberculosis*, los mismos se propusieron como candidatos para la construcción de nuevos plásmidos integrativos. Se inició un análisis bioinformático con las secuencias nucleotídicas de estos micobacteriofago; sin embargo y a pesar de su naturaleza temperada en *M. smegmatis* y en *M. tuberculosis* no pudieron encontrarse ORFs codificantes para integrasas/excisionasas ni secuencias que pudieran actuar como sitios attP en ninguno de los casos. En cambio se detectaron genes con homología a *parA* y *parB*, los cuales están descriptos en la bibliografía como parte de sistemas de partición involucrados en la herencia de unidades genéticas como plásmidos y cromosomas, y menos frecuentemente bacteriofagos [Gerdes, 2010]. Inesperadamente estos genes se han encontrado en una alta proporción en los aislamientos locales, mientras que aparecen con una frecuencia mucho menor en los micobacteriofagos disponibles en las bases de datos. Los nuevos micobacteriofagos agrupados en el *cluster* A, First, 20ES, CRB1, 41HC, 21AM y 21AS presentan *loci* de partición, a excepción de 40AC en cuyo genoma no ha podido detectarse ningún ORF con homología a *parB*. La imposibilidad de obtener clones lisógenos a partir de este micobacteriofago, junto con la divergencia mostrada por su proteína ParA en un análisis filogenético de las ParA de distintos micobacteriofagos, probarían la funcionalidad de este novel sistema de herencia. Teniendo en cuenta que una particularidad del género *Mycobacterium* es la reticencia al intercambio génico, reflejada en los pocos plásmidos y fagos transductores encontrados en el género, quizás algunos micobacteriofagos hayan adquirido estos *loci* de partición como una alternativa para perpetuarse junto con las micobacterias sin “perturbar” su genoma.

Los *clusters* A y B reúnen la mayor cantidad de micobacteriofagos encontrados en la biosfera hasta el momento, por lo tanto no fue llamativo que la mayoría de los nuevos aislamientos correspondan a estos dos grupos; y 5 de 12 pertenezcan al *cluster* B. Si bien este último ha sido dividido en varios *subclusters*, Jolie1, Mine, Hosp, 39HC y 40BC fueron muy similares entre sí y altamente homólogos al micobacteriofago KayaCho (*subcluster* B4). Todos presentaron la misma organización genómica y al igual que en KayaCho, se ha detectado en sus genomas la presencia de un ORF que codificaría para una proteína del tipo PE/PPE. La presencia de las mismas es inusual en bacteriofagos, aunque en micobacterias patógenas los genes que codifican para proteínas de esta familia pueden alcanzar hasta el 10% de la capacidad codificante del genoma. En estas especies es muy probable que estos genes estén involucrados en mecanismos de virulencia; si bien también se encuentran en especies no patógenas del

género *Mycobacterium*, aunque en una proporción mucho menor; el rol que cumplirían en estas bacterias y en sus virus aún es una incógnita [Sultana *et al.*, 2011].

Por otro lado se ha realizado el análisis y la anotación del genoma del micobacteriofago Jolie2, el mismo comparte una alta homología nucleotídica con los miembros del *cluster* G, aunque presenta un contenido de GC levemente mayor (68% versus 66%). Dado que este *cluster* aún no está subdividido en *subclusters*, es probable que Jolie2 represente un grupo diferente al del resto de los aislamientos descritos del cluster G. Teniendo en cuenta además, que a diferencia de Halo, BPs y Angel, tres de los micobacteriofagos más estudiados que infectan *M. tuberculosis* con una eficiencia muy baja, Jolie2 no fue capaz de hacerlo [Sampson *et al.*, 2009]. Otra diferencia fue la imposibilidad de obtener clones lisógenos a partir de Jolie2, considerando que en su genoma se ha detectado un ORF codificante para un probable RDF pero ninguno con homología a represores/integrasas, posiblemente los antecesores de este fago hayan sido lisógenicos.

Como se mencionó anteriormente, al momento de la escritura del presente trabajo de Tesis se han definido y caracterizado parcialmente 9 singletos denominados: Cosmo, Jean, MooMoo, Gaia, Muddy, Sparky, Dori, Wildcat, y DS6A. Teniendo en cuenta el número de genomas completos para los fagos de micobacterias, sólo el 1% de los mismos han mostrado muy poca homología entre ellos y con el resto de los aislamientos descritos, y por eso no han podido agruparse y son considerados *singletons*. Llamativamente en los aislamientos locales analizados se han detectado dos *singletons* 32HC y 19ES; el primero de ellos ha sido estudiado en mayor profundidad y su secuencia genómica recientemente depositada en Genbank. Si bien los productos génicos de la mayoría de los ORFs de 32HC no han presentado homología con proteínas conocidas, un número inusualmente alto de estos son semejantes a proteínas de *M. abscessus* de función desconocida. A pesar de ello, este aislamiento al igual que todos los ensayados en este trabajo no fueron capaces de infectar productivamente a las dos cepas clínicas ensayadas de esta micobacteria. Si bien no se cuenta con los genomas secuenciados de las mismas, publicaciones recientes dan cuenta del gran número de profagos y elementos de profagos preexistentes en diferentes variedades de *M. abscessus*, así la inmunidad por superinfección podría ser la responsable de restringir la replicación de 32HC en esta especie micobacteriana. [Sassi *et al.*, 2014]

A pesar de que no se ha completado totalmente el genoma del segundo *singleton* local (19ES), se han establecido para el mismo 85 ORFs transcritos en su mayoría en la misma dirección, entre los cuales se destaca la presencia de un gen que codificaría para una chaperona del tipo DnaJ, una proteína inusual en bacteriofagos [Qiu *et al.*, 2006]. Estas proteínas encontradas en distintas bacterias, son chaperonas de la familia Hsp40 que actúan conjuntamente con las chaperonas DnaK en distintas circunstancias. Existe un reporte en la bibliografía que involucra a DnaJ como participante activo en la

escisión del profago KpIE1 del genoma de *E. coli* [Champ *et al.*, 2011]. Teniendo en cuenta la naturaleza temperada del micobacteriofago 19ES en *M. smegmatis*, la presencia de dicho gen en su genoma podría conferirle una ventaja evolutiva al momento de tomar la decisión de escindirse del genoma de su hospedador y completar el ciclo lítico. Esta particularidad junto con las características extraordinarias de propagación encontradas para 19ES, merecen sin duda profundizar las investigaciones sobre este nuevo *singleton*, ya que el mismo podría utilizar receptores y/o mecanismos de infección diferentes del resto de los micobacteriofagos.

Por otro lado el comportamiento exhibido por el micobacteriofago CRB2 resulta peculiar desde todo punto de vista, ya que fue el único aislamiento no perteneciente al *cluster A*, capaz de replicarse productivamente en *M. tuberculosis*. Además este micobacteriofago inicialmente no pudo replicarse a 37°C en *M. smegmatis*, sin embargo una vez propagado en *M. tuberculosis* mostró un comportamiento diferente en *M. smegmatis*. Es probable que cuando CRB2 fue amplificado en la micobacteria de crecimiento lento, ésta haya ejercido una presión favorable a la selección de mutación/es que permitan superar el impedimento de replicarse a temperaturas mayores a 30°C. Otra particularidad reside en el análisis morfométrico, CRB2 pertenece a la familia *Siphoviridae* como el resto de los aislamientos estudiados, el virión del mismo posee la cola más larga superando los 350 nm. Este no es un dato menor teniendo en cuenta que todos los micobacteriofagos capaces de infectar *M. tuberculosis*, incluyendo los hallados en el presente trabajo tienen colas que promedian los 200 nm. Lamentablemente la secuenciación de CRB2 utilizando la tecnología 454 arrojó más de 40 fragmentos, dos de ellos de aproximadamente 10kb y el resto de tamaños variables entre 2000 y 500 pb, esto impidió la posibilidad de conocer la categorización de este nuevo aislamiento en los diferentes *clusters*. A pesar de ello y, teniendo en cuenta el comportamiento inusual de CRB2 y la falta de homología en secuencia nucleotídica cuando aproximadamente 1/3 de su genoma fue comparado mediante *blastn* con la base de datos, indicarían que CRB2 conforma un nuevo *singleton*. Dada las características de sus extremos, este micobacteriofago así como también aquellos que integran el *cluster B* fueron ensayados para comprobar su capacidad de realizar transducción generalizada, los resultados fueron negativos en ambos casos. Este resultado es coincidente con los datos reflejados en la bibliografía ya que de la vasta cantidad de micobacteriofagos sólo dos son transductores generalizados en *M. smegmatis*, y de todos los fagos descritos capaces de infectar *M. tuberculosis* ninguno tiene la potencialidad de realizar transducción ya que, a diferencia de CRB2, poseen extremos cohesivos.

Por último y en relación a uno de los objetivos del presente trabajo de Tesis que planteó la construcción de nuevas herramientas diagnósticas, una interpretación para la imposibilidad de obtener el micobacteriofago First Δ par-PaI radicaría en el cambio del tamaño genómico inherente a la delección. Si el micobacteriofago elegido no fuese capaz de encapsidar un tamaño distinto al original en sus viriones,

es lógico que no haya podido obtenerse el fago recombinante. Se plantea la posibilidad de hacer un reemplazo de la región a delecionar, utilizando un segmento de ADN no codificante que regenere el tamaño genómico original. Aunque el objetivo no fue alcanzado, es importante destacar el valor potencial de estos aislamientos no sólo en la generación de nuevos sistemas de detección sino también en el desarrollo de elementos de investigación. En este sentido, el micobacteriofago CRB2 podría ser utilizado como vector suicida teniendo en cuenta su incapacidad para replicarse a altas temperaturas.

Considerando el hallazgo de una enorme cantidad de fagos de micobacterias depositados en www.phagesdb.org, existía la posibilidad de que el análisis de sólo 18 aislamientos (lo que representa menos del 1% del total de micobacteriofagos) no proporcionara grandes aportes a este campo de la investigación básica. Sin embargo, el abanico de secuencias analizadas, reflejadas indudablemente en el descubrimiento de dos nuevos *singletons* pone de manifiesto nuevamente la rica diversidad exhibida por los virus del género *Mycobacterium*. De esta manera, a pesar de ser uno de los grupos de fagos más populosos e intensamente estudiados, el incremento de aislamientos es ciertamente necesario para contribuir al entendimiento de la biología de estas entidades biológicas.

5.2 Capítulo 2: Caracterización de mutantes de *M. smegmatis* resistentes a micobacteriofagos

Como se mencionó en la Introducción del presente Trabajo de Tesis, entre los mecanismos de resistencia a la infección por bacteriofagos, se encuentran los cambios en la envoltura celular. Éstos pueden ser directamente en la estructura química de los receptores, o en la disposición tridimensional de los diferentes componentes de superficie generando enmascaramiento de los mismos [Labrie *et al.*, 2010]. A pesar de los numerosos reportes que estudian la biogénesis de las moléculas constituyentes de la compleja envoltura celular micobacteriana, la información sobre moléculas que podrían actuar como receptores es bastante escasa, y no se conocen los pasos posteriores de la infección que incluyen el contacto y la translocación del ADN a través de la membrana celular. Dentro de la poca información disponible, se puede citar el trabajo llevado a cabo por Chen y colaboradores (2009), quienes mediante la utilización de mutantes transposicionales, han asociado la resistencia al micobacteriofago I3 con la pérdida de GPLs en *M. smegmatis* [Chen *et al.*, 2009]. También ha sido propuesto el micósido C, un tipo de GPL, como receptor del micobacteriofago D4 [Furuchi y Tokunaga, 1971; Dhariwal *et al.*, 1986], un espécimen que no ha sido caracterizado genómicamente al igual que un fago infectante de *Mycobacterium phlei* que se uniría a glicolípidos con restos de lixosa [Bisso *et al.*, 1976; Khoo *et al.*, 1996]. Además, ha sido reportado para *M. smegmatis* que la sobreexpresión del gen *mpr*, mediante alteraciones en la membrana celular, genera resistencia a los micobacteriofagos D29 y L5, ambos relacionados genéticamente [Barsom y Hatfull, 1996; Besra *et al.*, 1994].

Como parte de la caracterización de los nuevos aislamientos, se incluyó el estudio de distintas mutantes resistentes a los mismos encontradas durante la ejecución de Tesinas de Grado previas [Stella, Tesina de Grado, 2007; Franceschelli, Tesina de Grado], y simultáneas [Taselli S.E., tesina de Grado 2011] al presente trabajo de Tesis. El propósito de ello fue, no sólo tratar de elucidar los posibles receptores celulares para los nuevos micobacteriofagos sino también adentrarse en las interacciones entre éstos y sus hospedadores. Estas mutantes espontáneas presentan fenotipos distintos, siendo evidente en la mayoría de ellas, la existencia de alteraciones morfológicas en sus colonias con respecto a la cepa parental *M. smegmatis* mc²155 como se detalla más adelante.

Por otro lado, se emprendió un trabajo en colaboración con el grupo del Dr. C. Martín (Universidad de Zaragoza, España), quién junto a sus colaboradores iniciaron la búsqueda de mutantes resistentes mediante transposición en *M. smegmatis* mc²155, obteniendo así mutantes resistentes al fago D29. El análisis genético de estas cepas reveló que el transposón estaba interrumpiendo un gen que codifica para una oligorribonucleasa hipotética (ORN); enzima con actividad 3'-5' exonucleasa que ha sido reportada

como esencial en *E. coli* [Ghosh y Deutscher, 1999]. El metabolismo celular del ARN, en todos los organismos vivos, requiere el procesamiento de ARNs y también la degradación de los mismos. Las enzimas responsables de mantener este balance son endo y exoribonucleasas, incapaces de degradar oligonucleótidos extremadamente cortos [Deutscher, 2006]. Se ha reportado que la acumulación de nanoARNs (oligonucleótidos ≤ 5 nucleótidos) puede alterar el inicio de la transcripción de diferentes genes, provocando cambios en la expresión génica que pueden ser letales para las células. Por ello, para completar la degradación de estos nanoARNs las células eucariotas y procariotas cuentan con enzimas especializadas denominadas nanoARNasas [Nickels y Dove, 2011]. Las bacterias Gram positivas y negativas emplean mecanismos de degradación diferentes, y codifican distintas nanoARNasas; la actividad de la enzima ORN de *E. coli* es reemplazada por enzimas que presentan actividades solapadas en microorganismos como *Bacillus subtilis*, entre ellas NrnA y NrnB [Fang *et al.*, 2009]. Una búsqueda bibliográfica reveló que el género *Mycobacterium* y algunas otras actinobacterias son particulares en cuanto al contenido de nanoARNasas, ya que en sus genomas están presentes los genes codificantes para ORN y NrnA, lo que sugiere que las vías de procesamiento de ARN en estos organismos podrían ser diferentes [Mechold *et al.*, 2007]. Además, un trabajo reciente sobre la enzima NrnA de *M. smegmatis* sugiere que la misma tendría un rol importante en condiciones de estrés, aunque al igual que ORN esta enzima no es esencial para el microorganismo en cuestión [Kumar *et al.*, 2014].

5.2.1 Mutantes espontáneas resistentes a distintos micobacteriofagos

5.2.1.1. Resistencia y morfología de las mutantes.

En el presente trabajo se analizaron mutantes resistentes para los micobacteriofagos 40AC, 20ES, 21AM, 21AS y Bahial, y también para Bxz1 e I3, fagos ya descritos en la literatura [Lee *et al.*, 2004; Kozloff *et al.*, 1972]. En primer lugar, se determinaron las EFP mediante la titulación de bacteriofagos en la cepa salvaje y en las mutantes espontáneas correspondientes, como se detalla en la tabla 5.7. En la mayoría de los casos, cuando estos fagos fueron titulados sobre la mutante correspondiente no se observaron placas de lisis aisladas que permitan realizar un cálculo apropiado del título. En cambio, se vieron halos tenues en las gotas más concentradas, excepto cuando se realizó la titulación del fago 20ES sobre la mutante 3-R20ES donde no se pudieron observar halos de lisis. Para los micobacteriofagos 21AS y Bahial la resistencia fue parcial, obteniéndose una reducción de al menos cinco órdenes en los títulos obtenidos con respecto a la cepa salvaje. Las diferencias morfológicas entre las cepas resistentes y la salvaje fueron evidenciadas mediante el crecimiento en medio sólido con la utilización del colorante Rojo Congo, como puede observarse en la figura 5.16. Este compuesto presenta una estructura planar, y es de naturaleza hidrofóbica, por lo tanto tiene una alta tendencia a unirse a los lípidos y lipoproteínas abundantes en la superficie celular micobacteriana, permitiendo una mejor visualización de las colonias. De esta manera, mediante el análisis macroscópico de las colonias pudieron establecerse dos grupos bien

diferenciados por su morfología, el primero integrado por las mutantes cuyas colonias fueron lisas y húmedas (3-R20ES, 2-R21AM, 3-R21AS, 6-RBahia1 y 2-R40AC) y el otro formado por las mutantes de colonias extremadamente secas y rugosas (12-RI3 y 10-RBxz1). Es importante destacar que la morfología para todos los clones se mantuvo cuando las placas fueron incubadas a 30°C, y que el análisis de las curvas de crecimiento de las mutantes no reveló diferencias significativas con respecto a los parámetros de crecimiento obtenidos para la cepa salvaje [Taselli S.E., Tesina de Grado 2011].

Micobacteriofago	Títulos expresados en UFP/ml	
	mc2155	mutante
21AS	6×10^9	4×10^4
21AM	4×10^8	-
40AC	2×10^9	-
20ES	6×10^9	-
Bahia1	2×10^{10}	1×10^5
Bxz1	2×10^{10}	-
I3	4×10^{10}	-

Tabla 5.7. Comparación de los títulos obtenidos para cada micobacteriofago en su cepa mutante y en la salvaje. Se muestran sombreadas las mutantes rugosas correspondientes a micobacteriofagos ya descritos en la literatura.

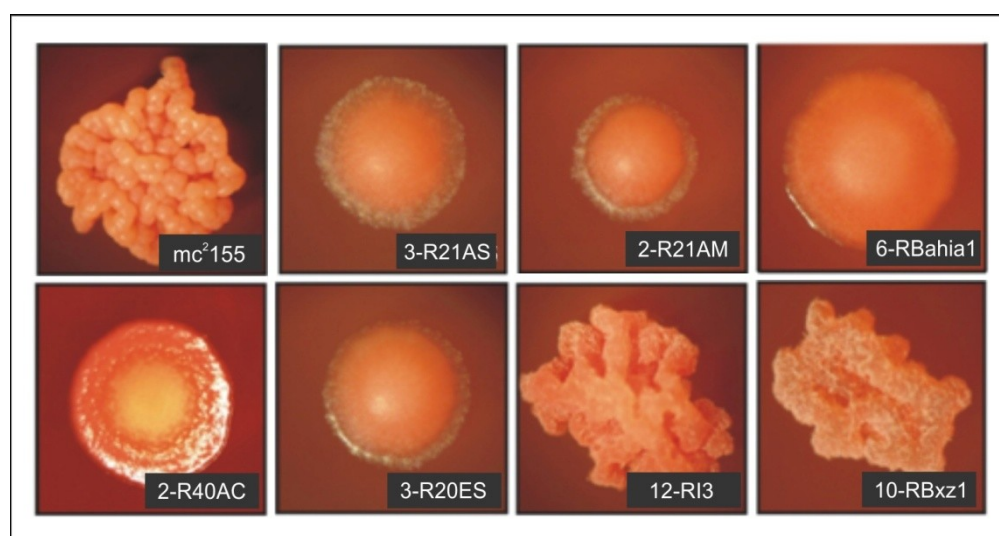


Figura 5.16. Morfología de las cepas resistentes y la cepa parental *M. smegmatis* en presencia de Rojo Congo. Las fotos se tomaron a un aumento de 2,5x utilizando una lupa Zeiss Stemi 2000C.

5.2.1.2 Análisis de lípidos extraíbles totales mediante TLC

Existen en la literatura numerosos reportes que relacionan cambios en el perfil de GPL en *M. smegmatis* y otras micobacterias con alteraciones en la morfología de sus colonias [Belisle *et al.*, 1993; Recht *et al.*, 2000]. Teniendo en cuenta las variaciones morfológicas que presentan las mutantes resistentes a micobacteriofagos con respecto a la cepa parental, fue de interés establecer el perfil de los lípidos extraíbles en las mismas, con el fin de comprender donde radicaría el origen de la resistencia en cada caso. En la figura 5.17 se observan los resultados obtenidos mediante TLC de los lípidos extraíbles totales para las mutantes resistentes estudiadas y para los controles *M. smegmatis* mc²155 y una mutante derivada de ésta última denominada Myc 55 que exhibe una morfología rugosa similar a las colonias de 12-RI3 y 10-RBxz1. Dicha mutante presenta una disrupción en el gen *MSMEG_0398* (*pks1*) que codifica para una enzima policétido sintasa involucrada en la biosíntesis de GPLs, impidiendo la producción de los mismos y alterando considerablemente su envoltura [Sondén *et al.*, 2005]. Claramente las mutantes 12-RI3 y 10-RBxz1 mostraron un patrón idéntico a Myc55, mientras que el resto exhibió un perfil similar al de la cepa salvaje (figura 5.16A). La utilización de una mezcla cloroformo/metanol/agua 60:12:2, como fase móvil, permitió una mejor resolución de la corrida; así en la figura 5.16B puede observarse la aparición de nuevas bandas para las mutantes 3-R20ES, 2-R21AM, 3-R21AS, 6-RBahia1 y 2-R40AC. Estos resultados indican que existe una concordancia entre la morfología de las colonias y el perfil de GPLs, las mutantes lisas tendrían modificaciones en algunos GPLs, mientras que las rugosas han perdido la mayoría de ellos. Dado que el resultado obtenido para la mutante resistente al micobacteriofago I3 sería similar al reportado por Chen *et al.*, se analizó mediante PCR y posterior secuenciación el gen *MSMEG_0392*. Para la mutante 12-RI3 el mismo conservó la secuencia salvaje, mientras que en 10-RBxz1, la aparición de una base extra generó un cambio en la lectura del ORF que produjo la aparición temprana de un codón de stop. Esto explicaría la desaparición de las bandas en la TLC para 10-RBxz1, en cambio en 12-RI3 las mutaciones responsables de este comportamiento probablemente se encuentren en otros de los numerosos genes que intervienen en la síntesis de GPLs, por ejemplo *MSMEG_0398* como se mencionó anteriormente [Billman-Jacobe, 2004].

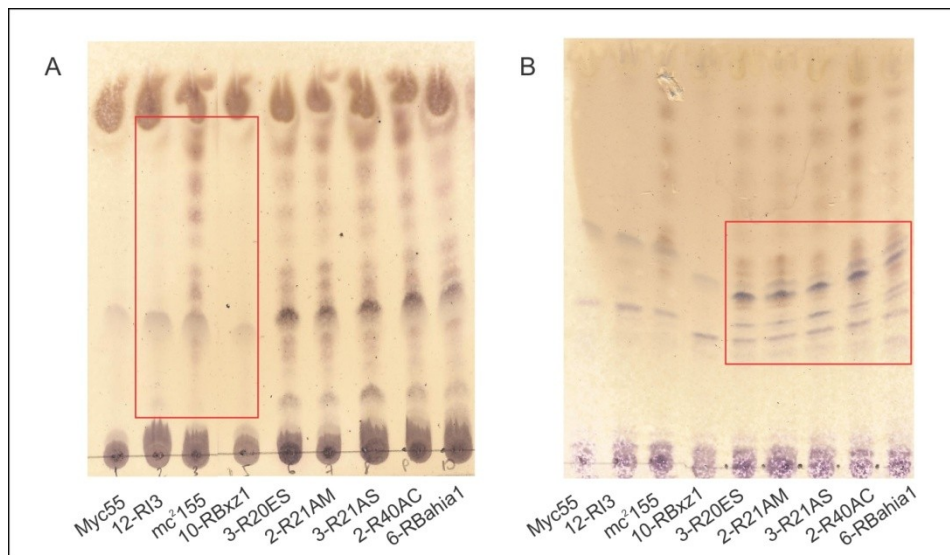


Figura 5.17. TLC de lípidos extraíbles de envoltura. Se utilizaron las mutantes resistentes, y *M. smegmatis* mc²155 y Myc55 como controles. Las corridas se desarrollaron en cloroformo/metanol(9:1) y cloroformo/metanol/agua (60:12:2); paneles A y B, respectivamente. Ambas fueron reveladas empleando α -naftol.

5.2.1.3 Determinación del origen de la resistencia

Los resultados arrojados por el análisis de los lípidos de envoltura serían en parte concordantes con los datos sobre la capacidad de adsorción de los micobacteriofagos a sus mutantes resistentes obtenidos por Taselli. El seguimiento de la cantidad de viriones no adsorbidos reveló que los mismos se mantienen constantes en el tiempo para los micobacteriofagos Bxz1 e I3, mientras que para el resto de los fagos la capacidad de adsorción en sus mutantes lisas fue semejante a la alcanzada en la cepa salvaje [Taselli, Tesina de Grado 2011]. Es probable que la resistencia de las cepas 12-RI3 y 10-RBxz1 resida en la ausencia del receptor/es en la superficie celular, impidiendo así el primer paso de la infección; en cambio para las mutantes 3-R20ES, 2-R21AM, 3-R21AS, 6-RBahia1 y 2-R40AC, serían los pasos posteriores a la adsorción los afectados por la/las mutaciones presentes. De manera de corroborar cual/es son las etapas alteradas por las mutación/es, se planteó la introducción artificial de ADN mediante electroporación para los micobacteriofagos Bxz1 y 21AM, en sus respectivas mutantes resistentes. Para ello, como se detalla en el apartado 4.9.1 de Materiales y Métodos, en este ensayo se utilizaron células resistentes a estreptomycin y sensibles a micobacteriofagos, para independizarse de los pasos posteriores a la inyección de ADN en la replicación fágica. De esta manera toda célula resistente que haya incorporado artificialmente ADN fágico durante la electroporación, y sea capaz de soportar la replicación del mismo y los pasos posteriores del ciclo dará lugar a la formación de un centro infeccioso visible cuando la mezcla de electroporación se ponga en contacto con las células sensibles a bacteriofagos (*M. smegmatis* mc²155 Sm^R). En la figura 5.18 se muestra el resultado obtenido para la mutante 2R-21AM, la introducción del ADN fágico artificialmente no ha generado placas de lisis sobre un césped de bacterias sensibles. La

aparición de nuevas bandas en la TLC para 2R-21AM (figura 5.17B) y los cambios en la morfología de sus colonias indicarían modificaciones en la envoltura celular que podrían enmascarar los receptor/es para 21AM; aunque los datos de adsorción obtenidos por Taselli descartarían esta hipótesis [Taselli, tesina de Grado 2011]. Por otro lado, si estos cambios interfirieran con la inyección del ADN a través de la envoltura, la introducción artificial del mismo habría salvado éste impedimento. Por lo tanto, serían los pasos posteriores a la entrada del ADN los afectados por la/las mutaciones en 2R-21AM, y probablemente en las restantes mutantes lisas. El ensayo para el micobacteriofago Bxz1, no pudo realizarse dada la imposibilidad de obtener células competentes óptimas para la mutante correspondiente; en este caso se esperaba que el ADN una vez en el citoplasma de 10R-Bxz1 pudiese seguir el curso normal de las etapas de infección vírica generando una cantidad de placas de lisis comparables a la cepa salvaje. Los cambios en la envoltura para las mutantes rugosas dificultan el crecimiento homogéneo de las mismas en medio líquido, a pesar del agregado de cantidades mayores de tensioactivo, y esto impide el correcto pasaje de corriente necesario para la transformación artificial de las mismas. Se debe mencionar que se determinó la eficiencia de transformación para la cepa 2R-21AM introduciendo el plásmido pMV261 y obteniéndose un recuento de colonias comparable para dicha cepa y *M. smegmatis* mc²155

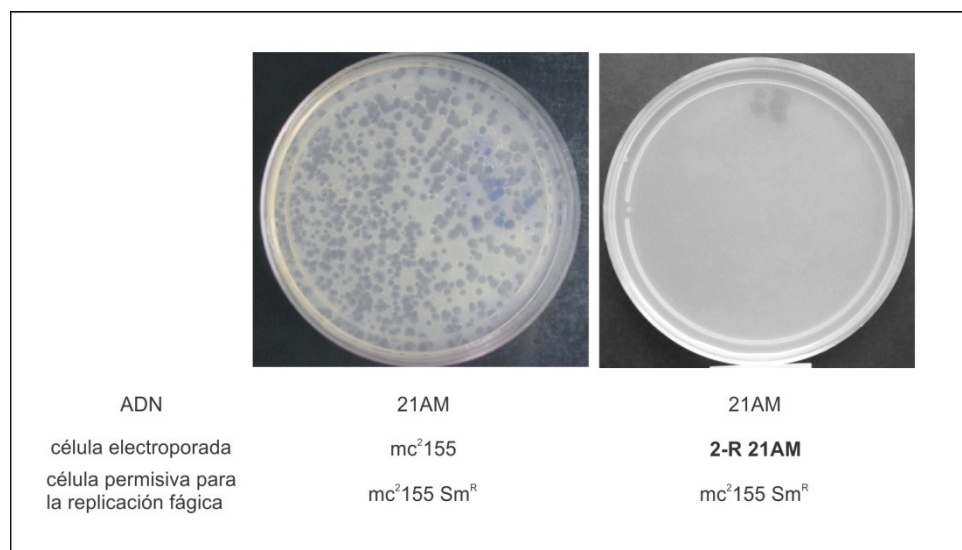


Figura 5.18. Producción de partículas fágicas a partir de la mutante resistente 2-R21AM. EL ADN del micobacteriofago 21AM fue electroporado en las células correspondientes y luego puesto en contacto con células permisivas para la replicación fágica.

5.2.1.4 Determinación de resistencia a otros fagos para cada una de las mutantes analizadas

Considerando los datos obtenidos sobre el requerimiento de cationes y las diferencias obtenidas en la determinación del rango de hospedador (ver sección 5.1.1.3), posiblemente los nuevos fagos aislados utilicen distintos mecanismos para llevar a cabo la infección. Como parte de la caracterización de los mismos resultó sustancioso examinar la resistencia de las diferentes mutantes analizadas frente al conjunto de micobacteriofagos estudiados en la presente Tesis Doctoral, incluyendo además a Bxz1 e I3. Para ello se analizó la EFP para cada fago sobre un césped de cada una de las mutantes resistentes, utilizando como control el título obtenido cuando la cepa salvaje fue incluida en el MAB. De esta manera pudieron establecerse dos categorías, las cepas que presentan una morfología rugosa permitieron una replicación comparable a la de la cepa salvaje para todos los micobacteriofagos, exceptuando 19ES y Bxz1 e I3, los cuales fueron capaces de replicarse exitosamente en las cepas lisas. En cambio el resto de los aislamientos mostró una reducción de al menos cinco órdenes cuando los micobacteriofagos fueron ensayados sobre las cepas lisas 3-R20ES, 2-R21AM, 3-R21AS, 6-RBahia1 y 2-R40AC como puede notarse en la tabla 5.8. Es probable que los fagos que pertenecen a un mismo grupo utilicen receptores y mecanismos de infección comunes.

Mutantes resistentes	Resistencia a micobacteriofagos		
	Sin lisis ¹	Reducción ²	Lisis total ³
3-R21AS2-R40AC 2-R21AM3-R20ES 6-RBahia1	21AM/ 20ES/ 40AC	21AS/ Bahia1/First/D29/ Bahia2/39HC/Mine/Hosp/ 40BC/CRB1/CRB2/Jolie1/ Jolie2/41HC/32HC	19ES Bxz1 I3
10-RBxz112-RI3	Bxz1	I3 19ES	21AS/ Bahia1/First/D29/ Bahia2/39HC/Mine/Hosp/ 40BC/CRB1/CRB2/Jolie1/ Jolie2/41HC/32HC/40AC/21AM/ 20ES/

Tabla 5.8. Ensayo de resistencias cruzadas. (1) No se observaron halos de lisis. (2) Reducción de las EFP en más de cinco órdenes de magnitud con respecto a la cepa parental *M. smegmatis* mc²155. (3) EFP similares a las obtenidas en la cepa parental *M. smegmatis* mc²155.

5.2.2 Actividad oligoribonucleasa y replicación de bacteriofagos

5.2.2.1 Construcción de la mutante delecional *M. smegmatis* mc² 155 Aorn

Como se mencionó anteriormente la disrupción del gen *MSMEG_4724* por la presencia de un transposón generaría resistencia a micobacteriofagos; por ello se ha planteado la deleción de dicho gen en la cepa *M. smegmatis* mc²155; la cual se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

De esta manera mediante el método *recombineering* se ha obtenido la mutante Δ orn reemplazando el gen en cuestión por un cassette de resistencia a Gm como se muestra esquemáticamente en la figura 5.19. Cuando la reacción de transformación fue sembrada en placas conteniendo el antibiótico mencionado se obtuvieron varios clones que fueron chequeados mediante una reacción de PCR de colonia; la obtención de un fragmento de mayor tamaño confirmó la presencia del cassette de resistencia en la región deseada. Además se diseñaron cebadores que hibridan dentro del gen *MSMEG_4724*, la ausencia de producto de PCR para el clon mutante corroboró la delección del mismo. Se realizó también la complementación de la mutación introduciendo en Δ orn una copia en *trans* del gen salvaje bajo el control de su propio promotor utilizando el vector integrativo pMV361.

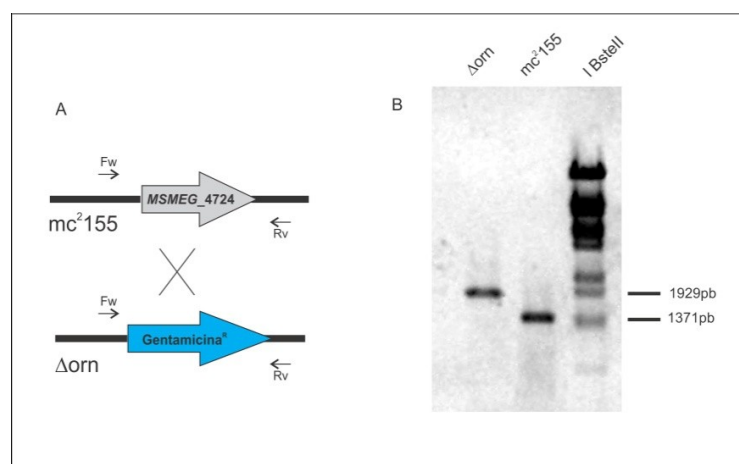


Figura 5.19. Construcción de la mutante *M. smegmatis* mc²155 Δ orn. Esquema del reemplazo génico en *M. smegmatis* mc²155 (panel A). Resultado de la PCR, en la segunda calle el tamaño del producto amplificado se corresponde con el tamaño del gen salvaje *MSMEG_4724*, banda que no se observa en la calle correspondiente a Δ orn confirmando la delección de *MSMEG_4724* (panel B).

5.2.2.2 Resistencia a micobacteriofagos de la mutante delecional *M. smegmatis* mc²155 Δ orn

Antes de emprender un análisis más detallado de la mutante Δ orn, se procedió a confirmar el comportamiento de la misma frente al micobacteriofago D29. Para ello se realizaron tanto la infección de Δ orn con el micobacteriofago D29 como la titulación del mismo incluyendo la cepa delecional en el MAB, obteniéndose el comportamiento esperado. El fago generó un número menor de placas de lisis, y éstas resultaron considerablemente más pequeñas, cuando D29 fue propagado en la cepa mutante con respecto a la cepa parental; y la EFP se redujo considerablemente como puede observarse en la figura 5.20. El efecto fue revertido cuando se usó en el MAB la cepa Δ orn complementada, denominada Δ ornC, concluyendo que la ausencia del producto génico codificado por el gen *MSMEG_4724* es responsable del fenotipo observado.

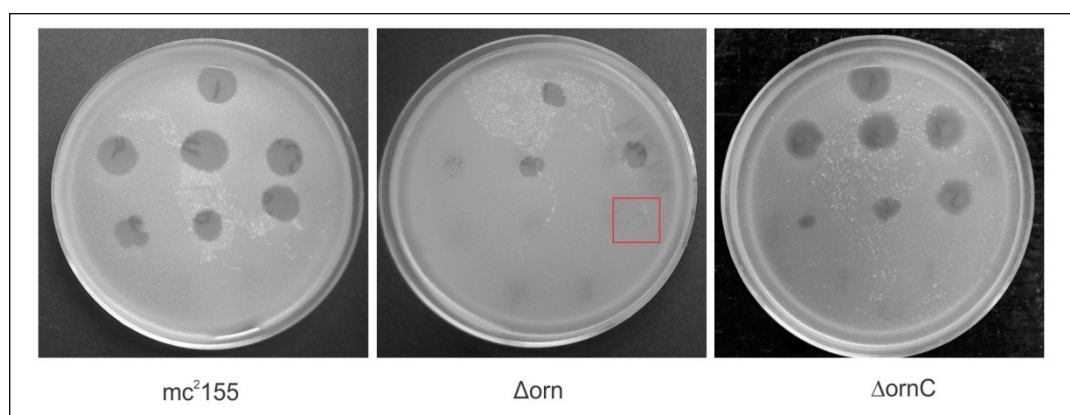


Figura 5.20. Titulación del micobacteriofago D29 en la cepa parental *M. smegmatis* mc²155, en la mutante Δ orn y en la cepa complementada Δ ornC. Se realizó el *spot test* sobre PI conteniendo células mutantes, complementadas y la cepa parental como control.

A partir de estos resultados se decidió hacer extensivo el estudio a los micobacteriofagos analizados en el presente trabajo de Tesis, y a otros ya descritos en la literatura, entre ellos L5, TM4, Bxz1, I3, Che8, Che9c, Che9d y Che12. De esta manera pudieron establecerse dos grupos, el primero compuesto por aquellos micobacteriofagos detallados en la tabla 5.9, que como D29 mostraron una reducción en la EFP de al menos dos órdenes de magnitud en Δ orn con respecto a la cepa parental; y aquellos cuya EFP se mantuvo con respecto a la cepa parental (no mostrados en la tabla).

Micobacteriofago	Título en mc ² 155	Título en Δ orn
D29	8 x 10 ¹¹ UFP/ml	2x10 ⁹ UFP/ml
L5	2x10 ⁹ UFP/ml	4x10 ⁷ UFP/ml
TM4	2x 10 ⁸ UFP/ml	~10 ³ UFP/ml
Che9c	2x 10 ¹¹ UFP/ml	~10 ⁹ UFP/ml
Che12	2x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁶ UFP/ml
First	4x10 ⁹ UFP/ml	2x10 ⁵ UFP/ml
20ES	2x10 ¹¹ UFP/ml	2x10 ⁸ UFP/ml
21AM	2x10 ¹¹ UFP/ml	~10 ⁶ UFP/ml
21AS	2x10 ⁵ UFP/ml	~10 ³ UFP/ml
41HC	4x10 ⁵ UFP/ml	~10 ³ UFP/ml
Bahia1	2x10 ⁹ UFP/ml	1x10 ⁸ UFP/ml
CRB1	2x 10 ¹¹ UFP/ml	~10 ⁸ UFP/ml
19ES	1x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁴ UFP/ml
Bahia2	4x10 ⁹ UFP/ml	~10 ⁴ UFP/ml
Jolie2	1x10 ⁸ UFP/ml	~10 ⁵ UFP/ml
ACorA1	2x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁶ UFP/ml
ACorA2	2x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁵ UFP/ml
ACor1	6x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁴ UFP/ml
ACor2	4x10 ¹¹ UFP/ml	~10 ⁵ UFP/ml
ACor4	2x10 ¹⁰ UFP/ml	~10 ⁵ UFP/ml
ACor5	8x10 ¹¹ UFP/ml	~10 ⁸ UFP/ml

Tabla 5.9 Títulos alcanzados por distintos micobacteriofagos en *M. smegmatis* mc²155 y en Δ orn. Se muestran en negrita los aislamientos estudiados en detalle en el presente trabajo.

Habiendo establecido que la ausencia de ORN afecta la eficiencia de replicación en aproximadamente la mitad de los micobacteriofagos ensayados, podría inferirse que el mecanismo mediante el cual el producto génico de *orn* interactúa o interfiere en el ciclo lítico es compartido por diferentes fagos de micobacterias. Es decir que este fenómeno no es particular para el micobacteriofago D29, por lo tanto, y teniendo en cuenta que es escasa la literatura acerca de la fisiología de micobacteriofagos, se decidió continuar examinando más exhaustivamente este fenómeno como parte de la presente Tesis Doctoral.

5.2.2.3 Caracterización fenotípica de la cepa *M. smegmatis* mc^2 155 Δ orn

Considerando que las mutantes resistentes descritas en el punto 5.2.1 presentaron una morfología singular con respecto a la cepa parental, se analizó el crecimiento en medio sólido para la mutante delecional Δ orn. La misma exhibió una morfología similar a la de la cepa salvaje *M. smegmatis* mc^2 155, y sus colonias fueron comparables en tamaño (figura 5.21 panel A). Cuando se analizó el crecimiento en medio líquido a 37°C como se detalla en la sección 4.8.1 de Materiales y Métodos; no se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento para ambas cepas. Es importante destacar que este ensayo se realizó por triplicado, observándose en todos los casos la tendencia que se muestra en la figura 5.21 (panel B).

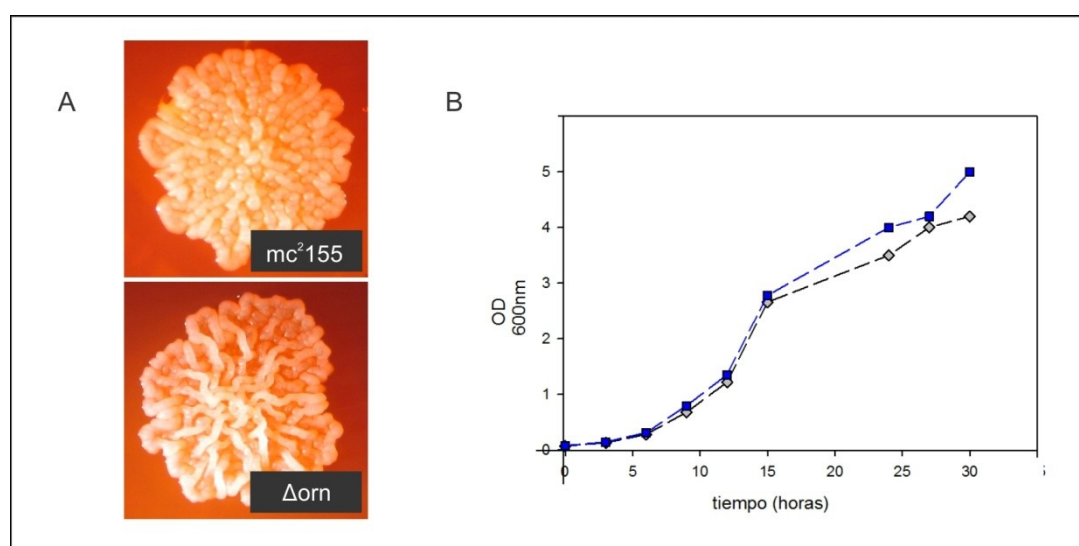


Figura 5.21 Morfología y crecimiento de la cepa Δ orn. Se muestran la morfología en medio sólido suplementado con Rojo Congo (panel A) y en medio líquido 7H9 ADS-GT (panel B) para la cepa mutante. *M. smegmatis* mc^2 155 fue utilizada en ambos casos como control. La curva gris corresponde a la cepa mutante y la azul a la parental.

A pesar de que no hubo diferencias morfológicas sustanciales entre la mutante Δ orn y la cepa parental, se analizó el perfil de GPLs de la mutante para descartar posibles cambios en la composición de los mismos. En la figura 5.22 se exhibe el perfil lipídico obtenido, el mismo fue idéntico para Δ orn y *M.*

smegmatis mc²155. La ausencia de la proteína ORN no estaría relacionada “*a priori*” con la biosíntesis de la envoltura celular micobacteriana; además la carencia de la misma es tolerada sin inconvenientes por la célula, ya que el crecimiento de Δ orn, tanto en medio líquido como sólido, fue comparable al de la cepa parental.

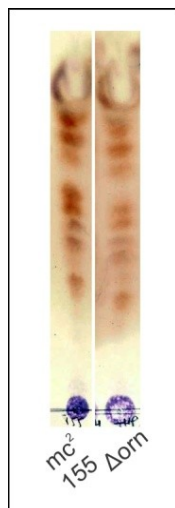


Figura 5.22. TLC de lípidos extraíbles de envoltura. Se utilizaron la mutante Δ orn y *M. smegmatis* mc²155 como control. La corrida se desarrolló en cloroformo/metanol(9:1) y la placa fue revelada empleando α -naftol.

5.2.2.4 Análisis del rol del gen *MSMEG_4724* en la propagación de micobacteriofagos

Con el objetivo de determinar que pasos de la infección fágica estarían afectados negativamente en la cepa Δ orn se analizó en primer lugar la capacidad del micobacteriofago D29 de adsorberse a la misma. Considerando los resultados expuestos en la sección anterior la mutante no tendría grandes cambios en la composición de su envoltura celular, por lo tanto el/los receptor/es deberían estar accesibles de manera que la primera etapa del ciclo ocurra normalmente. El ensayo realizado por triplicado se llevó a cabo determinando el porcentaje de fagos no adsorbidos en el tiempo. Del análisis de la gráfica presentada en la figura 5.23 se concluye que el micobacteriofago D29 se une de la misma manera a la cepa mutante y a la parental *M. smegmatis* mc²155, descartando la posibilidad de que la disminución en la formación de placas de lisis esté relacionada con alteraciones en el paso inicial de la infección.

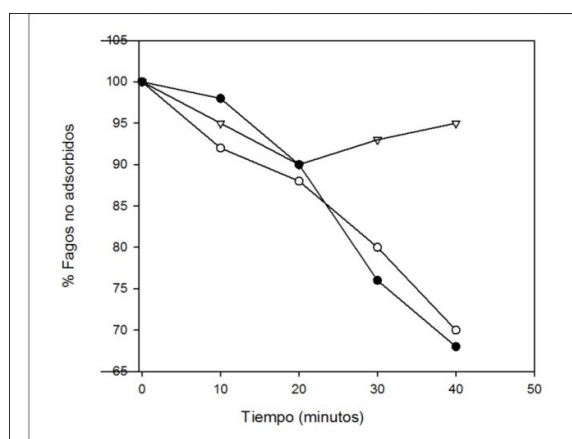


Figura 5.23. Adsorción de D29 a la mutante Δ orn. Los círculos llenos representan a los micobacteriofagos remanentes utilizando Δ orn, mientras que los círculos vacíos corresponden al ensayo con mc²155. La curva señalada con triángulos fue un control de estabilidad del fago durante el tiempo que tomó el ensayo.

La etapa posterior al reconocimiento y adsorción de un bacteriofago a la superficie de su célula blanco, esta seguida de la interacción del mismo con la membrana celular para permitir la translocación del material genético al citoplasma bacteriano. Si bien no se conocen los mecanismos utilizados por micobacteriofagos para superar la barrera que impone la membrana celular, los mismos se han estudiado para virus de otros géneros bacterianos, e incluyen diversas proteínas como se mencionó en la Introducción del presente trabajo. La unión irreversible entre bacteria-bacteriofago desencadena cambios conformacionales en las proteínas de este último, que en última instancia permiten la inyección del ADN al interior de la célula. Si esta etapa estuviese alterada en la cepa Δorn , la introducción artificial del material genético debería restaurar el fenotipo salvaje como se explicó anteriormente para la mutante espontánea 2-R21AM.

Cuando se llevo a cabo la electroporación del ADN del micobacteriofago D29 en la cepa mutante, se obtuvieron menos placas de lisis y notoriamente más pequeñas que aquellas observadas en la cepa parental, lo mismo ocurrió al realizar la propagación de D29 mediante una infección convencional. En cambio, sembrando la mezcla de transformación de ADN de D29- Δorn sobre un césped de células sensibles a D29 pero resistentes a un antibiótico, *M. smegmatis* mc²155 Sm^R, las placas de lisis fueron similares en número y tamaño a las obtenidas cuando el ADN de D29 fue introducido en la cepa salvaje *M. smegmatis* mc²155, como puede observarse en la figura 5.24.

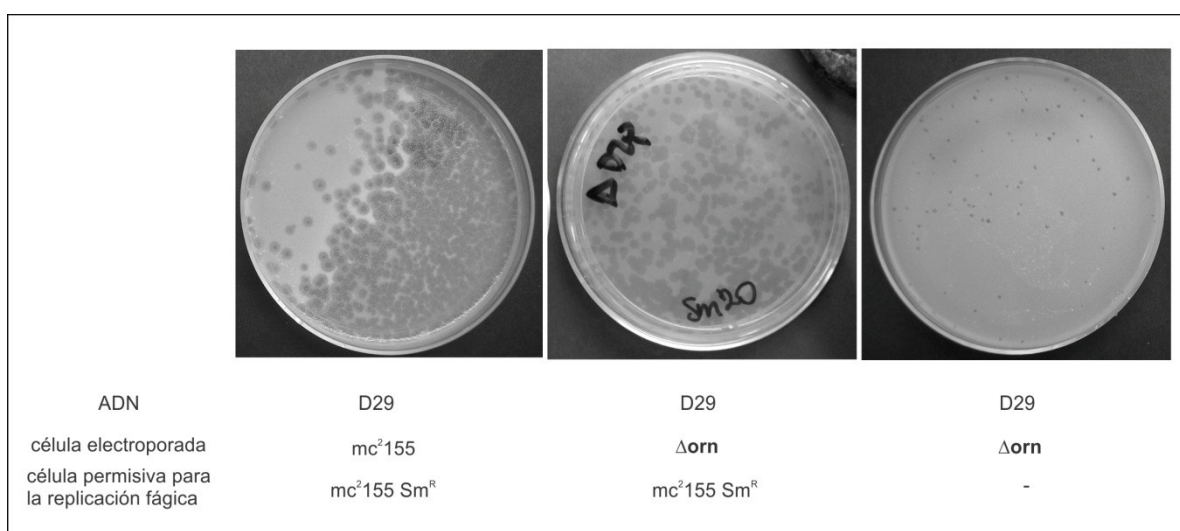


Figura 5.24. Producción de partículas fágicas a partir de células resistentes. Células electrocompetentes de *M. smegmatis* salvaje y mutante fueron transfectadas con ADN de D29, recuperadas y mezcladas con y sin *M. smegmatis* resistentes a estreptomicina en medio selectivo cuando fue necesario.

Debido a que el efecto de la ausencia de ORN sobre la replicación de micobacteriofagos es parcial, es decir que su falta no inhibe completamente el ciclo de los mismos, la interpretación de este ensayo no resulta sencilla. En primer lugar, una vez que el ADN fágico alcanza el citoplasma no habría inconvenientes en la replicación, expresión ensamblado y posterior lisis llevada a cabo por el micobacteriofago D29, ya que el número de centros infectivos fue comparable cuando células salvajes y mutantes electroporadas con la misma cantidad de ADN fueron sembradas sobre un césped de células sensibles a D29 pero resistentes a un antibiótico. De esta manera, la translocación artificial de ADN estaría restaurando el fenotipo normal, indicando que la inyección del material genético sería menos eficiente en Δorn . Sin embargo cuando la mezcla de electroporación ADN de D29- Δorn fue sembrada en ausencia de células sensibles al micobacteriofago, el número de centros infectivos fue considerablemente menor, señalando que en la mutante no sólo la etapa del pasaje del ADN a través de la membrana celular se vería afectada por la ausencia de ORN.

Por otro lado se realizó la propagación del micobacteriofago D29 mediante una infección convencional pero introduciendo algunas modificaciones, detalladas en Materiales y Métodos (apartado 4.9.4). Pasados treinta minutos desde el momento en que el bacteriofago ha sido puesto en contacto con la bacteria en cuestión, se agregó a la mezcla de infección FAS, un compuesto que actúa como virucida inactivando las partículas fágicas que no hayan infectado a ninguna de las células presentes. Posteriormente, la mezcla fue sembrada en dos condiciones diferentes, sobre un césped de *M. smegmatis* salvaje y sobre un césped formado por la cepa Δorn . De la figura 5.25 se deduce que en la primera condición ensayada hay un número mayor de placas y estas son más grandes. Cuando se hizo un recuento de las placas de lisis presentes en cada caso, se contaron 270 placas de lisis sobre la cepa salvaje y 195 sobre la cepa mutante, algunas de un tamaño muy pequeño que no pueden ser visualizadas en la foto. Así la cantidad de centros infectivos cuando el micobacteriofago D29 se propagó sobre la cepa mutante fue subestimada; en un principio este resultado pareciera contradictorio en cuanto al bloqueo parcial de la inyección del material genético, ya que el ADN estaría siendo translocado a un mayor número de células de las que pueden ser percibidas como placas de lisis. Sin embargo, si el transporte del ADN al citoplasma bacteriano fuese normal en Δorn , en este ensayo se debería haber obtenido una lisis total, comparable a la obtenida cuando células de *M. smegmatis* mc²155 fueron infectadas con D29 a una MOI= 0,12 (no se muestra en la figura). Teniendo en cuenta lo expuesto en la sección 5.2.2.2 que la ausencia de *orn* reduce la eficiencia de propagación de D29 en más de dos órdenes de magnitud, este resultado sugiere nuevamente que el ciclo fágico estaría bloqueado parcialmente en más de un punto en Δorn .

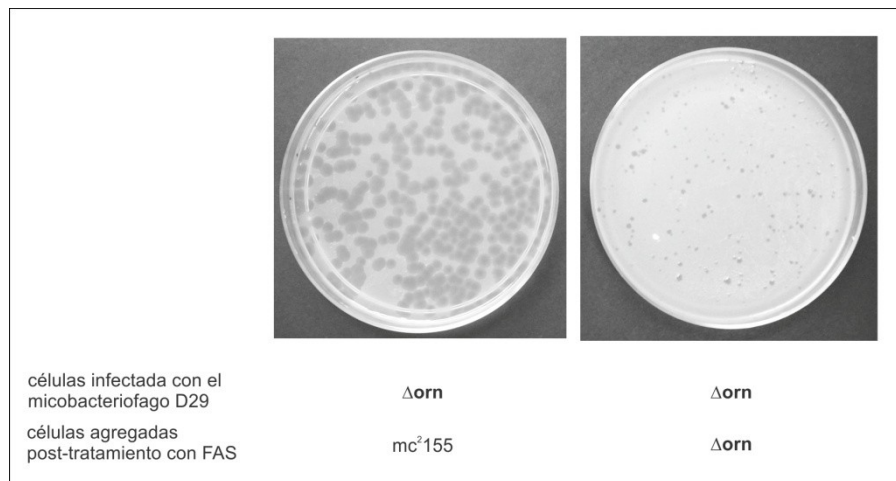


Figura 5.25. Infección de Δorn con el micobacteriofago D29. La mezcla de infección fue tratada con FAS 30mM y sembrada sobre un césped de *M. smegmatis* mc² 155 o Δorn . La MOI utilizada fue de 0,12.

La ausencia de *orn* no sólo causó una reducción en número y tamaño de las placas de lisis en la propagación del micobacteriofago D29; ya que otros aislamientos exhibieron el mismo comportamiento. En la figura 5.26 se evidencian los cambios en el patrón de propagación para los micobacteriofagos 21AM y First en la cepa salvaje y la cepa Δorn ; mientras que las placas de lisis generadas por 32HC y 40AC sólo redujeron levemente su diámetro sobre la cepa delecional. Esto coincide con las EFP que mostraron estos aislamientos en la cepa delecional como se señaló en la tabla 5.9.

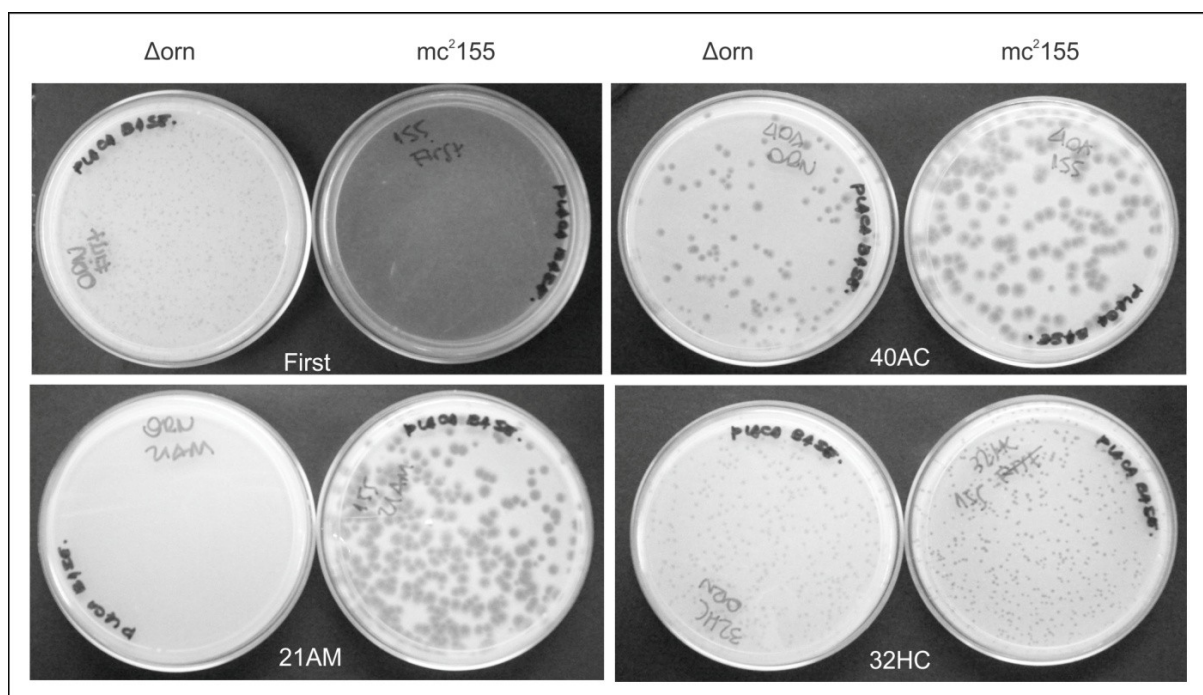


Figura 5.26. Propagación de los micobacteriofagos First, 40AC, 21AM y 32HC en la cepa parental y en la mutante Δorn .

El origen de este fenómeno radicaría en la imposibilidad de ciertos micobacteriofagos de desarrollar normalmente los pasos posteriores a la inyección para completar un ciclo infectivo óptimo. Un modo de estudiar los parámetros del ciclo lítico es mediante el análisis de las curvas de crecimiento para un dado bacteriofago en determinadas condiciones. A partir de las mismas se puede estimar el tiempo de latencia, es decir el tiempo entre que un determinado bacteriofago se adsorbe a la bacteria hospedadora hasta que produce la lisis de esta última, lo cual se evidencia por el aumento repentino de las UFP en el tiempo [Abedon y Yin, 2009]. Se realizó esta determinación para los micobacteriofagos 21AM, First, 32HC y 40AC, las curvas para cada uno de ellos en la cepa salvaje y en la mutante se detallan en la figura 5.27. Para los dos primeros micobacteriofagos se observó un retardo en los tiempos de latencia, es decir que estos bacteriofagos requirieron de más tiempo para liberar su progenie cuando fueron propagados en Δorn , siendo este efecto más pronunciado para 21AM. En cambio los micobacteriofagos 32HC y 40AC, cuyas EFP son comparables en la cepa salvaje y la mutante delecional, presentaron curvas similares en ambas cepas. Si bien las curvas fueron realizadas por triplicado observándose siempre la misma tendencia, el salto en la cantidad de UFP en los distintos casos fue muy variable. Por lo tanto no ha podido establecerse el tamaño de estallido, es decir el número de viriones liberado por cada célula, aunque pareciera que el mismo es menor cuando los micobacteriofagos 21AM y First son propagados en Δorn .

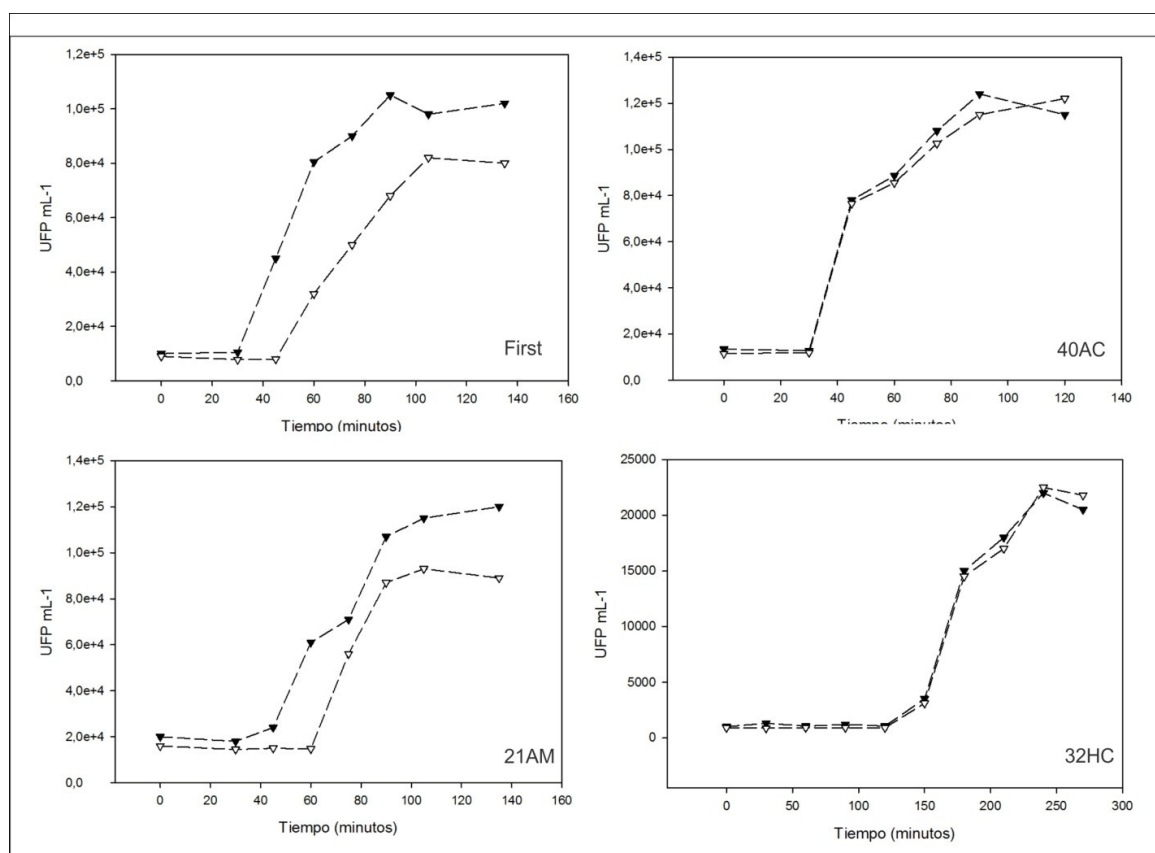


Figura 5.27. Curvas de crecimiento para los micobacteriofagos First, 40AC, 21AM y 32HC. Se indican en triángulos llenos las curvas realizadas en mc^2155 , y en triángulos vacíos las realizadas en Δorn .

5.2.2.5 Eficiencia de formación de placas de lisis de los micobacteriofagos en estudio sobre una mutante delecional en el gen *MSMEG_2630*

Como se mencionó anteriormente, Kumar y colaboradores han realizado un estudio estructural sobre el producto génico de *MSMEG_2630* y han generado la mutante delecional en *M. smegmatis* mc²155 denominada Δ MSMEG_2630. Esta nanoRNAsa, al igual que ORN, presenta actividad 3'-5' exonucleasa y su función, si bien no es esencial para la viabilidad celular, sería importante en condiciones de estrés [Kumar *et al.*, 2014]. Se ha llevado a cabo la titulación de los micobacteriofagos en estudio sobre la mutante Δ MSMEG_2630 cedida gentilmente por el Dr. Sharma. Cuando las EFP para cada uno de ellos fueron comparadas con las eficiencias obtenidas en la cepa salvaje, sólo 4 de 26 mostraron una reducción de al menos dos órdenes de magnitud. Entre ellos Mine, Jolie2 y ACor3 mostraron halos de lisis en las gotas más concentradas a partir de los cuales no pudo calcularse el título; y CRB1 cuyos títulos fueron $1,4 \times 10^9$ UFP/ml en la cepa salvaje y $1,2 \times 10^7$ UFP/ml en Δ MSMEG_2630. Dado que la replicación de los micobacteriofagos Mine y ACor3 no se ve afectada por la ausencia de ORN mientras que CRB1 y Jolie2 disminuyen la EFP en la mutante Δ orn estos resultados no aportarían datos esclarecedores para el entendimiento del rol de *MSMEG_4724* en la replicación de micobacteriofagos.

5.2.3 Discusión

El estudio de mutantes resistentes como parte de la caracterización de bacteriofagos ha permitido la identificación de receptores fágicos y de diferentes mecanismos de resistencia a bacteriofagos en distintos géneros bacterianos; entre ellos *Lactococcus*; dado el interés por mejorar la resistencia a bacteriofagos especialmente en aquellas cepas utilizadas como iniciadores en la industria láctea [Garvey *et al.*, 1995; Forde *et al.*, 1999; Capra *et al.*, 2011]. Los numerosos análisis químicos llevados a cabo desde la década del '70 para reconocer los componentes de envoltura celular del género *Mycobacterium*, han permitido identificar a los lípidos presentes en la misma como posibles receptores para sus potenciales bacteriofagos [Furuchi y Tokunaga, 1971; Goren *et al.*, 1972, Bisso *et al.*, 1976]. A pesar de ello y de la vasta cantidad de micobacteriofagos descubiertos y estudiados desde entonces, poco se ha avanzado en el entendimiento de los mecanismos de infección y las interacciones fago-hospedador en este género bacteriano.

En el presente trabajo de Tesis se han analizado mutantes espontáneas de *M. smegmatis* mc²155 resistentes a micobacteriofagos, las mismas fueron obtenidas mediante el aislamiento de células a partir de placas de lisis generadas por los micobacteriofagos locales 21AS, 21AM, 20ES, 40AC y Bahia1; e I3 y Bxz1 descritos en la literatura. Los micobacteriofagos mencionados han mostrado una reducción considerable de las EFP en sus mutantes correspondientes; y éstas presentaron cambios sustanciales en la morfología de sus colonias con respecto a la cepa salvaje. De acuerdo a la observación macroscópica de

las colonias pudieron establecerse dos grupos bien diferenciados, el primero integrado por las mutantes cuyas colonias presentaron un aspecto liso (6R-Bahia1, 2R-21AM, 3R-21AS, 3R-20ES, 2R-40AC) y el restante formado por las mutantes de colonias extremadamente secas y rugosas (10R-Bxz1 y 12R-I3). Teniendo en cuenta los distintos reportes encontrados en la literatura que relacionan modificaciones en la morfología de las colonias de especies de micobacterias y cambios en el patrón de moléculas de envoltura, se analizó el perfil de GPLs en el grupo de mutantes. Se incluyó además una cepa derivada de *M.smegmatis* mc²155 denominada Myc 55, ya que la misma presenta una morfología rugosa similar a la exhibida por 10R-Bxz1 y 12R-I3. El patrón de GPLs de estas tres cepas fue prácticamente idéntico, por lo tanto las mutantes rugosas serían incapaces de sintetizar GPLs, dado que Myc 55 ha sido caracterizada genéticamente y se conoce que presenta una mutación que la hace incapaz de sintetizar GPLs [Sondén *et al.*, 2005]. Estos datos junto a los obtenidos por Taselli en los ensayos de adsorción [Taselli, Tesina de Grado 2011], permiten inferir que la resistencia de las cepas rugosas residiría en la imposibilidad de ciertos fagos de adsorberse a la superficie micobacteriana. Además los resultados obtenidos son concordantes con lo publicado por Chen y colaboradores (2009), quienes mediante el estudio de mutantes transposicionales han identificado GPLs como receptores para el micobacteriofago I3. Si bien no han podido establecerse las mutación/es presentes en 12R-I3 responsables del fenotipo observado, para la mutante 10R-Bxz1 se ha identificado una mutación en el gen *MSMEG_0392* codificante para una glicosiltransferasa. En este caso, la generación de una proteína incompleta sería causante de la imposibilidad de sintetizar GPLs. Las mutantes lisas mostraron un patrón de GPLs similar al de la cepa salvaje, aunque la realización de una TLC utilizando una mezcla más polar como fase móvil permitió detectar la aparición de bandas nuevas para las mutantes 6R-Bahia1, 2R-21AM, 3R-21AS, 3R-20ES, 2R-40AC. Aunque es necesario el análisis químico de las moléculas que generaron las nuevas bandas, es probable que la/las mutación/es aparecidas en estas cepas permitan la síntesis de GPLs con más restos hidroxilados o hiperglicosilados. Si bien esas modificaciones podrían producir enmascaramiento y/o cambios en los potenciales receptores para los micobacteriofagos correspondientes, este punto quedaría invalidado considerando que la capacidad de adsorción de los mismos en las cepas lisas fue comparable a la alcanzada en la cepa salvaje [Taselli, Tesina de Grado 2011]. Teniendo en cuenta además que la introducción artificial de ADN del micobacteriofago 21AS en la mutante 2R-21AM, no produjo placas de lisis sobre un césped de bacterias sensibles, serían los pasos posteriores a la inyección del material genético los que estarían bloqueados en el ciclo fágico en las mutantes lisas. Del análisis del perfil de GPLs y de la morfología de las colonias para las mismas se podría especular que existe una hiperproducción de moléculas polares, la cual podría relacionarse con cambios que alteren la expresión génica. De esta manera, estas modificaciones podrían afectar no sólo la parte más externa de la envoltura celular sino que podrían generar cambios en toda la estructura de la misma y en la fisiología de estas micobacterias, teniendo en cuenta además que éstas fueron incapaces de desarrollar un biofilm maduro

[Taselli, Tesina de Grado 2011]. En este sentido y considerando que la mutación responsable del fenotipo observado fuera dominante es improbable que la misma pueda complementarse a partir de una biblioteca de clones de *M. smegmatis* mc²155, por ello se plantea la secuenciación completa de los genomas de estas mutantes para descubrir el origen de los cambios fenotípicos observados.

Por otro lado y con la meta de poder diferenciar a la totalidad de los aislamientos locales de acuerdo a los probables mecanismos de acción involucrados en la infección, se llevó a cabo el análisis de resistencias cruzadas. Mediante esta determinación pudieron agruparse a los micobacteriofagos en dos categorías, aquellos que utilizarían GPLs de superficie como moléculas receptoras (I3, Bxz1 y 19), y aquellos capaces de infectar a cepas carentes de los mismos, por lo que es probable que compartan el mecanismo de infección utilizando como receptores moléculas de superficie distintas a GPLs. Teniendo en cuenta que en este último grupo se encuentran micobacteriofagos capaces de llevar a cabo la infección exitosa de *M. tuberculosis* y que esta micobacteria no produce GPLs, es lógico que fagos como 21AS, 21AM y 20ES utilicen receptores alternativos. Es válido aclarar que los resultados obtenidos para el micobacteriofago Bxz1 sobre la mutante 12R-I3, difieren de lo publicado por Chen (2009) dado que Bxz1 fue capaz de replicarse sobre las mutantes transposicionales deficientes en GPLs. Teniendo en cuenta que para esta cepa no ha podido establecerse donde residen la/las mutación/es, una explicación para este discrepancia podría residir en que las mismas podrían provocar cambios extras a la pérdida de GPLs. Indudablemente la determinación del cambio genético existente en 12R-I3, así como también la obtención y análisis de mutantes originadas a partir del micobacteriofago 19ES, el cual es capaz de replicarse sin el agregado extra de cationes divalentes, serán fundamentales para el entendimiento de este comportamiento. También recientemente se ha planteado analizar la complementación en *trans* con un cassette de lisis alternativo como posibilidad para elucidar las etapas bloqueadas en las mutantes lisas. Del simple ensayo sobre la determinación de las resistencias cruzadas, se evidencia que por ejemplo el micobacteriofago 19ES es capaz de replicarse sin mayores inconvenientes en las mutantes lisas, por lo tanto sus endolisinas son capaces de actuar aún en una envoltura que podría estar modificada estructuralmente como se puntualizó más arriba. De este modo si la incapacidad de ciertos micobacteriofagos de propagarse en las cepas lisas implicara bloqueos en el último paso de la infección; la expresión exógena del cassette de lisis de 19ES en dichas cepas permitiría sortear este impedimento.

En el marco del estudio de los mecanismos de infección utilizados por los aislamientos locales y como parte de la colaboración establecida con el Dr C. Martin se construyó la mutante delecional en el gen *MSMEG_4724* denominada Δ orn. Esta proteína tiene alta homología con una oligoribonucleasa encontrada en *E. coli* y organismos superiores, y su actividad como exoribonucleasa de nanoARNs *in vitro* ha sido reportada por Park y colaboradores en 2008 [Park *et al.*, 2008]. El micobacteriofago D29, utilizado como modelo en este estudio, se replicó con una eficiencia menor en la mutante Δ orn; así la ausencia de *orn* bloquea parcialmente la replicación del micobacteriofago mencionado. Dado que el

mismo comportamiento fue observado en 21 de 34 micobacteriofagos analizados, entre ellos aislamientos locales y fagos ampliamente estudiados y reportados en la literatura, se emprendió en el presente trabajo un análisis más minucioso del comportamiento de la mutante y su relación con la replicación de fagos en micobacterias. Además la complementación de la cepa mutante utilizando un plásmido integrativo con la copia salvaje del gen *MSMEG_4724* restauró completamente el fenotipo para todos los micobacteriofagos ensayados, confirmando que la ausencia del mismo es la causante del fenotipo observado. En primer lugar, y teniendo en cuenta que las mutaciones que afectan los receptores fágicos son la causa más frecuente de resistencia a fagos, y más aún que dentro del género *Mycobacterium* la mayoría de los reportes indican cambios en el/los receptores y/o su entorno; se planteó el análisis de la morfología y perfil de GPLs de la mutante. Estos resultados junto con el patrón de adsorción para el micobacteriofago D29 en Δ orn, el cual fue comparable al alcanzado en la cepa salvaje, permitieron descartar la posibilidad de que modificaciones en la estructura tridimensional de los potenciales receptores que impidan la adsorción sean responsables del fenotipo observado. Entonces la disminución de las placas de lisis en número y tamaño, podría deberse a: (i) los fagos no inyectan su ADN con la misma eficacia que en la cepa salvaje, (ii) el ADN fágico no es capaz de replicarse en todas las células donde fue inyectado, (iii) la producción de partículas infectivas en la bacteria mutante es menor; y (iv) los nuevos viriones no pueden liberarse de la célula mutante con la misma efectividad. La introducción artificial del material genético mediante electroporación permite sortear los primeros pasos de la interacción fago-hospedador, entre ellos la translocación del ADN a través de la membrana celular. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron una reducción en número y tamaño en las placas de lisis generadas sobre un césped de células mutantes, que *a priori* sugerirían que la ausencia de ORN estaría bloqueando pasos posteriores a la inyección. Sin embargo, cuando la mezcla de electroporación ADN- Δ orn fue “revelada” sobre un césped de células sensibles al micobacteriofago D29, se obtuvo la misma cantidad de centros infecciosos que los alcanzados en la electroporación de la mezcla ADN-*M.smegmatis* mc²155, indicando que la inyección del material genético se encontraría parcialmente bloqueada en la mutante; aunque este no sería el único paso afectado. De este estudio se desprende que es probable que la ausencia de ORN esté afectando negativamente el ciclo de replicación fágica en más de un punto, entre ellos la inyección y algún/algunos pasos posteriores a la misma. Se plantea la realización de microscopía electrónica de transmisión de las células infectadas a distintos tiempos, como herramienta para visualizar lo que está ocurriendo con los viriones en una única célula. Dado que no todos los micobacteriofagos en estudio vieron afectada su propagación en la mutante, se propuso el análisis de ciertos parámetros de infección para fagos sensibles e insensibles a la ausencia de ORN. Así pudo determinarse que los tiempos de latencia fueron considerablemente más largos en Δ orn para micobacteriofagos, como 21AM y First, cuyas EFP son alteradas en la cepa mutante. Este retardo en el tiempo utilizado por los bacteriofagos para liberar su progenie a partir de la mutante, estaría indicando que en esta cepa la replicación, la expresión génica, las

etapas de ensamblado y/o la lisis de la misma son más ineficientes que en la cepa salvaje. No sería sorprendente que la ausencia de *orn* genere un efecto pleiotrópico en el ciclo lítico de ciertos micobacteriofagos si se tiene en cuenta que en esta condición se acumularían pequeños oligoribonucleótidos, que pueden por un lado iniciar la síntesis de ARN, alterando la expresión génica y por el otro disminuir la cantidad de ribonucleótidos disponibles para la síntesis de nuevos mensajeros como se reportó para *Pseudomonas aeruginosa* [Goldman *et al.*, 2011].

Teniendo en cuenta la caracterización genómica de los aislamientos realizada en el presente trabajo de Tesis se intentó realizar una correlación según las propiedades descritas en el Capítulo 1 y su comportamiento frente a la mutante deficiente en ORN, de manera de establecer relaciones entre el tipo de empaquetamiento, la naturaleza lítica/lisogénica, entre otras características, para tratar de inferir el rol de esta enzima y por qué su ausencia afecta negativamente la replicación de un grupo numeroso de bacteriofagos. Sin embargo, a diferencia de la concordancia exhibida entre bacteriofagos y mutantes espontáneas resistentes, reflejada en el hecho de que fagos pertenecientes a un mismo *cluster* siguieron un mismo comportamiento, en este caso no pudo establecerse un patrón que facilite el entendimiento del rol de ORN en la replicación de micobacteriofagos. Por otro lado se analizó el comportamiento de los micobacteriofagos frente a una cepa de *M. smegmatis* mc²155 que tiene delecionado el gen *MSMEG_2630*, el cual codifica para una nanoARNasa relacionada con ORN como se detalló anteriormente. No han podido extraerse datos concluyentes de este ensayo, ya que sólo cuatro micobacteriofagos vieron afectada su replicación por la ausencia del producto génico de *MSMEG_2630*, dos de los cuales también se ven afectados negativamente por la ausencia de *orn*. A pesar de ello y teniendo en cuenta que la propagación de sólo un 15% de los aislamientos ensayados resultó alterada por la ausencia de *MSMEG_2630*, este gen no estaría influyendo con la misma magnitud que *MSMEG_4724* en la replicación de micobacteriofagos. Probablemente *M. smegmatis* no utilice a ORN como mecanismo de defensa contra bacteriofagos, sino que su actividad sea necesaria para mantener la homeostasis celular; y quizá aquellos micobacteriofagos cuya eficiencia disminuye en Δorn sean más vulnerables por ejemplo, a la acumulación de oligoribonucleótidos cortos. Por otro lado, al igual que *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* cuenta con actividades nanoARNsas solapadas, aunque Rv_2511 el gen homólogo a *MSMEG_4724* sería esencial en esta micobacteria. Además considerando que *M. leprae*, especie que ha sufrido una reducción genómica a lo largo de la evolución conserva sólo un gen con actividad nanoARNsa homólogo a *orn* (*ML_0427*) [Vissa y Brennan, 2001]; se plantea, de ser factible, la generación de la doble mutante en *M. smegmatis* mediante transducción y el posterior estudio de su comportamiento frente a la replicación de micobacteriofagos.

Por último y debido a que los fagos son el reservorio de genes más rico sobre la tierra, no sería inapropiado pensar que aquellos micobacteriofagos que resultan insensibles a la ausencia de *orn* puedan codificar para enzimas que suplan su actividad. No hay reportes en la literatura sobre fagos que

codifiquen para este tipo de enzima, y tampoco se han encontrado en los aislamientos locales genes con homología a *orn*. Sin embargo teniendo en cuenta que la genómica comparativa es la herramienta de elección para identificar funciones biológicas, no siempre existe una correspondencia entre estructura y función [Lagesen *et al.*, 2010]; y esto ha sido demostrado puntualmente para nanoARNsas en diferentes procariotas [Arriano *et al.*, 2010].

6. Conclusiones

En este trabajo de Tesis se abordó el estudio de micobacteriofagos y su interacción con distintas micobacterias con el objetivo de entender la ecología de estas peculiares entidades biológicas, y explotar su potencial utilizándolas en el desarrollo de biosensores y en la construcción de herramientas de investigación. En una primera etapa se han estudiado micobacteriofagos aislados a partir de muestras ambientales y se han analizado desde sus características morfométricas hasta la secuencia genómica. Además se ha examinado la interacción de estos aislamientos locales con mutantes espontáneas resistentes a ciertos micobacteriofagos, y con una mutante de *M.smegmatis* mc²155 delecionada en un gen codificante para una enzima capaz de degradar completamente oligoribonucleótidos cortos. De este análisis se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se han aislado siete micobacteriofagos denominados Hosp, Jolie1, Jolie2, CRB1, CRB2, Bahia1 y Bahia2 utilizando *M.smegmatis* mc²155 como bacteria indicadora.
- Los micobacteriofagos CRB1 y Bahia1 fueron capaces de replicarse a 30 y 37°C, mientras que el resto de los aislamientos sólo pudieron propagarse a 30°C y ninguno de ellos pudo hacerlo a 42°C.
- Las características morfométricas de estos y del resto de los aislamientos analizados (First, 20ES, 21AM, 21AS, 32HC, 40AC, 41HC, 19ES, Mine ,40BC y 39HC) mostraron que los mismos pertenecen a la familia *Siphoviridae*.
- Ocho micobacteriofagos fueron capaces de lisogenizar *M. smegmatis*, First, 20ES, 21AM, 21AS,41HC, CRB1, 32HC y 19ES.
- Seis de ellos, First, 20ES, 21AM, 21AS,41HC y CRB2, fueron capaces de replicarse en *M. tuberculosis*, y exceptuando CRB2 el resto fue capaz de lisogenizar dicha micobacteria.
- Ninguno de los micobacteriofagos analizados fue capaz de realizar transducción generalizada en *M. smegmatis*.
- Todos los micobacteriofagos en estudio fueron secuenciados utilizando la tecnología 454-Roche, a partir de este análisis se pudo categorizar a la mayoría de los nuevos aislamientos en los grupos descritos en la literatura, y pudieron depositarse en Genbank la secuencia completa para diez de ellos.
- Los micobacteriofagos First, 20ES, 21AM, 21AS, 41HC, CRB1 y 40AC pertenecen al *cluster A*, y presentan un sistema de partición típico de cromosomas bacterianos y plásmidos que sería utilizado con relativa frecuencia por fagos de micobacterias.
- Los aislamientos Mine, 40BC, 39HC, Jolie1 presentaron las características típicas de los miembros del *cluster B*.
- El micobacteriofago Jolie2 fue establecido como parte del *cluster G*, aunque a diferencia de este grupo Jolie2 sería lítico.
- Se han identificado dos *singletons*, 19ES y 32HC. El primero presenta características particulares en cuanto a su propagación, ya que puede hacerlo sin el agregado extra de cationes divalente,

mientras que 32HC presentó en su genoma un alto número de genes con homología a genes sin función de *M. abscessus*.

- El micobacteriofago CRB2 es el único fago que presenta extremos circularmente permutados reportado capaz de infectar *M. tuberculosis*.
- Algunos micobacteriofagos analizados utilizarían GPLs como moléculas receptoras ya que fueron incapaces de replicarse en mutantes espontáneas deficientes en estas macromoléculas.
- Se ha generado la mutante delecional en el gen *MSMEG_4274* (*M. smegmatis* mc²155 Δ orn) mediante el sistema de *recombineering*.
- Más de la mitad de los micobacteriofagos ensayados mostraron una eficiencia reducida cuando fueron replicados en Δ orn.
- La deleción de *MSMEG_4274* no produjo cambios en los patrones de crecimiento y en los patrones de GPLs de la mutante delecional con respecto a la cepa parental.
- La ausencia de *MSMEG_4274* estaría relacionada con la imposibilidad para ciertos micobacteriofagos de inyectar normalmente el ADN en el citoplasma bacteriano, y además los mismos presentan un retardo en el tiempo necesario para llevar a cabo la lisis de la célula.
- La ausencia del gen *MSMEG_2630*, cuya función está relacionada con la del gen *MSMEG_4274*, afecta la replicación en menos del 10% de los micobacteriofagos ensayados.

7. Resumen

En las últimas décadas el estudio de los bacteriofagos específicos de micobacterias- micobacteriofagos- se ha constituido en una pieza clave para los avances alcanzados en el estudio de la fisiología y genética de este género bacteriano, que comprende numerosas especies entre ellas patógenos que suponen una amenaza en salud pública como *M. tuberculosis* y *M.leprae*, agentes causales de las tuberculosis y la lepra respectivamente.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han aislado siete micobacteriofagos usando *M. smegmatis* como bacteria indicadora; los cuales junto a otros once micobacteriofagos aislados previamente en el mismo laboratorio de trabajo, han sido caracterizados fenotípicamente, en cuanto a su naturaleza lítica o temperada, su rango de huésped y sus características morfométricas. Algunos de ellos se han integrado con facilidad al cromosoma de *M. smegmatis* mientras que seis de los dieciocho micobacteriofagos en estudio fueron capaces de infectar *M. tuberculosis*. También, gracias a la secuenciación genómica de estos especímenes los mismos pudieron agruparse en distintas categorías definidas en la literatura, se determinaron el número de ORFs en cada caso, y la función probable para los mismos, cuando esta pudo ser asignada; este análisis permitió finalizar la secuenciación genómica para diez de ellos, las cuales han sido depositadas en Genbank. Inesperadamente en una alta proporción, estos aislamientos presentaron *loci* de partición, constituidos por los elementos ParA, ParB y ParS. Mediante un análisis filogenético de los mismos, y considerando la naturaleza temperada de los micobacteriofagos que poseen estos sistemas, es probable que dada la reticencia del género *Mycobacterium* al intercambio génico, sus virus hayan adquirido estos *loci* de partición como una alternativa para perpetuarse junto con las micobacterias sin “perturbar” su genoma.

Por otro lado, en el marco de una colaboración establecida con el grupo del Dr. C. Martín (Universidad de Zaragoza, España), se ha construido una mutante en el ORF *MSMEG_4724*, codificante para una oligorribonucleasa hipotética (ORN) con actividad 3'-5' exonucleasa. La ausencia de la misma ha generado una reducción en la eficiencia de formación de placas de lisis para más de la mitad de los micobacteriofagos ensayados, bloqueando parcialmente el ciclo de replicación de los mismos en la etapa de inyección del material genético, y en algún otro punto que aún no pudo ser elucidado. Además, mediante el análisis de mutantes espontáneas resistentes a distintos micobacteriofagos, se han podido dividir a los aislamientos locales en dos grupos definidos, aquellos que usarían GPLs como moléculas receptoras, y un grupo mayoritario que fue capaz de replicarse en mutantes deficientes en estas moléculas, y por lo tanto tendrían preferencia por otro tipo de moléculas para iniciar la infección en *M. smegmatis*.

8. Referencias bibliográficas

- Abedon**, (2011). Lysis from without. *Bacteriophage* 1:1, 46-49.
- Abedon ST, Lejeune JT**, (2005). Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors. *Evol Bioinform Online* 1:97-110
- Abedon y Yin**, (2009). *Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. Methods in Molecular biology. Springer Protocols*
- Abeles SR1, Pride DT**, (2014). Molecular Bases and Role of Viruses in the Human Microbiome. *Mol Biol.* S0022-2836(14)00330-1.
- Ackermann HW, Prangishvili D**, (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol.* 2012 Oct;157(10):1843-9. Epub 2012 Jul 3.
- Ackermann HW**, (2003) Res Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol.*154(4):245-51.
- Ackermann HW**, (2001) Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000.
- Agarwal N, Raghunand TR, Bishai WR**, (2006). Regulation of the expression of *whiB1* in *Mycobacterium tuberculosis*: role of cAMP receptor protein. *Microbiology.* 152(Pt 9):2749-56.
- Ansaldi M**, (2012) Cell biology perspectives in phage biology. *Front Biosci (Elite Ed).*1;4:1823-9.
- Bardarov S**, (1997). Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:10961-10966.
- Bardarov S**, (2002). Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* 148:3007-3017.
- Barsom EK, Hatfull GF**, (1996). Characterization of *Mycobacterium smegmatis* gene that confers resistance to phages L5 and D29 when overexpressed. *Mol. Microbiol.* 21(1): 159-70.
- Bastías R, Higuera G, Sierralta W, Espejo RT**. A new group of cosmopolitan bacteriophages induce a carrier state in the pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. *Environ Microbiol.* 2010 Apr;12(4):990-1000
- Belisle JT, Klaczkiwicz K, Brennan PJ, Jacobs WR Jr, Inamine JM.**, (1993). Rough morphological variants of *Mycobacterium avium*. Characterization of genomic deletions resulting in the loss of glycopeptidolipid expression. *J Biol Chem.*15;26.
- Bergh O, Børshheim KY, Bratbak G, Haldal M.**(1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature.* 1989 Aug 10;340(6233):467-8
- Bertani G, Weigle JJ**, (1953). "Host controlled variation in bacterial viruses". *J Bacteriol*;65:113.
- Besra GS, Khoo KH, Belisle JT, McNeil MR, Morris HR, Dell A, Brennan PJ**, (1994) New pyruvylated, glycosylated acyltrehaloses from *Mycobacterium smegmatis* strains, and their implications for phage resistance in mycobacteria. *Carbohydr. Res.* 251: 99-114.
- Billman-Jacob**, (2004). Glycopeptidolipid synthesis in mycobacteria. *Current Science*, vol 86.
- Bisso G, Castelnuovo G, Nardelli MG, Orefici G, Arancia G, Lanéelle G, Asselineau C, Asselineau J**, (1976). A study on the receptor for a mycobacteriophage : phage phlei. *Biochimie.* 58(1-2): 87-97.
- Bonamonte D, De Vito D, Vestita M, Delvecchio S, Ranieri LD, Santantonio M, Angelini G**, (2013). Aquarium-borne *Mycobacterium marinum* skin infection. Report of 15 cases and review of the literature. *Eur J Dermatol.* 23(4):510-6.

- Bourhy P, Frangeul L, Couve E, Glaser P, Saint Girons I**, (2005). Complete nucleotide sequence of the LE1 prophage from the spirochete *Leptospira biflexa* and characterization of its replication and partition functions. *J Bacteriol* 187:3931–3940.
- Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P, Rohwer F.**, (2003). Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *J Bacteriol*.185(20):6220-3
- Breitbart M, Rohwer F**, (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol*. 13(6):278-84
- Brenner S, Jacob F, Meselson M.** (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*;190:576-81.
- Brüssow H, Hendrix RW**, (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*. 11;108(1):13-6.
- Brüssow H.**,(2005) Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. *Microbiology* 151:2133-40.
- Campbell A.**, (1962). Episomes. *Adv Genet*;11:101-45.
- Capra ML, Mercanti DJ, Rossetti LC, Reinheimer JA, Quiberoni A**, (2011). Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophage-resistant mutants. *J Appl Microbiol*.111(2):371-81.
- Casjens SR**, (2005). Comparative genomics and evolution of the tailed-bacteriophages. *Curr Opin Microbiol*2005;8:451–458.
- Champ S, Puvirajesinghe TM, Perrody E, Menouni R, Genevaux P, Ansaldi M**, (2011). Chaperone-assisted excisive recombination, a solitary role for DnaJ (Hsp40) chaperone in lysogeny escape. *J Biol Chem*.11;286(45):38876-85
- Chen J, Kriakov J, Singh A, Jacobs WR Jr, Besra GS, Bhatt A.**, (2009) Defects in glycopeptidolipid biosynthesis confer phage I3 resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*. 155(12): 4050-7.
- Citorik RJ, Mimee M, Lu TK**, (2014). Bacteriophage-based synthetic biology for the study of infectious diseases. *Curr Opin Microbiol*; 19:59-69.
- Clark JR, March JB**, (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials *Trends Biotechnol*; 24(5):212-8.
- Cole, S. T**, (1999). Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett*. 452:7-10. *Comput Biol Chem*. 2007 Apr;31(2):82-91. Epub 2007 Feb 20
- Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ.** (1961). General nature of the genetic code for proteins. *Nature*;192:1227-32.
- Daffé M, Draper P**, (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol*; 39:131-203.
- da Silva JL, Piuri M, Broussard G, Marinelli LJ, Bastos GM, Hirata RD, Hatfull GF, Hirata MH.**, (2013). Application of BRED technology to construct recombinant D29 reporter phage expressing EGFP. *FEMS Microbiol Lett*; 344(2):166-72.
- de la Iglesia AI, Stella EJ, Morbidoni HR.**(2009) Comparison of the performances of two in-house rapid methods for antitubercular drug susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):808-10.
- Deutscher MP**, (2006). Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*. 2006 Feb 1;34(2):659-6

- Dhariwal KR, Liav A, Vatter AE, Dhariwal G, Goren MB**, (1986). Haptenic oligosaccharides in antigenic variants of mycobacterial C-mycosides antagonize lipid receptor activity for mycobacteriophage D4 by masking a methylated rhamnose. *J Bacteriology* 168(1): 283-93.
- Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B, Delattre AS, Lavigne R**, (2012). Learning from bacteriophages - advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Pept Sci.*13(8):699-722
- Duckworth D.H**, (1976). Who discovered bacteriophage? *Bacteriol Rev*; 40(4): 793–802.
- Dussoix D, Arber W**. (1962). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. II. Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J Mol Biol*;5:37-49.
- Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, Boling L, Barr JJ, Speth DR, Seguritan V, Aziz RK, Felts B, Dinsdale EA, Mokili JL, Edwards RA**, (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun.* 24;5:4498. doi: 10.103
- Ekiert DC, Cox JS**, (2014). Structure of a PE-PPE-EspG complex from *Mycobacterium tuberculosis* reveals molecular specificity of ESX protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111(41):1475.
- Ellis EL, Delbrück M**, (1939). The Growth of Bacteriophage. *J Gen Physio*;22:365-84.
- Fang M, Zeisberg WM, Condon C, Ogryzko V, Danchin A, Mechold U**, (2009). Degradation of nanoRNA is performed by multiple redundant RNases in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.*37(15):5114-2
- Fischer S1, Kittler S, Klein G, Glünder G**, (2013). Microplate-test for the rapid determination of bacteriophage-susceptibility of *Campylobacter* isolates-development and validation. *PLoS One.*8(1)
- Ford ME, Sarkis GJ, Belanger AE, Hendrix RW, Hatfull GF**, (1998). Genome structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *J Mol Biol.* 29;279(1):143-64.
- Ford ME, Stenstrom C, Hendrix RW, Hatfull GF**, (1998). Mycobacteriophage TM4: genome structure and gene expression. *Tuber Lung Dis.*79(2):63-73
- Forde A1, Daly C, Fitzgerald GF**, (1999). Identification of four phage resistance plasmids from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* HO2. *Appl Environ Microbiol.*65(4):1540-7.
- Franceschelli JJ, Suarez CA, Terán L, Raya RR, Morbidoni HR**, (2014). Complete genome sequences of nine mycobacteriophages. *Genome Announc.* 2014 May 29;2(3).
- Fuhrman JA1, Schwalbach M** *Biol Bull.* 2003 Apr;204(2):192-5. Viral influence on aquatic bacterial communities.
- Fullner KJ, Hatfull GF**. (1997) Mycobacteriophage L5 infection of *Mycobacterium bovis* BCG: implications for phage genetics in the slow-growing mycobacteria. *Mol Microbiol.* 26(4):755-66.
- Furuchi A and Tokunaga T**. (1971) Nature of the Receptor Substance of *Mycobacterium smegmatis* for D4 Bacteriophage Adsorption. *Journal of Bacteriology.* 111(2): 404-411.
- Gadagkar RR, Gopinathan KP**. Inhibition of DNA injection from mycobacteriophage I3 by Tween-80. *Virology.* 1978 Dec;91(2):487-8.
- Gardner GM, Weiser RS** (1947) A bacteriophage for *M. smegmatis*. *Proc Soc Exper Biol Med* 66:205-206.
- Gerdes K, Moller-Jensen J, Bugge Jensen R** (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol Microbiol* 37: 455–466.
- Gilbert W, Dressler D**. (1968). DNA replication: The rolling circle model. *J Cold Spring Harb Symp Quant Biol*;33:473-84.

- Girons IS, Bourhy P, Ottone C, Picardeau M, Yelton** (2000). The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *J Bacteriol* 182: 5700–5705.
- Ghosh S, Deutscher** (1999) Oligoribonuclease is an essential component of the mRNA decay pathway. *MP. Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 13;96(8):4372-7
- Goldman SR, Sharp JS, Vvedenskaya IO, Livny J, Dove SL, Nickels BE.,** (2011). NanoRNAs prime transcription initiation in vivo. *Mol Cell*. 2011 Jun 24;42(6):817-25. doi: 10.1
- Gomathi NS, Sameer H, Kumar V, Balaji S, Dustackeer VN, Narayanan PR** (2008). In silico analysis of mycobacteriophage Che12 genome: characterization of genes required to lysogenise *Mycobacterium tuberculosis*.
- Gong C, Bongiorno P, Martins A, Stephanou NC, Zhu H, Shuman S, Glickman MS.**(2005) Mechanism of nonhomologous end-joining in mycobacteria: a low-fidelity repair system driven by Ku, ligase D and ligase C. *Nat Struct Mol Biol*. 12(4):304-12.
- Goren MB, McClatchy JK, Martens B, Brokl O.** (1972) Mycosides C: Behavior Site Substance for Mycobacteriophage D4. *Journal of Virology*. 9(6): 999-1003.
- Gottesman MM, Hicks ML, Gellert M.** J Genetics and function of DNA ligase in *Escherichia coli*. *Mol Biol*. 1973 Jul 15;77(4):531-47
- Govind R, Vedyappan G, Rolfe RD, Dupuy B, Fralick JA.** (2009) Bacteriophage-mediated toxin gene regulation in *Clostridium difficile*. *J Virol*. 83(23):12037-45
- Grigoriev PS, Lobočka MB** (2001) Determinants of segregational stability of the linear plasmid-prophage N15 of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 42: 355–368.
- Große JH, Casjens SR.**(2014) Understanding the enormous diversity of bacteriophages: The tailed phages that infect the bacterial family Enterobacteriaceae. *Virology*; 468-470C:421-443.
- Große JH, Jensen GL, Burnett SH, Breakwell DP.** Genomic comparison of 93 *Bacillus* phages reveals 12 clusters, 14 singletons and remarkable diversity. *BMC Genomics*.15:855. doi: 10.1186/1471-2164-15-855.
- Guilhot, C., B. Gicquel, and C. Martin.** (1992). Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. *FEMS Microbiol. Lett*. 77:181-186.
- Guilhot, C., I. Ota, R. Van, I, C. Martin, and B. Gicquel.** (1994). Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *J. Bacteriol*. 176:535-539.
- Hamilton RL, Brown WJ.** (1972) Bacteriophage typing of clinically isolated *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol*. 24(6):899-906.
- Hatfull GF, Cresawn SG, Hendrix RW.** (2008) Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. *Res Microbiol*. 159(5):332-
- Hatfull GF, Jacobs-Sera D, Lawrence JG, Pope WH, Russell DA, Ko CC, Weber RJ, Patel MC, Germane KL, Edgar RH, Hoyte NN, Bowman CA, Tantoco AT, Paladin EC, Myers MS, Smith AL, Grace MS, Pham TT, O'Brien MB, Vogelsberger AM, Hryckowian AJ, Wynalek JL, Donis-Keller H, Bogel MW, Peebles CL, Cresawn SG, Hendrix RW.** (2010) Comparative genomic analysis of 60 Mycobacteriophage genomes: genome clustering, gene acquisition, and gene size. *J Mol Biol*. 397(1):119-43. doi: 10.1016/j.jmb.2010.01.011.
- Hatfull GF, Sarkis GJ.** (1993) DNA sequence, structure and gene expression of mycobacteriophage L5: a phage system for mycobacterial genetics. *Mol Microbiol* 7:395–405.
- Hatfull GF** (2014) Molecular Genetics of Mycobacteriophages *Microbiol Spectr*.7;2(2):1-36.
- Hatfull GF** (2010) Mycobacteriophages: genes and genomes. *Annu Rev Microbiol*. 2010;64:331-56

- Hazbón MH, Guarín N, Ferro BE, Rodríguez AL, Labrada LA, Tovar R, Riska PF, Jacobs WR Jr.**(2003) Photographic and luminometric detection of luciferase reporter phages for drug susceptibility testing of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Clin Microbiol.* 41(10):4865-9.
- He L, Fan X, Xie J.,** (2012). Comparative genomic structures of *Mycobacterium* CRISPR-Cas. *J Cell Biochem.* 2012 Jul;113(7):2464-73.
- Hendrix RW.** Evolution: the long evolutionary reach of viruses. *Curr Biol.* 1999 Dec 16-30;9(24):R914-7. Review
- Hermoso JA, García JL, García P.**(2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol.* 10(5):461-72.
- Hershey AD, Chase M.** (1952). "Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage". *J Gen Physiol*;36:39-56.
- Hershey AD.** (1946). "Spontaneous mutations in bacterial viruses". *J Cold Spring Harb Symp Quant Biol*;11:33-7.
- Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H** (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryoelectron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Nat Acad Sci USA* 105(10):3963-7.
- Hosseinioust Z, Olsson AL, Tufenkji N** (2014) Going viral: Designing bioactive surfaces with bacteriophage. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1;124:2-16.
- Huff J, Czyn A, Landick R, Niederweis M.** (2010) Taking phage integration to the next level as a genetic tool for mycobacteria. *Gene.* 15;468(1-2):8-19
- Humphries P, Gordon RL, McConnell DJ, Connolly** (1974) Endonuclease R. Hind fragments of T7 DNA. *P.Virology.* 1974 Mar;58(1):25-31.
- Jacob F, Monod J.** (1961). "Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins". *J Mol Biol*;3:318-56.
- Jacobs, W.R. Jr.; Hatfull, G.F.** (2000) *Molecular Genetics of Mycobacteria.* ASM Press. Washington, D.C.
- Jacobs-Sera D, Marinelli LJ, Bowman C, Broussard GW, Guerrero Bustamante C, Boyle MM, Petrova ZO, Dedrick RM, Pope WH; Science Education Alliance Phage Hunters Advancing Genomics And Evolutionary Science Sea-Phages Program, Modlin RL, Hendrix RW, Hatfull GF** (2012) On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. *Virology.*20;434(2):187-20
- Jassim SA, Limoges RG.** (2014) Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Microbiol Biotechnol.* 30(8):2153-70.
- Jia Z1, Ishihara R, Nakajima Y, Asakawa S, Kimura M** (2007) Molecular characterization of T4-type bacteriophages in a rice field. *Environ Microbiol.* 9(4):1091-6.
- Keravala A, Ormerod BK Calos MP, Palmer TD** (2008) Long-term transgene expression in mouse neural progenitor cells modified with phiC31 integrase. *J Neurosci Methods.* 30;173(2):299-305.
- Khoo KH, Suzuki R, Dell A, Morris HR, McNeil MR, Brennan PJ, Besra GS.** Chemistry of the lyxose-containing mycobacteriophage receptors of *Mycobacterium phlei*/*Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry.* 1996 Sep 10;35(36):11812-9.
- Kontoghiorghes, Nicholas Andreou, Katerina Constantinou, George J Kontoghiorghes.** (2014) World health dilemmas: Orphan and rare diseases, orphan drugs and orphan patients *World J Methodol.* 4(3): 163–188
- Kozloff LM, Sundar Raj CV, Rao RN, Chapman VA, DeLong SJ** (1972) Structure of a transducing mycobacteriophage. *Virology.* 9(2):390-3.

- Kropinski AM.**(2006) Phage Therapy - Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 17(5):297-306.
- Krumsiek J, Arnold R, Rattei T.**(2007) Gepard: A rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*; 23(8): 1026-8. PMID: 17309896
- Kumar D, Grover A, Singh A, Manjasetty BA, Sharma R, Taneja B** (2014) Unique subunit packing in mycobacterial nanoRNase leads to alternate substrate recognitions in DHH phosphodiesterases. *Nucleic Acids Res.* (12):7894-910
- Lagesen, K., Ussery, D. W. & Wassenaar, T. M.** (2010). Genome update: the 1000th genome – a cautionary tale. *Microbiology* 156, 603–608.
- Laserson and CD Wells** (2007) Reaching the targets for tuberculosis control: the impact of HIV *Bull World Health Organ.* 85(5): 377–381.
- Lawn SD, Wilkinson R.** (2006) Extensively drug resistant tuberculosis. *BMJ.* 2006 333(7568):559-60.
- Lee S, Kriakov J, Vilcheze C, Dai Z, Hatfull GF, Jacobs WR Jr.** (2004). Bxz1, a new generalized transducing phage for mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 15; 241(2):271-6.
- Lengeler, J.W.; Drews, G.; Schlegel, H.G.** (1999) *Biology of the prokaryotes.* Blackwell Science. Stuttgart.
- Loessner MJ, Rees CE, Stewart GS, Scherer S.** (1996) Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl Environ Microbiol.* 62(4):1133-40.
- Lu TK, Koeris MS** (2011) The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*;14(5):524-31
- Luria SE, Delbrück M.** (1943). “Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance”. *Genetics*;28:491.
- Luria SE1, Anderson TF.** (1942) The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28(4):127-130.1.
- Marinelli LJ, Fitz-Gibbon S, Hayes C, Bowman C, Inkeles M, Loncaric A, Russell DA, Jacobs-Sera D, Cokus S, Pellegrini M, Kim J, Miller JF, Hatfull GF, Modlin RL** (2012). Propionibacterium acnes bacteriophages display limited genetic diversity and broad killing activity against bacterial skin isolates. *MBio.* 25;3(5). pii: e00279-12. doi: 10.1128/mBio.00279-12.
- Marinelli LJ, Hatfull GF, Piuri M.** (2012) Recombineering: A powerful tool for modification of bacteriophage genomes. *Bacteriophage,* 1;2(1):5-14
- Mc. Nerney R.** (1999) TB: the return of the phage. A review of fifty years of mycobacteriophage research. *Int J Tuberc Lung Dis* 3(3): 179-184
- McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Godfrey-Faussett P.**(2004) Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 42(5):2115-20.
- Mechold, U., Fang, G., Ngo, S., Ogryzko, V. & Danchin, A.** (2007). YtqI from *Bacillus subtilis* has both oligoribonuclease and pAp-phosphatase activity. *Nucleic Acids Res* 35, 4552–4561
- Mediavilla J, Jain S, Kriakov J, Ford ME, Duda RL, Jacobs WR Jr, Hendrix RW, Hatfull GF.** (2000) Genome organization and characterization of mycobacteriophage Bxb1. *Mol Microbiol,* 38(5):955-70.
- Meselson M, Weigle M.** (1961). Chromosome breakage accompanying genetic recombination in Bacteriophage. *Proc Natl Acad Sc USA*;47:857-68.

- Miller T1, Braun PG, Fehlhaber K, Prager R, Pfeifer Y, Rabsch** (2014) Typing of *Salmonella enterica* serovar *Infantis* isolates from 51 outbreaks in Germany between 1974 and 2009 by a novel phage-typing scheme. *W.Epidemiol Infect.* 142(1):75-83. doi: 10.1017/S095026881300037X. Epub 2013 Mar 21.
- Mills S, Shanahan F, Stanton C, Hill C, Coffey A, Ross RP.** (2013) Movers and shakers: influence of bacteriophages in shaping the mammalian gut microbiota. *Gut Microbes.*;4(1):4-16.
- O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A.**(2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 33(4):801-19.
- Oyaski M, Hatfull GF.** (1995) The cohesive ends of mycobacteriophage L5 DNA.
- Parish T, Roberts G, Laval F, Schaeffer M, Daffe M, Duncan K.** (2007) Functional complementation of the essential gene *fabG1* of *Mycobacterium tuberculosis* by *Mycobacterium smegmatis* *fabG* but not *Escherichia coli* *fabG*. *J Bacteriol* 2007;189:3721.
- Park Young A1, Elvin CM, Hamdan SM, Wood RJ, Liyou NE, Hamwood TE, Jennings PA, Dixon NE.** Hydrolysis of the 5'-p-nitrophenyl ester of TMP by oligoribonucleases (ORN) from *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis*, and human. *Protein Expr Purif.* 2008 Feb;57(2):180-7. Epub 2007 Oct 17.
- Payne, Sun, Sacchetti and G. F. Hatfull.** (2010). Mycobacteriophage Lysin B is a novel mycolylarabinogalactan esterase. *Mol. Microbiol* 73: 367-381
- Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, Jacobs-Sera D, Falbo J, Gross J, Pannunzio NR, Brucker W, Kumar V, Kandasamy J, Keenan L, Bardarov S, Kriakov J, Lawrence JG, Jacobs WR Jr, Hendrix RW, Hatfull GF.**(2003) Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell.* 113(2):171-8
- Petersen J1, Dubilier N2** (2014) Gene swapping in the dead zone. *Elife.* 13;3:e04600. doi: 10.7554/eLife.04600
- Petty NK, Evans TJ, Fineran PC, Salmond GP.** (2007) Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol.* 25(1):7-15.
- Piuri M, Jacobs WR Jr, Hatfull GF.** (2009) Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 4(3)
- Piuri Rondón L, Urdániz E, Hatfull GF** (2013) Generation of affinity-tagged fluoromycobacteriophages by mixed assembly of phage capsids. *M, Appl Environ Microbiol.* 79(18):5608-15.
- Qiu XB, Shao YM, Miao S, Wang L.** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Nov;63(22):25
- Recht J1, Martínez A, Torello S, Kolter R.,** (2000) Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol.* 2000 Aug;182(15):4348-51.
- Ripp S, Miller RV** (1997) The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* 143
- Ripp S.** (2009) Bacteriophage-Based Pathogen Detection. *Adv Biochem Eng Biotechnol*
- Rodriguez-Valera F, Mizuno CM, Ghai R.**(2014) Tales from a thousand and one phages. *Bacteriophage.* 1;4(1):e28265.
- Rohwer F, Edwards R.**(2002) The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage. *J Bacteriol.*; 184(16):4529-35

- Roldgaard BB, Scheutz F, Boel J, Aabo S, Schultz AC, Cheasty T, Nielsen EM, Olsen KE, Christensen BB.** (2004) VTEC O157 subtypes associated with the most severe clinical symptoms in humans constitute a minor part of VTEC O157 isolates from Danish cattle. *Int J Med Microbiol.* 294(4):255-9
- Rosenberg AH, Studier FW** (1987) T7 RNA polymerase can direct expression of influenza virus cap-binding protein (PB2) in *Escherichia coli*. *Gene*, 59(2-3):191-200.
- Roux S, Hawley AK, Torres Beltran M, Scofield M, Schwientek P, Stepanauskas R, Woyke T, Hallam SJ, Sullivan MB.**(2014) Ecology and evolution of viruses infecting uncultivated SUP05 bacteria as revealed by single-cell- and meta-genomics. *Elife.* 29;3:e03125.
- Rybniiker JI, Nowag A, van Gumpel E, Nissen N, Robinson N, Plum G, Hartmann P,** (2010). Insights into the function of the WhiB-like protein of mycobacteriophage TM4--a transcriptional inhibitor of WhiB2. *Mol Microbiol.* 2010 Aug;77(3):642-57. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.
- Rybniiker J, Kramme S, Small PL.** (2006) Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis*--application for identification and susceptibility testing. *J Med Microbiol*;55(Pt 1):37-42
- Saier MH Jr, Reddy BL .** (2014) Holins in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: Multifunctional Xenologues with Potential Biotechnological and Biomedical Applications. *J Bacteriol* 1;197(1):7-17
- Sala A, Bordes P, Genevaux P.** (2014) Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins (Basel).* 6;6(3):1002-20.
- Sambrook, J.; Russel, D.W.** (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition Cold Spring Harbor, NY.
- Sampson T, Broussard GW, Marinelli LJ, Jacobs-Sera D, Ray M, Ko CC, Russell D, Hendrix RW, Hatfull GF.** (2009) Mycobacteriophages BPs, Angel and Halo: comparative genomics reveals a novel class of ultra-small mobile genetic elements. *Microbiology.*155(Pt 9):2962-7
- Sander M, Schmieger H.** (2001). Method for Host-Independent Detection of Generalized Transducing Bacteriophages in Natural Habitats *Appl Environ Microbiol*; 67(4): 1490–1493
- Sarkis GJ, Jacobs WR Jr, Hatfull GF.** (1995) L5 luciferase reporter mycobacteriophages: a sensitive tool for the detection and assay of live mycobacteria. *Mol Microbiol.* 15(6):1055-67.
- Sassi M1, Bebeacua C, Drancourt M, Cambillau C.**(2013) The first structure of a mycobacteriophage, the *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* phage Araucaria. *J Virol.* 87(14):8099-109.
- Shinnick TM, Good RC.** (1994) Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13(11):884-901.
- Shukra AM, Sridevi NV, Dev Chandran, Kapil Maithal** (2014) Production of recombinant antibodies using bacteriophages. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 4(2):91-8.
- Símboli N, Takiff H, McNerney R, López B, Martín A, Palomino JC, Barrera L, Ritacco V.**(2005) In-house phage amplification assay is a sound alternative for detecting rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in low-resource settings. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(1):425-7
- Sime-Ngando T.** (2014) Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol.* 24;5:355.
- Siringan P, Connerton PL, Cummings NJ, Connerton IF.**(2014) Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*. *Open Biol.*26;4:8.
- Smith KC, Castro-Nallar E, Fisher JN, Breakwell DP, Grose JH, Burnett SH** (2013). Phage cluster relationships identified through single gene analysis. *BMC Genomics.*19;14:410.

- Snapper, S.B.; Melton, R.E.; Mustafa, S.; Klesser, T.; Jacobs, W.R. Jr.** (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4:1911-1919.
- Sondén B, Kocíncová D, Deshayes C, Euphrasie D, Rhayat L, Laval F, Frehel C, Daffé M, Etienne G, Reyrat JM.** (2005) Gap, a mycobacterial specific integral membrane protein, is required for glycolipid transport to the cell surface. *Mol Microbiol.* 58(2):426-40.
- Stella EJ** (2013) Tesis de Grado.
- Stella EJ, de la Iglesia AI, Morbidoni HR.**(2009) Comparison of the performance of two mycobacteriophage D29-based protocols for fluoroquinolone susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods.* 79(3):371-3
- Stella EJ, Franceschelli JJ, Tasselli SE, Morbidoni HR** (2013). Analysis of novel mycobacteriophages indicates the existence of different strategies for phage inheritance in mycobacteria.. *PLoS One.*8(2):e56384.
- Stover, C.K.; de la Cruz, V.F.; Fuerst, T.R.; Burlein, J.E.; Benson, L.A.; Bennett, L.T.; Bansal, G.P.; Young, J.F.; Lee, M.H.; Hatfull, G.F.** (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351(6326):456-460.
- Sultana R, Tanneeru K, Guruprasad L.,** (2011) The PE-PPE domain in mycobacterium reveals a serine α/β hydrolase fold and function: an in-silico analysis. *PLoS One.*10;6(2):e16745.
- Summers, W.C.** (1999) Bacteriophage discovered. In Felix d'Herelle and the Origins of Molecular Biology. pp. 47–59, Yale University Press.
- Taselli** (2011) Tesina de Grado
- Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP.**(2001) Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol.* 21(12):3926-34.
- Timme TL, Brennan PJ** (1984) Induction of bacteriophage from members of the *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum* serocomplex. *J Gen Microbiol.*;130(8):2059-66.
- Tufariello JM, Malek AA, Vilchère C, Cole LE, Ratner HK, González PA, Jain P, Hatfull GF, Larsen MH, Jacobs WR Jr.** (2014) Enhanced specialized transduction using recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio.* 27;5(3):e01179-14.
- Udwadia, Z.F.; Amale, R.A.; Ajbani, K.K.; Rodrigues, C.** (2011) Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India *Clinical Infect Dis Advance Access CID* 2011:0.
- van Kessel, J. C. and G. F. Hatfull.** (2007). Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Methods* 4:147-152.
- Velayati, A.A.; Reza Masjedi, M.; Farnia, P.; Tabarsi, P.; Ghanavi, J.; ZiaZarifi, A.H.; Hoffner, S.E.** (2009) Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. *CHEST* 136:420-425.
- Vincent Lévy-Frédault, V.; Portaels, F.** (1992) Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *Internat J of Systemat Bacteriol.* 42(2):315-323.
- Wassermann MM.; Saphra I.** (1955) The use of bacteriophages in typing *Salmonella* cultures. *J Bacteriol* 69(1):97-100.
- Weinbauer MG.** (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev.* 28(2):127-81.
- Xu J, Hendrix RW, Duda RL.** (2004) Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes. *Mol Cell.* 8;16(1):11-21

Yin Y1, Fischer D (2008) Identification and investigation of ORFans in the viral world. *BMC Genomics*.19;9:24. doi: 10.1186/1471-2164-9-24.

Yoo SY1, Merzlyak A2, Lee SW2 (2014) Synthetic phage for tissue regeneration. *Mediators Inflamm*. 2014;192790.

Yoshida M, Takaki Y, Eitoku M, Nunoura T, Takai K (2013). Metagenomic analysis of viral communities in (hadopelagic sediments. *PLoS One.*;8(2):e57271

Young R. (2014) Phage lysis: three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol*.52(3):243-58.

Zimmerman SB, Little JW, Oshinsky CK, Gellert M. (1967). "Enzymatic joining of DNA strands: a novel reaction of diphosphopyridine nucleotide". *Proc Natl Acad Sci USA*;57:1841-8.

Zinder ND, Lederberg J. (1953). Genetic exchange in Salmonella. *J Bacteriol*;64:679-99.