

Tesis Doctoral

Estudio de la interacción fago-bacteria en *Lactobacillus casei*

Dieterle, María Eugenia

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Dieterle, María Eugenia. (2017). Estudio de la interacción fago-bacteria en *Lactobacillus casei*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6271_Dieterle

Cita tipo Chicago:

Dieterle, María Eugenia. "Estudio de la interacción fago-bacteria en *Lactobacillus casei*". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.
https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6271_Dieterle



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

“Estudio de la interacción fago-bacteria en *Lactobacillus casei*”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Química Biológica

Lic. María Eugenia Dieterle

Director de Tesis: Dra. Mariana Piuri

Consejero de estudios: Dra. María Julia Pettinari

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad
de Buenos Aires, IQUIBICEN-CONICET.

Buenos Aires, Mayo 2017

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Escribo, borro y vuelvo a escribir. Si esta suele ser la sección más simple de redactar, no pareciera ser el caso. Esto no sucede porque haya transitado sola este camino, al contrario he tenido la fortuna de encontrarme con gente maravillosa en el recorrido que lo allanaron regalándome su conocimiento, tiempo, voluntad, risas, empuje y hasta incomodidades que permitieron estar hoy acá, pudiendo cerrar un ciclo. Quizás sea esto último lo difícil y hasta por momentos paralizante. Me alivia saber que las personas quedan y seguirán siendo parte. A todos, un incondicional gracias.

Empiezo por Marian con quien de alguna forma siento que aprendimos juntas : vos, en tu rol como directora y el mío, como estudiante. Primero, gracias por permitirme ser parte del equipo y confiar en mi para comenzar juntas este proyecto ¡Todo resulta más simple cuando el entusiasmo es compartido! Gran parte de mi formación académica te la debo a vos, gracias por dirigirme con tu absoluta presencia y por compartir tus conocimientos. Valoro mucho la libertad con la que que trabajamos, dándome el espacio para proponer y desarrollar mis ideas. Te agradezco por las oportunidades que me brindaste y los increíbles viajes que compartimos. Te admiro y quiero mucho Marian!

San, jamás me olvidaré la felicidad que me generaste cuando abriste las puertas del laboratorio. Siempre estaré agradecida. Gran parte de que todo esto funcione es gracias a vos, siempre con tu excelente predisposición y enseñando con el ejemplo. Gracias por escuchar y por las vastas sugerencias para los experimentos.

Carmen, le agradezco por brindarme de su tiempo para discutir ideas y generar enriquecedoras charlas. ¡Siento una gran admiración por usted! Gracias particularmente por sus valiosos aportes en la lectura del manuscrito.

Quiero agradecer a Becar-Campus France por financiar una estadía en el laboratorio del Dr. Cambillau, en Marsella, Francia.

Al Dr Christian Cambillau le agradezco por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio y por su infinito entusiasmo. Este trabajo no sería lo mismo sin su valiosa colaboración. Quiero agradecer a todo el laboratorio de la AFMB, principalmente al Dr. Alain Roussel por recibirme en su laboratorio, Beatrice, Joan, Phillipe, Christine, Edoardo y Polo que siempre me trataron con gran calidez y permitieron tener una estadía placentera y fructífera. En particular, quiero agradecer a la Dra. Aline Desmyter que colaboró en la producción de nanoanticuerpos. Gracias Anais, Jennifer y Amal que siempre estuvieron dispuestas a ayudar dentro del laboratorio y divertinos fuera de él.

Un párrafo aparte merece Silvia. No solo tuve la oportunidad de conocer a una excelente científica sino también a una gran persona. Primero, gracias por guiarme en el fascinante y a la vez complejo mundo de la cristalografía, por responder mis inquietudes y por tu infinita colaboración. Te agradezco por haberme adoptado durante mi estadía en Marsella, por las tantas cenas compartidas, los otros montones de cafés terapéuticos y tu invaluable compañía. Infinitas gracias por “aplicarte” tanto.

Quisiera agradecer a todos los colaboradores que han permitido que el proyecto avance: al Dr. Graham Hatfull quien me recibió en su laboratorio, al Dr. Carlos Batthyany, a la Dra Rosario Duran, al Dr. Sergio Neimeroski, al Dr. Adrián Turjanski, al Dr. Esteban Lanzarotti, a Joaquina Fina Martin, a Charles Bowman y a Dan Russel.

Gracias a todos los compañeros de laboratorio que forman y formaron parte de esta gran familia de bacterias Gram positivas, sus fagos y estrés: Marian, Mer, Mariano, Pablo, Marianito, Lula, Joaqui, Lacho, Flor, Estef, Lil, Jordi, Mati, Pau. Entre charlas, mates y siempre algo dulce para “degustar” todos ustedes ayudan a que sean solo las bacterias las estresadas (me corrijo, las más estresadas) ¡Feliz de ser parte de este grupo con el que da gusto venir a trabajar! Mer y Marianita, les agradezco por sus enseñanzas y los tantos protocolos que me facilitaron. Por estar siempre dispuestas y de la mejor forma. A Marian por su buena onda que contagia y se lo extraña cuando se va. A Mati por su ayuda en

informática y por escuchar, siempre. A Joaqui y Jor, que mantienen el labo a raya. Gracias chicas por los favores de mesada y la buena onda de todos los días.

A Lil y Estef, el dúo *Myco* de la mesada de enfrente. ¡Este camino lo hicimos juntas! Les agradezco por estar siempre presentes, tanto en el laboratorio como fuera de él. Incluso aquellos días cuesta arriba, con ustedes todo se hace más fácil. Estef, gracias amiga por ser incondicional, por tu solidaridad y por tantos oídos prestados. ¿Cuál será nuestro próximo destino?

A los chicos de genética bacteriana por su buen humor y divertidas historias que hacen que los días sean más amenos.

A mis amigos de la facu y de la vida, algunos cerca y otros más lejos pero siempre manteniendo la amistad. Gracias por todos los momentos regalados o robados. Sofi te agradezco por socorrerme en cada oportunidad en el que alguna herramienta gráfica me superaba.

Gracias Pablo por haberte cruzado en mi vida y cambiármela. Por robarme sonrisas todos los días. Por la ayuda inmensurable de estas últimas semanas.

A mi sostén incondicional que es mi familia, les agradezco por generar los cimientos de lo que soy, por la educación que me brindaron y principalmente formarme como persona, nada hubiera sido posible sin ustedes. Todo empieza en casa. Gracias por su infinito apoyo, ¡gracias por tanto! Este trabajo es para ustedes.

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

Dieterle ME., Spinelli S., Sadovskaya I., Piuri M., Cambillau C. **2017.** Evolved Distal Tail carbohydrate binding modules of *Lactobacillus* phage J-1: A novel type of anti-receptor widespread among Lactic Acid Bacteria phages. *Molecular Microbiology*. Accepted Author Manuscript.

Dieterle ME, Fina Martin J, Neimeroski S, Duran R, Cambillau C, Piuri M. **2016.** Characterization of prophage like elements containing “evolved” Dit/Tal modules in the genome of *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Microbiol Biotechnol.*100: 9201–9215

Dieterle ME, Bowman C, Lanzarotti E, Batthyany C Turjanski A., Hatfull G, Piuri M. **2014.** Exposing the secrets of two well known *Lactobacillus casei* phages: Genomics and structural analysis. *Appl Environ Microbiol.* 80(22):7107-7121.

Dieterle ME, Jacobs-Sera D, Russell D, Hatfull G, Piuri M. **2014** Complete Genome Sequences of *Lactobacillus* Phages J-1 and PL-1. *Genome Announc.* 2(1). pii: e00998-13.

Índice

RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	18
ABREVIATURAS.....	20
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Los bacteriófagos.....	22
1.1 Clasificación y morfología de fagos.....	23
1.2 Ciclo lítico /lisogénico.....	24
1.3 Profagos.....	26
2. Bacterias del ácido láctico.....	28
2.1 BAL empleadas en procesos industriales derivados del uso de bacterias lácticas.....	29
2.1.1 BAL empleadas en la producción de leches fermentadas.....	30
2.1.2 BAL empleadas en la producción de quesos.....	31
2.1.3 BAL no pertenecientes al fermento o al cultivo iniciador.....	32
2.2 BAL del grupo de <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.3 BAL con características probióticas.....	33
3. Bacteriófagos de BAL.....	35
3.1 Fagos de <i>Lactococcus</i>	37
3.2 Fagos de <i>S. thermophilus</i>	37
3.3 Fagos de <i>Lactobacillus</i>	38
4. Fagos del grupo <i>L. casei</i>	39
5. Profagos en BAL.....	42
6. Interacción fago-bacteria.....	43
6.1 Evolución de los fagos con cola.....	44
6.2 Fagos que reconocen receptores sacarídicos.....	48
6.2.1 La placa base del fago p2.....	49
6.2.2 La placa base del fago TP901-1.....	52
6.3 Fagos que reconocen receptores proteicos.....	53
6.4 Receptores bacterianos.....	55

6.4.1 Ácidos teicoicos.....	56
6.4.2 Glicopolímeros.....	57
7. La problemática de la propagación fágica dentro de la planta y formas de control.....	59
7.1 Leche cruda y productos de reciclaje.....	60
7.2 Factores ambientales.....	61
7.3 Cultivos iniciadores.....	62
8. Mecanismos de fagorresistencia.....	63
8.1 Inhibición de la adsorción.....	63
8.2 Inhibición de la eyección del ácido nucleico.....	65
8.3 Clivaje del ácido nucleico de fagos.....	66
8.4 Infección abortiva (Abi).....	68
8.5 Sobreproducción de componentes virales.....	68
8.6 ARN antisentido.....	69
OBJETIVOS.....	71
Objetivos generales.....	72
Objetivos específicos.....	72
MATERIALES Y MÉTODOS.....	73
1. Bacteriófagos, cepas y medios de cultivo utilizados.....	74
2. Plásmidos utilizados.....	76
3. Técnicas utilizadas para la manipulación de fagos.....	78
Producción de stock viral.....	78
Ensayo en placa.....	79
Aislamiento de ADN de fago.....	79
Purificación de los fagos en gradiente discontinuo de Cloruro de Cesio (ClCs).....	80
Microscopía Electrónica de transmisión (MET).....	81
Identificación de proteínas por espectrometría de masa (MS).....	81
Ensayos de adsorción.....	82
Ensayo de inhibición de la adsorción.....	83
Aislamiento de posibles mutantes del fago J-1.....	85

4. Secuenciación y anotación de los genomas.....	86
5. Métodos computacionales.....	86
6. Ensayos con profagos.....	88
Inducción de profagos mediante el agregado del mutágeno Mitomicina C (MC).....	88
Ensayos de PCR en tiempo real para la determinación de la escisión de los profagos.....	88
7. Clonado, expresión y purificación de proteínas de interés.....	91
Clonado de proteínas de interés.....	91
Expresión de proteínas.....	94
Purificación de proteínas.....	94
Zimograma.....	95
Proteólisis controlada.....	96
Ensayos de interacción proteína-bacteria utilizando microscopía de fluorescencia.....	96
8. Anticuerpos anti-Dit.....	97
Inmunización y prueba de inmunogenicidad.....	97
Ensayo de Western Blot (WB).....	97
Inmunoelectromicroscopía.....	98
Ensayos de neutralización e inhibición de la adsorción con anticuerpos.....	98
Ensayo de inmunofluorescencia para evaluar la unión proteína-bacteria.....	99
9. Cristalización y determinación de la estructura del CBM2.....	99
10. Microscopía electrónica por tinción negativa de la placa base del fago J-1.....	102
11. Nanoanticuerpos.....	103
Generación de VHH.....	103
Interferometría en biocapas (BLI).....	105
Ensayo de unión proteína- bacteria en presencia de nanoanticuerpos usando citometría de flujo.....	106
Ensayo de neutralización usando nanoanticuerpos.....	107
ANEXO I - Medios de cultivo, soluciones y <i>buffers</i>	108
ANEXO II-Secuencias aminoacídicas de la proteína gp16 y gp17 de J-1 y sus posibles dominios.....	110
RESULTADOS.....	112
Capítulo 1. Caracterización a nivel genómico y proteómico de los fagos J-1 y PL-1.....	113

1.1 Aportes previos desarrollados en el laboratorio.....	114
1.2 Secuenciación del fago PL-1.....	116
1.3 Organización del genoma de PL-1 y sus diferencias con J-1.....	117
1.3.1 Empaquetamiento y Morfología del virión.....	120
1.3.2 Lisis.....	124
1.3.3 Integración e inmunidad.....	125
1.3.4 Módulo de Replicación y extremo derecho.....	126
1.4 Proteínas de la placa base.....	127
1.4.1 gp16 o Dit.....	127
1.4.2 gp17 o Tal.....	133
Capítulo 2. Evaluación del riesgo de inducción de profagos presentes en la cepa modelo <i>L. casei</i> BL23.....	136
2.1 Aportes previos desarrollados en el laboratorio.....	137
2.2 Estrategia de análisis de profagos inducidos.....	139
2.3 Nivel de escisión de los profagos.....	140
2.4 Estimación de la replicación fágica.....	143
2.5 Análisis genómico y estructural de PLE2 y PLE3.....	145
2.6 Proteínas de la placa base de PLE1, PLE2, PLE3.....	152
2.6.1 Dit.....	153
2.6.2 Tal.....	155
Capítulo 3. Análisis funcional de la placa base de los fagos J-1 y PL-1.....	157
3.1 Primeros ensayos: reconocimiento fago-hospedador.....	158
3.2 Unión de la proteína Dit a <i>L. casei/ paracasei</i>	160
3.3 Inhibición de la adsorción de Dit.....	163
3.4 Anticuerpos anti-Dit.....	164
3.4.1 Ensayo de inmunoelectromicroscopía.....	165
3.4.2 Neutralización e inhibición de la adsorción.....	166
3.5 Ensayos de unión del CBM1 y CBM2 al huésped.....	167
3.6 Ensayo de inhibición de la adsorción del CBM2.....	169
3.7 Ensayos preliminares con la proteína Tal.....	170

3.8 Identificación de posibles receptores.....	172
Capítulo 4. Análisis estructural de la placa base del fago J-1.....	176
4.1 Determinación de los fragmentos a clonar y ensayos preliminares.....	177
4.2 Estructura del dominio CBM2.....	179
4.3 Potencial sitio de unión del sacárido en el CBM2.....	180
4.4 Tentativa de cristalización del CBM1.....	183
4.5 Nanoanticuerpos: anti CBM1 y anti CBM2.....	183
4.5.1 Nanoanticuerpos: generación.....	184
4.5.2 Nanoanticuerpos: Formación del complejo con el CBM1.....	187
4.5.3 Nanoanticuerpos: Ensayos de unión a Dit y CBMs.....	188
4.5.4 Nanoanticuerpos: Ensayos de neutralización.....	190
4.6 Reconstrucción por microscopía electrónica de la placa base.....	191
DISCUSIÓN.....	195
La problemática de los fagos de <i>Lactobacillus</i> spp. en la industria láctea.....	196
1. Genómica de fagos.....	197
2. El riesgo de las cepas lisogénicas.....	201
3. La placa base de los fagos J-1 y PL-1.....	203
4. Desarrollo de estrategias racionales para el control fágico.....	210
CONCLUSIONES.....	213
BIBLIOGRAFÍA.....	216

Índice de Figuras

Figura 1. Morfología por microscopía electrónica y esquemas de las familias pertenecientes al orden Caudovirales.....	24
Figura 2. Esquema general del ciclo lítico y lisogénico de los fagos.....	26
Figura 3. Esquema de integración y escisión del genoma de un fago temperado.....	27
Figura 4. Producción mundial de leche.....	30
Figura 5. Representación esquemática de la organización genómica de fagos del grupos <i>L. casei</i>	41
Figura 6. Representación esquemática del módulo de morfogénesis de fagos de <i>Siphoviridae</i>	45
Figura 7. Conservación de las proteínas del la cola.....	47
Figura 8. Estructura de las proteínas de la punta de la cola de p2.....	50
Figura 9. Estructura por microscopía electrónica de la placa base de p2.....	51
Figura 10. Estructura de la placa base de TP-901-1.....	53
Figura 11. Conformación adoptada por las proteínas de la punta de la cola de SPP1.....	54
Figura 12. Esquema general de la envoltura de bacterias Gram positivas.....	55
Figura 13. Estructura del polisacárido de pared (CWPS) de <i>L. casei</i> BL23	59
Figura 14. Diferentes estrategias usadas por las bacterias para evitar la adsorción.....	64
Figura 15. Estructura de los complejos RBP (TP901-1) junto con el DARPin 20 y el VHH5.....	65
Figura 16. Mecanismo general de CRISPR-Cas.....	67
Figura 17. Vector pET-28 a-c (+) y PHEN4.....	78
Figura 18. Mapas genómicos del bacteriófago J-1 y PL-1.....	115
Figura 19. Comparación de la secuencia nucleotídica de los fagos J-1 y PL-1.....	116
Figura 20. Comparación genómica de fagos de <i>Lactobacillus</i>	118
Figura 21. MET de los fagos J-1 y PL-1.....	120
Figura 22. Identificación de las proteínas asociadas al virión.....	121
Figura 23. Cambio en el marco de lectura de los ARNm de la cápside y las chaperonas.....	124
Figura 24. Alineamiento aminoacídico de la proteína Dit entre J-1, PL-1 y sus homólogas en otros fagos del grupo <i>L. casei</i>	130
Figura 25. Análisis por HHpred de la proteína Dit de J-1.....	131
Figura 26. Análisis topológico de la proteína Dit de J-1 y PL-1.....	132

Figura 27. Alineamiento aminoacídico de la proteína Tal y sus homólogas en otros fagos del grupo <i>L. casei</i> y predicción de la estructura.....	134
Figura 28. Localización de los profagos en el genoma de <i>L. casei</i> BL23.....	137
Figura 29. Escisión de PLEs.....	138
Figura 30. Esquema de trabajo utilizado para evaluar el nivel de inducción de profagos.....	140
Figura 31. Nivel de escisión de los PLEs.....	142
Figura 32. Replicación de los profagos después de la escisión.....	143
Figura 33. Tasa de replicación de PLE2 aproximada a una curva exponencial.....	144
Figura 34. Microscopia electrónica de los fagos obtenidos post-inducción con MC de la cepa <i>L. casei</i> BL23.....	145
Figura 35. Análisis preliminar de la secuenciación de los profagos inducidos.....	147
Figura 36. Mapas genómicos de PLE2 y PLE3	151
Figura 37. Homologías identificadas por HHpred para las proteínas Dit de PLE1/ PLE2.....	153
Figura 38. Similitud de secuencia entre las proteínas Dit evolucionadas de PLE3 y J-1.....	154
Figura 39. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas Dit de PLE3 (<i>L. casei</i> BL23) con profagos inducidos de bacterias del grupo <i>L. casei</i>	154
Figura 40. Representación esquemática de las proteínas de la placa base de PLE1/PLE2 y PLE3 basado en el análisis por HHpred.....	156
Figura 41. Placas de lisis de J-1 y PL-1	159
Figura 42. Cinética de adsorción de J-1 y PL-1.....	159
Figura 43. Ensayo de adsorción en presencia de azúcares.....	160
Figura 44. Unión de GFP-Dit a células de <i>Lactobacillus</i>	162
Figura 45. Ensayos control con las proteínas GFP y mCherry.....	163
Figura 46. Inhibición de la adsorción de Dit en los fagos J-1 y PL-1.....	164
Figura 47. Proteína Dit en el virión.....	165
Figura 48. Ensayos con anticuerpos anti-Dit.....	166
Figura 49. Dominios de la proteína Dit de J-1 e interacción con células de <i>L. casei</i>	168
Figura 50. Ensayo de inmunofluorescencia.....	169
Figura 51. Inhibición de la adsorción del CBM1 y CBM2 de Dit.....	170
Figura 52. Ensayos preliminares J-1 GFP-Tal.....	172

Figura 53. Interacción del CBM2 de J-1 con <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> ATCC 27139 en presencia del azúcar L-ramnosa.....	173
Figura 54. Ensayo de fluorescencia en presencia y ausencia del polisacárido de pared de <i>L. casei</i> BL23.....	175
Figura 55. Proteólisis controlada de Dit.....	178
Figura 56. Purificación y cristalización del CBM2.....	180
Figura 57. Estructura de CBM2.....	181
Figura 58. Comparación de la estructura del CBM2 con otros dominios tipo CBM.....	182
Figura 59. Purificación y cristales del dominio CBM1.....	183
Figura 60. Generación de nanoanticuerpos.....	184
Figura 61. Microscopía electrónica de la placa base.....	185
Figura 62. Alineamientos de las secuencias VHH.....	186
Figura 63. Interferometría en biocapas (BLI).....	187
Figura 64. Purificación y ensayo de interacción del complejo CBM1-VHH52.....	188
Figura 65. Ensayos de unión de GFP-Dit en presencia de nanoanticuerpos por citometría.....	189
Figura 66. Ensayos de neutralización usando nanoanticuerpos.....	191
Figura 67. Microscopía electrónica de la placa base del fago J-1.....	193
Figura 68. Reconstrucción de la placa base del fago J-1 por microscopía electrónica de transmisión.....	194
Figura 69. <i>Dot plot</i> de los 36 genomas de <i>Lactobacillus</i> spp.....	199
Figura 70. <i>Dot plot</i> de los fagos del grupo <i>L. casei</i>	201
Figura 71. Reconstrucción en tres dimensiones de la placa base de J-1, p2 y TP901-1.....	204

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de la familia de las integrasas tipo serina y tirosina.....	28
Tabla 2. Proteínas de la placa base en fagos de BAL.....	48
Tabla 3. Bacteriófagos de BAL y sus posibles receptores.....	56
Tabla 4. Cepas <i>E. coli</i> utilizadas en el trabajo.....	75
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados como <i>primers</i> en la PCR en tiempo real.....	90
Tabla 6. Construcciones plasmídicas realizadas para la expresión de las proteínas.....	93
Tabla 7. Colección de datos y estadísticas del refinamiento.....	102
Tabla 8. Posibles genes y productos de los fagos de <i>Lactobacillus</i> PL-1 y J-1.....	119
Tabla 9. Proteínas presentes en el virión obtenidos por espectrometría de masa.....	121
Tabla 10. Profagos en <i>L. casei</i> BL23.....	138
Tabla 11. Anotación de los genes a partir de la secuenciación de los fagos PLE2 y PLE3.....	149
Tabla 12. Identificación de las proteínas asociadas al virión por MS.....	152
Tabla 13. Construcciones de la dominios proteicos correspondientes a Dlt /Tal.....	178
Tabla 14. Proteínas de la placa base en fagos de BAL.....	205
Tabla 15. Posibles CBMs en las placas base de fagos del grupo <i>L. casei</i>	207

RESUMEN

“Estudio de la interacción fago–bacteria en *Lactobacillus casei*”

Los bacteriófagos que infectan bacterias ácido lácticas (BAL) son el principal problema de fallas en la fermentación generando grandes pérdidas económicas. *Lactobacillus casei* resulta de especial interés porque además de contribuir con las propiedades organolépticas del producto final, muchas cepas presentan propiedades probióticas y son parte de productos comerciales. El uso de las mismas es el resultado de años de investigación que valida los supuestos beneficios en los alimentos. Debido a esto, la infección por fagos de estas cepas específicamente elegidas es perjudicial ya que no pueden ser reemplazadas con facilidad. En esta tesis estudiamos dos aspectos fundamentales de la relación fago-bacteria en *Lactobacillus casei*. Por un lado, la caracterización a nivel genómico y proteómico de los fagos *Lactobacillus casei* J-1 y PL-1 con particular énfasis en el aparato de reconocimiento del receptor o placa base a nivel estructural y funcional. Por otro, la presencia de profagos presentes en *L. casei* BL23 con el objetivo de evaluar el riesgo en la generación de fagos con capacidad infectiva en la industria láctea.

Las placas base ubicadas en la punta de la cola son grandes complejos multiproteicos conformados por un ensamblaje de seis proteínas distales de la cola (Dit), tres proteínas de la cola asociadas a lisinas (Tal) y un número variable de proteínas de unión al receptor (RBPs) que reconocen estructuras presentes en las envolturas bacterianas. Sin embargo, la secuenciación de los fagos J-1 y PL-1 ha mostrado que carecen de las canónicas RBPs. En su lugar, hemos demostrado que la Dit, hasta ahora sólo descrita como estructural, cumple un rol en el reconocimiento del receptor siendo la ramnosa al menos uno de los azúcares reconocidos por estos fagos. En la secuencia de Dit de J-1 y PL-1 existen dos inserciones ausentes en las “clásicas” Dits. La primera inserción presenta homología a módulos de unión a carbohidratos (CBMs, en este caso CBM1) mientras que para la segunda no se encontró similitud. La resolución de la estructura por rayos X de este dominio reveló un plegado similar a CBMs y se lo denominó CBM2. Con el objetivo de descifrar la función de estos módulos, se realizaron ensayos de unión a las bacterias y de inhibición de la adsorción que demostraron que el CBM2, pero no el CBM1, era el

responsable del reconocimiento. Ensayos con el polisacárido de pared (CWPS) rico en ramnosa purificado de *L. casei* BL23 inhibieron la unión del CBM2 a las bacterias. La reconstrucción por microscopía electrónica de la placa base de los viriones enteros muestra que el CBM2 se encuentra en la periferia del complejo, óptimo para reconocer al CWPS. Análisis de secuencia revela que estas Dits evolucionadas están conservadas en fagos que infectan BAL. En resumen, estos resultados identifican a las Dits evolucionadas como los antireceptores en los fagos J-1 y PL-1. A su vez, generando nanoanticuerpos que reconocen al complejo Dit y la región N-terminal de Tal se mostró que uno de ellos bloquea la infección. Por otro lado, Tal tiene la capacidad de hidrolizar el peptidoglicano bacteriano que permitiría la inyección del ADN.

Los fagos pueden encontrarse no solo en los sustratos usados como materia prima sino también como profagos en las propias cepas iniciadoras. La inducción de profagos y generación de virus con potencial de infectar otras cepas es un riesgo en la industria láctea. Hemos identificado 3 profagos completos (PLE1, PLE2, PLE3) en el genoma de *L. casei* BL23. Usando PCR cuantitativa, mostramos que 2 de ellos se inducen aunque con distintas cinéticas (PLE2 y PLE3). Según datos de secuenciación, microscopía electrónica y espectrometría de masa, al menos uno forma un virión potencialmente infectivo. Análisis estructural de las placas base de los profagos muestra nuevamente la presencia de CBMs en las proteínas Dits.

Estos resultados resaltan la relevancia de los CBMs en las Dits evolucionadas en los primeros pasos de la infección y sugieren que deberían considerarse como dispositivos *bona-fide* de adhesión y no solo como proteínas meramente con función estructural como habían sido descritas hasta hoy. El estudio del complejo multi-proteico involucrado en el reconocimiento al huésped y conservado en fagos que infectan cepas de BAL junto con el estudio de la inducción de profagos aporta datos de relevancia que podrían utilizarse para desarrollar estrategias anti-fágicas en la industria láctea.

ABSTRACT

“Study of phage–bacteria interaction in *Lactobacillus casei*”

Bacteriophages infecting Lactic Acid Bacteria (LAB) are the main cause of fermentation failures leading to economic losses. *Lactobacillus casei* is particularly of interest because besides its contribution with the organoleptic properties, several strains have purported probiotic properties and are part of commercial formulations. The use of these strains is the result of years of research that validated the claimed benefits in food products. Noteworthy, phage attack on these specifically chosen strains is particularly deleterious, as they cannot be replaced easily. On this thesis, we studied two fundamental aspects of phage-bacteria interaction in *Lactobacillus casei*. On one hand, we characterized *Lactobacillus casei* phage J-1 and PL-1 at a genomic and proteomic level, particularly we focused on the structure and functionality of the recognition receptor machinery or baseplate. On the other hand, we identified and study prophages in *L. casei* BL23 to evaluate the risk of infective phage formation in dairy industry.

Baseplates are large complexes located at the tip of the tail, the core of which assembles six Distal tail (Dit) proteins, three Tail associated lysin (Tal) proteins and a variable number of Recognition Binding Proteins (RBPs) that recognize receptors of the cell envelope. While most phages possess a dedicated RBP, phage J-1 and PL-1 genome seemed to lack one. We have shown that Dit plays a role in host recognition and that its sequence comprises two inserted modules compared to “classical” Dits. The first insertion was found to be similar to carbohydrate-binding modules (CBMs, here CBM1), whereas the second insertion was undocumented. To decipher the role of these modules, we determined the structure of the second insertion, named CBM2, and found it similar to several CBMs. We found that expressed CBM2, but not CBM1, could bind to *L. casei* cells and neutralize phage attachment to the bacterial cell wall. Isolated and purified rhamnose-rich cell wall polysaccharide (CWPS) of *L. casei* BL23 prevents CBM2 attachment to the host. Electron microscopy reconstruction of the J-1 virion baseplate revealed that CBM2 is projected at the periphery of Dit to optimally bind the CWPS receptor. Taken together, these results identify J-1 and PL-1 evolved Dit as the phage antireceptor. Moreover, nanobodies raised

against J-1 Dits and the N-terminal of Tal complex block infection. Additionally, Tal hydrolyzes the bacteria peptidoglycan to allow phage DNA injection.

Bacteriophages can be found on the substrates used for fermentation but they are also found as prophages in the bacterial strains used as starters. Prophage induction and generation of new phages is a risk for dairy industry. We identified three complete prophages (PLE1, PLE2, and PLE3) in the genome of *L. casei* BL23. Using quantitative real-time PCR, we showed that PLE2 and PLE3 can be induced but with different kinetics. Sequencing, electron microscopy and mass spectrometry analysis showed that at least one of them forms a potential infective virion. A structural analysis of the baseplate proteins of these prophages provides more evidence that CBMs may replace RBPs present in other well-studied LAB phages.

These results highlight CBM relevance in evolved Dits at the first steps of infection. Dits should be considered as *bona-fide* potential adhesion devices and not only as passive hubs. The detailed study of the proteins involved in host recognition and conserved in LAB phages in combination with prophage induction in the prototype *L. casei* BL23 strain will facilitate the design of new strategies for avoiding phage propagation in dairy industry.

ABREVIATURAS

% v/v	Porcentaje volumen en volumen	MC	Mitomicina C
Å	Ångström	MCS	Sitio múltiple de clonado
aa	aminoácidos	MET	Microscopía electrónica de transmisión
Abi	Infección abortiva	MFA	Microscopía de fuerza atómica
Abs	Absorbancia	MI	Multiplicidad de infección
ADN	Ácido desoxirribonucleico	min	minutos
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico doble cadena	ml	mililitro
ARN	Ácido ribonucleico	mM	milimolar
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	MRS	Man, Rogosa y Sharpe
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia	MS	Espectrometría de masa
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	MTP	Proteína mayor de la cola
<i>attB</i>	sitio de unión en la bacteria	MWCO	Molecular Weight Cut off
<i>attL</i>	sitio híbrido ubicado a la izquierda del profago	NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>attP</i>	sitio de unión en el fago	NPS	Estructura de cuello
<i>attR</i>	sitio híbrido ubicado a la derecha del profago	NSLAB	Bacterias no pertenecientes al fermento
BAL	Bacterias Ácido Lácticas	OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
BIM	Mutantes insensibles al fago	ON	Recuperación toda la noche (<i>Overnight</i>)
BLI	Interferometría en biocapas	ORF	Marco abierto de lectura
BSA	Albúmina cristalina de Suero Bovino	pb	Pares de bases
C	Condición control de crecimiento	PBS	<i>Buffer</i> fosfato
CBM	Dominio de unión a carbohidratos	PBST	<i>Buffer</i> fosfato- Tween
ClCs	Cloruro de cesio	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CRISPR Repeats	<i>Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats</i>	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Ct	Ciclo Umbral	PEG	Polietilenglicol
CWPS	Polisacárido de pared	PG	Peptidoglicano
Darpins	Designed Ankyrin Repeat Proteins	PIP	<i>Phage Infection Protein</i>
Dit	Proteína distal de la cola	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
DO	Densidad Óptica	PSMs	Número total de péptidos encontrados
EEUU	Estados Unidos	R/M	Restricción / Modificación
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	RBP	Proteína de unión al receptor
EPS	Exopolisacárido	s	segundos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	SDS	Duodecilsulfato de sodio
FDA	Administración de Alimentos y Drogas	SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa	spp	especies
GFP	Proteína verde fluorescente	subsp	subespecie
gp	Producto génico	Tal	Proteína de la cola asociada a la lisina
GPCL	<i>Genomics and Proteomics Core Laboratory</i>	TB	Medio Terrific
GRAS	Generalmente reconocidas como seguras	TEMED	Terametilendiamina
h	Horas	TEV	Tobacco Etch Virus
HA	Hemaglutinina	TMB	Tetrametilbencidina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>	TMP	Proteína cinta métrica
HTH	Hélice vuelta hélice	Trp	Terminador de la cola
IATA	Instituto de Agroquímica y Biotecnología de Alimentos	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Virus</i>	UFP	Unidades Formadoras de Placas
IDT	<i>Integrated DNA technologies</i>	µl	microlitro
kb	kilobases	µM	micromolar
Kd	Constante de disociación	UV	Ultravioleta
kDa	kilodalton	VHH	nanoanticuerpos
l	litro	WB	<i>Western Blot</i>
LB	Luria-Bertani	WTA	Ácidos teicoicos
LTA	Ácido lipoteicoicos		
LZ	Lisozima		
			Microorganismos
		<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
		<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i> (y <i>Lactococcus lactis</i>)
		<i>S.</i>	<i>Streptococcus</i>

INTRODUCCIÓN

1. Los bacteriófagos

Los bacteriófagos (virus bacterianos o del griego comedores de bacterias) son elementos biológicos incapaces de reproducirse independientemente y requieren de un huésped bacteriano para su multiplicación. Estos virus infectan específicamente bacterias causando, generalmente, la lisis celular y la liberación de cientos de nuevos viriones listos para infectar a las células vecinas. Fagos y bacterias están continuamente desafiándose en una relación de tipo presa-predador y en constante co-evolución. (Hatfull *et al.*, 2008; Koskella y Brockhurst, 2014). Los fagos son considerados las entidades biológicas más abundantes y diversas del planeta. Una estimación de su número llega a 10^{31} superando a las bacterias al menos por un factor de 10 (Breitbart y Rohwer, 2005). Bergh *et al.* (1989) encontraron que tan solo en un mililitro de agua hay aproximadamente 10 millones de partículas virales (Bergh *et al.*, 1989).

Desde su descubrimiento, hace más de 100 años, los fagos se han utilizado para el control de poblaciones bacterianas y como herramientas en biología molecular. En los años 50, muchos de los grandes hallazgos que incluyeron la caracterización de ADN como material genético, el descifrado del código genético y la regulación de la expresión génica, fueron realizados inicialmente en fagos. Su actual interés se expandió al desarrollo de nuevas tecnologías no solo para terapia y biocontrol sino también para la detección bacteriana, *delivery* de drogas y nanotecnología.

Por otro lado, debido a su extraordinaria prevalencia, modulan poblaciones bacterianas en ecosistemas naturales como también en nichos ecológicos creados por el hombre (Weitz *et al.*, 2017). Se sabe que los bacteriófagos tienen el potencial de interferir con cualquier proceso biotecnológico que requiere del uso de bacterias (Sturino y Klaenhammer, 2006).

La abundancia que representan, la diversidad de sus genomas, el impacto en la evolución microbiológica, el control de las infecciones y sus innumerables aplicaciones (Brussow y Kutter, 2005) generan un constante y renovado interés que estimula el estudio de los fagos en todos sus campos.

1.1. Clasificación y morfología de fagos

Los virus procariotas pueden presentar forma polihédrica, filamentosa, pleomórfica o con cola. Además, contienen ADN o ARN de cadena simple o doble como material genético.

Más de 6300 virus han sido observados bajo el microscopio electrónico de transmisión (MET). El 96% de los mismos se encuentran clasificados en el orden de los *Caudovirales*. Este orden presenta una estructura cabeza-cola única en virología. Las cabezas son icosaédricas o levemente elongadas y las colas presentan una forma helicoidal que consiste en discos apilados generalmente con una placa base, espinas y fibras terminales. Estas características morfológicas sustentan un origen evolutivo monofilético. Los viriones del orden *Caudovirales* no presentan envoltura y consisten principalmente en proteína y ADN y los lípidos generalmente están ausentes. El ADN es único, lineal y doble cadena. La composición de sus bases generalmente está en concordancia con la composición en la bacteria huésped. Los mapas genéticos son complejos y aquellos genes con funciones relacionadas se encuentran cercanos entre sí (Ackermann y Prangishvili, 2012). El ICTV (*International Committee on Taxonomy of Virus*) reconoce en la última revisión a 3 familias dentro del orden *Caudovirales* (figura 1): *Myoviridae* (6 subfamilias y 39 géneros no contemplados en la subfamilia), *Podoviridae* (3 subfamilias y 20 géneros no contemplados en la subfamilia) y *Siphoviridae* (6 subfamilias y 94 géneros no contemplados en la subfamilia) (Krupovic et al., 2016)

-*Myoviridae*. Poseen colas contráctiles que consisten en una vaina y un tubo central. Representan aproximadamente el 24,8% de los fagos aislados. Un cuello separa la vaina de la cabeza. Ejemplos de esta familia son el fago T4, P1 y el fago Mu.

-*Siphoviridae*: Poseen colas largas no contráctiles comprenden el 57,3% de los fagos aislados. Ejemplos de esta familia incluyen al fago lambda, T1.

-*Podoviridae*. Poseen colas cortas y representan un 14,2%. El fago T7, P22 pertenecen a esta familia.

Los géneros se diferencian por la estructura genómica, la formación de concatémeros, presencia de bases inusuales y polimerasas de tipo ADN y ARN. Sin embargo, aún hoy la clasificación es tema de controversia (Ackermann y Prangishvili, 2012) .

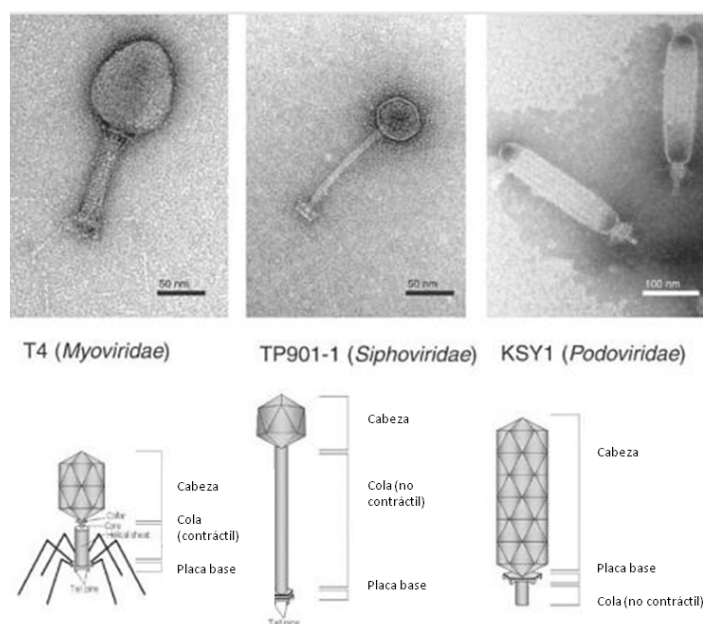


Figura 1. Morfología por microscopía electrónica y esquemas de las familias pertenecientes al orden *Caudovirales*. El fago T4 presenta una cabeza y una cola contráctil (*Myoviridae*). El fago temperado TP901-1 que infecta a *Lactococcus lactis* tiene una cabeza isométrica y una larga cola no contráctil (*Siphoviridae*). El fago temperado KSY1 que también infecta a *L. lactis*, presenta una morfología particular con una larga cabeza y con una cola corta no contráctil (*Podoviridae*). Adaptado de McAuliffe et al. (2007).

1.2. Ciclo lítico /lisogénico

Una partícula viral puede infectar una cepa específica o una serie de cepas pertenecientes a la misma especie o mismo género, es decir que existe una especificidad del fago hacia la bacteria huésped. Las formas en las que un fago se propaga son a través de un ciclo lítico o lisogénico (Figura 2). Los fagos virulentos están restringidos al ciclo lítico que, en última instancia, termina con la lisis del hospedador liberando la progenie viral por brotación o lisis celular (Young et al., 2000). Por otro lado, el ciclo lisogénico contempla a los fagos de tipo temperados. En este caso, el fago integra su ácido nucleico en el genoma de la bacteria (o permanece extracromosomal) estableciendo un estado conocido como profago y se replica como parte del huésped. Debido a la incorporación de material genético al hospedador, pueden observarse cambios en el fenotipo de la cepa infectada (Brüssow et al., 2004). Eventualmente, el profago puede escindirse (en caso que se haya integrado) y continuar con el ciclo lítico (figura 2). La decisión de iniciar un ciclo lítico o lisogénico de los

fagos depende de las condiciones del huésped infectado (fase de crecimiento, estado fisiológico) y de la multiplicidad de infección (relación fago/ bacteria) lo que conduce al cambio genético que determina el proceso a seguir (Sturino y Klaenhammer, 2006). Recientemente, se descubrió que la comunicación entre virus a través de pequeñas moléculas en un mecanismo de tipo *quorum sensing* contribuye a la decisión de realizar un ciclo lítico o lisogénico (Erez *et al.*, 2017).

La infección de fagos con cola comienza cuando las estructuras especializadas en la adsorción, ubicadas en la punta de la cola, se unen específicamente a moléculas en la superficie de la bacteria. Dada la especificidad de los receptores en la bacteria, los fagos pueden infectar a un rango acotado de bacterias. Cuando la unión fago-bacteria es irreversible, el ADN del fago pasa desde la cabeza hasta la célula huésped. En general, la punta de la cola tiene un mecanismo enzimático para penetrar la pared y la membrana plasmática y liberar el ADN directamente dentro de la célula en un proceso dependiente de energía. El ADN del fago replica dentro de la bacteria y usa la propia maquinaria celular para la biosíntesis de componentes virales y la maduración de la partícula fágica. En la mayoría de los casos, los productos de los genes que se transcriben inicialmente están vinculados a decidir el ciclo (lítico o lisogénico en el caso de fagos temperados) a seguir, proteger el genoma del fago y reestructurar la maquinaria metabólica del hospedador a disposición del fago. Los genes intermedios una vez transcritos, se vinculan con la replicación fágica, seguido de los genes tardíos que codifican las proteínas estructurales del virión y las enzimas vinculadas a la lisis bacteriana (Salmond y Fineran, 2015).

El ciclo lítico se completa cuando la progenie viral es liberada hacia el exterior. Los fagos con cola usan principalmente dos proteínas: la lisina, encargada del clivaje del peptidoglicano y la holina una proteína que hace poros en la membrana interna en el tiempo justo para que la lisina llegue al peptidoglicano y se libere la progenie viral (Kutter *et al.*, 2005)

En el ciclo lisogénico, los pasos involucrados en la adsorción del fago a la bacteria y la inyección del ADN, son similares a los que se producen durante el ciclo lítico. Sin embargo, el ADN viral se inserta en el cromosoma bacteriano o se mantiene como un plásmido extracromosomal. Esta transición depende de la presencia de proteínas codificadas en el genoma viral que actúan como reguladoras de la transcripción. Estas proteínas

reprimen la expresión de los genes fágicos asociados al ciclo lítico, favoreciendo el lisogénico. Las bacterias que transportan profagos reciben el nombre de lisógenas y bajo ciertas condiciones, el fago temperado puede ser inducido a iniciar un ciclo lítico de multiplicación. La transición hacia un ciclo lítico puede ser provocada por ciertos factores como la luz solar, la presencia de peróxido de hidrógeno y cambios de temperatura, aunque los más eficaces son la mitomicina C (MC) y la radiación UV-C (254 nm) (Weinbauer, 2004; Kutter *et al.*, 2005)

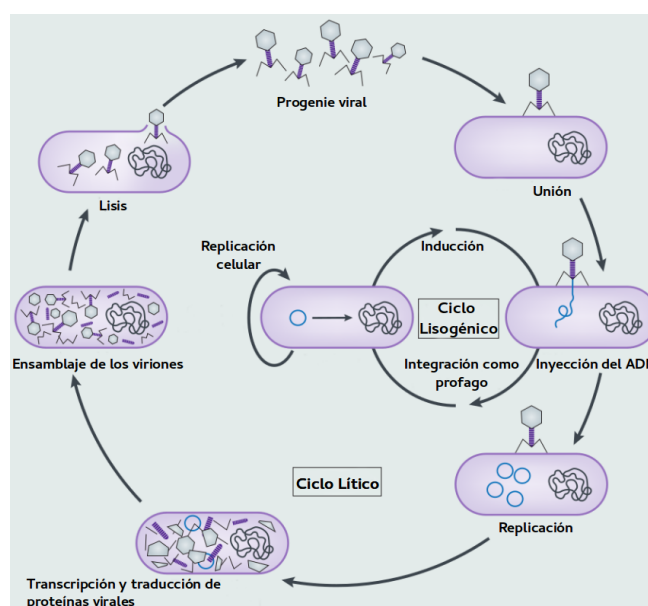


Figura 2. Esquema general del ciclo lítico y lisogénico de los fagos. Adaptado de Salmond y Fineran (2015).

1.3. Profagos

No es extraño encontrar en genomas bacterianos, ADN proveniente de fagos. Aproximadamente la mitad de la secuencias bacterianas contienen uno o más profagos. Los profagos son relevantes como elementos móviles de ADN y están vinculados con la transferencia horizontal en bacterias (Canchaya *et al.*, 2003). Cuando se comparan bacterias filogenéticamente relacionadas mediante un análisis de *dot plot* (ej.: *Listeria monocytogenes/innocua*, *Salmonella typhi/ typhimurium*), la mayor parte de las diferencias se encuentran en las secuencias correspondientes a los profagos (Glaser *et al.*, 2001).

Aunque podría pensarse que los fagos disminuyen la eficiencia adaptativa o *fitness* bacteriano debido al gasto metabólico que implica replicar el ADN extra, sumado a la posible lisis del hospedador si el profago logra inducirse; éstos pueden proveerle a la bacteria cierta ventaja adaptativa. Una clara ventaja es la inmunidad que protege al lisógeno a la superinfección por otros fagos. El análisis de la expresión en bacterias lisogénicas ha demostrado que los profagos no son elementos genéticos pasivos y juegan un rol en la fisiología celular (Canchaya *et al.*, 2003). Además, los profagos contribuyen al fenómeno de conversión lisogénica que puede convertir a una bacteria de no patogénica a patogénica (Freeman, 1951). Numerosos factores de virulencia de patógenos bacterianos se encuentran codificados en ADN correspondiente a profagos: la toxina del cólera codificada en el fago Ctx phi integrado en el huésped *Vibrio cholerae* (Waldor y Mekalanos, 1996), la neurotoxina del botulismo tipo C1 presente en el profago C-ST en el huésped *Clostridium botulinum* (Sakaguchi *et al.*, 2005), entre otros

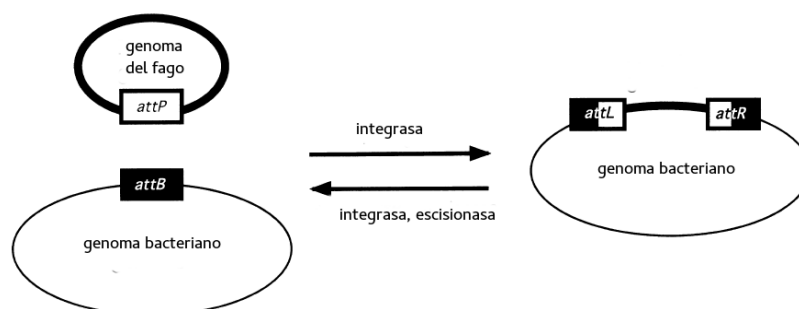


Figura 3. Esquema de integración y escisión del genoma de un fago temperado. Adaptado Groth y Calos, (2004).

Los fagos temperados codifican para una integrasa que media la recombinación sitio específica entre una secuencia corta de ADN del fago (*attP*) y el sitio de unión en la bacteria (*attB*). Un fago integrado, está flanqueado por dos sitios híbridos llamados *attL* y *attR* donde cada uno consiste en la mitad del *attP* y el *attB* (figura 3). Estas secuencias *attL* y *attR* son también los sustratos para la posterior escisión mediada nuevamente por una integrasa y generalmente una escisionasa y otros factores (Groth y Calos, 2004).

Las recombinasas de tipo sitio específicas se clasifican en dos grandes familias basadas en la homología de secuencia y el residuo catalítico, de tipo tirosina (ej: integrasa

del fago lambda) o de tipo serina (fago C31, R4 y TP901-1) (Esposito y Scocca, 1997; Smith y Thorpe, 2002). La tabla 1 muestra las principales diferencias entre los dos tipos de familias.

Tabla 1. Características de la familia de las integrasas tipo serina y tirosina. Adaptado de Groth y Calos. (2004)

Huésped	Integrasa de tipo tirosina	Integrasa de tipo serina
Residuo catalítico	Tirosina	Serina
Mecanismo	Formación y resolución de unión tipo <i>Holliday</i>	Corte escalonado de 2pb, rotación 180° y ligación
attB	Secuencia corta, región superpuesta flanqueada por dos repeticiones invertidas e imperfectas.	Secuencia corta, región superpuesta en ocasiones flanqueada por dos repeticiones invertidas e imperfectas.
attP	Secuencia extensa, múltiples sitios de unión para la integrasa, necesita factores del huésped y cofactores.	Secuencia corta, región superpuesta en ocasiones flanqueada por dos repeticiones invertidas e imperfectas.
Región superpuesta	6-8 pb	3-12 pb
Factores del huésped	Si (HimA, FIS)	No

2. Bacterias del ácido láctico

Las Bacterias del Ácido Láctico (BAL) son un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladoras que incluyen varios géneros como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella* y *Enterococcus* (Vandamme et al., 1996). Este grupo de bacterias se caracteriza por la ausencia en sus genomas de genes cuyos productos se encuentran involucrados en varias rutas de biosíntesis. Debido a esta limitante, las BAL se consideran auxótrofas y suelen encontrarse en ambientes ricos en aminoácidos, purinas y pirimidinas (Kandler, 1983)

Desde un punto de vista bioquímico, las BAL incluyen a los homofermentativos, cuyo único producto de la fermentación es el ácido láctico y heterofermentativos, que además de ácido láctico liberan otros productos secundarios durante la fermentación de carbohidratos como el ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Kleerebezem y

Hughenoltz, 2003; Broadbent et al., 2008). Originalmente la taxonomía clásica agrupó a las BAL por sus características morfológicas y fisiológicas. Con la llegada de las herramientas moleculares se redefinió el grupo, particularmente mediante la secuenciación de ARN ribosomal 16S (Stackebrandt y Teuber, 1988).

Las BAL han sido utilizadas de forma segura durante cientos de años y siguen siendo utilizadas en la producción y preservación de alimentos debido a la producción de ácido láctico como producto de la fermentación de las hexosas. Como consecuencia de su historial se les ha otorgado la clasificación Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS, de sus siglas en inglés *Generally Recognized as Safe*) por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, de sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos.

2.1. BAL empleadas en procesos industriales derivados del uso de bacterias lácticas

Durante la mayoría de las fermentaciones a escala industrial, los sustratos fermentables son inoculados con bacterias seleccionadas para generar un producto fermentado con las características organolépticas o funcionales de interés. Las bacterias iniciadoras utilizadas son tradicionalmente compuestas por una mezcla de bacterias que fueron originalmente aisladas de la flora endógena del alimento. La industria ha desarrollado estrategias de inóculos más consistentes basados en cultivos iniciadores concentrados, optimizados y bien definidos que actúan como biocatalizadores (Thunell y Sandine, 1985).

Más de 6.000 millones de personas en el mundo consumen leche y /o productos lácteos (OECD/FAO, 2016). Nuestro país tiene una larga tradición en el consumo de productos lácteos y niveles de ingesta por habitante comparables con los de países desarrollados. Si se compara la producción de leche de los principales productores, Argentina se ubica en el puesto 12 con 11,2 millones de toneladas de producción en el año 2015 (considerando a la Unión Europea como un productor único) (OECD/FAO, 2016). La figura 4 resume la producción mundial de los principales productores.

En el país, el 76% de la producción total de leche cruda se destina a la elaboración de productos, de los cuales los quesos y el yogur representan la mayor participación (31% y

28%, respectivamente). Datos de 2015 extraídos de Ministerio de Agroindustria de la Nación (Ministerio de Agroindustria de la Nación, s. f.)

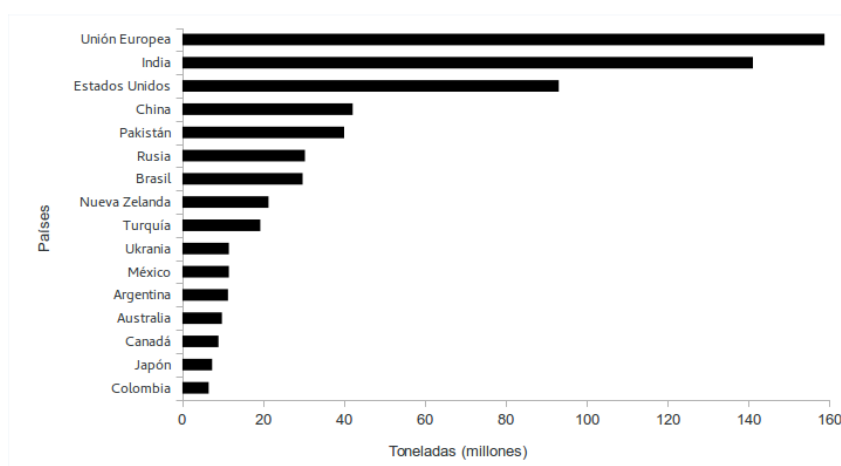


Figura 4. Producción mundial de leche. El gráfico muestra la producción de leche desglosada por países o regiones en función de los millones de leche producidos en 2015.

2.1.1. BAL empleadas en la producción de leches fermentadas

La leche fermentada es modificada por el desarrollo de BAL transformando la lactosa en ácido láctico y otros metabolitos. El proceso de fermentación involucra la inoculación de la leche pasteurizada con el cultivo iniciador y una incubación a 40-44°C durante aproximadamente 4 o 5 horas. El principal cambio ocurre con el descenso del pH (hasta pH 4,6-4) produciendo la coagulación de la caseína y la inhibición del desarrollo de gran número de microorganismos. La fermentación permite obtener un producto con características organolépticas adecuadas debido a la formación de metabolitos como el acetaldehído y el diacetilo. Algunas bacterias producen polisacáridos como el EPS (exopolisacárido) que confieren a la leche fermentada un aumento en la viscosidad. Las leches fermentadas engloban una gran cantidad de productos como:

- yogur: en cuya elaboración deben emplearse dos microorganismos como cultivo iniciador que actúan simbióticamente, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* según la FDA. Inicialmente, *S. thermophilus* crece más rápido en presencia de O₂ disuelto produciendo ácido fórmico y CO₂. El ácido fórmico estimula el desarrollo de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* resultando en una

disminución del tiempo de fermentación. Este último cuenta con sistemas de peptidasas o exoproteinasas originando péptidos y aminoácidos a partir de las proteínas de la leche (Ray, 2004)

- kefir: es una leche fermentada ácido-alcohólica, líquida, efervescente y ligeramente alcohólica fermentada por una microflora variable de *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Candida kluyveromices* y *Saccharomices kefir* y bacterias productoras de ácido acético.
- Leches fermentadas a partir de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. acidophilus*, *L. variant*) les dan unas características parecida a las del yogur, pero con una textura o sabor diferente. En ciertos casos, el agregado de otras bacterias lácticas a la fermentación suele utilizarse con el objetivo de otorgar algún efecto benéfico para la salud y no para la fermentación dado que la acidificación resulta más lenta (Gobbetti et al., 2010; Surono y Hosono, 2011).

2.1.2 BAL empleadas en la producción de quesos

Las bacterias que se utilizan como cultivos iniciadores en la elaboración de los quesos pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Los cultivos iniciadores tienen que acidificar la leche para favorecer su coagulación con el agregado de la renina y además influyen en la textura, aroma y vida útil de los quesos. El cultivo iniciador dependerá del tipo de queso que se quiera elaborar. Por ejemplo, si el queso es de pasta blanda se usan cultivos de acidificación rápida como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Para los de pasta dura y firme se usan cultivos con capacidad proteolítica y lenta producción de ácido como el formado por *L. casei* y *Leuconostoc citrovarum*.

Principalmente en Europa es común la producción de quesos artesanales donde la composición no se sabe con exactitud. En los denominados fermentos de sueros, se incuban los sueros provenientes de elaboraciones anteriores a 45°C durante toda la noche y están vinculados con la producción de quesos duros. Por otro lado, los fermentos de leche con una menor acidez o incubaciones a temperaturas menores, están vinculados con la

producción de quesos blandos. A nivel industrial, el fermento está estandarizado y controlado evitando fluctuaciones en la calidad del producto (Ray, 2004).

2.1.3 BAL no pertenecientes al fermento o al cultivo iniciador

Las NSLAB (de sus siglas en inglés *Non Starter Lactic Acid Bacteria*) no son inoculadas para el proceso fermentativo, sino que provienen de bacterias que sobrevivieron a la pasteurización y proliferan post-acidificación durante la maduración de varios quesos. Las NSLAB son bacterias mesófilas generalmente pertenecientes al género *Lactobacillus*. Las cepas que usualmente se aíslan son *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *L. curvatus*. Por ejemplo, la flora bacteriana predominante del queso Gouda suizo manufacturado con leche pasteurizada presenta al género *Lactobacillus* como dominante (76%) siendo *L. paracasei*/ *L. casei* y *L. rhamnosus* las más representativas. Estas cepas también contribuyen al sabor y maduración de los quesos por su elevada actividad de peptidasas (Beresford et al., 2001).

2.2 BAL del grupo de *Lactobacillus casei*

El género *Lactobacillus* conforma un grupo muy diverso y heterogéneo. Se encuentra dentro del grupo de bacterias Gram positivas, con un porcentaje de G + C variable en su ADN de entre 33 y 55%. Al microscopio se observan como largos bacilos inmóviles, que no forman esporas (Claesson et al., 2007). Actualmente se han descrito 177 especies de *Lactobacillus* (LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr/>) y es el género más diverso de las BAL. Los *Lactobacillus* son anaerobios aerotolerantes pudiendo crecer tanto en presencia o ausencia de oxígeno. Debido a sus altos requerimientos nutricionales, su hábitat comprende ambientes ricos en carbohidratos. Los miembros de este género pueden encontrarse en plantas y alimentos en descomposición, aunque también forman parte de la microbiota normal de animales como el hombre. Se los puede hallar en la boca, el tracto gastrointestinal y urogenital; y varía la cantidad encontrada según la edad del hospedador y especie. Frente a estos ambientes, los *Lactobacillus* presentan una resistencia mayor a condiciones ácidas que otras bacterias lácticas. También se aislaron de leche, vinos, ensilados, pickels, carne, etc. Muchas cepas de este género juegan un rol importante tanto

en fermentaciones tradicionales como a escala industrial o, en otros casos, también suelen contaminar otros productos (Sun *et al.*, 2015).

En particular, el grupo de *Lactobacillus casei* incluye las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* que están muy relacionadas filogenéticamente. Se agrupan de esta forma dado que sus límites de especie no están claramente identificados. La taxonomía de las especies de *L. casei* ha sido tema de controversia donde se ha intercambiado el uso de *L. casei* y *L. paracasei* en la literatura (Stefanovic *et al.*, 2016). Especies del grupo *L. casei* han sido aisladas de ingredientes crudos y fermentados en la industria láctea, especialmente del queso donde aparecen como especies NSLAB dominantes durante la maduración como se explicó en la sección 2.1.3 (Beresford *et al.*, 2001). Estas especies también se emplean en la elaboración de productos fermentados. Además de las propiedades organolépticas que su metabolismo proporciona a los productos, muchos autores sostienen el valor de ciertas cepas como probióticos y algunos efectos cepa específicos se describen en la sección siguiente (de Vrese y Marteau, 2007; Bermúdez-Humarán *et al.*, 2011). *L. casei* puede atravesar el estómago tolerando el bajo pH para colonizar luego el intestino (Greene y Klaenhammer, 1994). Su gran diversidad de nichos y sus potenciales aplicaciones ha hecho que estas especies sean unas de las más estudiadas del género *Lactobacillus* (Stefanovic *et al.*, 2016). Actualmente (marzo 2017), el NCBI reporta que existen 8 secuencias completas (33 genomas incompletos) de *L. casei*; 7 secuencias completas (49 genomas incompletos) para *L. paracasei* y 9 secuencias completas (106 genomas incompletos) para *L. rhamnosus*.

En particular, *L. casei* BL23 ha sido ampliamente estudiada a nivel genético, bioquímico y fisiológico (Piuri *et al.*, 2003; Muñoz-Provencio *et al.*, 2012; Bourand *et al.*, 2013; Revilla-Guarinos *et al.*, 2013). Su genoma fue secuenciado en 2010 con el número de referencia FM 177140 (Mazé *et al.*, 2010). *L. casei* BL23 se utilizó en este trabajo junto con las cepas *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092.

2.3 BAL con características probióticas

Existe un renovado interés en el uso de microorganismos en alimentos debido a su aporte en el sabor y aroma, pero principalmente por sus aspectos beneficiosos en la

restauración de la salud y tratamiento de enfermedades. Así, la Organización Mundial de la Salud redefinió en 2002 el concepto de probióticos como “aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren algún efecto benéfico en la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2006). Los principales microorganismos utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo ésta una característica de cepa y no de especie.

Para ser considerados probióticos, los microorganismos deben reunir las siguientes características:

- No ser patógenas, especialmente para personas inmunocomprometidas.
- No ser sensible a las enzimas proteolíticas.
- Ser capaces de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Tener capacidad para adherirse a las superficies epiteliales.
- Ser capaces de producir componentes antimicrobianos.
- Permanecer vivas y estables durante su empleo.
- Tener un mecanismo específico de adhesión al intestino humano.
- Ser capaces de un crecimiento rápido en las condiciones del tracto gastrointestinal
- Ser capaces de inmunoestimular, aunque sin efectos proinflamatorios.

Los productos probióticos comercializados actualmente se pueden dividir en tres tipos:

- a) los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen principalmente con fines nutritivos (yogures, leche, quesos, etc.);
- b) las leches cultivadas y fermentadas (Actimel, SancorBio), quesos probióticos (Bioqueso Ilolay Vita) utilizados básicamente como vehículos de bacterias probióticas.
- c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas

Posiblemente, las dos cepas con propiedades probióticas más conocidas sean *L. casei* Defensis (*L. casei* DN-114 001) que está presente en Actimel y es un producto de Danone; y *L. casei* cepa Shirota (LcS) YIT9018 que es utilizada en el producto Yakult proveniente de Japón. Varios estudios sustentan que la administración y el consumo de alimentos funcionales con *L. casei* contribuye a mejorar el estado de salud y/o a disminuir el

riesgo de aparición de varias enfermedades a través de la regulación del sistema inmune, específicamente de la respuesta inmune celular (Yasuda *et al.*, 2008; Boge *et al.*, 2009; Kato-kataoka *et al.*, 2016). Ambos productos son de venta libre en supermercados, y se ha registrado un aumento creciente en su indicación terapéutica. Actualmente, Yakult se distribuye a 33 países con una elaboración de aproximadamente 700 millones y 1500 millones de unidades por día. Mediante estudios *in vivo* se comprobó que las dietas enriquecidas con leches fermentadas con *L. casei* reducen la duración y la severidad de las diarreas inducidas por rotavirus (Peluso *et al.*, 2000).

Se le han adjudicado funciones similares a un suplemento lácteo de probióticos como es el Bioplus, que contiene un cultivo especializado, *L. casei* Vitalis, cepa derivada de *L. casei* CRL 431 (*L. CASEI* 431® de Chr. Hansen) aumentando la respuesta del sistema inmune. *L. CASEI* 431® es la cepa probiótica presente en la Leche BIO y se comercializa en Argentina. También se ha reportado que reduce los síntomas virales como el de influenza (Rizzardini *et al.*, 2012). Asimismo, un nuevo producto de SanCor Bio posee a las bacterias probióticas *L. CASEI* 431® y *L. acidophilus* CRL 730 y el agregado de fructanos, que son los prebióticos naturales encargados de promover el desarrollo de bacterias benéficas para la salud en el propio tracto intestinal y favorecer la absorción de calcio y magnesio.

L. casei BL23 presenta un potencial uso como probiótico mostrando efectos anti-inflamatorios en ratón (Rochat *et al.*, 2007). Esta cepa junto con otras *L. casei*, han mostrado una atenuación en colitis con una reducción en la pérdida de peso y otros parámetros clínicos como el sangrado rectal y la consistencia de las heces (Foligne *et al.*, 2007). Recientemente, se mostró que en tratamientos orales en ratón, *L. casei* BL23 modula la respuesta inmune y los protege de la 1,2-dimetilhidrazina (DMH) que induce el cáncer colorectal (Lenoir *et al.*, 2016)

3 Bacteriófagos de BAL

La importancia de las infecciones fágicas durante la producción de lácteos no se conoció hasta el año 1935 cuando Whitehead y Cox encontraron al primer fago específico para la cepa *L. lactis*; veinte años más tarde que Frederick Twort y Felix D'Herelle descubrieran en forma independiente a los fagos (Twort, 1915; D'Herelle, 1917; Whitehead

y Cox, 1936). Sin embargo, y pese a muchos esfuerzos, las infecciones fágicas de BAL empleadas como iniciadoras sigue siendo la causa más común de las fermentaciones lentas, de baja calidad o de la pérdida total del producto en el peor de los casos (Surono y Hosono, 2011). Algunas estimaciones asumen que los bacteriófagos son los principales responsables de las pérdidas económicas en fábricas afectando entre el 0,1% y el 10% de los fermentos lácteos (Moineau y Lévesque, 2005).

En general, las fermentaciones bacterianas están comprometidas cuando los títulos fágicos son mayores a 10^4 unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro. Los valores altos de pH, concentraciones remanentes de lactosa e insuficiencia en el contenido de ácido láctico son indicativos de ataques fágicos en los primeros pasos de la fermentación. El impacto que estos factores tienen en las variaciones en el sabor y la textura debe evitarse en productos comerciales para satisfacer al cliente y generar la confianza en el producto. Peor aún, los residuos de lactosa pueden permitir el crecimiento de microorganismos indeseados alterando las cualidades del producto u ocasionar un ecosistema óptimo para el crecimiento de patógenos (Moineau y Lévesque, 2005).

En la elaboración de leches fermentadas, la leche se somete primariamente a un tratamiento térmico de 90°C y el producto no se expone al medio ambiente, sino que ocurre en compartimientos cerrados. Por ende, las contaminaciones fágicas no son tan frecuentes. Sin embargo, la resistencia de algunos fagos a altas temperaturas, la incapacidad de rotar los cultivos en algunos productos y el uso de cepas probióticas que no pueden reemplazarse fácilmente ha revalorizado el estudio de las interacciones fago-bacterias en estas cepas.

Por otro lado, los problemas de contaminación fágica en la elaboración de quesos es más alarmante ya que se utiliza leche cruda o pasteurizada, no siendo este último tratamiento suficiente para la inactivación de gran parte de la población fágica (Briggiler Marcó et al., 2012). Además, en este caso se usan tinas abiertas en contacto con el ambiente y la generación de bioaerosoles con partículas virales a partir de la separación del suero contribuye con la diseminación fágica (Moineau y Lévesque, 2005). Diariamente, grandes volúmenes de leche cruda son fermentados por BAL iniciadoras siendo *L. lactis* la cepa más utilizada; consecuentemente son los fagos de esas cepas los más estudiados, seguido de los fagos de *S. thermophilus* (Emond y Moineau, 2007). El número de fagos

reportados para *Lactobacillus* es mucho menor. En esta última década, los datos sobre fagos que afectan cepas probióticas pertenecientes a *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. paracasei* han tenido un rol más relevante en concordancia con el aumento en la utilización de estos microorganismos (M. L. Capra *et al.*, 2009). A continuación se enumera la clasificación actual o los avances en cuanto a la clasificación de los fagos más preponderantes en la industria láctea. Aún hoy, todos los fagos aislados que infectan BAL son miembros del orden *Caudovirales* (Samson y Moineau, 2013).

3.1 Fagos de *Lactococcus*

Las cepas de *L. lactis* más utilizadas en la industria láctea pertenecen a dos sub-especies: *L. lactis* subsp. *lactis* o *L. lactis* subsp. *cremoris*. Los fagos de *Lactococcus* comenzaron a clasificarse en 1984 (Jarvis, 1984). Las morfologías identificadas pertenecen solo a las familias de *Siphoviridae* y *Podoviridae*. La última actualización corresponde al trabajo de Deveau *et al.* (2006) donde se clasificaron en 10 grupos. En la familia *Siphoviridae* se encuentran los grupos 936, P335, 1358, C2, Q54, P087, 949, 1706 mientras que en *Podoviridae*, P034 y KSY1. Esta clasificación está basada en microscopía electrónica, reacciones serológicas, hibridización ADN-ADN y secuenciación, revalidándose unas a otras (Deveau *et al.*, 2006). Prevots *et al.* (1990) identificaron a los fagos virulentos de las especies 936 como a los dominantes en la industria láctea y su prevalencia continúa hasta el día de hoy (Prevots *et al.*, 1990; Deveau *et al.*, 2006; Rousseau y Moineau, 2009; Mahony *et al.*, 2013). La arquitectura genómica y contenido de los fagos de 936 está muy conservada y es probable que su éxito se deba al número limitante de especies a infectar. Del total de fagos de *Lactococcus* secuenciados, el 70% pertenece a las especies 936. También suelen aislarse fagos de los grupos C2 (virulentos) y P335 (virulentos y temperados) durante el proceso fermentativo (Mahony *et al.*, 2016).

3.2 Fagos de *S. thermophilus*

Todos los fagos aislados que infectan *S. thermophilus* pertenecen a la familia de *Siphoviridae* con largas colas no contráctiles, usualmente con más de 200 nm de longitud. Dada la similitud morfológica entre ellos, las reacciones serológicas, el rango de huésped y

posteriormente los perfiles de ADN y de proteínas, la clasificación está basada en el tipo de mecanismo de empaquetamiento del ADN que emplean. De acuerdo a esto, se clasifican en dos grandes grupos denominados cos (extremos cohesivos) y pac (empaquetamiento de tipo cabeza llena) (Le Marrec *et al.*, 1997). Recientemente, se creó un nuevo grupo con un solo representante a partir del aislamiento de un nuevo fago 5093 que infecta a una cepa iniciadora *S. thermophilus* CSK939 usada en la producción de mozzarella. Su secuencia presenta particularidades únicas en los fagos de *Streptococcus* y además su sistema de reconocimiento al hospedador presenta estructuras de tipo globulares (Mahony y van Sinderen, 2014).

3.3 Fagos de *Lactobacillus*

Aunque en estos últimos años se han secuenciado fagos que infectan *Lactobacillus spp.*, su gran diversidad hace difícil contar con información taxonómica (Mahony *et al.*, 2012). Se conocen más de 100 especies dentro del género *Lactobacillus* lo cual aumenta en consecuencia aún más la heterogeneidad fágica (Claesson *et al.*, 2007). En Villion y Moineau (2009), se reportaron 231 fagos, de los cuales 186 fueron observados por microscopía electrónica: 109 perteneciendo a la familia de *Siphoviridae*, 76 a la de *Myoviridae* y solo uno a la familia de *Podoviridae* (Villion y Moineau, 2009).

En el año 2000, se contaba con la secuencia de cinco genomas de fagos de *Lactobacillus* pertenecientes a *Siphoviridae*, si bien su identidad de secuencia era baja, compartían la misma disposición de sus módulos. Esta observación permitió clasificarlos junto a otros fagos de *Siphoviridae* que infectan diferentes géneros bacterianos. El fago de *L. casei* A2, el fago de *L. gasserii* ϕ adh y el fago de *L. rhamnosus* Lc-Nu fueron asignados al grupo tipo Sfi-21 mientras que el fago de *L. delbrueckii* LL-H y mv4 como también el fago de *L. plantarum* phig1e se clasificaron en el grupo tipo Sfi11 (Canchaya *et al.*, 2003). La mayoría de los fagos tipo Sfi-21 poseen un genoma con extremos cohesivos, con un módulo característico de la cápside que incluye una proteasa. Por otro lado, los del grupo de Sfi-11 empaquetan el ADN con el mecanismo de cabeza llena y tienen una proteína de andamiaje característica.

La naturaleza de tipo mosaico de los genomas parecería ser la característica encontrada en estudios comparativos que refleja transferencias de tipo horizontal entre diferentes fagos. Es por eso que se necesita más información y más secuencias para realizar una clasificación adecuada. Actualmente, se tiene en consideración su huésped y posteriormente se considera la morfología y el rango de huésped asociado.

4 Fagos del grupo *L. casei*

En 1965, a partir de una fermentación anormal de la bebida Yakult en Japón, se aisló el primer fago de *L. casei* denominado J-1 (Hino y Ikebe, 1965). En la elaboración de esta leche fermentada, se empleó a la cepa *L. casei* Shirota como iniciadora. Este fago se comportó como virulento en la cepa hospedadora “Shirota”, originalmente aislada de heces humanas. El fago PL-1 fue aislado dos años más tarde cuando se empleaba una nueva cepa resistente a J-1 (Watanabe et al., 1970). Ambos fagos están serológicamente relacionados.

J-1 y PL-1 fueron caracterizados extensivamente por diferentes grupos en Japón y gran parte de estos trabajos se resumen en el review de Sechaud et al., (1988). Estos fagos pertenecen a la familia *Siphoviridae* y son capaces de infectar diversas cepas de *L. casei/paracasei* incluyendo cepas comerciales (Sechaud et al., 1988). Los primeros trabajos contemplaron aspectos que incluyen la morfología del fago, adsorción a las células, aislamiento de cepas resistentes, y el proceso de eyección o expulsión del ADN, principalmente para el fago PL-1 (Watanabe et al., 1970; Watanabe K, Takesue S, 1977; Khosaka, 1977; Watanabe et al., 1982; Watanabe et al., 1984) . Los trabajos más recientes incluyeron la optimización de las condiciones para la transfección de protoplastos con ADN de fago, inactivación de fagos y caracterización de determinadas regiones del ADN genómico (Watanabe K, Kakita Y, Nakashima Y, 1990; Kakita et al., 1995; Watanabe et al., 1995; Kashige et al., 2001; Capra et al., 2006). Ambos bacteriófagos se describieron como virulentos, con ADN doble cadena y morfológicamente semejantes al fago lambda de *E. coli*. También ha sido caracterizada la endolisina del fago PL-1 con actividad *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de potencial uso biotecnológico (Kashige et al., 2000). Aunque J-1 y PL-1 se aislaron en los años ´60 y se estudiaron por décadas, sus secuencias genómicas no estaban disponibles.

La secuenciación de los genomas no solo es necesaria para la clasificación de los fagos sino también para entender su evolución y poder estudiarlos con mayor profundidad. El fago A2 (aislado de suero en la producción de queso azul en España usando la cepa *L. casei* ATCC 393) y el fago phiAT3 (inducido de *L. casei* 393 usando MC) han sido ampliamente estudiados y su secuencia genómica se encuentra disponible (García *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2005). Ambos fagos pertenecen a la familia de *Siphoviridae* y son de tipo temperado. El genoma de A2 presenta 42411 pb, un contenido de G+C de 44,8% (similar al de su hospedador), 61 ORFs y sus extremos son cohesivos. 55 ORFs se transcriben en una dirección mientras que los seis restantes en la dirección contraria. Por otro lado, el fago phiAT3 tiene 39166 pb, un contenido de G+C de 44,6% y también extremos cohesivos. El genoma presenta 53 ORFs con los genes que codifican para la integrasa, escisionasa y el represor CI en la cadena complementaria (Lo *et al.*, 2005). Los genomas de estos fagos, como en la mayoría de los fagos de BAL, se caracterizan por tener una organización similar en los siguientes módulos: empaquetamiento, morfogénesis, lisis, cambio genético, replicación y la región derecha de la que poco se sabe sobre la función de los genes (figura 5).

En el grupo *L. casei* también se secuenciaron los fagos Lc-Nu (Tuohimaa *et al.*, 2006), Lb338-1 (Alemayehu *et al.*, 2009) como también a los profagos Lrm1 (Durmaz *et al.*, 2008), Lca1 (Ventura *et al.*, 2006), CL1, CL2, iA2, iLp84 e iLp1308 (Mercanti *et al.*, 2015). Todos presentan morfología de *Siphoviridae* exceptuando al fago Lb338-1 de la familia *Myoviridae* con un genoma de mayor tamaño y un muy bajo contenido de G+C.

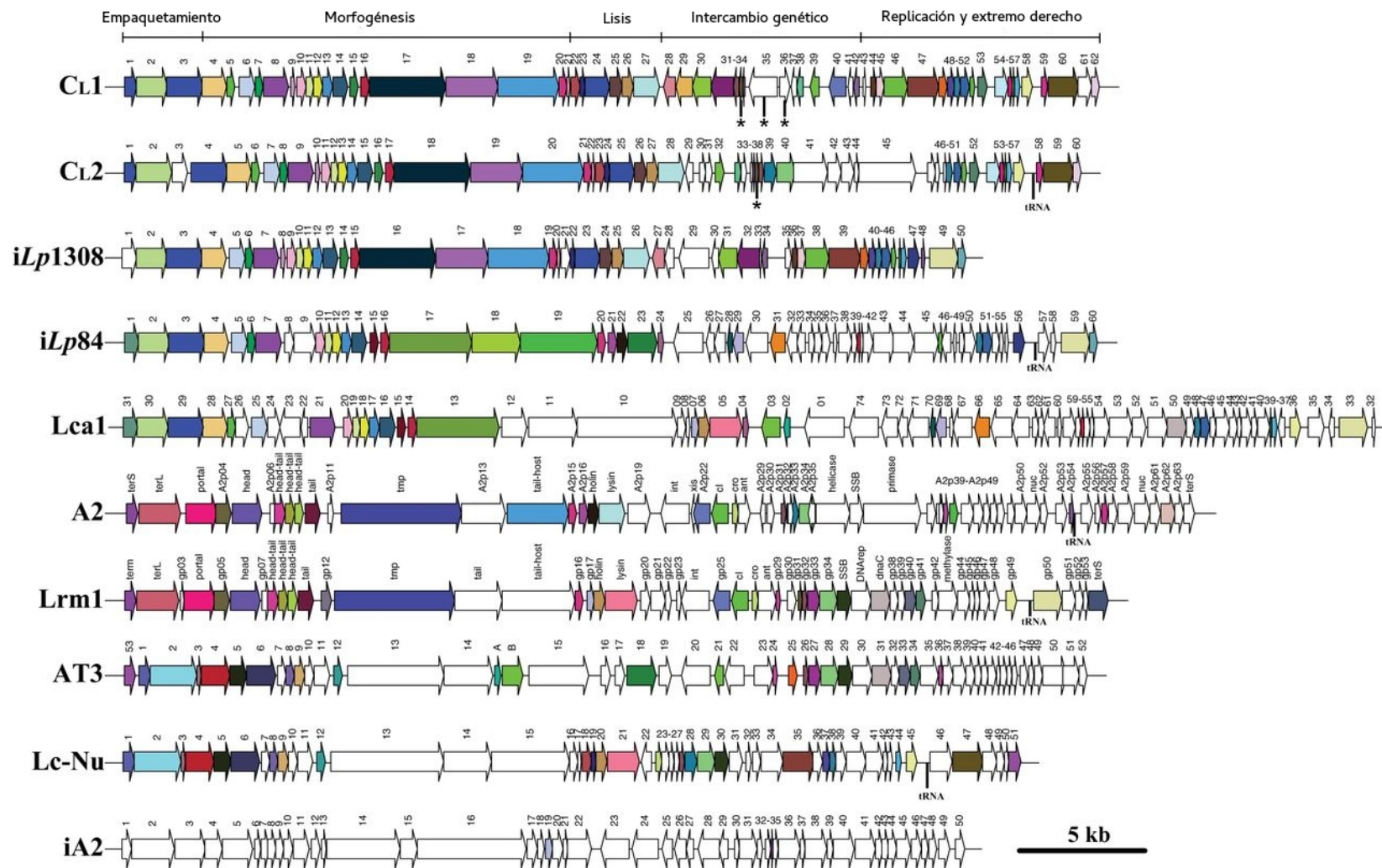


Figura 5. Representación esquemática de la organización genómica de fagos del grupo *L. casei*. Cada esquema corresponde a los genomas de los fagos indicados y los respectivos ORFs están representados con flechas. Los ORFs del mismo color presentan una identidad aminoacídica superior al 80%. Los ORFs blancos tienen menos de un 80% de identidad. Adaptado de Mercanti *et al.*, (2015)

5 Profagos en BAL

La lisogenia está ampliamente distribuida en *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Sechaud et al., 1988; Desiere et al., 2002; Canchaya et al., 2003; Ventura et al., 2006). Un estudio pionero mostró que de 148 cepas de *Lactobacillus* (pertenecientes a 15 especies diferentes), el 27% liberaba fago al sobrenadante cuando se lo exponía a MC (Yokokura et al., 1974). El aumento en el número de secuencias de genomas bacterianos disponibles ha revelado la presencia de múltiples fagos temperados o remanentes de fagos en los genomas de *Lactobacillus* spp. y otras BAL (Canchaya et al., 2003; Douillard et al., 2013). Estas BAL expuestas a diferentes condiciones de estrés ambiental como calor, sal, antimicrobianos o hambreado pueden activar la inducción de profagos que pueden replicar y liberar nuevos viriones. En especies de *S. thermophilus* se ha demostrado una incidencia menor de lisogenia; en solo el 1-2% de las cepas se ha inducido un profago en presencia de MC aunque algunos reportan una frecuencia mayor (25%) (Briggiler Marcó et al., 2012). Mercanti et al. (2011) mostraron que de 30 cepas de *Lactobacillus* inducidas, se pudo extraer ADN de fago de 25 de ellas; además de las 11 cepas comerciales estudiadas, 10 contenían profagos (Mercanti et al., 2011). El profago Lrm1 se indujo por MC de una cepa iniciadora de *L. rhamnosus*. En este caso, los fagos detectados parecían defectivos (Durmaz et al., 2008). Los fagos CL1, CL2 fueron aislados de un lisado espontáneo (CL1 y CL2) de *L. paracasei* A, cepa utilizada en productos comerciales. Con el agregado de MC, también se indujo al fago iA2 de la misma cepa (Capra et al., 2010). El fago iLp84 fue aislado de *L. paracasei* 84 también con el agregado del inductor MC. La presencia de remanentes de profagos es también considerado un riesgo debido a la posibilidad de recombinación con fagos virulentos (Shimizu Kadota et al., 1983; Moineau et al., 1994). Los intercambios genéticos entre módulos han sido reportados en profagos y fagos de BAL (Bouchard y Moineau, 2000; Labrie y Moineau, 2007; Lima-Mendez et al., 2011; Baugher et al., 2014). En genomas pertenecientes a *L. gasseri*, varios profagos (inclusive en *tándem*) presentaron la capacidad de inducirse espontáneamente y su alto grado de homología a profagos o genes presentes en múltiples cepas de *Lactobacillus* sugiere que los fagos temperados probablemente contribuyan con la transferencia horizontal de genes en este género (Raya et al., 1989; Baugher et al., 2014). La presencia y el riesgo de inducción espontánea deben

ser estudiados cuando se seleccionan las cepas y se diseñan los cultivos iniciadores para un proceso fermentativo en particular (Emond y Moineau, 2007).

Durante la maduración del queso, hay un aumento en los aminoácidos libres y en la reducción del amargor por la hidrólisis de grandes péptidos hidrofóbicos debido a la lisis temprana de *L. lactis*. La autólisis de cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* se ha correlacionado con la presencia de profagos termoinducibles. Una cepa curada del profago *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 demostró tener niveles líticos lentos comparados con la cepa salvaje (Lepeuplel et al., 1998; Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

6 Interacción fago–bacteria

La primera condición para que un fago pueda infectar a la bacteria es la presencia de receptores específicos en la superficie de la célula huésped. Como se dijo con anterioridad, la infección de fagos con cola comienza cuando las estructuras especializadas en la adsorción, ubicadas en la punta de la cola, como fibras, espículas o placas base se unen específicamente a moléculas pertenecientes a la superficie de la bacteria. Las paredes de bacterias Gram positivas consisten en una capa gruesa de peptidoglicano decorada con varias proteínas y polisacáridos (Delcour et al., 1999). La unión en algunos casos requiere de dos estadios e incluso dos receptores diferentes. En general, la adsorción presenta una primera etapa reversible de unión a los receptores a través de las fibras de la cola y un adecuado posicionamiento de la placa basal. Luego de los re-arreglos convenientes en la placa base, puede existir una interacción irreversible entre proteínas de la cola y los receptores bacterianos (Kutter et al., 2005). La velocidad y eficiencia de adsorción son parámetros importantes que pueden variar para el sistema fago-huésped dependiendo de factores externos (temperatura, pH, presencia de cofactores específicos como Ca^{2+} y Mg^{2+}) y el estado fisiológico de la bacteria. Los estudios estructurales de fagos han permitido predecir el tipo de receptor que reconocen, proteico o sacarídico de acuerdo a la morfología del aparato de reconocimiento viral (anti-receptor). Los fagos que interactúan con proteínas, generalmente poseen una punta de cola puntiaguda mientras que aquellos que interactúan con azúcares presentan una estructura mayor denominada placa base. La mayoría de los fagos de BAL presentan un rango de huésped acotado (Rousseau y Moineau,

2009) y la sensibilidad de los huéspedes se ha asociado directamente con las decoraciones específicas de cepa o la cadena lateral del polisacárido superficial de la pared (Räisänen *et al.*, 2004; Räisänen *et al.*, 2007) Los receptores y anti-receptores en BAL han sido foco de estudio durante estos últimos años principalmente en *Lactococcus*, *Streptococcus* y recientemente en *Lactobacillus* debido a su relevancia industrial y su potencial aplicación en el desarrollo de estrategias que eviten las infecciones fágicas (Chapot-Chartier *et al.*, 2010; Ainsworth *et al.*, 2014; Vinogradov *et al.*, 2016).

6.1 Evolución de los fagos con cola

La gran divergencia de los genomas fágicos suele ser un obstáculo que evita detectar homologías entre proteínas y por ende determinar relaciones filogenéticas entre ellos. Sin embargo, el alto grado de conservación en el orden de los genes es llamativo cuando se comparan genomas de fagos que pertenecen a las familias de *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Myoviridae* (Duplessis y Moineau, 2001; Vegge *et al.*, 2005) principalmente en el módulo de morfogénesis (figura 6). En particular, la organización canónica de los genes de la cola en los fagos de *Siphoviridae* es la siguiente: terminador de la cola o Trp, la proteína mayor de la cola o MTP (*Major Tail Protein* de sus siglas en inglés), sus chaperonas (con el característico cambio del marco de lectura traduccional) (Xu *et al.*, 2004), la proteína cinta métrica o TMP (*Tape Measure Protein* de sus siglas en inglés), la proteína distal de la cola o Dit (de sus siglas en inglés *Distal Tail Protein*), las fibras o proteína asociada a lisinas o Tal (*Tail Associated Lysin* de sus siglas en inglés) y las proteínas de reconocimiento del receptor o RBP (*Receptor Binding Protein* de sus siglas en inglés). Esta misma organización también se ha visto en *Myoviridae* con algunas adaptaciones (Pell *et al.*, 2009).

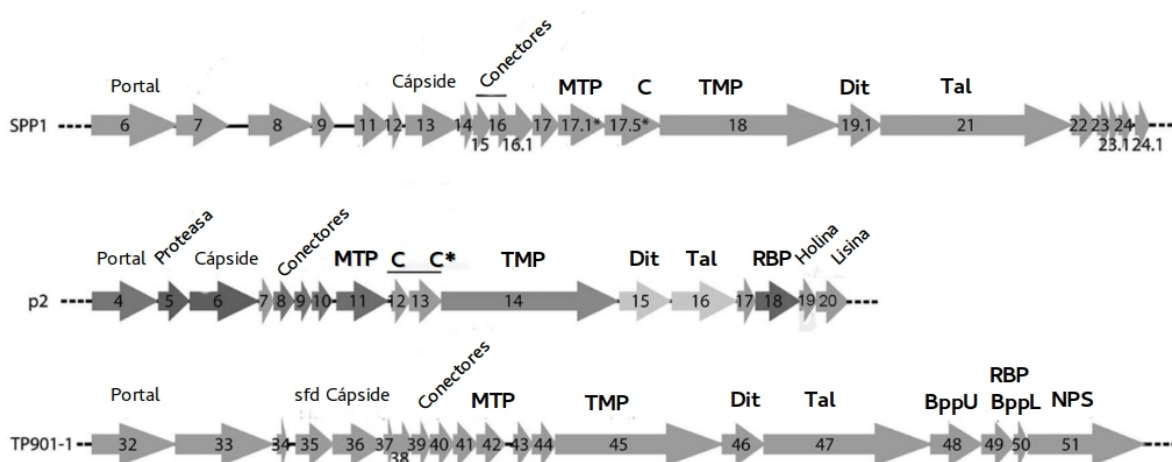


Figura 6. Representación esquemática del módulo de morfogénesis de fagos de *Siphoviridae*. Genes que sintetizan las proteínas del virión en SPP1, p2 y TP901-1. En negrita se destacan las proteínas de la cola. Trp (terminador de la cola); MTP (proteína mayor de la cola); C y C*, (chaperonas); TMP (proteína cinta métrica); Dit (proteína distal de la cola); gp27-like/Tal (proteína asociada a lisina o fibra de la cola); RBP (proteína de reconocimiento del receptor); BppU (placa base superior); BppL (placa base inferior); NPS (estructura de cuello). * indica un cambio en el marco de lectura. Adaptado de Spinelli *et al.* (2014)

La proteína TMP, MTP y la proteína terminadora forman la cola del bacteriófago y están presentes en *Siphoviridae* y en *Myoviridae* (con el agregado de la vaina con capacidad de contraerse) (Leiman *et al.*, 2009). Las estructuras conservadas entre las colas contráctiles y no contráctiles indican un ancestro común y genera controversia en cuanto a si la vaina se perdió en un progenitor para dar lugar a la familia *Siphoviridae* o evolucionó de un progenitor común para interactuar con la MTP.

En la punta de la cola se encuentra el aparato de reconocimiento del receptor que varía en tamaño, morfología y complejidad. Pese a sus diferencias aparentes, una mirada más detallada muestra nuevamente estructuras similares entre fagos diversos. La proteína Dit es una pieza clave en la morfogénesis y es la encargada de iniciar el ensamblaje del complejo de adsorción. Las estructuras de las proteínas tipo Dit de SPP1, p2 y TP901-1 muestran una alta conservación y postulan un motivo estructural conservado para los fagos de *Siphoviridae*. El análisis de la secuencia aminoacídica de Dit de fagos que infectan bacterias Gram positivas, destaca que la primera mitad de la región N-terminal está conservada debido a su interacción con la MTP (figura 7 C) mientras que las mayores

diferencias se encuentran en el C-terminal reflejando la necesidad de variar de acuerdo a los contextos. La proteína Tal presente en fagos alejados filogenéticamente como el fago T4, (gp27), el fago Mu (gp44) como también en p2 (ORF16), en TP901-1 (ORF 47) y en el profago EGD-e de *Listeria monocytogenes* (gp18, PDB 3g69) muestran que están estructuralmente conservadas (figura 7 D) y ensambladas como trímeros idénticos. Pese a sus estructuras similares y su posición en el aparato final, la proteína Tal de p2 por ejemplo está directamente expuesta al entorno o en otros casos como en T4 se prolonga hacia el exterior con la proteína gp5 en la punta del dispositivo (Veesler y Cambillau, 2011) La presencia o no de estructuras tipo aguja en la punta de la cola, sugieren distintos mecanismos de infección. En el caso de TP901-1 y Tuc2009 (tipo-P335) se reportó la presencia de una fibra con actividad hidrolítica. En este caso, la liberación de la región C-terminal con capacidad de digerir la pared bacteriana, explicaría un posible mecanismo para que el ADN cruce la gruesa capa de peptidoglicano durante la infección (Kenny *et al.*, 2004; Vegge *et al.*, 2005).

Según el principio de parsimonia, la teoría más conservada para los fagos con cola es un origen evolutivo común. Como la evolución involucró el intercambio de módulos funcionales a través de la adquisición o pérdida de material genético por recombinación entre fagos o entre fagos y bacterias, la teoría modular postula que la evolución tiene lugar a través de la transferencia de unidades intercambiables que consisten en dominios proteicos en vez de genes completos (Botstein, 1980). Estos intercambios pueden facilitar la permanente adaptación en diferentes condiciones o aumentar el rango de huésped. Todos los fagos ADNdc y genomas de profagos tienden a ser mosaicos, con acceso a *pools* de genes por transferencia horizontal (Veesler y Cambillau, 2011). En fagos de *S. thermophilus*, la región N-terminal de los anti-receptores bacterianos o RBPs está conservada probablemente debido a su interacción con otras proteínas de la cola mientras que la región C-terminal diverge debido a que su función está asociada a reconocer al hospedador (región denominada VR2) (Duplessis y Moineau, 2001). Lo mismo ocurre en fagos de *Lactococcus* donde el dominio de RBP denominado cabeza diverge con el rango de huésped (Dupont, Janzen, *et al.*, 2004; Dupont, Vogensen, *et al.*, 2004; Mc Grath *et al.*, 2006). Este patrón también se observa en distintos fagos de Caudovirales que infectan bacterias Gram negativas. Estos resultados indican que la región que contacta con el

hospedador se encuentra sometida a una presión evolutiva que permite la diversificación y el reconocimiento de los diferentes blancos existentes (Hendrix et al., 1999).

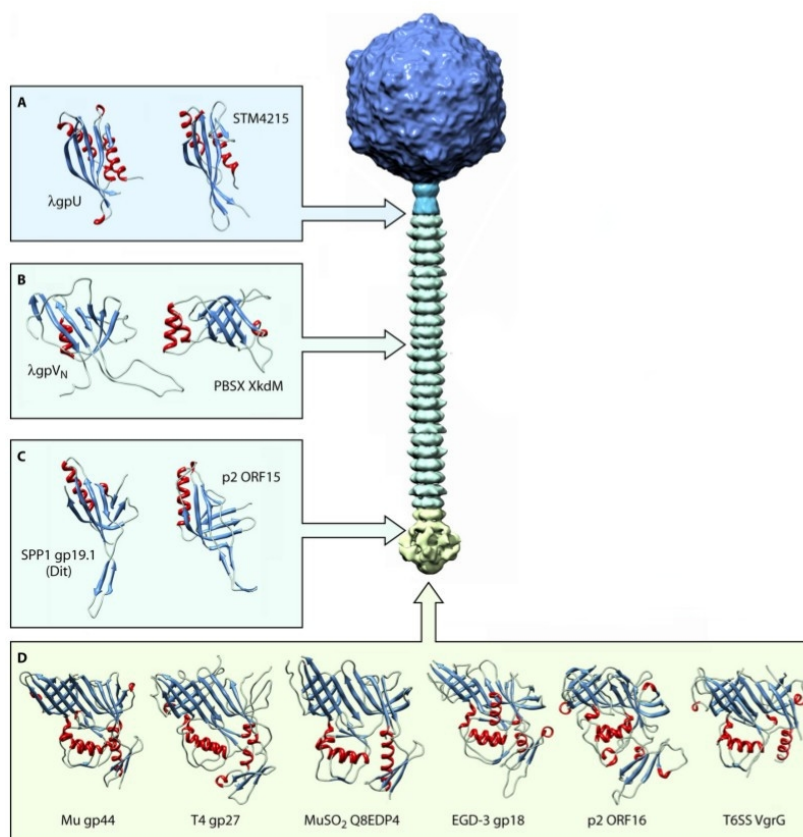


Figura 7. Conservación de las proteínas de la cola. **A.** Estructuras de las proteínas terminadoras de la cola gpU (PDB: 3FZ2) y una proteína de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PBSX XkdM (PDB 2GJV). **B.** Estructura de la MTP del fago de *Siphoviridae* lambda (gpV N [PDB 2K4Q]) y el Myofago PBSX (XkdM [PDB 2GUJ]). **C.** Estructura de las proteínas Dit de SPP1 gp19.1 (PDB 2X8K) y p2 ORF15 (PDB 2WZP). **D.** Estructuras de las proteínas tipo Tal observadas en *Myoviridae*, Mu gp44 (PDB 1WRU), T4 gp27 (PDB 1K28), y MuSO₂ Q8EDP4 (PDB 3CDD); para *Siphoviridae*, EGD-e gp18 (PDB 3GS9) y p2 ORF16 (PDB 2WZP); y el sistema T6SS de *E. coli* incluyendo CFT073 VgrG (PDB 2P5Z). Adaptado de Veesler y Cambillau, (2011).

Empleando distintas aproximaciones Cardarelli et al. (2011) y Veesler y Cambillau (2011); sugieren que tanto las proteínas conectoras de la cabeza, la proteína MTP del fago lambda, junto con la región N-terminal de Dit y Tal y las proteínas terminadoras de la cola parecerían ser parte de la misma familia de proteínas con motivos estructurales similares y mecanismos de ensamblaje conservados (figura 7 A-D)(Cardarelli et al., 2011). Es decir, que

hay un número limitado de pliegues que aparecen en las estructuras finales. Sus hipótesis se basan en que se originan a partir de los pliegues de la MTP y que a través de la duplicación de genes seguido de diversificación de los mismos culminarían en la diferenciación de sus funciones específicas actuales.

6.2 Fagos que reconocen receptores sacarídicos

Los fagos miembros de los grupos 936, P335, 1358, 949 y P087 que infectan *Lactococcus* reconocen componentes sacarídicos en la envoltura bacteriana. En particular, los fagos TP901-1 (grupo P335) y p2 (grupo 936) se han estudiado en detalle a nivel estructural siendo los modelos empleados como base para el estudio de distintos sistemas de interacción fago-bacteria. La tabla 2 muestra los nombres con los que se han caracterizado cada uno de las proteínas de estas placas base

Las colas de TP901-1 y p2 presentan un largo similar, los hexámeros de la MTP tienen también un grosor similar mientras que el recorrido helicoidal difiere. Una de las mayores diferencias radica en que p2 presenta decoraciones en la cola provenientes de la región C-terminal de la MTP. En el fago SPP1 y lambda, la presencia de estas decoraciones se ha vinculado con un primer reconocimiento de los receptores. Ambos fagos presentan una estructura de placa base grande comparada con fagos que reconocen receptores proteicos (Spinelli et al., 2014). A continuación, se presentan con más detalle las estructuras de las placas base de estos dos fagos modelo que infectan BAL.

Tabla 2. Proteínas de la cola en fagos de BAL. Se muestran los nombres generales de las proteínas de la placa base y los nombres de cada proteína en el fago caracterizado.

Proteína /Fago	p2	TP901-1	Tuc2009
TMP	ORF 14	ORF 45	ORF 48
Dit	ORF 15	ORF 46	ORF 49
Tal	ORF 16	ORF 47	ORF 50
BppU (o placa base superior)	-	ORF 48	ORF 51
BppA	-	-	ORF 52
RBP (o placa base inferior)	ORF 18	ORF 49	ORF 53

6.2.1 La placa base del fago p2

Debido a la posición de los genes en el genoma del fago p2, los *orf 15, 16, 17 y 18* codifican para las proteínas presentes en la placa base (Figura 9). Cuando estos genes son expresados en bloque forman un complejo macromolecular de ~1.0 MDa conteniendo las proteínas codificadas por los *orfs 15, 16 y 18* (Campanacci *et al.*, 2010) sin encontrarse en el complejo a la proteína del *orf 17*. El complejo se cristalizó en combinación con nanoanticuerpos (VHH 5) y difractó a una resolución de 2,6 Å (Sciara *et al.*, 2010). La estructura resultó medir 230 Å de ancho y 160 Å de alto y presentó una simetría casi hexagonal y formada de abajo hacia arriba por: tres ORF16 (Tal), seis ORF15 (Dit) y seis trímeros del ORF18 o RBPs (como también 18 VHH5) (figura 8 A y B).

La proteína Dit (ORF15) está compuesta por dos dominios (Figura 8 H). La región N-terminal contiene el dominio que permite la conformación en anillo (1-132) con homología a gpV del fago lambda (Pell *et al.*, 2009) y Hcp, una proteína del complejo T6SS (Veesler y Cambillau, 2011). Una extensión con 4 hebras tipo β forman el cinturón que abraza a la siguiente proteína Dit en el anillo hexamérico (figura 8 D y G). Las regiones N-terminal de seis Dit en su conjunto forman un anillo ajustado de 2 pliegues de hojas β . El anillo delinea un canal de 40 Å que permite el tránsito del genoma de ADNdc durante la infección. Por otro lado, la región C-terminal (residuos 137-275) está localizada en la periferia del anillo sin contacto entre los dominios. El dominio C-terminal tiene un plegado de tipo galectina suplementado con una extensión denominada el brazo (residuos 147-188) teniendo un rol crítico en el ensamblaje de la placa base a través de la formación de la mano con tres dedos (figura 8) que une la Dit a la región N-terminal de las RBPs (ver más adelante). Por otro lado, la proteína Tal (ORF16) (figura 8 E) es una proteína de 398 aminoácidos con 4 dominios y similar a gp27 del fago T4 (Kanamaru *et al.*, 2002). Sin embargo, a diferencia de T4, forma un domo sobre el final de la cola cerrando el canal (Sciara *et al.*, 2010). Tres proteínas Tal se ensamblan formando un homotrímero (figura 8 E, F, I).

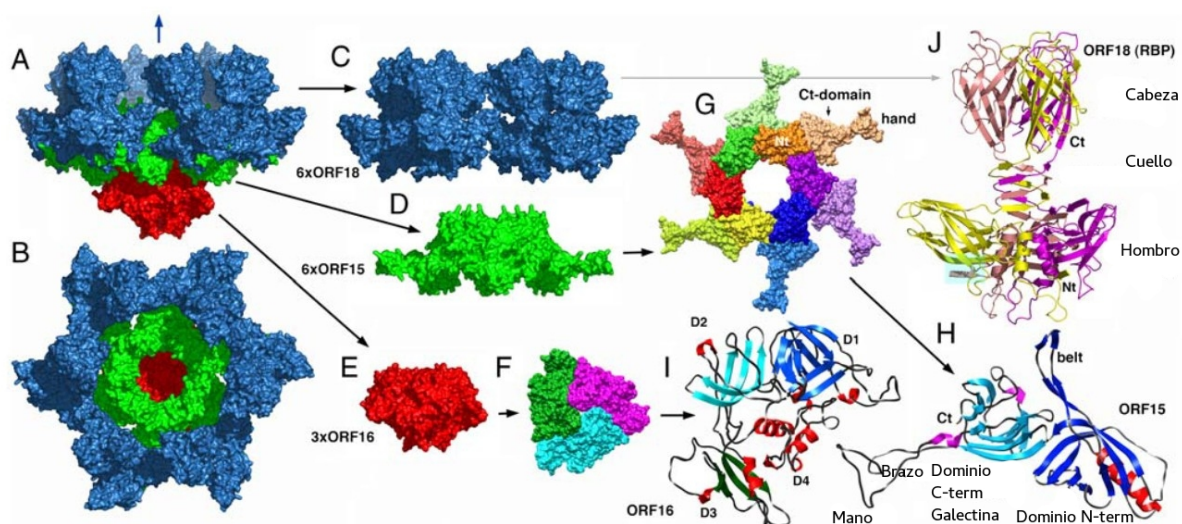


Figura 8. Estructura de las proteínas de la punta de la cola de p2. **A.** Vista de la superficie de la placa base; ORF15 (Dit) en verde, ORF16 (Tal) en rojo y ORF18 (RBP) en azul. La flecha azul en la zona superior marca la ubicación del resto del fago. **B.** La placa base se rotó 90° en el propio eje horizontal. Se forma un canal central formado por el hexámero del ORF 15 pero cerrado por la proteína trimérica ORF16. **C.** Arreglo del ORF18 en seis trímeros (RBPs). **D.** ORF15 en forma hexamérica (Dit). **E.** ORF16 en su conformación trimérica (Tal). **F.** Vista de la Tal rotada 180° con cada monómero en un color diferente. **G.** El hexámero formado por ORF15 se ve con la misma orientación que en (B). Cada subunidad, como también los dominios N- y C-terminales tienen un color diferente. **H.** Vista en formato cintas de la subunidad ORF15 (Dit). Los dominios N- y C- terminal tienen las hojas β coloreadas en azul y celeste respectivamente, las hélices α en rojo y violeta (I). Vista en formato de cintas de la subunidad ORF16 (Tal). Los cuatro dominios han sido identificados de D1 a D4. Solo el D4 es helicoidal. **J.** Vista en formato cintas del RBP ORF18 trimérico, cada cadena es de un color diferente. Se representan los dominios triméricos con hombro, cuello y cabeza. Sciarra et al. (2010)

La proteína RBP (figura 8 C y J) es un ensamblaje de tres cadenas de 264 aminoácidos formando un homotrímero (Spinelli et al., 2006; Tremblay et al., 2006) (Spinelli et al., 2006; Tremblay et al., 2006). Estos ensamblajes triméricos también se han visto en la proteína gp12 del fago T4 (Chappell et al., 2002) y en las RBPs de adenovirus y reovirus (van Raaij et al., 2001). La RBP de p2 está organizada en tres dominios: la cabeza, que interactúa con el receptor, el hombro en contacto con otras proteínas del complejo y el cuello que funciona como puente conectando los otros dos dominios. La estructura en alta resolución de la RBP de p2 revela la presencia de 3 moléculas de glicerol interactuando con el dominio denominado cabeza (Spinelli et al., 2006).

Cada proteína Tal contacta dos Dit que interactúan con dos trímeros de RBP. No hay contacto directo entre la Tal y las RBPs por ende la proteína Dit funciona como eje del complejo. Llamativamente, en p2, la estructura reportada en complejo con los VHHs presentó los dominios tipo cabeza de las RBP hacia arriba en dirección contraria a la interacción con el hospedador. Dado que este fago es dependiente de Ca^{2+} para la infección, se intentaron obtener cristales en presencia de Ca^{2+} y Sr^{2+} . En este caso, las estructuras obtenidas presentaron a las RBPs en dirección contraria, habiendo rotado aproximadamente 200° y dejando, en este contexto, al dominio tipo cabeza en una conformación óptima para interactuar con su hospedador. La región tipo galectina, la mano y el brazo de la proteína Dit también sufrieron cambios drásticos al igual que la Tal, ahora con el domo abierto (formando un canal de 32 \AA de diámetro) que permite la eyección del ADN (Figura 9) (Sciara *et al.*, 2010; Bebeacua, Lai, *et al.*, 2013; Bebeacua, Tremblay, *et al.*, 2013)

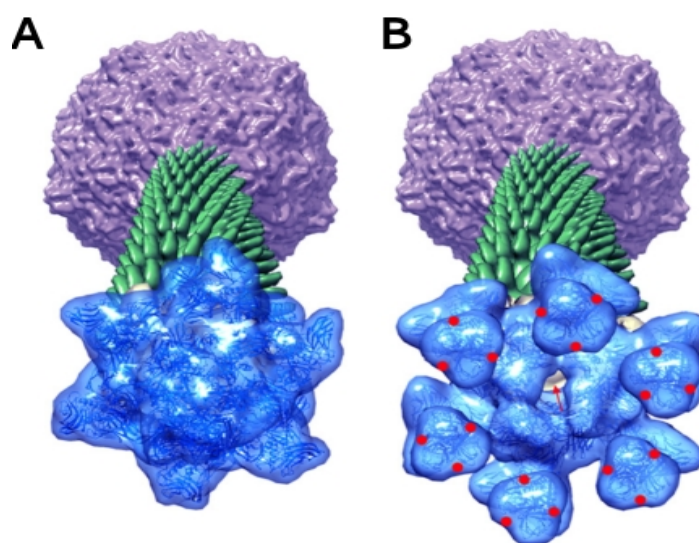


Figura 9. Estructura por microscopía electrónica de la placa base de p2. Mapa de la densidad electrónica coloreada en azul a 20 \AA . Se muestra la rotación desde la forma inactiva (**A**) de la placa base de p2 y en presencia de Ca^{2+} adoptando la forma activada (**B**). La flecha roja muestra el canal que se forma y los puntos rojos, los sitios de unión. (Bebeacua, Tremblay, *et al.*, 2013)

6.2.2 La placa base del fago TP901-1

Para este fago se utilizó nuevamente la expresión en bloque de los genes que forman parte de la placa base, en este caso, se pudieron, expresar y difractar a una resolución de 3,8 Å el producto de los *orf 46, 48 y 49* que codifican para DIT, BppU y BppL, respectivamente (Campanacci *et al.*, 2010; Shepherd *et al.*, 2011; Veessler *et al.*, 2012). La placa base de TP901-1 es de 320 Å de ancho y 160 Å de alto y presenta un peso molecular de 1,76 MDa exhibiendo una simetría hexamérica (figura 10 A, B y C). Este complejo está formado por la proteína DIT hexamérica de 80 Å de diámetro que forma un canal de 37 Å para el pasaje del ADNdc (figura 10 D panel central). Los seis dominios provenientes de la región C-terminal (residuos 146–255) de la DIT no están en contacto entre ellos (dominio de tipo galectina). Cada monómero del hexámero está formado por la región N-terminal (residuos 1–145) que forma un β -sándwich, una α -hélice y una horquilla β . La proteína DIT presenta una estructura similar a la de los fagos SPP1 (Veessler *et al.*, 2010) y p2 (Sciara *et al.*, 2010), demostrando nuevamente que este módulo forma el eje central de la placa base de los fagos de bacterias Gram positivas (Veessler y Cambillau, 2011). La proteína DIT está rodeada por 18 copias de BppU (ORF48) (figura 10 D, panel izquierdo) que se ensamblan en trímeros. Cada trímero se une a un complejo homotrimérico de RBPs para dar un total de 18 RBPs conteniendo 54 BppL (ORF49) en total (figura 10 D, panel derecho). La estructura trimérica de los RBPs también se ha determinado por rayos X. El hombro es mucho más pequeño comparado con la RBP de p2, contiene un plegado con tres hélices paralelas, al cuello le sigue la estructura de prisma β comparable con lo visto en p2 (Figura 8 J). El dominio cabeza es un barril β formado por hojas β antiparalelas y exhibe una estructura similar a p2. También en la RBP de TP901-1 se encontraron moléculas de glicerol en la interfase de la cabeza (Veessler *et al.*, 2012).

A partir de estudios de microscopía electrónica se han encontrado similitudes entre esta placa base y la del fago Tuc2009. La mayor diferencia radica en que Tuc2009 presenta una proteína extra denominada BppA cuyo gen está localizado entre *BppU* y *BppL*. Esta proteína extra ayudaría a aumentar la afinidad del trípode con su receptor (Collins *et al.*, 2013). Pese a su alta similitud de secuencia, el dominio denominado cabeza de las RBP/BppL difiere entre ambos fagos. Cuando se construyó un derivado mutante de TP901-1 (denominado TP901-1C) en el que se reemplazó la BppL original por la de Tuc2009, se

obtuvo un fago que adquirió el rango de huésped de Tuc2009 (Vegge *et al.*, 2006). Este resultado corrobora el rol clave de esta proteína en el reconocimiento del hospedador.

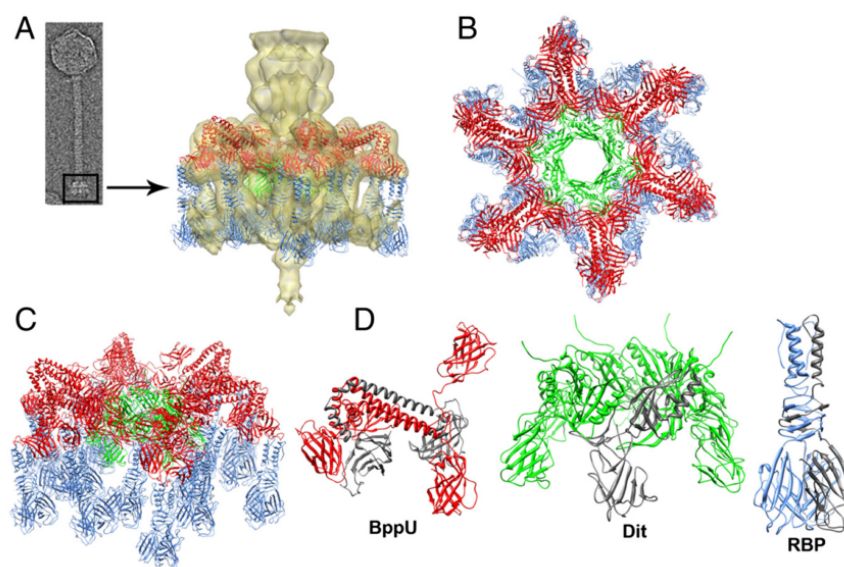


Figura 10. Estructura de la placa base de TP-901-1. Estructura de la placa base resuelta por rayos X y su solapamiento con la reconstrucción por MET. La placa base está formada por 18 copias de BppU (rojo) rodeando el hexámero de Dit (verde) y sosteniendo 18 estructuras triméricas RBPs (azul). **B.** Vista superior de la placa base mirando hacia abajo desde el eje de la cola. **C** Vista de la placa base rotada 30° respecto a A. **D** Los tres diferentes tipos de proteínas presentes en la placa base, de izquierda a derecha: BppU trimérico, Dit hexamérico, RBP trimérico. En gris se resalta un monómero de cada estructura.

6.3 Fagos que reconocen receptores proteicos

La interacción proteína-proteína suele ser fuerte, por ende, una sola proteína o un pequeño complejo proteico viral sería suficiente para unirse con los receptores proteicos debido a la alta afinidad, avidez y especificidad de la interacción. Uno de los fagos más estudiados a nivel estructural conteniendo un receptor de tipo proteico es el fago SPP1 que infecta a *Bacillus subtilis* y reconoce a la proteína YueB luego de interactuar en forma reversible con azúcares de la superficie bacteriana (Plisson *et al.*, 2007; Vinga *et al.*, 2012). La cola está compuesta por 40 anillos (gp17 y gp17.1, por fuera) que delimitan un canal que contiene a la TMP (gp18), por este canal también transita el genoma del fago para ser liberado en la bacteria. La punta de la cola (Tal o fibra de la cola gp21) no tiene un canal por

donde pase el ADN pero sí interactúa con YueB y esta unión genera cambios conformacionales abriendo la estructura en la parte distal de la cola que permite la liberación del ADN viral. Este proceso de apertura, se ha observado por reconstrucción por microscopía electrónica donde se resolvieron dos conformaciones, en forma cerrada o abierta, en las que aparece el hexámero DIT (gp19,1 PDB 2WZP) (figura 7 C) y la región N-terminal del trímero conformado por Tal siendo el Ca^{2+} un estabilizador de la conformación abierta (Veesler *et al.*, 2009; Goulet *et al.*, 2011) (Figura 11). De esta forma, se considera a la proteína DIT como un eje que articula las proteínas de la cola. Los receptores proteicos LamB y FhuA de los fagos de *Siphoviridae* λ y T5, respectivamente también han sido identificados. Dentro de los fagos de *Lactococcus*, se sabe que solo el grupo C2 reconoce a receptores proteicos. Los fagos de *Lactococcus* tipo C2 interactúan con la proteína PIP (de sus siglas en inglés *Phage Infection Protein*) a través de su RBP localizada en el extremo del fago (Valyasevi *et al.*, 1991). Tanto YueB como PIP son parte del complejo de secreción de tipo VII.

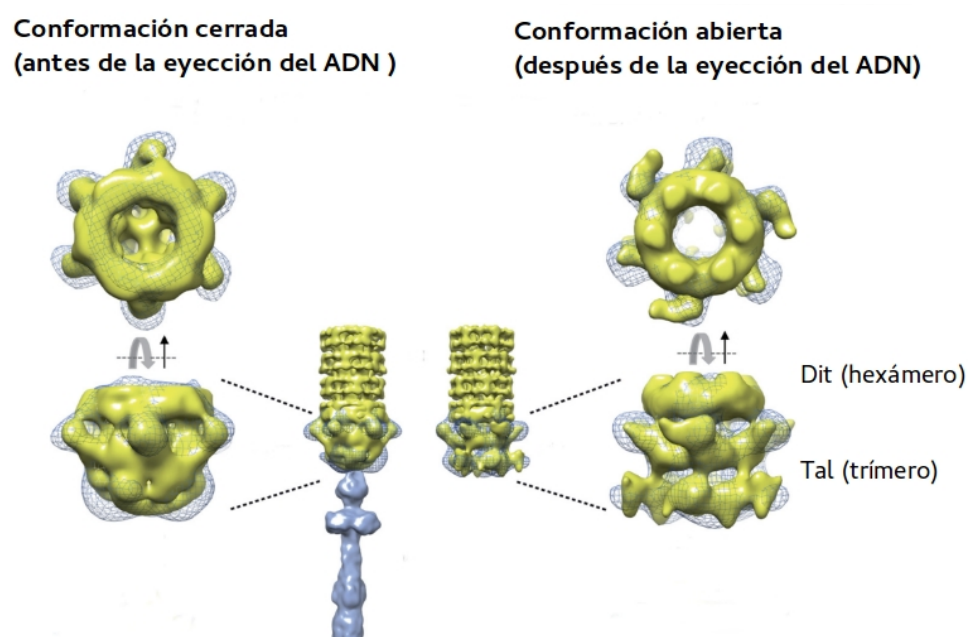


Figura 11. Conformación adoptada por las proteínas de la punta de la cola de SPP1. Conformación de la estructura de la punta de la cola en forma cerrada (izquierda) y abierta (derecha) observadas por microscopía electrónica de transmisión y posterior reconstrucción con y sin el agregado de Ca^{2+} . En celeste se muestra el C-terminal de la Tal. Adaptado de Goulet *et al.* (2011).

6.4 Receptores bacterianos

Las envolturas bacterianas juegan un papel fundamental en la interacción fago-bacteria. Durante el ciclo de infección, los fagos deben primero adherirse a la bacteria y por ende los componentes que actúan como receptores normalmente se encuentran expuestos en la envoltura (Forde y Fitzgerald, 1999). Para bacterias Gram positivas, se ha descrito que los ácidos teicoicos (WTA) (Baptista *et al.*, 2008), los lipoteicoicos (LTA) (Räisänen *et al.*, 2004) y los polisacáridos de pared (CWPS) (Chapot-Chartier *et al.*, 2010) están asociados con la adsorción de los fagos. En la tabla 3 se resumen algunos de los receptores o potenciales receptores descritos para fagos que infectan BAL.

Luego de la unión irreversible a un componente de la superficie bacteriana, el ADN del fago debe llegar desde la cabeza hasta la célula huésped. En general, la punta de la cola tiene un mecanismo enzimático para penetrar la capa de peptidoglicano y luego tener contacto o penetrar la membrana plasmática para liberar el ADN directamente dentro de la célula (Kenny *et al.*, 2004; Stockdale *et al.*, 2015). La figura 12 muestra una representación esquemática de la pared de una bacteria Gram positiva.

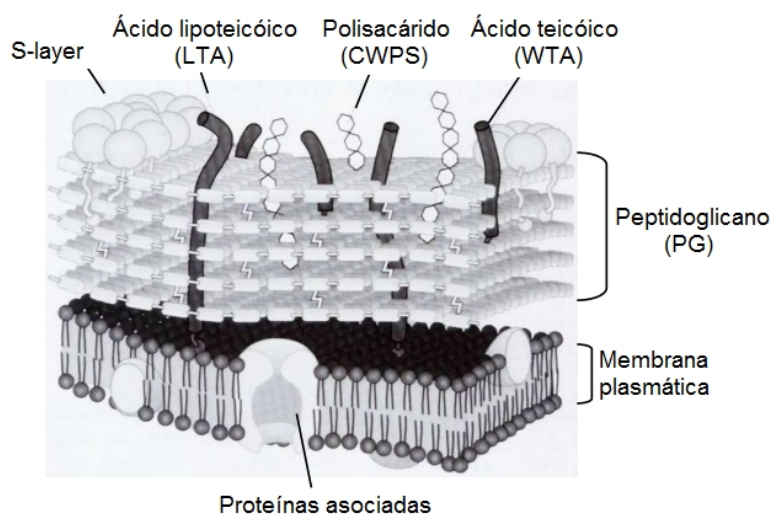


Figura 12. Esquema general de la envoltura de bacterias Gram positivas

Tabla 3. Bacteriófagos de BAL y sus posibles receptores Adaptado de Mahony et al. (2012)

Huésped	Fago	Posible Receptor
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Sk1 (936)	CWPS
	TP901-1 (P335)	Carbohidrato
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	C2 (C2)	PIP
	LL-H	LTA
<i>L. delbrueckii</i>	JCL1032	Carbohidrato desconocido
	YAB	CWPS
<i>L. casei</i>	J-1	L-ramnosa/ D-galactosamina
<i>L. plantarum</i>	PHI1	CWPS
	PHI2	Ácido teicoico
<i>L. helveticus</i>	CNRZ832B1	Proteína S-layer
<i>S. thermophilus</i>	CYM	CWPS
	5093	Carbohidrato desconocido

6.4.1. Ácidos teicoicos

Los ácidos teicoicos son glicopolímeros ricos en fosfato y se clasifican en dos grupos: LTA, adosados a la membrana citoplasmática a través de un glicolípido y los WTA unidos covalentemente al peptidoglicano. Su síntesis depende de vías diferentes aunque suelen compartir algunas de las estructuras finales. Los LTA presentan como estructura más común los polímeros de glicerol fosfato. Los WTA son diversos pero los más comunes son los polímeros de glicerol fosfato o ribitol fosfato. Estas últimas cadenas pueden sustituirse con D-alanil o residuos de glicosil (glucosa, galactosa o N acetil galactosamina) que contribuyen a la funcionalidad del ácido teicoico (Palomino et al., 2013; Chapot-Chartier, 2014). En *L. casei* o *L. rhamnosus*, no se detectaron WTA en concordancia con la falta de genes *tag* o *tar* de biosíntesis. *L. plantarum*, por otro lado, presenta ambos.

El LTA de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC15808 ha sido identificado como el receptor para el bacteriófago LL-H. Se ha demostrado además que en presencia de una alta D-alanilación decrece la adsorción fágica mientras que se requiere la sustitución α Glc para una unión eficiente (Räisänen et al., 2004).

6.4.2. Glicopolímeros

En los últimos años la estructura y función de los glicopolímeros de BAL ha cobrado un interés particular debido a su incidencia en el crecimiento bacteriano, *fitness*, su interacción con células eucariotas y en la sensibilidad a fagos.

Los componentes polisacáridicos pueden dividirse en tres grupos:

- *Polisacáridos capsulares (CPS), covalentemente unidos al peptidoglicano formando una gruesa capa externa denominada cápsula.
- *Polisacárido de pared (CWPS) que pueden estar unidos a la pared covalentemente o no aunque sin formar una cápsula.
- *Polisacárido extracelular (EPS) que son liberados al ambiente sin estar unidos covalentemente a la superficie bacteriana. En general, se considera que el EPS puede ayudar o no en la exposición del receptor pero no se consideran receptores de fagos.

La afinidad de las RBPs de ciertos fagos por el glicerol o fosfo-glicerol sugerían originalmente que estos podían reconocer los ácidos lipoteicoicos (LTA). Sin embargo, la estructura simple de este tipo de moléculas no podía explicar las diferentes y sutiles especificidades de los mismos. Esto llevó a sugerir que los fagos miembros de las especies de P335 y 936 de *L. lactis* podían reconocer carbohidratos (Geller *et al.*, 2005). Los primeros estudios, en general, comenzaron con ensayos de competencia donde se agregaban los azúcares inhibiendo la adsorción o infección. En el año 2010, Chapot-Chartier *et al.* describieron que rodeando a la pared de *L. lactis* existía una película de CWPS que podía ser un buen candidato como receptor para estos fagos. Los CWPS fueron descritos originalmente en *L. lactis* MG1363 y están compuestos por unidades repetidas de hexasacáridos-fosfato. Probablemente, estén unidos en forma covalente debido a que se requieren fuertes tratamientos ácidos para separarlos de las bacterias. A través de microscopía de fuerza atómica (MFA) y MET se observó que el CWPS forma una capa compacta recubriendo a la célula que finalmente se denominó película. Realizando mutaciones de genes pertenecientes al operón de *L. lactis* MG1363 que codifica para la maquinaria biosintética de la síntesis del polisacárido, como las glicosil-transferasas, se han podido determinar los receptores de algunos de los fagos (biL170, 645 y sk1) (Dupont, Vogensen, *et al.*, 2004; Chapot-Chartier *et al.*, 2010). Este operón, existente en las distintas

cepas de *L. lactis*, tiene un tamaño de 20-25 Kb en el que se se encontrarían los genes vinculados con la síntesis de los sacáridos que forman la película. A su vez, se identificaron regiones conservadas entre las distintas cepas y otras regiones disimilares que le darían una composición sacarídica específica a cada cepa.

La MFA mostró la presencia de una capa sin rugosidades en la cepa salvaje *L. lactis* MG1363 mientras que una mutante sin CWPS presentó una superficie rugosa. A su vez, se observó que la mutante deficiente en el CWPS tiende a formar largas cadenas o filamentos que parecen tener defectos morfológicos. Por ende, también se sugiere que los CWPS son importantes en el proceso de división celular. Empleando ensayos de resonancia plasmónica de superficie se demostró la afinidad del fago p2 por la película de la cepa MG1363, en este mismo ensayo se utilizó como control al fago TP901-1 que presentó una afinidad significativamente menor frente a la película de esta cepa (Bebeacua, Tremblay, et al., 2013).

Recientemente se han identificado otros polisacáridos asociados a pared en *Lactobacillus* spp.:

-En *L. rhamnosus* GG, se encontró un polisacárido largo rico en galactosa en la superficie bacteriana (Lebeer et al., 2009). Este polisacárido, denominado EPS, se detectó por AFM y contribuye con ciertas propiedades de la superficie como la determinación de la adhesión y la formación de biofilms (Francius et al., 2009).

-En *L. plantarum* WSF1, se encontró un *cluster* de cuatro genes en el genoma asociado a la producción de polisacáridos. Este polisacárido influye en las propiedades inmunomodulatorias de la cepa (Remus et al., 2012).

-En *L. casei* Shirota YIT9018 fueron descritos dos tipos de CWPS: PS-1, largo y de mayor peso molecular (compuesto de glucosa, ramnosa, y pequeñas cantidades de galactosa y glucosamina) y otro más corto y de menor peso molecular denominado PS-2 (compuesto de glucosa, ramnosa, galactosamina y glucosamina) (Yasuda et al., 2008) en una disposición espacial diferente. Los glicomas de varias cepas de *L. casei* con orígenes disímiles (saliva, queso, intestino humano) fueron comparados con un *microarray* tipo lectinas donde se observaron perfiles diferenciales que sugieren la presencia de diferentes CWPS (Yasuda et al., 2011).

-En 2016, Vinogradov *et al.* purificaron el polímero más abundante de la pared bacteriana de *L. casei* BL23. El análisis de la composición del CWPS reveló la presencia de α -Rha, α -Glc, β -GlcNAc y β -GalNAc formando una unidad repetitiva de heptasacáridos (variante 1), con una sustitución parcial adicional con α -Glc (variante 2). También fue identificado un final no reducido de octasacáridos, correspondiente a la unidad terminal del CWPS (variante 3) y permitió definir la unidad biológica repetitiva de este CWPS (Figura 13).

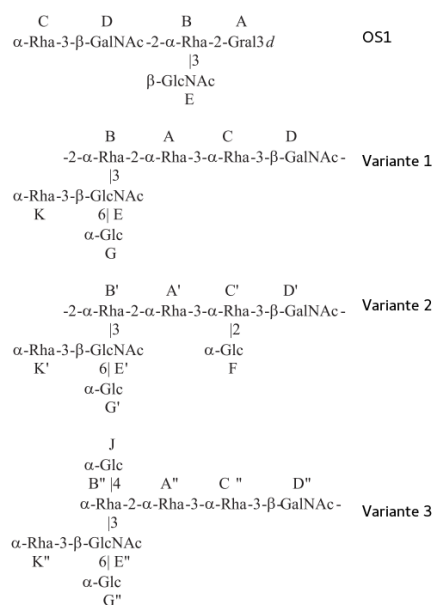


Figura 13. Estructura del polisacárido de pared (CWPS) de *L. casei* BL23

7. La problemática de la propagación fágica dentro de la planta y formas de control

Los fagos que se encuentran en el entorno fermentativo pueden persistir en la planta de producción durante largos períodos y a menudo adaptarse para hacer frente a obstáculos tecnológicos que se les presentan, tales como la pasteurización y otros saneamientos de tipo térmico y químico. Una gran diversidad de fagos está naturalmente presente en el ecosistema y por ende su ausencia es inalcanzable; sin embargo, la identificación de los mismos evita la diseminación y permite su posible control con el objetivo de resguardar el crecimiento bacteriano. A continuación, se detallan las fuentes de contaminación más frecuentes y las precauciones o medidas de sanitización usadas en planta.

7.1. Leche cruda y productos de reciclaje

Se sabe que la entrada de nuevos fagos a la planta ocurre principalmente a través de la leche cruda con concentraciones que varían entre el 10^1 y 10^4 fagos/ ml. Madera *et al.* (2004) reportaron que el 10 % de las muestras de leche recolectadas de diferentes lugares de España contenían fagos de *Lactococcus* y el 37% de las muestras de leche presentaban ADN de fago, detectándolo con la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Madera *et al.*, 2004). Aunque estos resultados subestiman los números reales, muestran un alto porcentaje de fagos antes de ingresar en la planta. En la industria láctea, la leche puede ser tratada de diferente manera antes de ser usada en el proceso de fermentación. Se pueden aplicar tratamientos térmicos, de alta presión o radiación iónica para limitar los títulos virales sin modificar las propiedades de los alimentos (Guglielmotti *et al.*, 2012). Varios grupos han demostrado que mucho de los fagos pueden sobrevivir a la pasteurización. Más aún, la concentración de fagos es más alta si solo se termiza o directamente se usa la leche cruda. Los tratamientos actuales incluyen el calentamiento a baja temperatura durante un tiempo prolongado (63°C durante 30 minutos) o alta temperatura durante un tiempo corto (72°C por 15 segundos). En la elaboración del yogur, la leche se calienta a 82°C durante 10 minutos. Se ha demostrado que fagos de *Lactococcus* pertenecientes al grupo 936 son más resistentes a la pasteurización que otros miembros del grupo c2 (Madera *et al.*, 2004). En otros casos, no parecería haber una preferencia al tipo de familia o grupo mostrando una amplia variabilidad en la resistencia a la temperatura (M. L. Capra *et al.*, 2009; Atamer y Hinrichs, 2010; Guglielmotti *et al.*, 2012; Pujato *et al.*, 2014). Estos resultados indican que los fagos entran al proceso de manufactura y se acumulan rápidamente pudiendo llegar a concentraciones de 10^9 fagos / ml de suero de queso o por gramo de producto (McIntyre *et al.*, 1991; Briggiler Marcó *et al.*, 2012).

También se ha estudiado la inactivación de los fagos usando tecnología de alta presión. La mayoría de los estudios reportan una reducción en el título viral a presiones de 100 MPa y mayores (Moroni *et al.*, 2002; M L Capra *et al.*, 2009). Müller-Merbach *et al.*, (2005) han mostrado que la combinación de calor con alta presión tiene efectos sinérgicos llevando a una disminución aún más rápida del título viral (Müller-Merbach *et al.*, 2005). Nuevamente, los fagos de *Lactococcus* de tipo 936 fueron más resistentes que los fagos de tipo C2.

Particularmente, en la producción del queso, se reciclan concentrados de suero con el objeto de mejorar el rendimiento o mejorar los atributos del producto final (Hinrichs, 2001), Sin embargo, este proceso es riesgoso debido a la posible presencia de fagos en los ingredientes reutilizados. De hecho, los fagos siguen presentes en suero, incluso si son sometidos a pasteurización o a temperaturas mayores (95°C por varios minutos). Las sales, grasas, azúcares y proteínas del suero podrían además proteger a los fagos del daño térmico (Hinrichs, 2001; Quiberoni *et al.*, 2003; Atamer y Hinrichs, 2010). El escenario es aún más alarmante sabiendo que el suero se utiliza generalmente concentrado, aumentando aún más los niveles fágicos.

7.2. Factores ambientales

Aunque la leche cruda sea la fuente principal de entrada de fagos a la planta, hay varios pasos en el proceso fermentativo que pueden agudizar el problema. Los aerosoles son una importante ruta de dispersión de los fagos que pueden permanecer en el aire por períodos prolongados. Las personas moviéndose o transportando equipamiento y materiales crudos pueden causar la dispersión de los fagos como aerosoles. Las consecuencias son aún peores si no hay límites entre zonas contaminadas y no contaminadas (Briggiler Marcó *et al.*, 2012). Las superficies de trabajo son también otro punto de contaminación (Neve *et al.*, 1994). Un ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) puso en evidencia que, en superficies como el piso, las paredes, las escaleras, y el equipamiento en general se ha encontrado material genético de fagos de *Lactococcus* tipo c2 y tipo 936 (Verreault *et al.*, 2011). Esto enfatiza la relevancia de una correcta sanitización, un personal instruido y un adecuado diseño de planta láctea para prevenir las infecciones fágicas. Los sistemas tipo spray con desinfectantes apropiados ayudan a controlar las infecciones. A la hora de elegir el sanitizante adecuado deben considerarse diversos factores incluyendo una rápida actividad antimicrobiana, que sea de fácil aplicación, bajo costo, sin efectos en el producto final y que no sea degradado en un producto de efecto adverso. Los productos que contienen ácido paracético son en general los más efectivos para una inactivación efectiva y rápida. Las propiedades fotocatalíticas del TiO₂ presentan ciertas ventajas como el bajo costo, la seguridad, la ausencia de residuos, operación simple, amplio espectro y sugieren una alternativa a la desinfección química tradicional (Guglielmotti *et al.*, 2012).

7.3. Cultivos iniciadores

Como ya se mencionó en la sección 5, los mismos cultivos iniciadores pueden ser fuente de bacteriófagos ya que la mayoría de cepas de BAL son polilisogénicas. Es importante realizar un planeamiento adecuado utilizando diferentes cepas sin posibilidad de ser infectadas por los mismos fagos y a la vez sin profagos. En la realidad, es difícil reemplazar a las bacterias iniciadoras por las propiedades organolépticas que le brindan al producto. Por eso, pueden utilizarse diferentes estrategias anti-fágicas con el objetivo de controlar las infecciones.

El uso de cepas iniciadoras no definidas aún se utiliza en la elaboración de quesos artesanales (Bissonnette *et al.*, 2000). Por un lado, estos quesos son altamente resistentes a fagos porque las bacterias crecen en su presencia. Por el otro, la incapacidad de mantener las mismas propiedades tecnológicas en diferentes partidas llevó a que se reemplacen por el cultivo directo de multicepas, principalmente en la producción quesera a gran escala. Esos cultivos cuentan con la ventaja de ser conocidos permitiendo una alta tasa de reproducibilidad. Sin embargo, la infección por fagos puede causar la interrupción del fermento por el limitado número de cepas utilizadas. Alternativamente, el uso de inoculaciones directas del cultivo a la tina ha contribuido a disminuir el riesgo de la infección fágica. Se ha hecho un gran esfuerzo en la búsqueda de nuevas cepas iniciadoras desde el *pool* de cepas provenientes de la leche cruda, cultivos no definidos o tradicionales. Las cepas de BAL de grado alimenticio (ej. sin resistencia a antibióticos) o pro-tecnológicas (gran rango de resistencia, alta acidificación, sin sabor indeseado) tienen hoy un alto valor comercial (Briggiler Marcó *et al.*, 2012). La extensa sobrevida de los fagos y las bacterias en el mismo ambiente ha hecho seleccionar también una variedad de mecanismos de defensa que serán discutidos en la siguiente sección. Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad para evitar propagaciones fágicas es la rotación de cultivos, impidiendo que determinadas poblaciones fágicas escalen a niveles incontrolables.

Es conocido que muchos fagos son dependientes de cationes divalentes para que ocurra la infección. La industria ha utilizado medios inhibitorios que contienen tampones fosfatos o sales citrato con el objetivo de secuestrar a los mismos previo al agregado de la leche. Sin embargo, algunas cepas han mostraron un retraso en el crecimiento y en los

perfiles de acidificación posiblemente debido a la capacidad *buffer* de los fosfatos agregados. Como en la mayoría de los casos, esta estrategia es válida dentro de un marco de medidas a tomar en la planta dado que existen fagos independientes de calcio (Suarez *et al.*, 2007)

8. Mecanismos de fagorresistencia

Las bacterias poseen mecanismos naturales anti-fágicos interrumpiendo distintas etapas del ciclo de infección que pueden ser utilizados a favor de los procesos fermentativos. El aumento masivo de genomas secuenciados en bases de datos públicas y el desarrollo en paralelo de herramientas de manipulación genética para BAL han permitido desarrollar mecanismos de resistencia inspirados en los naturales o manipulados genéticamente con el fin de proteger el producto lácteo (Labrie *et al.*, 2010). La selección de cepas que contienen naturalmente mecanismos de resistencia a fagos o el uso de cepas de interés con el sistema de defensa adecuado también son alternativas factibles en el momento de controlar la población fágica durante un proceso biotecnológico.

8.1. Inhibición de la adsorción

La unión específica del fago a un receptor bacteriano es el primer paso en la infección. Cualquier modificación que cambie la conformación del mismo o que pueda competir por el sitio de reconocimiento con el fago, tiene el potencial de proteger a la bacteria de la infección por fagos (Figura 14). Cuando las bacterias son desafiadas con un fago, aparecen bacterias resistentes o BIMs (*Bacteriophage insensitive mutants* de sus siglas en inglés) que en general contienen modificaciones en componentes claves de la adsorción. El aislamiento de BIMs resulta interesante porque no involucra manipulación genética y por ende no hay restricciones en su aplicación en la industria alimenticia (Viscardi *et al.*, 2003).

La película de polisacárido que recubre a la cepa *L. lactis* MG1363, contiene al receptor del fago sk1 (936) y mutaciones en los genes involucrados en la biosíntesis de la película inhiben la infección con éxito. En otros casos, la inactivación de la proteína de

membrana (PIP) en *L. lactis* inhibe la adsorción de los fagos tipo c2 confiriendo resistencia bacteriana (Valyasevi et al., 1991). Este mecanismo ha sido tan efectivo que ahora los fagos de tipo c2 son raros en Canadá (Samson y Moineau, 2013). Otro mecanismo de defensa bacteriana implica la producción de polímeros extracelulares como EPS que pueden interferir en la interacción fago-superficie celular enmascarando al receptor. Sin embargo, los fagos han evolucionado para reconocer específicamente a estos polímeros extracelulares y en algunos casos, degradarlos empleando enzimas específicas que codifican en su genoma. Los cambios específicos en el genoma del fago pueden también alterar el rango de huésped. El monitoreo de cambios en el genoma, principalmente en genes asociados con la especificidad de huésped, puede ayudar a determinar los posibles huéspedes bacterianos. Lamentablemente, para muchos fagos de BAL, el mecanismo de adsorción es poco conocido y por ende encontrar alguna forma de evitar esas infecciones resulta compleja (Labrie et al., 2010).

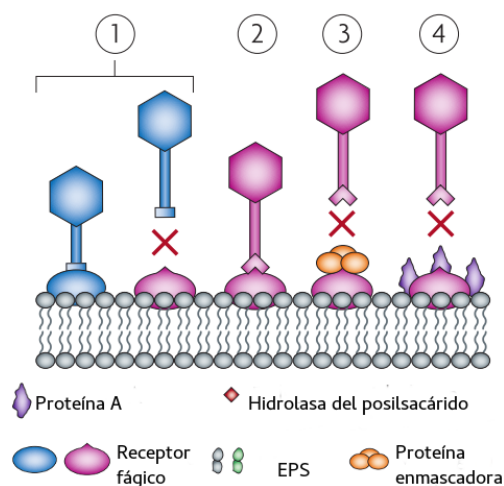


Figura 14. Diferentes estrategias usadas por las bacterias para evitar la adsorción. 1. Las bacterias pueden resultar resistentes modificando los receptores de la superficie. 2. Los fagos pueden adaptarse y ahora reconocer al nuevo receptor. 3. Las bacterias pueden producir una proteína que enmascare el receptor como ocurre en *Staphylococcus aureus* que produce la proteína A y reduce la adsorción. 4 El EPS puede bloquear la adsorción, pero los fagos pueden producir una hidrolasa que permita llegar al receptor. Adaptado de Labrie et al. (2010).

Los VHH o nanoanticuerpos se han probado con éxito y presentan varias ventajas para su aplicación: pueden ser usados a bajas concentraciones, no afectan el crecimiento bacteriano ni la acidificación y se producen fácilmente a gran escala (Ledebøer *et al.*, 2002). Por otro lado, los DARPins (de sus siglas en inglés *Designed Ankyrin Repeat Proteins*) que se unen a las RPBs han sido seleccionados para prevenir la adsorción de los fagos (Veesler *et al.*, 2009). Los DARPins tienen la habilidad de unirse a diferentes proteínas con alta afinidad, son estables y fácilmente producibles en *E. coli*. Los sitios de unión difieren de los VHH que podrían usarse en combinación para cubrir un gran número de epítopes. Sin embargo, tanto el costo como su posible utilización deben ser validados. La figura 15 muestra la interacción de un VHH y un DARPIn con un RBP de la placa base del fago TP901-1.

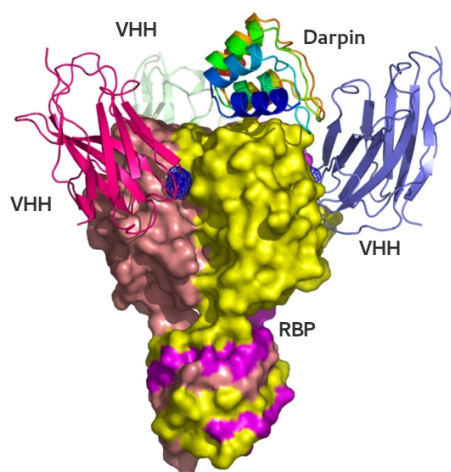


Figura 15. Estructura de los complejos RBP (TP901-1) junto con el DARPIn20 y el VHH5. El RBP se muestra en modo superficie mientras que los VHH (fucsia, azul y verde) y el DARPIn20 (coloración arco-iris) en modo cinta. Adaptado de Veesler *et al.* (2009)

8.2. Inhibición de la eyección del ácido nucleico

Luego de la adsorción, el ADN del fago debe ser inyectado al citoplasma bacteriano. Son pocos los sistemas capaces de inhibir este paso que han sido reportados en la literatura. Con frecuencia se asocian con el fenómeno llamado inmunidad a la superinfección que proviene de los profagos presentes en la cepa lisógena y bloquean la entrada del ADN fágico dentro de la célula. Estas proteínas pueden estar ancladas a la membrana celular o bien asociadas a componentes de la membrana. En *L. lactis*, una proteína del fago temperado Tuc2009 ubicada en la membrana bacteriana inhibe la eyección del ADN de los

fagos relacionados P335 y no relacionados 936 (Mc Grath *et al.*, 2006). Un sistema similar se encontró en un profago de *S. thermophilus*. En este caso, el genoma del profago TP-j34 codifica una lipoproteína que bloquea la inyección de ADN fágico (Sun *et al.*, 2006).

8.3. Clivaje del ácido nucleico de fagos

Dos mecanismos ampliamente estudiados en la edición del ADN en bacterias son el sistema modificación restricción (M / R) y recientemente, el sistema CRISPR-Cas. El primero se basa en que el genoma de los fagos puede ser blanco de endonucleasas específicas luego de entrar a la bacteria. Dos sistemas enzimáticos complementarios participan en el mecanismo: una endonucleasa que hidroliza el ADN foráneo (restricción), y una metilasa que modifica el ADN bacteriano en determinadas secuencias específicas (modificación), de modo que resulte inmune a la hidrólisis mediada por su propia enzima de restricción (Vasu y Nagaraja, 2013). Si el ADN foráneo no está protegido por alguna modificación, las enzimas pueden clivarlo en regiones específicas y detener la infección. De acuerdo a su estructura y modo de acción, el sistema M/R se divide en cuatro grupos (tipo I a IV) (Vasu y Nagaraja, 2013). Hasta el momento, sólo los sistemas I, II y III fueron encontrados en BAL. Estos sistemas pueden estar codificados tanto en plásmidos (*Lactococcus*) como en el cromosoma (*S. thermophilus*). En *Lactobacillus*, estos sistemas fueron evidenciados en *L. helveticus*, *L. delbrueckii* y *L. plantarum* y generalmente aparecen asociados con otros mecanismos de fagorresistencia. Los fagos también pueden protegerse de este sistema si presentan una enzima con actividad de metiltransferasa que actúa más rápidamente que las enzimas de restricción del huésped bloqueando los sitios de reconocimiento de las mismas. También pueden acarrear moléculas que inhiban a las enzimas de restricción o contener menos sitios de corte en su genoma (Szczepankowska *et al.*, 2013)

Uno de los últimos mecanismos más estudiados es el sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) loci y sus proteínas asociadas Cas que proveen inmunidad adaptativa y hereditaria en bacterias contra ADN foráneo (Figura 16) (Barrangou y Marraffini, 2014). Durante la respuesta, pequeños fragmentos de ADN foráneo (*protospacers*) son incorporados entre secuencias directas repetidas para originar los arreglos CRISPR en un proceso denominado adaptación (Barrangou *et al.*, 2007). Luego, estos loci son transcritos y procesados en pequeños ARNs de interferencia (biogénesis)

que guían a la/s nucleasas para un clivaje específico de secuencias complementarias en el genoma fágico o ADN plasmídico (interferencia). El número de repeticiones y espaciadores varía de cepa a cepa y se ha encontrado en un 40% de los genomas bacterianos. Los fagos pueden evadir este sistema de inmunidad adaptativa mutando la secuencia blanco presente en el espaciador (*protospacer* en el genoma del fago) o la secuencia PAM necesaria para que el ADN sea reconocido como foráneo y sea clivado (Deveau et al., 2008). Sin embargo, la bacteria puede tomar una nueva región del ADN invasor y protegerse nuevamente. Exponiendo a bacterias que codifican en sus genomas sistemas CRISPR-Cas a fagos problemáticos en la industria, se pueden generar cepas resistentes contra muchos fagos. La empresa DuPont comenzó con el desarrollo de cepas resistentes a fagos a través de CRISPR-Cas en 2007. En el 2012, la compañía anunció la primera aplicación comercial utilizando esta tecnología en un producto para hacer queso mozzarella denominado CHOOZITSWIFT (DUPONT, <http://www.danisco.com/about-dupont/news/news-archive/2012/dupont-hurdles-the-process-challenges-for-pizza-cheese/>) a través del uso de una cepa de *S. thermophilus*. En 2015, Hovarth, investigador de la compañía, declaró que DuPont ya cuenta con 6000 fagos en su colección para inmunizar bacterias.

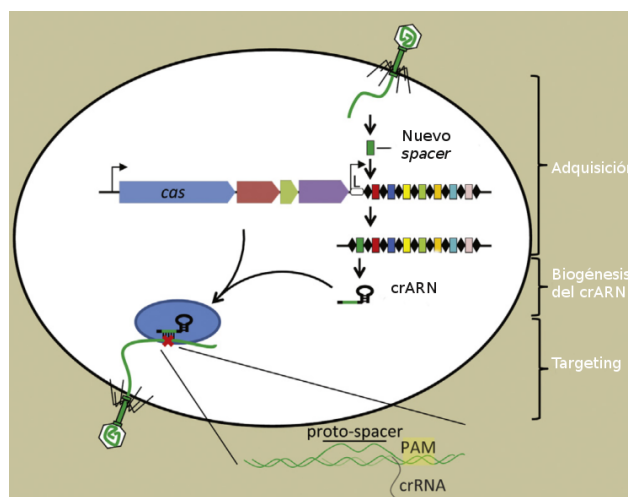


Figura 16. Mecanismo general de CRISPR-Cas. Adaptado de Barrangou y Marraffini, (2014).

8.4. Infección abortiva (Abi)

La infección abortiva (Abi) es un sistema de muerte celular altruista que se activa por la infección fágica y limita la replicación viral protegiendo a la población bacteriana. La bacteria atrapa las partículas no maduras dentro de la célula limitando su propagación en el ambiente. La mayoría de los sistemas Abi aislados se encuentran en plásmidos y solo unos pocos se han encontrado en el genoma bacteriano o codificados en profagos. La mayoría de la información disponible proviene de *E. coli* o *L. lactis* (Chopin et al., 2005; Hyman y Abedon, 2010) Hasta el día de hoy, han sido reportados veintitrés sistemas Abi en *Lactococcus* (Chopin et al., 2005; Holubová y Josephsen, 2007; Haaber et al., 2008). Algunas características compartidas son, la reducción del *burst size*, la eficiencia de plaqueo, y el número de centros infecciosos y muerte de las células infectadas.

En los últimos años se ha asociado al sistema Abi con otros sistemas llamados toxina- antitoxina. En condiciones normales, el componente tipo toxina es neutralizado por la antitoxina. Cuando ocurre algún tipo de estrés o cuando la toxina -más estable que la antitoxina- se activa, se libera dentro de la célula causando la muerte celular (Chopin et al., 2005)

El sistema Abi puede ser utilizado clonando el gen letal bacteriano bajo la expresión de un promotor inducible por el fago. Cuando el fago infecta, el gen tóxico se expresa y la bacteria muere. Ejemplos de esta metodología se han usado con éxito en *L. lactis*. El cassette de restricción L1al se puso bajo control de un promotor inducible del fago ϕ 31. Cuando este fago infecta a la bacteria, los genes de restricción se expresan y por ende destruyen a la bacteria (Djordjevic y Klaenhammer, 1997). Lamentablemente, para este sistema es necesario conocer cuáles son los fagos contaminantes y es posible que solo funcione en un rango viral acotado.

8.5. Sobreproducción de componentes virales

Las secuencias blanco de los genomas de los fagos pueden utilizarse para bloquear distintos pasos en el ciclo de multiplicación. Dado que se necesita una fina y correcta transcripción de cada gen para completar eficientemente el ciclo, la perturbación de esa expresión conduce a problemas replicativos en los fagos. Por ejemplo, cuando un ori de

replicación del fago se clona en un plásmido de alto número de copias, la replicación del fago se reduce significativamente (O'Sullivan *et al.* 1993). En *L. lactis*, los ori del fago $\phi 50$, fago $\phi 31$ y Tuc2009 también mostraron una disminución en la replicación del fago (O'Sullivan *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 1999). Sin embargo, la protección es limitada a fagos con orígenes de replicación similares. Además, se han encontrado fagos posiblemente por recombinación con profagos o por mutaciones puntuales. Otro ejemplo, contempla la existencia de profagos en estado de latencia, que expresan el represor tipo CI. Este represor además puede proveer protección a las sucesivas infecciones con fagos (inmunidad a la superinfección). Cuando este represor se sobre expresa en *Lactococcus*, le provee protección para el grupo de fagos que tienen como blanco a ese represor (Sturino y Klaenhammer, 2007).

8.6. ARN antisentido

Ciertos genes esenciales o parte de ellos pueden ser clonados bajo un promotor de transcripción fuerte en orientación reversa para producir moléculas de ARN anti sentido. Cuando este ARN hibrida con la secuencia blanco genera una molécula de ARNdc que es susceptible a la degradación. Este sistema puede ser usado también para transcriptos ARNm policistrónicos. Otra estrategia a utilizar sería generar una molécula antisentido a la secuencia del RBS bloqueando el inicio de la traducción. La clave de esta técnica consiste en elegir un buen blanco donde su disminución tenga un impacto significativo en el fago, pero no en la bacteria. Algunas de estas estrategias se han implementado con éxito en *S. thermophilus* y en *L. lactis* donde el ARN antisentido que hibrida con la primasa y la helicasa reducen significativamente la replicación. Sin embargo, su alta especificidad evita que sea aplicable a un gran rango de fagos (Sturino y Klaenhammer, 2002; Sturino y Klaenhammer, 2004).

Aunque en los últimos años la construcción de cepas modificadas genéticamente ha sido intensamente estudiada como herramienta tecnológica; las legislaciones actuales de organismos genéticamente modificados no permiten su utilización en la industria de

alimentos. Para los productos probióticos, las estrategias de control antifágicas son incluso más escasas dado que la rotación de cultivos no puede ser implementada. Si se quiere utilizar una cepa derivada resistente a fago, los beneficios en la salud de la nueva cepa deben ser evaluados *de novo*.

En vista de generar herramientas para el control de fagos a futuro, esta tesis aportará conocimiento básico que ayude al abordaje del problema, principalmente en lo que respecta a sistemas de reconocimiento del hospedador en fagos y profagos de *Lactobacillus casei/ paracasei*.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Considerando la importancia actual de algunas cepas de *Lactobacillus casei* como probióticas y el riesgo que implica la infección por fagos de las mismas; en esta tesis se abordarán dos aspectos fundamentales de la relación fago-bacteria. Por un lado, se estudiarán las proteínas involucradas en la interacción con el hospedador de los bacteriófagos de *Lactobacillus J-1* y PL-1. Por otro lado, se evaluará la estabilidad de profagos integrados en el genoma de una cepa de *Lactobacillus casei* y los mecanismos involucrados en su inducción.

Esta tesis aportará principalmente conocimiento básico sobre el mecanismo poco conocido de interacción de los fagos de *Lactobacillus* con las bacterias hospedadoras que luego podrá ser utilizado en el diseño de nuevas estrategias para la construcción de mutantes resistentes a fagos y cepas curadas (de profagos) para su empleo en la industria alimenticia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a nivel genómico y proteómico los fagos J-1 y PL-1.
2. Evaluar el riesgo de inducción de los profagos presentes en la cepa modelo *Lactobacillus casei* BL23.
3. Analizar funcionalmente las proteínas de la placa base de los fagos y los posibles receptores en la bacteria.
4. Estudiar estructuralmente la placa base del fago J-1 y desarrollar nanoanticuerpos contra sus componentes para su potencial uso en cristalización y como estrategia anti-fágica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bacteriófagos, cepas y medios de cultivo utilizados

Cepas de *Lactobacillus* spp. utilizadas

-*Lactobacillus casei* BL23, cedida por la colección de cepas del IATA (Instituto de Agroquímica y Biotecnología de Alimentos, Valencia España).

-*L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092. Cordialmente cedidas por la Dra. Quiberoni del INLAIN, Universidad del Litoral.

-*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Las cepas de *Lactobacillus* se propagan en medio MRS (Man Rogosa Sharpe, Merck, EEUU) a 37°C sin agitación. Para mantenimiento a largo plazo, se adicionó glicerol a cultivos de 18 h en medio MRS hasta una concentración de 20 % v/v, y los glicerolados se guardaron a -70°C.

Cepas de *E. coli* utilizadas

Las cepas se encuentran resumidas en la tabla 4.

Para la manipulación rutinaria de las cepas se utilizó medio Luria-Bertani (LB) caldo o agar. Las cepas fueron mantenidas a 4°C en placas de medio LB a través de re-siembras periódicas, con el agregado de antibióticos según el requerimiento de cada cepa. Para mantenimiento a largo plazo, se adicionó glicerol a cultivos de 18 h en medio LB hasta una concentración de 20% v/v, y los glicerolados se guardaron a -70°C.

Para la expresión proteica, las cepas *E. coli* se crecieron en medio LB, medio nutritivo (BD Difco, Franklin Lakes, EEUU) o medio Terrific (Amresco, Solon, EEUU) según corresponda con agitación moderada a 37°C. Los protocolos correspondientes a la expresión de proteínas se encuentran explicados en su respectiva sección. Cuando correspondía, se agregaron antibióticos en la siguiente concentración: kanamicina (15 µg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU), cloranfenicol (34 µg/ml) (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU), ampicilina (100µg/ml) (Sigma, Aldrich, St. Louis, EEUU) para *E. coli*.

Tabla 4. Cepas *E. coli* utilizadas en el trabajo

Cepa	Genotipo	Característica de interés
<i>Top10</i> Carlsbad, EEUU)	(Invitrogen, F ⁻ <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Phi80 <i>lacZ</i> (del)M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-</i> <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (SmR), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Cepa de clonado.
<i>E. coli</i> BL21(DE3) [pLysS] Madison, EEUU)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07</i> <i>ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺] _K - 12(λ^S) pLysS[T7p20 <i>ori_{p15A}</i>] (Cm ^R)	Cepa de Expresión. DE3 indica la presencia del lisógeno que contiene el gen para la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor Lac UV5. Es necesario IPTG para inducir la expresión. PlysS indica que proviene del plásmido que expresa la lisozima de T7 y reduce el nivel basal de expresión. Deficiente de proteasa ompT. Marcador de selección: cloranfenicol y ampicilina.
<i>E. coli</i> T7 Ipswich, EEUU)	(NEB, <i>fhuA2 lacZ::T7 gene1 [lon ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ(<i>mcrC-mrr</i>)114::IS10</i>	Cepa de expresión. RNA Polimerasa T7 en el operón Lac (no presenta el profago λ). Es necesario IPTG para inducir la expresión. Deficiente de proteasas Lon y OmpT. Resistente al fago T1 (<i>fhuA2</i>) Marcador de selección: cloranfenicol.
<i>E. coli</i> wk6 (Cordialmente cedida por la Dra. Desmyter)	F ⁺ <i>lacIq Δ(lacZ)M15 proA+B+ Δ(lacproAB) galE rpsL</i>	Cepa de expresión no supresora. Usada para los nanoanticuerpos.
<i>E. coli</i> TG1 Middleton, EEUU)	(Lucigen, [F ⁺ <i>traD36 proAB lacIqZ ΔM15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5(<i>rK - mK -</i>)</i>	Cepa de expresión supresora. Supresor Ámbar UAG>CAG(Gln) . Utilizada en <i>phage display</i> para proteínas fusionadas a III.

Bacteriófagos utilizados

- fago de *Lactobacillus* J-1
- fago de *Lactobacillus* PL-1
- fago de *Lactobacillus* PLE2
- fago de *Lactobacillus* PLE3

Los fagos J-1 y PL-1 son capaces de infectar diversas cepas de *Lactobacillus casei/paracasei* incluyendo cepas comerciales (Capra et al., 2006). Estos fagos fueron aislados de accidentes ocurridos durante la fermentación de Yakult en plantas industriales japonesas y depositados en la colección ATCC. Cordialmente cedidos por la Dra. Quiberoni del INLAIN (Instituto de lactología industrial), Universidad del Litoral.

Los fagos PLE2 y PLE3 han sido inducidos de la cepa *L. casei* BL23 y su descripción forma parte de esta tesis doctoral.

El fago J-1 se propaga en la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 mientras que el fago PL-1 lo hace en *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092. Ambos fagos también pueden infectar a la cepa *L. casei* BL23. Los stocks de fagos se guardaron a 4°C en *buffer* de fago.

Para mantenimiento a largo plazo, las suspensiones fágicas se conservaron con el agregado de glicerol 15% v/v a -80°C.

2. Plásmidos utilizados

La mayoría de las construcciones realizadas se hicieron utilizando como base a los vectores de expresión **pET-28b(+)** (Novagen, Darmstadt, Alemania) y **pLic07** BioXtal (Francia, trabajo no publicado). En la tabla 6, sección 5, se detallan los vectores construidos.

pET-28b(+)

El vector Novagen pET-28a-c(+) presenta una región N-terminal 6x His-Tag/thrombin/T7-Tag y de forma opcional también tiene una secuencia His-Tag en la región C-terminal (no

utilizada). Marcador de selección: kanamicina. En este vector se realizaron los clonados fusionados a proteínas fluorescentes (figura 17 A).

pLic07

Las secuencias detalladas de A-F se clonaron en el vector pLIC07 cedido por BioXtal (trabajo no publicado). El vector pLIC07 se diseñó para realizar clonados de ligación independiente y es un derivado del vector de expresión pET-28a+. Presenta un cassette codificando 6×*His tag*, el gen *Trx* y el sitio de clivaje TEV (Tobacco etch virus) seguido del gen suicida *sacB*. En este vector se clonaron los dominios para analizarlos estructuralmente. Marcador de selección: kanamicina.

En la construcción de los nanoanticuerpos, se utilizaron los fagémidos PHEN4 y PHEN6

PHEN4

El fagémido contiene una señal *PelB* en la región N-terminal y un dominio *HA-tag* (hemaglutinina tag) en el C-terminal. La secuencia *leader PelB* dirige el nanoanticuerpo al espacio periplamático y el *HA-tag* se puede utilizar para la detección del nanoanticuerpo. También hay un stop ámbar entre el *HA-tag* y la secuencia del gen *III*. En la cepa supresora TG1, los nanoanticuerpos son fusionados a la proteína *III* y se expresan en la punta de la partícula fágica con el objeto de hacer el *panning* (ver sección 11). La figura 17 B detalla el vector utilizado. (Arbabi Ghahroudi et al., 1997). Con este fagémido se seleccionaron los clones de los nanoanticuerpos 01,04, 07, 18, 52, 57. Marcador de selección: ampicilina.

PHEN6

Derivado del PHEN4. Se reemplazó el *HA-tag* y el gen *III* entre *Not I* y *EcoRI* por un fragmento codificando 6×*His tag* seguido de un codón stop. Vector de expresión en el que se subclonan los nanoanticuepros de interés (Lauwereys et al., 1998). Marcador de selección: ampicilina.

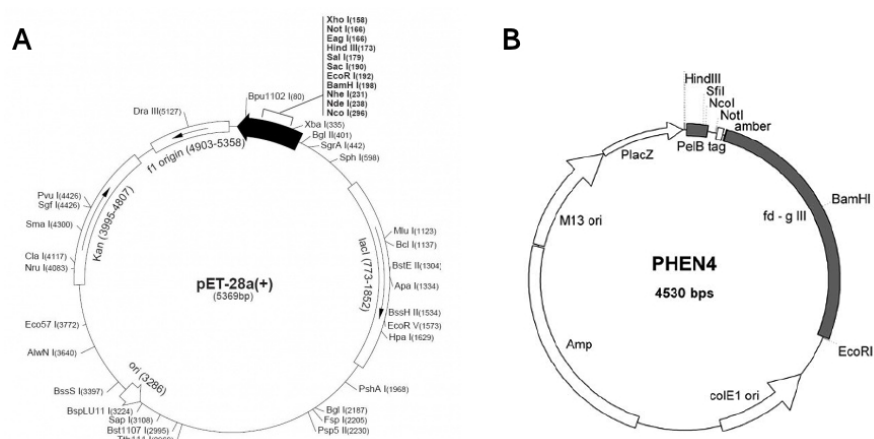


Figura 17. Vector pET-28 a-c (+) y PHEN4. **A.** pET-28b(+) se utilizó como esqueleto para la expresión de los diferentes dominios. pLic07 es un derivado de pET-28a(+). **B.** fagémido PHEN4 utilizado para la selección de los nanoanticuerpos de interés. PHEN6 es un derivado de PHEN4.

3. Técnicas utilizadas para la manipulación de fagos

Producción de stock viral

En cultivos de 75 ml de MRS se inocularon las cepas *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 (DO_{600nm} de 0,1 y DO_{600nm} de 0,2, respectivamente) y se las dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se agregó la cantidad correspondiente de fago dependiendo de la multiplicidad de infección óptima para cada fago (MI 0,1 para PL1 en la cepa *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 y 0,05 para J-1 en la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139) junto con 10mM $CaCl_2$. Se monitoreó a través del tiempo la densidad óptica a fin de cosechar los sobrenadantes cuando la DO_{600nm} bajara abruptamente indicando la lisis celular. Los tiempos óptimos de cosecha fueron de 6 horas para J-1 y 8 horas para PL-1. Se separó el sobrenadante de las células realizando primero dos centrifugaciones a $3200 \times g$ durante 15 min a $4^\circ C$. Luego, los sobrenadantes fueron filtrados utilizando filtros de $0,45\mu m$ (Millipore, EEUU) y concentrados por ultracentrifugación. La ultracentrifugación se realizó a $64000 \times g$ durante 2 horas a $8^\circ C$. Los *pellets* fueron resuspendidos en 500 μl de *buffer* de fago y guardados a $4^\circ C$ para su posterior uso. En cada producción de stock viral, los títulos se mantuvieron entre $1-5 \times 10^{12}$ aproximadamente durante los sucesivos 6 meses de uso.

Ensayo en placa

Se utilizó el ensayo en placa descrito originalmente por d'Herelle para realizar los recuentos. Para ello, se usó como medio semisólido MRS *top agar* mantenido a una temperatura de 55°C y el posterior agregado de CaCl₂ 10mM. Se agregaron 100 µl de células indicadoras a DO_{600nm} de 1 que equivale aproximadamente a 1x10⁸ células/ml y 100 µl de la dilución correspondiente de fago. Las diluciones seriadas de fago se realizaron en *buffer* de fago y las células se diluyeron con solución fisiológica. Luego se agregó el *top agar* con las células indicadoras y la dilución de fago sobre una placa conteniendo MRS sólido. Se dejó secar y se incubó en estufa a 30°C. Luego de 24-48 horas, se calcularon las UFP/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/ml} = \frac{\text{número de placas de lisis}}{\text{Volumen del inóculo (ml)} \times \text{dilución utilizada}} \quad (1)$$

Para realizar mediciones semi-cuantitativas se recurrió a la técnica del *spot test*. En este caso las células indicadoras se agregaron al *top agar* conteniendo la concentración adecuada de Ca²⁺. Una vez solidificado, se colocaron las diferentes diluciones seriadas del fago por gota (10 µl) en la placa. Se utilizó el mismo cálculo anteriormente explicado de UFP/ml para estimar el orden del título viral.

Aislamiento de ADN de fago

La extracción de ADN se realizó empleando un protocolo convencional con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (FCI) que se detalla a continuación.

A 100µl del stock de fago (1x10¹²UFP/ml)se le agregaron 400 µl de *buffer* TE pH 8. Se agregó 0,1 µg/ml RNAsa (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y se la dejó actuar por 15 minutos. Cuando el ADN se utilizó para la secuenciación, se incubó el fago por 30 min a 37°C con DNAsa (30µg/ml) (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y luego se inactivó. Se adicionó un volumen de FCI, se mezcló con el uso de un vortex y se centrifugó 5 minutos a 16000 x g. Se tomó la fase acuosa y se repitió este paso 2 veces más o hasta no observar una interfase. El fenol desnaturaliza las proteínas y el cloroformo favorece la separación de

fases. Luego, se realizaron dos extracciones con un volumen de cloroformo- isoamílico (24:1), se mezclaron las fases y se centrifugó 5 min a 16000 x g.

A la fase acuosa obtenida, se le adicionaron 2,5 volúmenes de etanol 100% para disminuir la polaridad y favorecer la precipitación del ADN. Se agregó acetato de sodio 3M que neutraliza las cargas. Se dejó 30 minutos en hielo para favorecer la precipitación. Se centrifugó 30 minutos a 16000 x g, se lavó con EtOH 70% para eliminar el exceso de sales. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos. El *pellet* obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 80 µl de *buffer* TE pH 8 o agua miliQ. El ADN se guardó a 4°C.

Purificación de los fagos en gradiente discontinuo de Cloruro de Cesio (ClCs)

Con el objetivo de purificar a los fagos, se realizaron una (o dos) purificaciones en un gradiente discontinuo de ClCs (cloruro de cesio). Para ello se utilizaron los tubos Thinwall, Ultra-Clear™ (Beckman Coulter, EEUU) con capacidad para 5,5 ml. En primer lugar, se agregó 3,6 ml (66% v/v) de fago resuspendido en *buffer* de fago (2×10^{11} UFP aproximadamente). Luego, con una pipeta pasteur se agregó desde el fondo del tubo, y evitando la formación de burbujas, las soluciones detalladas a continuación en el siguiente orden establecido:

1°-0,47 ml glicerol 10% (8,4 % v/v)

2°-0,69 ml de ClCs 1,4 g/ml (12,5 % v/v)

3°- 0,69 ml de ClCs 1,6 g/ml (12,5 % v/v)

Posteriormente, se completó con *buffer* de fago en la zona superior y se centrifugó a 110000 x g durante dos horas a 8°C. Se observó una banda nítida blanca entre los 1,4 g/ml y 1,6 g/ml correspondiéndose a la densidad de los virus de 1,5 g/ml aproximadamente. La banda se extrajo directamente del tubo con una jeringa y posteriormente las muestras se dializaron en *buffer* de fago para eliminar el ClCs presente en la muestra. Cuando los fagos fueron sometidos a MET, la purificación en ClCs se realizó dos veces consecutivas mejorando significativamente las imágenes colectadas

Microscopía Electrónica de transmisión (MET)

J-1, PL-1 o los profagos fueron purificados dos veces en un gradiente discontinuo de ClCs. Se utilizaron grillas cubiertas de una fina película de carbón hidrófilo (Ted Pella Inc., Redding, EEUU) sobre uno de los lados siendo necesario que queden con baja o nula carga para que la tinción responda correctamente. Para ello, previo a la preparación de la muestra, se les aplicaron dos descargas eléctricas. Luego, 6 μl de las partículas purificadas (10^{10} UFP/ml) se depositaron en las grillas durante un minuto. El exceso de muestra fue retirado con papel secante y lavado 2 veces con agua. Las muestras se tiñeron con 10 μL de 1% acetato de uranilo durante 30 segundos. Las microfotografías se guardaron en la cámara 2K x 2K FEI Eagle CCD usando el microscopio electrónico *Tecnai Spirit* operado a 120 kV y a una magnificación de 56000x o 110000x .

En el caso de la muestra proveniente del profago, originalmente se observó el lisado sin purificar. En este caso, se tomaron 5 μl de los lisados concentrados por ultracentrifugación y se siguió el protocolo detallado arriba. Luego, la muestra se observó nuevamente al MET pero con un paso de purificación en ClCs.

El multímero proveniente de la construcción F-Dit (1-679)-Tal (1-393) - ver sección 6- también se observó por MET. En este caso, las grillas se tiñeron con 10 μL de Tungstato de metilamina NanoW 2% (Nanoprobes, Nueva York, EEUU).

Identificación de proteínas por espectrometría de masa (MS)

Aproximadamente 50 μl (un total de 5×10^{10} UFP) de fago J-1 y PL-1 purificado en ClCs se colectaron por centrifugación a 20000 x g por 30 minutos. Los *pellets*, conteniendo a los fagos, se resuspendieron en 37,5 μl de agua destilada, se congelaron a -70°C y se descongelaron en 3 rondas sucesivas. La muestra se calentó a 75°C por 4 minutos. Se agregó DNasa (1U) (Fermentas, EEUU) y se incubó por 30 minutos con el objetivo de reducir la viscosidad causada por el ADN. Finalmente, se agregó 4X SDS del *buffer* de siembra y se calentó por 5 minutos a 100°C . Se sembraron 20 μl de muestra en un gel 12% de SDS-poliacrilamida y la electroforesis se corrió a 90 V hasta que el colorante desapareció del gel. Los geles se tiñeron con *Coomassie blue*. Las bandas se compararon

con un marcador de peso molecular para determinar el peso molecular aproximado de las proteínas.

Para la identificación por espectrometría de masa (MS), se utilizó el mismo protocolo descrito anteriormente pero con algunas modificaciones. El gel se tiñó con *Coomasie blue* coloidal y se tuvieron los recaudos necesarios para evitar el contacto de las muestras con la queratina. Las bandas fueron cortadas y digeridas con tripsina (o Lys-C en el caso de PL-1 y J-1) seguido de la elución de los péptidos, cromatografía y espectrometría de masa en tándem (MS/MS) en un LTQ Velos Orbitrap mass spectrometer y MALDI TOF MS. Los péptidos se identificaron por identidad de secuencia contra las proteínas predichas para J-1 y PL-1 con anterioridad. Esta sección del trabajo se realizó durante una pasantía corta en el Instituto Pasteur de Montevideo en colaboración con el Dr. Carlos Bathyanny.

Ensayos de adsorción

L. casei subsp. *casei* ATCC 27139 o *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 se creció hasta una DO_{600nm} de 1. Luego, 150 μ l de células fueron infectadas con 150 μ l del fago J-1 o PL-1 a una multiplicidad de infección de 0,005. Para el ensayo de cinética de adsorción, se midió el porcentaje de adsorción de las respectivas células a los tiempos 5, 10, 20, 30, 60 min a 37°C en presencia de 10 mM $CaCl_2$. A los tiempos indicados, las células se removieron por centrifugación a 16000 x g por 5 minutos. El fago no adsorbido del sobrenadante fue cuantificado usando la fórmula (1) (UFP/ml no adsorbido condición X, donde X son los diferentes tiempos). En paralelo, se realizó un control haciendo el mismo ensayo pero sin el agregado de células para cuantificar las UFP/ml iniciales del ensayo (condición inicial). Todos los puntos fueron realizados por triplicado y en ensayos independientes

Para los cálculos de porcentaje de adsorción se consideró la siguiente fórmula.

$$\% \text{ adsorción} = \frac{\text{UFP/ml condición inicial} - \text{UFP/ml no adsorbido condición X}}{\text{UFP/ml condición inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Ensayo de inhibición de la adsorción

Para los ensayos de inhibición de la adsorción se siguieron las recomendaciones brindadas por la Dra. Capra del INLAIN, Santa Fe, comunicación personal.

El ensayo de inhibición de la adsorción es una adaptación al ensayo de adsorción pero usando paredes celulares (ver sub-ítem) y la potencial molécula inhibidora. Brevemente, 50 μ l de paredes celulares (100 μ g) se incubaron con 50 μ l de *buffer* de fago (control) o las proteínas a diferentes concentraciones a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego, se adicionaron 50 μ l de fago (1×10^6 UFP/ml). La mezcla se incubó a 37°C por una hora (tiempo necesario para que haya una adsorción mayor al 90%) y las paredes se removieron por centrifugación a 16000 x g durante 5 minutos. Los fagos no adsorbidos en el sobrenadante se midieron con el método de doble agar (UFP/ml no adsorbido condición X) usando la fórmula (1). En todos los casos, se realizó un recuento UFP/ml iniciales (eximido de proteínas y paredes celulares, UFP/ml condición inicial) y un ensayo de control de la adsorción sin el agregado de proteínas (condición control). Para cada ensayo, se calculó la adsorción fágica usando la fórmula (2).

Para los cálculos de inhibición de la adsorción se utilizó la siguiente fórmula

$$\% \text{ de Inhibición de adsorción} = \% \text{ adsorción control} - \% \text{ adsorción condición X} \quad (3)$$

Para examinar la inhibición de la adsorción por los azúcares, se empleó el mismo protocolo usando azúcares en vez de proteínas. Los azúcares se utilizaron a 0,25 M y los resultados se expresaron directamente en % de adsorción.

Purificación de paredes

La purificación de las paredes celulares se hizo esencialmente como se ha descrito en Palomino *et al.* (2013). con algunas modificaciones. Brevemente, 100 ml de un cultivo de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 o *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 se creció ON a 37°C. Luego, las células se centrifugaron a 3200 x g y se resuspendieron en 50mM Tris-HCl pH 7.5. Las células se rompieron por sonicación en presencia de bolitas de vidrio (10

ciclos de 20 segundos seguido de intervalos en hielo de 1 minuto). Los extractos celulares se incubaron con DNAsa (30µg/ml) (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) y RNAsa (5µg/ml) (Thermo Scientific, Waltham, EEUU) a 37°C por una hora y tanto las células no lisadas como el debris celular se removieron por una centrifugación a bajas revoluciones (dos pasos de centrifugación a 1500 x *g* por 10 min). Las paredes celulares se recuperaron del sobrenadante por centrifugación a 20000 x *g* por 20 minutos y el *pellet* se lavó 3 veces en agua destilada realizando el mismo ciclo de centrifugaciones. Los *pellets* de la última centrifugación se mantuvieron a -20 °C. Para la cuantificación, una parte de las muestras se liofilizó y se pesó (µg). La adsorción, usando paredes celulares, fue realizada como se describió con anterioridad usando 100 µg de paredes.

Estadística

Para el ensayo de inhibición de la adsorción de los fagos en presencia de la proteína DIT, se realizó un ANOVA de 2 factores con interacción. Uno de los factores es la proteína utilizada (GFP-DIT J-1 o GFP-DIT PL-1) y el otro factor es la concentración de proteína utilizada (0,01 µM, 0,04 µM, 0,16 µM y 0,64 µM). Los tratamientos (8) quedan determinados por las interacciones entre ellos. Se utilizó estadística paramétrica y para que las conclusiones del análisis de la varianza (ANOVA) sean válidas, al realizar el diseño experimental se tuvo en cuenta que se cumplan los supuestos de manera que las muestras sean aleatorias y las observaciones independientes. Además, se pusieron a prueba los supuestos de distribución normal de la variable respuesta en cada tratamiento e igual variabilidad entre los tratamientos. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza se estudiaron mediante Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, respectivamente. Las comparaciones se efectuaron utilizando la prueba de Tukey y se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0.05$, donde se las denotó con distintas letras. A su vez, antes de verificar los supuestos del modelo se recurrió a herramientas gráficas para visualizar el efecto de los tratamientos, su variabilidad y los posibles *outliers*. Los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico Infostat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina.

Aislamiento de posibles mutantes del fago J-1

Se intentaron aislar mutantes espontáneas resistentes a J-1 deficientes en la adsorción. Para ello, se utilizó la cepa *L. casei* BL23 de secuencia conocida. Se ensayaron dos metodologías para el mismo fin.

En primer lugar, se sembraron 100 placas de MRS agar con *L. casei* BL23 y J-1, a una MI de 1. El plaqueo se llevó a cabo con la técnica del ensayo en placa explicado previamente. Luego, las placas se incubaron a 37°C durante un período de 10 días. Las colonias aisladas se repicaron 3 veces en medio agarizado para su purificación. Posteriormente, se inocularon en MRS caldo en presencia del fago J-1 con la finalidad de corroborar la resistencia (en paralelo se creció un control en ausencia del fago y se monitoreó la DO_{600nm}). La resistencia también se corroboró mediante ensayos de *spot test* en los que utilizando hasta 1×10^8 UFP tampoco se observó lisis bacteriana.

En segundo lugar, se utilizó la técnica de cultivo secundario (Capra *et al.*, 2011) con algunas modificaciones. Brevemente, un cultivo de DO_{600nm} de 0,1 se infectó a una MI de 0,1 y se incubó en forma estática a 37°C. Luego de la lisis bacteriana, los cultivos se mantuvieron a 37°C durante 4 días observándose crecimiento bacteriano (cultivo secundario). Seguidamente, se plaquearon en MRS agar y posteriormente distintos clones se incubaron durante 24 horas a 37°C en medio líquido. Los diferentes clones seleccionados se repicaron en medio agarizado 3 veces para su purificación. Se crecieron nuevamente en MRS caldo en presencia de J-1 con la finalidad de comprobar su resistencia. También se realizó el ensayo de *spot test* sin encontrarse placas de lisis.

A aquellos clones que mostraron en primera instancia resistencia al fago J-1, se los sometió durante tres pasajes sucesivos a infecciones en medio líquido con el fago a 37°C por 24 horas. Solo a aquellos clones que desarrollaron turbidez sobre el final del ensayo, se los consideró posibles mutantes. Las 18 posibles mutantes elegidas se alicuotaron y se guardaron a -70°C en glicerol 15% v/v.

4. Secuenciación y anotación de los genomas

El fago PL-1 se secuenció usando 454TM (Roche, Suiza) y los profagos (PLE2 y PLE3) por Ion TorrentTM (Thermo Fisher Scientific, EEUU) en *Genomics and Proteomics Core Laboratories* (GPCL) de la Universidad de Pittsburgh.

Las lecturas fueron ensambladas usando Newbler versión 1.1 y controladas utilizando el programa Consed versión 20. Los datos ensamblados produjeron un *contig* grande con consenso de valores mayores a 60 cubriendo el genoma de PL-1 45 veces. Los extremos del genoma fueron evidenciados de la reconstrucción de las lecturas en cada final de los *contig*. La cobertura final para PLE2 fue de 178 veces y para PLE3 de 109 veces.

El análisis de secuencia y anotación se realizó usando el programa *DNA master* versión 5.22.5 disponible en <http://cobamide2.bio.pitt.edu/>. La anotación incluyó además el uso de Genemark (Borodovsky y McIninch, 1993), Glimmer (Delcher *et al.*, 1999), ARNt y ARNtm se identificaron con tRNAscan-SE con un umbral de corte bajo (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>), ARAGORN (<http://bioinfo.thep.lu.se>) y luego fueron manualmente curadas. Para cada ORF, la anotación de su respectiva función se hizo utilizando BLASTp (Altschul *et al.*, 1990), CDD (Marchler-Bauer y Bryant, 2004), y HHpred (Söding *et al.* 2005).

Número de acceso para los distintos fagos secuenciados, entre paréntesis se indica el número Refseq:

Lactobacillus phage J-1 KC171646 (NC_022756.1)

Lactobacillus phage PL-1 KC171647 (NC_022757.1)

Lactobacillus phage PLE2 KU848187 (NC_031036.1)

Lactobacillus phage PLE3 KU848186 (NC_031125.1)

5. Métodos computacionales

Se creó una base de datos con los fagos de *Lactobacillus* secuenciados existentes y los mapas genómicos comparativos se realizaron usando el software Phamerator (Cresawn *et al.*, 2011), siendo umbral de detección 32.5% de identidad con ClustalW y un E-valor de 10^{-50} para BLASTP.

EL modelado de la proteína gp16 (Dit) y gp17 (Tal) se realizó en colaboración con el Dr. Adrian Turjanski y el Dr. Esteban Lanzarotti. Los dominios proteicos de Dit y Tal fueron detectados usando el servidor Pfam (Finn *et al.*, 2016) y el servidor HHpred (Söding *et al.*, 2005) .

En Pfam, para la proteína gp16 o Dit se detectó un dominio *Sipho_tail* (PF05709) con E-valores of $1.1e^{-72}$ para J-1 y $4.6e^{-72}$ para PL-1. Con el objetivo de tener un templado para realizar el modelado, se utilizó el PDB 2x8k (cadena A) que pertenece a la familia pfam *Sipho_tail*. Usando el software HMMER y el perfil de HMM, se alineó la secuencia aminoacídica de gp16 con el templado, correspondiente a la familia *Sipho_tail*. Para ambos fagos, dos regiones (Dom1 y Dom2) no fueron cubiertas por este templado correspondiéndose con inserciones de probabilidad alta en el Pfam HMM logo.

El Dom1 y el Dom2 se subieron posteriormente en forma independiente al servidor HHpredcon el objetivo de detectar estructuras conocidas con homología más remota. El Dom1 resultó con un *hit* significativo contra un dominio de unión a carbohidratos o CBM (PDB 2xon) con 98,4 y 93,2 de probabilidades para J-1 and PL-1, respectivamente. En el caso de J-1, los alineamientos presentaban valores con E-valor de $4.1E^{-06}$, un P-valor= $1.3E^{-10}$, y una identidad de 15% con una cobertura de 80%. Para PL-1, Dom1, los valores fueron E-valor= $1.1E^{-06}$, un P-valor= $3.5E^{-05}$, una identidad de 14% y una cobertura de 61%. El Dom2 no resultó con ningún *hit* significativo tanto para J-1 como para PL-1.

No se encontraron *hits* con la proteína gp17 de J-1 and PL-1 en el servidor de Pfam. En HHpred, en cambio, hubo un *hit* con alta probabilidad (97.8%) contra la cadena A del PDB 1wru (E-valor=0.0055 and P valor= $1.7E^{-07}$), una secuencia que pertenece a *Prophage_tail* (PF06605) family en Pfam. El HMM correspondiente a esta familia se usó para alinear gp17 con la secuencia estructural usada como templado. La identidad entre el templado 1wruA y gp17 PL1/ J-1 en el contexto de la familia Pfam (*Prophage_tail*) cubrieron solamente alrededor del 40% de las secuencias y solo un 7% de identidad. En este caso, se prefirió utilizar el alineamiento de HHPred para el modelado comparativo que tenía un 8% de identidad y un 35% de cobertura. Se utilizó MODELLER (Webb y Sali, 2014) para construir modelos basados en los alineamientos anteriormente mencionados sobre las regiones que habían sido alineadas. Para cada secuencia blanco, se construyeron 10

modelos diferentes y las medidas de calidad se asignaron con GA341 cuando se analizaron dominios globulares.

6. Ensayos con profagos

Inducción de profagos mediante el agregado del mutágeno Mitomicina C (MC)

Un pre-cultivo de *L. casei* BL23 se creció en medio MRS a 37°C bajo condiciones estáticas hasta llegar a una DO_{600nm} de crecimiento exponencial. Luego, las células se inocularon en medio fresco (DO_{600nm} 0,05) y cuando alcanzaron una DO_{600nm} de 0,1-0,2 se le agregó el inductor MC 0,1 µg/ml (MC; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, EEUU). El mismo protocolo se aplicó a mayor escala (1 l) y a distintos tiempos, se recolectaron alícuotas de 25 ml de los cultivos parcialmente lisados de la inducción con MC o sin inducir (0,3 ,6 ,9 horas; ver 4.2). A las 9 horas, el cultivo parcialmente lisado se centrifugó a 3200 x g y se filtraron los sobrenadantes con una jeringa de poro 0.45 µM. Los sobrenadantes fueron ultracentrifugados a 64000 x g durante 2 horas. Los *pellets* conteniendo los fagos se resuspendieron en *buffer* de fago y los stocks fueron guardados a 4 °C.

También se evaluó un protocolo de inducción por UV pero en este caso no se detectó inducción de profagos (Raya y H'bert, 2009).

Ensayos de PCR en tiempo real para la determinación de la escisión de los profagos

La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó usando el ciclador *MyiQ real-time thermal cycler* (Bio-Rad, Hercules, EEUU) con una Real -Mix (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificaron los *attB* y *attP* de los tres profagos que se encontraban completos y el gen cromosomal en copia única, *prtp*. La tabla 5 muestra los oligonucleótidos usados en esta sección. El ADN extraído de los cultivos lisogénicos inducidos por MC a diferentes tiempos (0, 3, 6 y 9 h) se usó como templado (ver sub-item). La frecuencia de escisión de los profagos se determinó con el colorante SYBR Green 1. (Life Technologies, Carlsbad, EEUU). Los oligonucleótidos se diseñaron manualmente y las reacciones de PCR se realizaron en las siguientes condiciones de ciclado (5 min a 95 °C, 40 ciclos de 20 s a 90 °C, 20 s a 52 °C, y 20 s a 72 °C). Los valores umbral (Ct) se determinaron por un análisis automático con el programa IQTM 5 Optical System

(Bio-Rad, Hercules, USA). Las eficiencias de las amplificaciones se determinaron realizando diluciones seriadas y calculadas con la siguiente fórmula $E = \exp^{-1/m}$ siendo E la eficiencia de amplificación y m la pendiente de la curva. En estas condiciones, la eficiencia de las PCRs con los diferentes primers fue comparable llegando a más de 95%.

Los ensayos de PCR se realizaron por triplicado en tres corridas realizadas en forma independiente. En primera instancia, se realizó a una curva estándar con el objeto de calcular las concentraciones desconocidas de los diferentes fragmentos a ensayar. Para la realización de una curva estándar, se utilizaron los *primers* ED47 y ED48 con el objeto de amplificar una región del gen *prtp* a distintas concentraciones de ADN ensayadas (24 ng y luego se realizaron sucesivas diluciones al décimo hasta 10^{-5}). EL ensayo se hizo por cuadruplicado y de forma independiente. Para cada dilución, se calculó el correspondiente Ct. Se graficó el Ct vs el logaritmo de la concentración de ADN obteniéndose una derivación de la función lineal con la siguiente fórmula $\text{Conc} = 10^{((\text{Ct} - 45,113) / -3,315)}$ con la intercepción en 45,113 y la pendiente de -3,315; $R^2 = 0,997$. Para el análisis posterior, los valores de Ct se transformaron en concentración utilizando la ecuación recientemente explicada. La tasa de escisión se calculó como *attB/prtp* (esta tasa puede ser descripta como la fracción de bacterias en el cultivo que sufre escisión). La tasa de circularización se determinó como la relación *attP/attB*, es decir que la concentración del fago circularizado esta relativizada a la fracción de escisión. Los valores medios y el 95% de los intervalos de confianza se calcularon para la tasa de escisión usando el paquete R Rmsic (<http://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>). Los intervalos de confianza no superpuestos se consideraron indicativos de que existen diferencias significativas en la tasa de escisión.

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de IDT (San José, California, EEUU), resuspendidos en agua estéril a una concentración de 250 μM y luego se realizó una dilución de trabajo de 25 μM .

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados como primers en la PCR en tiempo real. Se muestran los Oligonucleótidos utilizados para la determinación de la tasa *attB/prtp* y *attP/attB*.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Posición	Fragmento Amplificado
ED35	TTTATGTTGTTGCCGCGATG	928592-928612	PLE1 attB qPCR
ED36	AACGTTGTTACACGGGCATT	962867-962887	
ED84	GCACGTGAGATTCCGGTTCTC	1043208- 1043228	PLE2 attB qPCR
ED85	ATGCATGTCACGCCTCTATCC	1078436- 1078416	
ED39	GGATCAACCCATTCAACCAG	1248315-1248335	PLE3 attB qPCR
ED40	TTTCCTATCCAAACGACCTCA	1289445-1289465	
ED41	CAAGGGTTCTGCTATCTGTGG	928727-928748	PLE1 attP qPCR
ED42	AATTGCGCTTTATTTTGAGAAA	962735-962757	
ED43	CTACTTTTCCGGCAAGCAA	1043334-1043353	PLE2 attP qPCR
ED44	ACTGTGCAATTTGTGTGCAA	1078255-1078275	
ED45	TGGAGCTCTTTATTTGCCACA	1248473-1248452	PLE3 attP qPCR
ED46	CTTTTACACCGGCGATTTGA	1289206-1289226	
ED47	CATCGAGTTGGCCTTAGCAT	2410754-2410774	prtp qPCR
ED48	ACTGCCGGTGAAAGTTATGG	2410881-2410901	

Extracción de ADN de *Lactobacillus casei* BL23

Se recogieron por centrifugación las células de 10 ml de un cultivo ON (o el equivalente a 10 ml a una DO_{600nm} de 6) en MRS y se lavaron con 10 ml de EDTA 50 mM. El *pellet* se resuspendió en 600 μ l de Tris HCl 50 mM, EDTA 20 mM con 5 mg/ml de lisozima y 30 U de mutanolisina y se incubó 2 hs. a 37 °C. Luego se agregó RNAsa 0,1mg/ml y proteínasa K 0,2 mg/ml. Las células se lisaron añadiendo SDS o Sarkosyl hasta una concentración final del 1% y se incubaron durante 2 h a 50 °C o 16 hs. a 42 °C. Se realizaron 2 extracciones con FCI (25:24:1) y otras 2 extracciones con cloroformo/isoamílico (24:1). Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2 volúmenes de etanol absoluto o 0,6 volúmenes de isopropanol (dependiendo del volumen final alcanzado). Luego de colocado el etanol el ADN se recuperó empleando una varilla de vidrio, se dejó secar bien y la varilla se dejó toda la noche a 4 o C en agua o *buffer* TE (Tris HCl 10 Mm pH 8, EDTA 1 mM). De esta manera se obtiene el ADN menos fragmentado y libre de sales.

7. Clonado, expresión y purificación de proteínas de interés

Clonado de proteínas de interés

Para el clonado se usaron *primers* libres de sales comprados en IDT technologies (pet28-GFP, pet28-mCherry, construcciones 1-6) o Eurofins MWG Operon (Luxemburgo, Luxemburgo) (construcciones A-F). Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua estéril a una concentración de 250 μM y luego se realizó una dilución de trabajo de 25 μM . Los genes 16 y 17 como así también sus diferentes dominios, se amplificaron usando ADN de los fagos J-1 y PL-1 como templado según corresponda. Para la construcción de pet28-GFP se utilizó el plásmido pMP14 como templado para amplificar el gen *Egfp* (Piuri et al., 2009) y para pet28mCherry se amplificó el gen *mCherry* del plásmido pTLGR (García-Cayuela et al., 2012). La tabla 6 detalla todas las construcciones realizadas.

-Para las construcciones pet28-GFP, pet28-mCherry y las construcciones 1-6, el inserto se amplificó por PCR utilizando la Go Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se realizó un clonado con el uso de enzimas de restricción, desfosforilación del vector, ligación inserto-vector y transformación de células *E. coli* TOP10 electrocompetentes (ver sub-ítem).

- Para la construcción por PCR de los vectores sin el paso de ligación (A-F) se utilizó el protocolo de Unger et al. (2010) (Unger et al., 2010). A continuación, se explica brevemente el protocolo con las modificaciones pertinentes. Los *primers* presentan 20-25 nucleótidos que hibridan con el inserto a amplificar y otros 20-25 nucleótidos con homología al vector de destino. Para amplificar el inserto se realiza un primer paso de amplificación por PCR. Para ello se utilizó la polimerasa PHUSION (NEB, Ipswich, Massachusetts, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante. Los fragmentos amplificados se purifican en gel de agarosa y se cuantifica la concentración por $\text{Abs}_{260\text{nm}}$. Posteriormente, se realiza una segunda reacción de PCR con el vector donde se clonará el inserto. En este caso, el propio inserto funciona como *primer* ya que contiene una zona de homología con el vector de destino. Para ello se siguió el siguiente protocolo de PCR para una reacción: ADN (vector de destino) 20 ng, *buffer* de reacción 1X, 200 μM dNTPs, 100 ng del inserto, 0,8 μl PHUSION. Las reacciones de PCR se realizaron en las siguientes condiciones de ciclado 30 s a 95 °C, 20 ciclos de [20 s a 95 °C, 60 s a 60 °C, y 30 s/ kb a 72

°C], 10 min a 72 °C. Luego, el producto de PCR se purificó en columna de purificación y se transformaron células electrocompetentes.

Los clonados fueron corroborados por *colony-PCR* empleando Taq DNA Polimerasa, posterior extracción de ADN plasmídico (Wizard plus sv miniprep, Promega, Madison, EEUU) y liberación del fragmento clonado por digestión con enzimas de restricción. Los clones positivos se secuenciaron por MacroGen Korea (Corea del Sur).

En el apéndice 2, se muestran las secuencias de Dit y Tal de J-1 y los respectivos dominios. Además, se resaltan aquellos seleccionados para las construcciones de la tabla 6.

Preparación de células electrocompetentes

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se inoculó una colonia de TOP10 en 3 ml de LB y se incubó toda la noche a 37°C a 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio LB, partiendo de una DO_{600nm} inicial de 0,05. El cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,7- 0,8, en esta instancia las células se incubaron durante 10 minutos en hielo y se obtuvo el pellet mediante centrifugación (10 min a 3200 x g a 4°C), el pellet se lavó tres veces con 30 ml de agua miliQ. Finalmente, las células se resuspendieron en aproximadamente 1 ml de glicerol 10% v/v en agua miliQ, las células se separaron en alícuotas de 50 µl y se conservaron a -70°C hasta su uso.

Transformación de células electrocompetentes

Para realizar la electroporación se adicionaron entre 50 - 100 ng de ADN a una alícuota de células electrocompetentes y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación (No. catálogo 1652086 de BIO-RAD) estéril y previamente enfriada. La electroporación se efectuó dando un pulso en un electroporador BioRad usando las siguientes condiciones: 200 Ohms, 25 µF y 2,5 kV.

Una vez electroporadas, las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo LB y se dejaron recuperar a 37°C con agitación durante 1 hora para *E. coli*. Transcurrido el tiempo de recuperación se plaquearon e incubaron en el medio correspondiente en presencia del antibiótico indicado para realizar la selección de las bacterias transformantes.

Tabla 6. Construcciones realizadas para la expresión de las proteínas y los dominios de la placa base de J-1 y PL-1.

Vector	Construcción
Pet28-GFP	Se construyó un vector de expresión que genera una fusión de la proteína de interés a la proteína verde fluorescente o GFP en el N-terminal. <i>egfp</i> se amplificó de pMP14 (Piuri et al. 2009) con los primers ED74 (tgactCATATGgtgagcaagggcgaggagc) y ED75 (tgactCATATGgtgagcaagggcgaggagc). El producto de PCR fue digerido con NdeI y BamHI y se clonó en el vector pET28b para dar lugar a Pet28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 31,9 kDa.
Pet28-mCherry	Se construyó un vector de expresión que genera una fusión de la proteína de interés a la proteína mCherry en el N-terminal. <i>mCherry</i> se amplificó del plásmido pTLGR (García Cayuela et al. 2012) usando los primers ED96 (tagcagctagcATGGTTTCAAAGGGGAGG) y ED97 (tgaacggatccTTTATATAATTCGTCATGCCAC). El producto de PCR fue digerido con NheI y BamHI y clonado en Pet28b para dar lugar a la versión Pet28-mCherry o como se denominará mCherry. El tamaño de la proteína esperada es de 32kDa.
1) J-1 GFP-Dit	El gen 16 de J-1 se amplificó usando los primers ED76 (tagcaGAATTCgcaaatttaatttggagg) y ED77 (tgaacGAGCTCcatagcctgcctct). El producto de PCR fue digerido con EcoRI/SacI y se clonaron en pET28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 104,3 kDa.
2) PL-1 GFP-Dit	El gen 16 de PL-1 se amplificó usando los primers ED76 (tagcaGAATTCgcaaatttaatttggagg) y ED77 (tgaacGAGCTCcatagcctgcctct). El producto de PCR fue digerido con EcoRI/SacI y se clonaron en pET28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 98,5kDa.
3) J-1 GFP-Tal	El gen 17 se amplificó usando los primers ED78 (gctaaGAATTCaaggatttttatttggga) y ED79 (gatccAAGCTTctaactgcgtatacctca). El producto de PCR fue digerido con EcoRI/HindIII y clonado en pET28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 142kDa.
4) GFP-CBM1.CBM2	La secuencia correspondiente al dominio C-terminal (129-614) se amplificó usando los primers ED86 (TAGCAgaattcACGGCTGACAACATGCCATA) y ED99 (tgaacgagctcttaGTCTTTGAAGCGGTTAGG). El producto de PCR fue digerido con EcoRI/ SacI y clonado en pET28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 92,7kDa.
5) GFP-CBM1	La secuencia correspondiente al dominio CBM1 (129-322) se amplificó usando los primers ED86 (TAGCAgaattcACGGCTGACAACATGCCATA) y ED87 (TGAACgagctcCTAAGGtaCCGCTGGGTTAGGtGACC). El producto de PCR fue digerido con EcoRI/ SacI y clonado en pET28-GFP. El tamaño de la proteína esperada es de 50.6kDa.
6) mCherry CBM2	La secuencia correspondiente al dominio CBM2 (368-614) se amplificó usando los primers ED98 (tagcaggatccCCCGATGAGACTGATGGTT) y ED99 (tgaacgagctcttaGTCTTTGAAGCGGTTAGG). El producto de PCR fue digerido con BamHI/ SacI y clonado en pET28-mCherry. El tamaño de la proteína esperada es de 56,9kDa.
A-Dit (129-679)	La secuencia correspondiente a la región 129-679 de Dit de J-1 se amplificó usando los primers ED103 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTATAGCCATGCCTCCTGCC) y ED104 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAATCCGCTGGGTTAGGTGACCA). A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. El tamaño de la proteína esperada es de 60,8 kDa.
B-Dit (129-322)	La secuencia correspondiente a la región 129-322 de Dit de J-1 se amplificó usando los primers ED104 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAATCCGCTGGGTTAGGTGACCA) y ED105 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAATCCGCTGGGTTAGGTGACCA). A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. El tamaño de la proteína esperada es de 21,23 kDa.

C-Dit (368-614)	La secuencia correspondiente a la región 368-614 de Dit de J-1 se amplificó usando los <i>primers</i> ED106 (CGAGAACCTGTACTTCCAATCAATGGGCTCTCCCGATGAGACTG) y ED107(GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTATTTGAAGCGGTTAGGAATATCAT) A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. EL tamaño de la proteína esperada es de 27,7kDa.
D-Dit (1-322)	La secuencia correspondiente a la región 1-322 de Dit de J-1 se amplificó usando los <i>primers</i> ED102 (CGAGAACCTGTACTTCCAATCAATGGCAAATTAATATTTGGAGGTCAT) y ED105 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAATCCGCTGGGTTAGGTGACCA). A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. EL tamaño de la proteína esperada es de 35 kDa.
E-Dit (114-358)	La secuencia correspondiente a la región 114-358 de Dit de J-1 se amplificó usando los <i>primers</i> 107 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTATTTGAAGCGGTTAGGAATATCAT) y 114 (GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAATAGCAGTTAACACACCGTGC). A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. EL tamaño de la proteína esperada es de 26,4 kDa.
F-Dit (1-679)-Tal (1-393)	La secuencia correspondiente a la región 1-679 de Dit y 1-393 de Tal de J-1 se amplificó usando los <i>primers</i> 102 (CGAGAACCTGTACTTCCAATCAATGGCAAATTAATATTTGGAGGTCAT) y 112(GGATCCGTATCCACCTTTACTGTTATTAGATCTGCTCAGCAAGTTGC) . A través del clonado libre de ligación se clonó en pLic07. EL tamaño del multímero esperado es de 579kDa (75KDa Dit + 43KDa de Tal)

Expresión de proteínas

Los plásmidos recombinantes se transformaron en las cepas *E. coli* BL21 (DE3)pLysS (Novagen) (pet28-GFP, pet28 mCherry y las construcciones 1-6) o T7 Express (NEB, Ipswich, Massachusetts, EEUU) (construcciones de A-F). Las células fueron crecidas a 37 °C en medio mínimo o LB (A-F) o medio Terrific (A-F) hasta que la DO_{600nm} llegara a 0,6-0,7. Luego, la expresión fue inducida por el agregado de 0,5 mM (1-6) o 1mM de IPTG toda la noche a 23 °C (pet28-GFP, pet28 mCherry y las construcciones 1-6) o 17°C (A-F).

Las células se centrifugaron a 3200 x *g* durante 10 minutos y los *pellets* bacterianos se homogenizaron y se congelaron en *buffer* de lisis. Luego del descongelado, se agregó DNasa I (20 µg/ml) y MgSO₄ (1mM) seguido del lisado de células por sonicación. El *debris* celular y las células enteras se eliminaron con una centrifugación a 16000 x *g* por 30 minutos. El sobrenadante clarificado se utilizó para la purificación proteica.

Purificación de proteínas

La purificación de proteínas se realizó en un sistema AKTA FPLC utilizando una columna de níquel (5 mL His Trap Crude column GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) equilibrada en *buffer* A. Las proteínas se eluyeron con el agregado de *buffer* B. Después del desalado, y cuando fue necesario, se llevó a cabo un corte por TEV proteasa

(1:20 TEV proteasa: proteína) seguida de una segunda purificación en Ni²⁺-NTA y conservando en este caso el *flow through* con la proteína de interés que ya no tiene el *His-tag*. En los casos A-F se procedió a realizar una cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 75HR 26/60 (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) o Superose 6 HR16/60 (Multímero E) equilibrada en 10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl o 10 mM HEPES pH 7.5 300 mM NaCl o PBS dependiendo de la proteína. La calidad de la preparación final se comprobó por *SDS-PAGE* (dependiendo del peso molecular de la proteína se realizó un gel de poliacrilamida entre 7,5%- 15%) y espectrofotometría UV.

Para la construcción F, también se agregó glicerol al 10% durante toda la purificación.

Para la formación del complejo CBM1-VHH52 la proteína y el nanoanticuerpo se agregaron en una relación 1:1,2, se los dejó reposar unos minutos y se realizó nuevamente una cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 75HR 26/60.

Para los ensayos de cristalización, los dominios purificados fueron concentrados en el mismo *buffer* que el utilizado en la cromatografía de exclusión por tamaño. Para ello se utilizó un Amicon con el *cutoff* correspondiente (10 kDa -100kDa, dependiendo del dominio) (Millipore, Billerica, EE.UU).

Zimograma

Una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (0.2% m/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, EEUU) se incorporó en un gel de poliacrilamida 10 % conteniendo solo 0,001% SDS. Se sembraron 15 μ l de GFP- Tal (aproximadamente 1 μ g) en *buffer* de siembra. Previo al sembrado las muestras se calentaron a 100°C por 5 minutos. Luego de una corrida electroforética de 2 h a 100 V, el gel se incubó 30 minutos en agua miliQ a temperatura ambiente. El gel se colocó en *buffer* de renaturalización y se incubó a 37°C en agitación durante toda la noche. Luego se realizaron sucesivos lavados con agua miliQ y se tiñó durante 2 h con azul de metileno en agitación a temperatura ambiente. El gel se destiñó con agua miliQ por 48-72h en agitación a temperatura ambiente. La actividad enzimática se observó por la presencia de una zona clara en el gel donde se produjo la degradación del peptidoglicano y la lisis de la bacteria indicadora.

Proteólisis controlada

Con el objeto de determinar dominios estables, se realizó una proteólisis controlada de la proteína GFP-Dit. La proteína GFP-Dit se trató con la proteínasa tripsina (que corta péptidos hacia el C-terminal de los residuos Lys y Arg) y la proteínasa GluC (que corta los péptidos hacia el C-terminal de Glu) a diferentes concentraciones ($2,5 \times 10^{-3}$ g/l, $2,5 \times 10^{-2}$ g/l y 0,25 g/l) durante 45 minutos a temperatura ambiente para tripsina y a 37 °C para GluC. Los ensayos se visualizaron por SDS-PAGE. Los resultados con la proteínasa GluC, no dieron una respuesta convincente y por ende se discontinuaron. Por otro lado, la digestión con tripsina mostró bandas de posible proteólisis y se procedió a analizar el resultado con la concentración óptima ($2,5 \times 10^{-2}$ g/l) y a diferentes tiempos (45min, 90min, 16hs). Las bandas nuevamente se resolvieron por análisis de SDS-PAGE. Las bandas estables en el tiempo se determinaron por MS.

Ensayos de interacción proteína-bacteria utilizando microscopía de fluorescencia

Los ensayos de unión de las proteínas fluorescentes a las células usando las proteínas purificadas, J-1 GFP-Dit, PL-1 GFP-Dit, GFP, mCherry, J-1-GFP-Tal y los correspondientes dominios de Dit se hicieron como se describió en (Habann *et al.*, 2014) con algunos ajustes. Brevemente, 0,3 ml de bacterias en crecimiento exponencial se centrifugaron y resuspendieron en 100 μ l de *buffer* de fago modificado y se incubaron con un 1 μ g (o hasta 3 μ g en el caso de los dominios de Dit) de la proteína recombinante correspondiente durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces con PBS (5 min a 16000 x g) y la unión a las bacterias se detectó por microscopía de fluorescencia (Axiostar Plus; Carl Zeiss) con un objetivo 100X con aceite de inmersión y contraste de fase. Cuando la unión se realizó en presencia de azúcares, J-1 GFP-Dit y PL-1 GFP-Dit se preincubaron con 0.25 M de L- ramnosa, D- glucosa o N-acetil glucosamina o el CWPS purificado de *L. casei* BL23 por 30 minutos a temperatura ambiente. Después, el protocolo se continuó como lo expuesto con anterioridad.

El software Carl Zeiss Axio Vision versión 4.6 Se utilizó para la toma de imágenes. En todos los experimentos, se utilizó el mismo tiempo de exposición. Para la detección de la proteína verde fluorescente (EGFP), se usó el filtro CLON ZsGreen1 (42002-HQ 470/30X,

HQ520/40m, Q495LP) de Chroma Technology Corporation y para la detección de la proteína mCherry se usó el juego de filtros 64 HE mPlum shift free (E) Carl Zeiss EX BP 587/25, BS FT605, EM BP 647/70. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante el uso del Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.) se empleó la misma configuración de brillo y contraste para todas las imágenes obteniendo imágenes comparables entre sí.

8. Anticuerpos anti-Dit

Imunización y prueba de inmunogenicidad

Se produjeron anticuerpos en ratón contra J-1 GFP-Dit empleando un protocolo de inmunización de 10 semanas en 5 ratones en colaboración con Hebe Perez. Originalmente se inyectaron 300 µg de proteína pura provenientes del gel de poliacrilamida en 2 dosis pero la inmunidad fue indetectable (inyección el día 1 y estimulación el día 16). El protocolo se extendió con el agregado de 2 dosis de un total de 300 µg (día 30 y día 45) de proteína soluble con el adyuvante incompleto de Freund (50 µl por inyección).

El suero de cada ratón fue probado individualmente en ensayos de *dot blot* en diluciones 1/250 a 1/2000. Dado que la combinación de los anticuerpos no mostraba una disminución en la detección de la proteína, se decidió utilizar los sueros combinados para los ensayos subsiguientes. Primero se realizó un *western blot* para determinar la dilución óptima de uso. Empleando la dilución 1/2000 se detectaron niveles de proteína hasta 0,125 µg considerados suficientes para ensayos futuros.

Ensayo de *Western Blot* (WB)

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) activada en metanol. La transferencia se realizó en un equipo ECL semi-Dray Blotters (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido) a 0.45 mA durante 1 hora. Luego, la membrana se incubó con *buffer* de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Se realizaron 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con PBST. Se incubó con una dilución 1/2000 de anticuerpo primario anti-Dit de J-1 hecho en ratón durante 90 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron 3 lavados sucesivos con PBST y se incubó con una dilución 1/50000 de anticuerpo secundario anti-ratón asociado a biotina

hecho en cabra (Thermo Scientific, Waltham, EEUU). Luego de 3 lavados con PBST, se incubó durante 5 minutos con Str-Hrp (del inglés, *Streptavidin- Horseradish peroxidase*). Luego de sucesivos lavados con PBST, se realizó el revelado con el sustrato quimioluminiscente ECL Pierce siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, Waltham, EEUU).

El ensayo de *Dot blot* es una adaptación al ensayo de *WB*. En este caso, se colocaron distintas concentraciones del antígeno directamente en la membrana de PVDF, previamente activada, a modo de gota (5 μ l a una concentración 10 μ g/ml). Luego se continúa con el protocolo descrito para *WB* utilizando distintas concentraciones/ tiempos del anticuerpo primario a ensayar.

Inmunoelectromicroscopía

Los fagos previamente purificados en CLCs fueron dializados por 20 minutos usando TGB *buffer* con una membrana de diálisis (Novagen D-tube TM dialyzer MWCO 3.5 kDa, Merck millipore, Kenilworth, EEUU). Los fagos dializados se pusieron en grillas de Níquel con la descarga eléctrica correspondiente durante 20 segundos y luego se incubaron ON (20°C) con el anticuerpo primario (anti-Dit) diluido 1/2000 en *buffer* TGB. Luego, las grillas se lavaron en TGB y se incubaron por 1 hora con una dilución 1/40 del anticuerpo secundario (realizado en cabra, anti-ratón IgG conjugado con partículas de oro 5 nm-Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU). La fijación se realizó usando 0.25% v/v glutaraldehído por 20 minutos en PBS a temperatura ambiente. La grilla se lavó y se secó 5 veces con agua destilada y filtrada agregando gotas de 20 μ l. Finalmente, las muestras fueron teñidas con 2% ácido fosfotúngstico (pH 7.0) por 30 segundos y se observaron en un microscopio electrónico Tecnai Spirit operado a 120 kV y a 2000- por 2000- pixel CCD.

Ensayos de neutralización e inhibición de la adsorción con anticuerpos

Los bacteriófagos (1×10^5 UFP) se desafiaron contra los anticuerpos anti-Dit por 20 minutos. Luego, se agregaron 100 μ l de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (1×10^8 UFC) y se siguió el mismo protocolo que el descrito para los ensayos de inhibición de la adsorción pero con células bacterianas en vez de paredes.

Para los ensayos en medio líquido se adaptó el protocolo descrito en De Haard et al. (2005). Para ello, en 20 ml de MRS, se adicionaron los bacteriófagos con un título de 1×10^3 UFP/ml final junto con los anticuerpos anti-Dit a diferentes concentraciones (diluciones 1:200 a 1:3200) durante 20 minutos en 20 ml de medio MRS. Luego, se agregó 1% de un cultivo ON y 10 mM de CaCl_2 a cada muestra. Los controles sin fagos o sin anticuerpos se realizaron en paralelo. Se monitoreó a lo largo del tiempo la $\text{DO}_{600\text{nm}}$. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Ensayo de inmunofluorescencia para evaluar la unión proteína-bacteria.

0.5 ml de células crecidas en fase exponencial de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 se lavaron 3 veces con PBS. Las células se resuspendieron en 50 μl de PBS, se agregaron 3 μg de la proteína a ensayar (CBM1, CBM2 o el control negativo) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y luego se incubaron con el anticuerpo anti-Dit (dilución 1/200) por una hora. Las células se lavaron nuevamente 3 veces con PBS y se agregó una dilución 1/200 de anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra Alexa Fluor-647 (Life Technologies, Carlsbad, EEUU) por una hora. Las células se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en 30 μl de PBS y se observaron por microscopia de fluorescencia.

Los ensayos que se describen a continuación (cristalización de proteínas, reconstrucción de la placa base del fago J-1 y la producción de nanoanticuerpos) se realizaron en el laboratorio del Dr. Christian Cambillau en la Universidad de Marsella, Marsella, Francia durante una pasantía de 8 meses. La Dra. Silvia Spinelli, la Dra. Aline Desmyter y el Dr. Christian Cambillau colaboraron activamente para poder avanzar en el proyecto.

9. Cristalización y determinación de la estructura del CBM2

Los ensayos de cristalización iniciales se realizaron en microplacas de 96 pocillos utilizando un robot Mosquito[®] para la carga de la proteína (TTP Labtech, Melbourn, Reino Unido) y un robot Tecan-Genesis[®] (LabX, Midland, Canada) para el manejo de los diferentes

kits/soluciones de cristalización. El cribado primario de todas las construcciones se realizó con la técnica de caracterización de *Stura (Molecular Dimensions, Suffolk, Reino Unido)*, con el objeto de identificar la solubilidad de las mismas en una variedad de agentes precipitantes (PEGs y sales) y tres valores de pH (5,5; 7; 8,5) a 20°C en una configuración de difusión del vapor en gota sentada.

La cristalización del CBM2 se realizó con la proteína a una concentración de 8 g/l. A los 4 días se observaron cristales proteicos. Después de una semana de equilibrado a 20°C, 8 de las condiciones probadas mostraron cristales preliminares prometedores. A continuación, se optimizó el crecimiento de los cristales en la condición 1.2M citrato de sodio y 10 mM borato de sodio a un pH 8,5. Se prepararon placas de cristalización sucesivas modificando la concentración de citrato de sodio y el pH en la misma configuración (difusión del vapor en gota sentada). Finalmente, los mejores cristales se obtuvieron a una concentración 8 g/l de proteína en 0,8-1,2M de citrato de sodio como precipitante y 10 mM de borato de sodio entre pH 8,9 y 9,7. Los cristales se pusieron en contacto con diferentes metales pesados a efectos de obtener las fases experimentales necesarias para la resolución de la estructura. El cristal con CsI/Nal se colectó en la línea de cristalografía de proteínas ESRF BM14 (ESRF, Grenoble, Francia) equipada con un detector MAR 225 CCD, a una temperatura de 100K. Las imágenes de la difracción se procesaron y escalan con el paquete HKL2000 (Denzo and Scalepack) (Otwinowski, 1993). El conjunto de datos se colectó en un solo derivado del cristal a una longitud de onda de rayos X 1.7712 Å hasta 1.7 Å. La subestructura de los átomos pesados se obtuvo (se pudo resolver) mediante los programas SHELXC/D/E (Sheldrick, 2008) usando la interfase gráfica HKL2MAP (Pope, 2004). Esta subestructura fue refinada y utilizada para el cálculo de las fases con el paquete Phenix AutoSol (Adams *et al.*, 2010) Con este procedimiento se obtuvieron mapas fácilmente interpretables que permitieron construir el modelo entero del CBM2. La construcción manual de los modelos fue realizada con el programa COOT (Emsley *et al.*, 2010) y alternativamente refinada con autoBUSTER (Blanc *et al.*, 2004). Se consiguió una resolución final de 1,28 Å con los datos nativos colectados en la línea de cristalografía de proteínas Proxima 1 (Soleil, Saint Aubin, Francia) en un detector DECTRIS Quantum 6 a una temperatura de 100K. Las imágenes de difracción fueron colectadas y puestas a escala con el paquete XDS/XSCALE (Kabsch, 2010). Los detalles de los parámetros de colección de datos y estadísticas de procesamiento de los mismos se

muestran en la tabla 7. La estructura tridimensional obtenida a partir del cristal impregnado con CsI/NaI se utilizó como modelo de reemplazo molecular con Molrep (Vagin y Teplyakov, 2010). Las coordenadas atómicas se depositaron en el Protein Data Bank (PDB 5LY8). Las estructuras moleculares y sus densidades electrónicas fueron representadas mediante el programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015), VMD (Humphrey *et al.*, 1996) o UCSF Chimera <http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>

Los intentos de cristalización del CBM1 (en el *buffer* 300mM NaCl y 10 mM HEPES pH 7,5) se hicieron en primera instancia con una batería de diferentes kits de cristalización. En este caso, se optó por preparar las proteínas con seleno-metionina durante su sobreexpresión para la resolución del problema de las fases. Para un protocolo detallado, véase Protein Expression and Purification Core Facility https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/seleno/. Después de dos semanas de equilibrado a 20°C se observaron cristales proteicos pero pequeños. Luego de varias optimizaciones, se decidió realizar el crecimiento de los cristales por el método de gota suspendida en las siguientes modalidades 2µl x 2µl, 1µl x 1µl y 1,5µl x 1µl correspondiendo el primer volumen a la proteína concentrada a 5g/l y el segundo a la solución de cristalización (60mM Mes Na, 40mM Tris, 33mM NaCl, AmSO₄ (1,4-2 M) 10% PEG 400 pH 6,7-7,2). Se observaron mejoras en los cristales a la semana de equilibrado. Los cristales fueron crio-protegidos en la solución de cristalización suplementada con glicerol al 14 -18 % v/v, montados en cryo-loops y vitrificados en un flujo de nitrógeno. Los datos se colectaron en la línea de cristalografía de proteínas Proxima 1 (Soleil, Francia) en un detector DECTRIS Quantum 6 a 100K pero, pese a nuestros esfuerzos la difracción no superó los 7 Å.

A modo preliminar, se probaron una batería de diferentes kits de cristalización para el complejo CBM1-VHH52 a una concentración de 5,2 g/l en PBS. Los kits de cristalización PEG I y PEG II (Quiagen, Hilden Alemania) presentaron resultados alentadores con formación de pequeños cristales a las dos semanas de equilibrado. Se espera poder retomar el proyecto a la brevedad.

Tabla 7. Colección de datos y estadísticas del refinamiento.

	CBM2 Csl/NaI	CBM2 nativa
PDB	-	5LY8
Colección de datos	ESRF BM14	Soleil PX1
Longitud de onda (Å)	1.7712	0.953
Gupo espacial	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
celda (Å), ángulos (°)	48.6, 64.4, 74.5 / 3 x	49.0, 63.7, 74.5 / 3 x
	90.0	90.0
Límites ^a de resolución (Å)	50.0-1.97 (2.04-1.97)	34.4-1.28 (1.31-1.28)
Rmerge ^a	0.061 (0.212)	0.034 (0.432)
CC1/2	99.9 (98.6)	100.0 (93.2)
Reflexiones únicas ^a	15081 (768)	60896 (4359)
N.ano	13028 (664)	
Media((I)/d.e(I)) ^a	31.0 (8.8)	28.7 (3.8)
Completo ^a (%)	88.2 (46.5)	99.8 (97.6)
Multiplicidad ^a	13.3 (7.5)	7.0 (5.9)
SigAno ^a	1.52 (1.3 at 2.3 Å)	-
CCano	65 (56 at 2.3 Å)	-
REFINAMIENTO		
Resolución ^a (Å)		34.4-1.28 (1.31-1.28)
Número de reflexiones ^a		60732 (4217)
Número de átomos de proteína / moléculas de agua		1923/317
Número de reflexiones en el juego de datos libre (test set)		3037
R _{work} /R _{free} ^a (%)		0.184 / 0.198 (0.203/0.217)
r.m.s.d. longitud de enlaces (Å) / ángulos (°)		0.012 / 1.21
B-wilson / Factor B-promedio		14.0 / 20.4
Ramachandran plot: favorecidos / permitidos / excluidos (%)		97.5 / 2.5 / 0

^a los números entre paréntesis se refieren a la capa de mayor resolución:

10. Microscopía electrónica por tinción negativa de la placa base del fago J-1.

Se depositaron 6 µl del fago J-1 previamente purificado en ClCs (10¹⁰ UFP/ml) sobre grillas cubiertas de una fina película de carbón hidrófilo y se incubaron por un minuto, luego se retiró el exceso de líquido y se lavó 2 veces con agua MiliQ filtrada y por último se tiñeron con 10 µl de 1% de acetato de uranilo por 30 segundos. Se colectaron 200 imágenes en un microscopio electrónico Tecnai Spirit operado a 120 kV, usando una cámara FEI Eagle CCD (2K x 2K) a una magnificación de 110,000x (tamaño del pixel 4.83 Å/pixel). La reconstrucción tridimensional se realizó con el procedimiento de partícula única y el paquete

informático XMIPP (Sorzano *et al.*, 2004). Se seleccionaron manualmente 865 placas base y se sometieron a procesos de alineamiento y de clasificación de las partículas utilizando el programa Xmipp (Scheres *et al.*, 2008) imponiendo una simetría C6. El volumen inicial se determinó usando la aproximación del consenso de muestras al azar (RANSAC) (de la Rosa-Trevín *et al.*, 2013) con tres clases en 2D. La resolución del volumen final se estimó en 20 Å usando la correlación de la celda de Fourier a un criterio de 0,5. El mapa de microscopía electrónica se depositó en el EMDDataBank database, (EMD-4150).

11. Nanoanticuerpos

Generación de VHH

Para la generación de nanoanticuerpos, en primer lugar se inmunizó una llama (*Llama lama*). Para ello, 1 mg del complejo Dit (1-679)-Tal (1-393) se resuspendió en 10 mM HEPES pH 7.5 300 mM NaCl y se inyectó en forma subcutánea cuatro veces, con intervalos de una semana, seguido de una quinta inyección dos semanas más tarde (Ardèche lamas, Francia). Los linfocitos se aislaron de una muestra de sangre obtenida 5 días luego de la última inmunización. Se generó una biblioteca de *phage display* usando los procedimientos estándar explicados en Nguyen *et al.* (2001). Brevemente, a partir del ARNm total se sintetizó ADNc por transcripción reversa con un oligo dT. El ADNc se usó como templado para la amplificación por PCR de las secuencias que se corresponden con la región variable de los anticuerpos de cadena pesada, los amplicones se digirieron con PstI y NotI para clonarlos en los mismos sitios del fagémido PHEN4 y crear una biblioteca de nanoanticuerpos (Nguyen *et al.*, 2001)..

La tecnología *phage display* consiste en exponer péptidos, proteínas o anticuerpos en la superficie de partículas de fagos. Una característica importante de este sistema es la fusión traduccional de la secuencia que codifica para el nanoanticuerpo al gen que codifica una proteína de la proteína pIII del fago M13. Las partículas de fagos que presentan nanoanticuerpos en su superficie pueden ser seleccionadas con una diana de interés (en este caso CBM1-CBM2). Todas las partículas de fagos que no se unan a la diana de interés son eliminadas mediante sucesivos lavados. Las partículas de fagos capturadas son eluidas primeramente y después son utilizadas para infectar *E. coli* TG1 y permitir la amplificación

de estos fagos para ser utilizados en un nuevo ciclo de selección (o ronda de *panning*). De esta forma, se puede seleccionar de una gran población de fagos, aquellos que expresen el nanoanticuerpo de interés en su superficie. 3 rondas de *panning* resultaron en el aislamiento de nanoanticuerpos que reconocían los dominios CBM1-CBM2. Se procedió a la expresión periplásmica (ver sub-item) de los 48 clones de interés en la cepa *E. coli* TG1 del *panning* 2 y *panning* 3. Luego de realizar la extracción periplásmica de las proteínas, se procedió a realizar un ensayo de ELISA. Los nanoanticuerpos se seleccionaron por el ensayo de ELISA contra CBM1 o CBM2 (ver sub-ítem). Luego se extrajeron los plásmidos que provenían de los clones con un resultado positivo (40 clones) de interacción nanoanticuerpo-proteína de interés y se secuenciaron. Las secuencias de interés se subclonaron en el vector de expresión PHEN6 que además de tener la señal *pelB*, se encuentra fusionado a un 6x *his* tag y desprovisto de la proteína III. Las expresiones posteriores se realizaron en la cepa *E. coli* WK6.

Expresión periplasmática

Se realizó la expresión de los clones de nanoanticuerpos seleccionados del *panning* 2 y 3 en la cepa *E. coli* TG1 en placas de 24 pocillos. Para ello, en cada pocillo se agregó 4 ml de medio Terrific + glucosa 0,1% y el clon correspondiente. Se incubó 4-5 horas a 37°C a 200 rpm hasta que la DO_{600nm} llegó a 0,8 y luego se agregó 1mM IPTG para la respectiva inducción.

Para la expresión a volúmenes mayores, se realizó un escalado manteniendo las proporciones

Extracción periplasmática

Se centrifugaron las placas durante 10 min a 3200 x *g*. Los pellets se resuspendieron en 75 μ l de *buffer* TES frío y se mantuvo en hielo por 2 horas. Luego se agregaron 150 μ l de *buffer* TES $\frac{1}{4}$ frío por una hora. Se centrifugó por 30 min a 12000 x *g* a 4°C en eppendorf. El sobrenadante se guardó a 4°C con el objeto de realizar un ensayo de ELISA.

Para la extracciones periplasmáticas a volúmenes mayores, se realizó un escalado manteniendo las proporciones y luego se procedió a realizar el punto Purificación de proteínas.

ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

En una microplaca de 96 pocillos se coloca el antígeno a probar, en este caso se utilizó la proteína purificada CBM1 y CBM2 (100µg/ml en PBS) y la placa se incubó ON a 4°C. Al día siguiente, se vació la placa y se lavó 3 veces con 300 µl de PBS. La placa se bloqueó con 300 µl PBS- 2% leche durante 2 horas a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados más de 300 µl en PBS y se agregó 100 µl de la fracción periplasmática de los clones TG1 /PHEN4 ON.

El revelado se realizó de la siguiente forma:

En primer lugar se lavó la placa con 3 lavados de 300 µl de PBST y 3 lavados con 300 µl PBS. Luego se agregaron 100 µl de una dilución 1/1000 de anticuerpo anti-HA hecho en ratón en PBS-leche 2% durante 1 hora a 37°C. La placa se volvió a lavar 3 veces con PBST y 3 veces con 300µl PBS. Se agregaron 100 µl de anticuerpo anti-ratón HRP 1/1000 en PBS-leche 1% durante 1 hora a 37°C. Luego, se volvieron a repetir 3 lavados de 300 µl con PBST y 3 lavados con 300 µl de PBS. Finalmente, se agregaron 100 µl de sustrato TMB, tetrametilbencidina (Sigma T5525-50TAB) (9,9 ml NaAc 100mM pH 6 + 2µl H₂O₂+ 100µl TMB 100x) que da una coloración azul. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 1M (color amarillo) y la placa se leyó a Abs_{450nm}.

Interferometría en biocapas (BLI)

Previo a realizar los ensayos de BLI, las proteínas CBM1 y CBM2 se “biotinilaron” a un radio 1:1 usando el EZ-Link NHS-PEG4-biotin *kit* (Perbio Science, Helsingborg, Suecia). La reacción se detuvo removiendo el exceso de biotina a través de una columna de desalado Zeba Spin (Perbio Science, Helsingborg, Suecia). El equipo OctetRed96 (ForteBio, Menlo Park, EEUU) se utilizó para los ensayos de BLI. Los ensayos se hicieron en placas negras de 96 pocillos. El volumen total de las muestras (o solo del *buffer*) fue de 0,2 ml y las revoluciones por minutos fueron de 1000 rpm por cada paso de carga, asociación y disociación. El experimento se realizó a 25°C.

Los tips sensores de estreptavidina (ForteBio, Menlo Park EEUU) se hidrataron en 0.2ml de *buffer kinetic* (KB; ForteBio, USA) por 20 minutos previo a su uso. Como control inicial, los tips se cargaron con la proteína biotinilada (inmovilización) a 5 µg/ml en el KB

seguido de un paso de *quenching* usando biocitina. La reacción control fue guardada y luego se monitoreó la unión entre las proteínas y los diferentes nanoanticuerpos a 200 nM. La asociación-disociación se llevó a cabo por 500 segundos, cada una. La disociación completa del nanoanticuerpo-proteína, se realizó con 3 incubaciones sucesivas en glicina 10mM durante 5 segundos y posterior neutralización en KB durante 5 segundos.

Para el ensayo del VHH52-CBM1, se procedió de la misma forma pero en este caso, el nanoanticuerpo se inmovilizó en el sensor realizando los pasos anteriormente descriptos. Luego, se utilizó un rango de concentraciones del CBM1 (0-400nM) para calcular la constante de disociación.

Ensayo de unión proteína- bacteria en presencia de nanoanticuerpos usando citometría de flujo.

Para los ensayos de citometría de flujo, se siguió el mismo protocolo usado en los ensayos de inmunofluorescencia aunque con algunas modificaciones. 0,5 ml de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 a DO_{600nm} de 1 se lavaron con *buffer* de fago modificado. Después del lavado, las células se incubaron con 1 μ g de Dit-GFP o con la mezcla de Dit-GFP/ VHH (500nM) por 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron en un vol final de 250 μ l de PBS, el número de células en la muestra final fue de aproximadamente 1×10^6 UFC, suficiente para evaluarlas en el citómetro. Las células incubadas con Dit-GFP/VHH o solo la proteína Dit-GFP se analizaron con el citómetro de flujo BD FACSAria II flow usando una fuente de luz 488-nm. En paralelo, se realizaron ensayos solo con GFP-Dit y solo con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. La población bacteriana primero se determinó con los perfiles SSC y FSC que fueron reconocidos usando PBS como blanco. Se guardaron 10000 eventos en cada experimento. Las células fluorescentes y no fluorescentes se discriminaron de acuerdo a la intensidad de fluorescencia (GFP-H). Se empleó el software BD FACSAria software (BD FACSDiva, firmware version 6.1.3) para adquirir los valores y el software FlowJo v10 para análisis de los datos.

Ensayo de neutralización usando nanoanticuerpos

Para los ensayos en medio líquido se adaptó el protocolo descrito en (De Haard *et al.*, 2005). Para ello, en 20 ml de MRS, se le adicionaron los bacteriófagos con un título de 1×10^3 UFP/ml final y los nanoanticuerpos 01, 04, 07, 18, 52, 57 de forma individual o una mezcla de nanoanticuerpos anti-CBM1 (04, 52, 57) o anti-CBM2 (01, 07, 18) a 500 nM durante 20 minutos. Luego se agregó a cada muestra 1% de un cultivo ON y 10 mM de CaCl_2 , los controles sin fagos o sin anticuerpos se realizaron en paralelo. Los ensayos se realizaron por triplicado de forma independiente. El mismo ensayo pero con diferentes concentraciones (20-500 nM) del VHH57 se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente.

ANEXO I – MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y BUFFERS

-Medio MRS

Composición: peptona de caseína 19 g/l; extracto de levadura 4 g/l; extracto de carne 8 g/l; D(+) glucosa 20 g/l; fosfato de potasio di-básico 2 g/l; citrato de di-amonio 2 g/l; Tween 80 1 g/l; acetato de sodio 5 g/l; sulfato de magnesio 0,2 g/l; sulfato de manganeso 0,04 g/l; pH 6,5.

Disolver 55,3 gr del medio MRS y llevar a 1 L con dH₂O. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm).

-MRS agar

Disolver 55,3 gr del medio MRS, agregar 15 gr agar. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm).

-MRS top agar

Disolver 55,3 gr del medio MRS, agregar agar 7,5 gr, glicina 7,5 gr y llevar a 1 L con dH₂O. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm).

-Medio LB

Composición: Bacto Triptona 10g/l, Extracto de levadura 5g/l, NaCl 10g/l. Disolver 25gr del medio y llevar a 1l con agua destilada. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm).

-Medio TB o terrific

Composición: 12g/l Triptona, 24g/l Extracto de levadura. 5g/l Glicerol.

Disolver los componentes en 900 ml de agua destilada. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm). Una vez frío, agregar 100ml de una solución filtrada de 0.17M KH₂PO₄ and 0.72M K₂HPO₄

-Caldo nutritivo

Composición: puripeptona 5 g/l, extracto de carne 3g/l, NaCl 8 g/l. pH final: 7,3

Disolver los componentes en 900 ml de agua destilada. Autoclavar 15 min a 121°C (1 atm)

- PBS (buffer fosfato)

Composición: NaCl 136,9 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 8 mM.

-PBST (ELISA, WB)

Composición: PBS, Tween 20 (0,1%).

-Buffer de fago

Composición: TrisHCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 68,5 mM, MgSO₄ 10 mM. Autoclavar cada solución por separado (15 min a 121°C) y luego mezclar.

-Buffer de fago modificado

Se respeta la composición del *buffer* de fago y se agrega 0.1% Tween 20, 10 mM CaCl₂

-Buffer TE pH8

Composición: 10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA pH8

-Buffer de siembra (gel de poliacrilamida)

Composición: 40% Glicerol, 240 mM Tris HCl pH 6.8, 8% SDS, 0,04% azul de bromofenol, 5% beta-Mercaptoetanol

-Buffer de renaturalización (zimograma)

Composición: 25mM Tris-HCl, pH 7,4 con 1% Tritón X 100

-Buffer de bloqueo (WB)

Composición: PBS, 0,05% Tween20, 5% Leche mólico

-TGB *buffer* (inmunoelectromicroscopía)

Composición: 200 mM Tris, 500 mM glicina, 1% v/v butanol pH 7.5

-TES *buffer* (extracción periplasmática)

Composición: 0,2M Tris-HCl pH 8, 0,mM EDTA, 0,5M sacarosa

-Buffer de lisis (Purificación de proteínas)

50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0.1 mg/ml lisozima, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

-Buffer A (purificación proteínas)

Composición: 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol

-Buffer B (purificación proteínas)

Composición: buffer A suplementado con 250mM de Imidazol

-Acetato de sodio 3M (extracción de ADN)

Composición: NaOAc.3H₂O 40.8 g/100 ml. Disolver primero en 80 ml de dH₂O, ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial y dH₂O hasta 100 ml. Esterilizar por filtración.

-FCI (extracción de ADN de fago)

Composición: Preparar la mezcla en una campana de gases, con guantes. Se añaden 1 mL de alcohol isoamílico, 24 ml de cloroformo y 25 ml de fenol. Se mezcla bien y se almacena a 4°C

ANEXO II—Secuencias aminoacídicas de la proteína gp16 y gp17 de J-1 y sus posibles dominios

J-1 Dit 1-679 (proteína completa)

MANLIFGGHKIGSSSLQFSAARGVFSEVENTTQSVGASDGEMLIRSLKSRRIIPVTYDFVALSRREFERQLAPLLYSSGVQKLIIDDRPDEFWYAKVDGKIDMDRA
 YFLGTGTINFLVPDGHIAHSVATKTADNMPYKDVPVNMLTDSGFESGRTPANYVWGDGKDNANRLFLVGGQYPSFPTPFGTYMLRIENQSSDSSTSPDQYSVFPL
 SKPVTIKAGETWTYSYKYAAAGSATGQASDYLTTSDLSPIWGLSMGHANRNTDGGQNTWHQFSATMTADSDITVTNRYRFGFKVKTYSGGGWICIDNIKLEKN
 DTASPWSPNADPEYSDAITVPNAGTYPSEPVITATINGDDGVLTAINDQGSVLQFGSPDETDGFVKQKSERYHLDNFQPTPTGVLNNGVTAFFPYEHGND
 ANVQSGPFYANGIAYPSTERTASNYWNGPMSGTIPKNSNGSNTANFQFVNRVNVGTNAAEVGRFEFNLTQGGKIVASLALFDDASNDQWVFGTVDYD
 SQAQMLFFDLLPRNYRDGNYNNAVITKMGDQLTFRDLRIDLDGGIETRTVSGFSSVPIDGWTAWFPGFSDQRGWSINWQDSYFEWINVDYWDIPNRFK
 DGDVVKIDVANRRVLVNGAEDRTLQGTIGNDWGGFKIQPGNNTIELLTSSWAKQCKAEVSWQEAWL

Dominios

Dit (N-terminal + cinturón) 1-128

MANLIFGGHKIGSSSLQFSAARGVFSEVENTTQSVGASDGEMLIRSLKSRRIIPVTYDFVALSRREFERQLAPLLYSSGVQKLIIDDRPDEFWYAKVDGKIDMDRA
 YFLGTGTINFLVPDGHIAHSVAT

CBM 1 129-322 (insertado entre N-terminal + cinturón y el primer dominio galectina)

B-Dit (129-322)

KTADNMPYKDVPVNMLTDSGFESGRTPANYVWGDGKDNANRLFLVGGQYPSFPTPFGTYMLRIENQSSDSSTSPDQYSVFPLSKPVTIKAGETWTYSYKYAAA
 GSATGQASDYLTTSDLSPIWGLSMGHANRNTDGGQNTWHQFSATMTADSDITVTNRYRFGFKVKTYSGGGWICIDNIKLEKNDTASPWSPNAD

Dit dominios galectinas 323-367 y 615-679

PEYSDAITVPNAGTYPSEPVITATINGDDGVLTAINDQGSVLQF//
 DGDVVKIDVANRRVLVNGAEDRTLQGTIGNDWGGFKIQPGNNTIELLTSSWAKQCKAEVSWQEAWL

CBM2 368-614 (insertado entre los dominios galectinas)

C-Dit (368-614)

GSPDETDGFVKQKSERYHLDNFQPTPTGVLNNGVTAFFPYEHGNDANVQSGPFYANGIAYPSTERTASNYWNGPMSGTIPKNSNGSNTANFQFVNRV
 NVGTNAAEVGRFEFNLTQGGKIVASLALFDDASNDQWVFGTVDYDGSQAQMLFFDLLPRNYRDGNYNNAVITKMGDQLTFRDLRIDLDGGIETRTVSGF
 SVPIDGWTAWFPGFSDQRGWSINWQDSYFEWINVDYWDIPNRFK

Dit 1-322

D-Dit (1-322)

MANLIFGGHKIGSSSLQFSAARGVFSEVENTTQSVGASDGEMLIRSLKSRRIIPVTYDFVALSRREFERQLAPLLYSSGVQKLIIDDRPDEFWYAKVDGKIDMDRA
 YFLGTGTINFLVPDGHIAHSVATKTADNMPYKDVPVNMLTDSGFESGRTPANYVWGDGKDNANRLFLVGGQYPSFPTPFGTYMLRIENQSSDSSTSPDQYSVFPL
 SKPVTIKAGETWTYSYKYAAAGSATGQASDYLTTSDLSPIWGLSMGHANRNTDGGQNTWHQFSATMTADSDITVTNRYRFGFKVKTYSGGGWICIDNIKLEKN
 DTASPWSPNAD

Dit 129-679

A-Dit (129-679)

KTADNMPYKDVPVNMLTDSGFESGRTPANYVWGDGKDNANRLFLVGGQYPSFPTPFGTYMLRIENQSSDSSTSPDQYSVFPLSKPVTIKAGETWTYSYKYAAA
 GSATGQASDYLTTSDLSPIWGLSMGHANRNTDGGQNTWHQFSATMTADSDITVTNRYRFGFKVKTYSGGGWICIDNIKLEKNDTASPWSPNADPEYSDAIT
 VPNAGTYPSEPVITATINGDDGVLTAINDQGSVLQFGSPDETDGFVKQKSERYHLDNFQPTPTGVLNNGVTAFFPYEHGNDANVQSGPFYANGIAYPSTER
 TASNWNGPMSGTIPKNSNGSNTANFQFVNRVNVGTNAAEVGRFEFNLTQGGKIVASLALFDDASNDQWVFGTVDYDGSQAQMLFFDLLPRNYRDGN
 YNAVITKMGDQLTFRDLRIDLDGGIETRTVSGFSSVPIDGWTAWFPGFSDQRGWSINWQDSYFEWINVDYWDIPNRFK DGDVVKIDVANRRVLVNGAE
 DRTLQGTIGNDWGGFKIQPGNNTIELLTSSWAKQCKAEVSWQEAWL

Dit 114-358 Cinturón CBM1 extendido

E-Dit (114-358)

INFLVPDGHIAHSVATKTADNMPYKDVPVNMLTDSGFESGRTPANYVWGDGKDNANRLFLVGGQYPSFPTPFGTYMLRIENQSSDSSTSPDQYSVFPLSKPVTIK
 AGETWTYSYKYAAAGSATGQASDYLTTSDLSPIWGLSMGHANRNTDGGQNTWHQFSATMTADSDITVTNRYRFGFKVKTYSGGGWICIDNIKLEKNDTASPW
 SPNADPEYSDAITVPNAGTYPSEPVITATINGDDGVLTAI

RESULTADOS

Capítulo 1
Caracterización a nivel genómico y proteómico
de los fagos J-1 y PL-1

1. Caracterización a nivel genómico y proteómico de los fagos J-1 y PL-1

1.1. Aportes previos desarrollados en el laboratorio

Los fagos J-1 y PL-1 fueron aislados en los años '60 debido a problemas en la fermentación de la leche fermentada Yakult en Japón y, aunque fueron estudiados por décadas (Watanabe *et al.*, 1984; Nakashima *et al.*, 1994; Kakita *et al.*, 1995; Kashige *et al.*, 2001), sus genomas no eran conocidos.

El aumento en el número de fagos y bacterias secuenciadas proveen una poderosa información para comprender su evolución, estudiar la interacción fago-hospedador y desarrollar herramientas de resistencia que eviten la pérdida de los cultivos bacterianos en los bioprocesos (Sturino y Klaenhammer, 2007). En la actualidad, los bajos costos y el fácil acceso a la secuenciación, hacen difícil pensar en la manipulación y estudio de los virus sin contar con su secuencia.

Este trabajo comenzó con la secuenciación y anotación de los genes de los genomas de los fagos J-1 y PL-1. La descripción de la secuencia genómica de J-1, se realizó en 2012 (Dieterle, 2012). El fago J-1 presentó un genoma de 40931 pb con un contenido G+C de 44,8% y extremos cohesivos de 10 bases simple cadena en el extremo 3' (final izquierdo- 3'-CGGTCGGCCT). Su disposición genómica no se alejó de la clásica disposición de los fagos con cola presentando los módulos: empaquetamiento, morfogénesis, lisis, cambio genético, replicación y la región derecha (figura 18). Su análisis genómico reveló 63 marcos de lectura abierto (ORFs) sin presencia de ARNt. 57 genes se transcriben de izquierda a derecha mientras que los 6 restantes lo hacen en la dirección contraria.

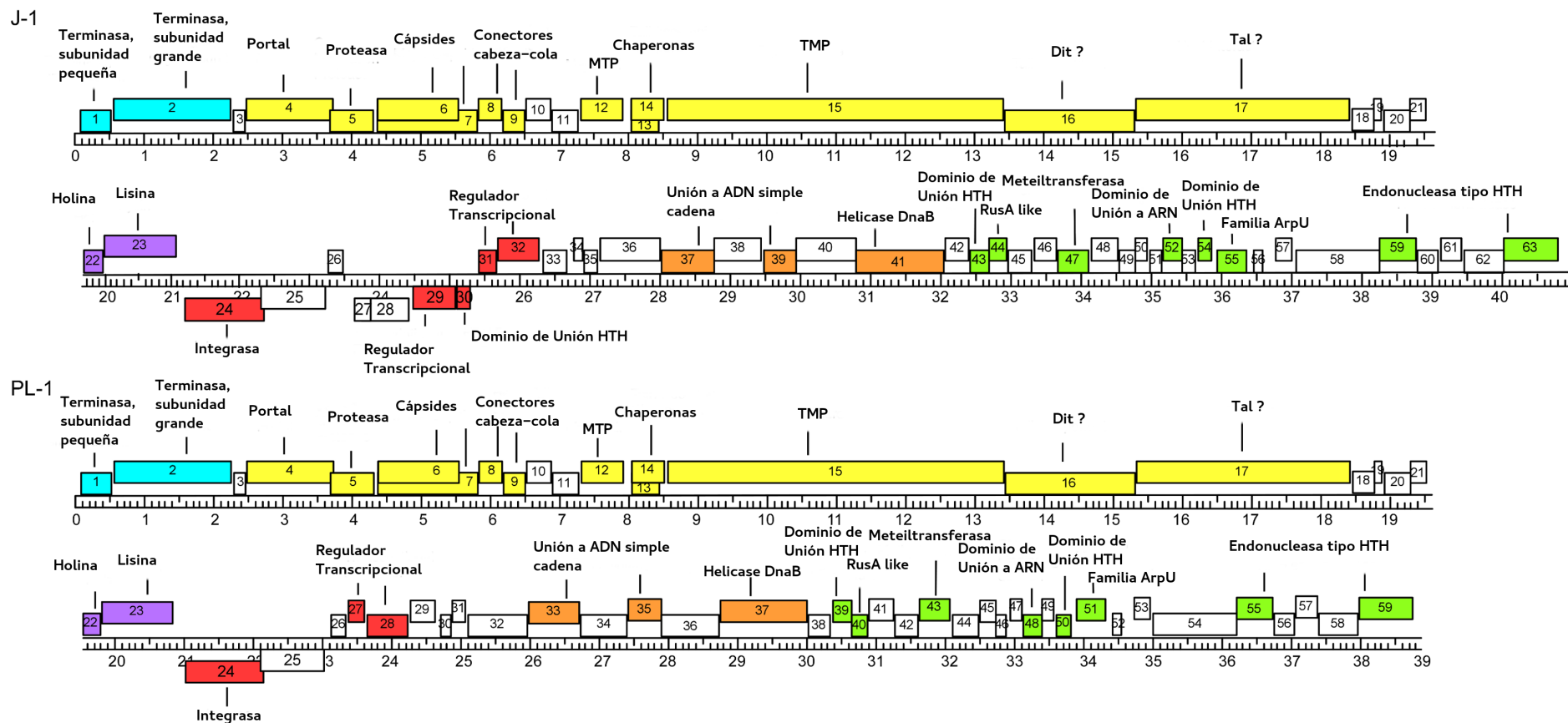


Figura 18. Mapas genómicos del bacteriófago J-1 y PL-1. Los genes están mostrados en rectángulos arriba o debajo del genoma dependiendo si se transcriben hacia la derecha o a la izquierda, respectivamente. Los putativos genes están divididos en los siguientes módulos: empaquetamiento (celestes), estructura del virión (amarillo), lisis (violeta), integración e inmunidad (rojo), y replicación (anaranjado). Las posibles proteínas codificadas por los genes en el extremo derecho están coloreadas en verde y los marcos de lectura abierto sin función asignada aparecen en blanco.

1.2. Secuenciación del fago PL-1

La secuenciación del fago PL-1 mostró una extensión de 38880 pb con un contenido de G+C 44,9%. Presenta extremos cohesivos de 10 bases en la extensión 3' (final izquierdo, 3'-CGGTCGGCCT), 4 bases menor que la secuencia GAACGGTCGGCCTC descrita previamente (Nakashima *et al.*, 1994). El análisis de *dot plot* (figura 19) muestra la similitud entre las secuencias de los fagos J-1 y PL-1. La secuencia de PL-1 es idéntica a la de J-1 a excepción de dos regiones en el genoma: la región de cambio genético, donde el fago PL-1 carece de 1.9-kpb correspondiéndose a la región de 23513 a 25418 de J-1 (detallado en 1.3.3) y en los genes 16 y 17 (detallado en 1.4). La alta homología entre sus genomas se condice con la observación de que anticuerpos policlonales anti-J-1 también reconocen a la partícula viral de PL-1 (Watanabe *et al.*, 1970). A su vez, el fago PL-1 se aisló dos años más tarde cuando se usaba una cepa resistente a J-1 para la fermentación del mismo producto (Hino y Ikebe, 1965). Estas similitudes y diferencias encontradas a nivel genómico podrían aportar indicios de cómo evolucionaron los fagos para contraatacar los mecanismos de resistencia bacterianos.

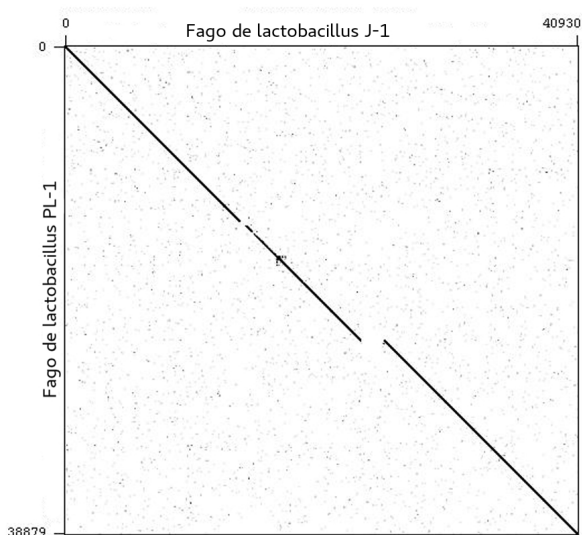


Figura 19. Comparación de la secuencia nucleotídica de los fagos J-1 y PL-1. Se compararon las secuencias de los fagos J-1 y PL-1 a través de un *dot plot* usando el programa Gepard (Krumisiek *et al.*, 2007)

1.3. Organización del genoma de PL-1 y sus diferencias con J-1

El análisis del genoma de PL-1 reveló 59 potenciales marcos de lectura (63 en J-1) sin genes que codifiquen para ARNt. Los codones más utilizados como inicio de la traducción fueron ATG (73.5%), con un menor uso de GTG (17%) y TTG (9.5%).

La delección de PL-1 resultó de la pérdida de 4 genes correspondiéndose a los genes 27 a 30 en el fago J-1. PL-1 presenta 57 ORFs que se transcriben de izquierda a derecha y 2 desde la derecha. La organización genómica se divide en los mismos módulos anteriormente descritos y representados en la figura 18. La tabla 8 resume los genes, homologías encontradas y posibles funciones. La presencia de una integrasa de la familia de la tirosina sugiere un origen temperado de estos fagos.

La comparación nucleotídica de la secuencia de los fagos J-1 y PL-1 con otros fagos de BAL mostraron una alta similitud de secuencia con el fago A2 y Lrm1, principalmente en lo que respecta a los genes de empaquetamiento y al módulo estructural (figura 20). Dada la alta identidad entre J-1 y PL-1, a continuación se hará mención a los números de los genes correspondientes a PL-1 considerando que los de J-1 son idénticos y se marcarán las diferencias cuando las hubiere.

Decidimos examinar por microscopía electrónica de transmisión (MET) a los fagos J-1 y PL-1 observando que tienen una morfología clásica de *Siphoviridae* con colas largas no contráctiles como la mayoría de los fagos que infectan a BAL. J-1 presenta una cabeza isométrica de 65 ± 4 nm de diámetro y el largo de la cola es de 283 ± 8 nm (Figura 21 A-B). PL-1 también tiene una cabeza isométrica de 62 ± 4 nm de diámetro y un largo de cola de 290 ± 7 nm (figura 21 C-D). Estos resultados coinciden con los reportados anteriormente por Watanabe *et al.*, (1970). En la mayoría de los viriones, se observó en la punta de la cola una estructura de placa base y una extensión en forma de espícula (ver flechas en figura 21).

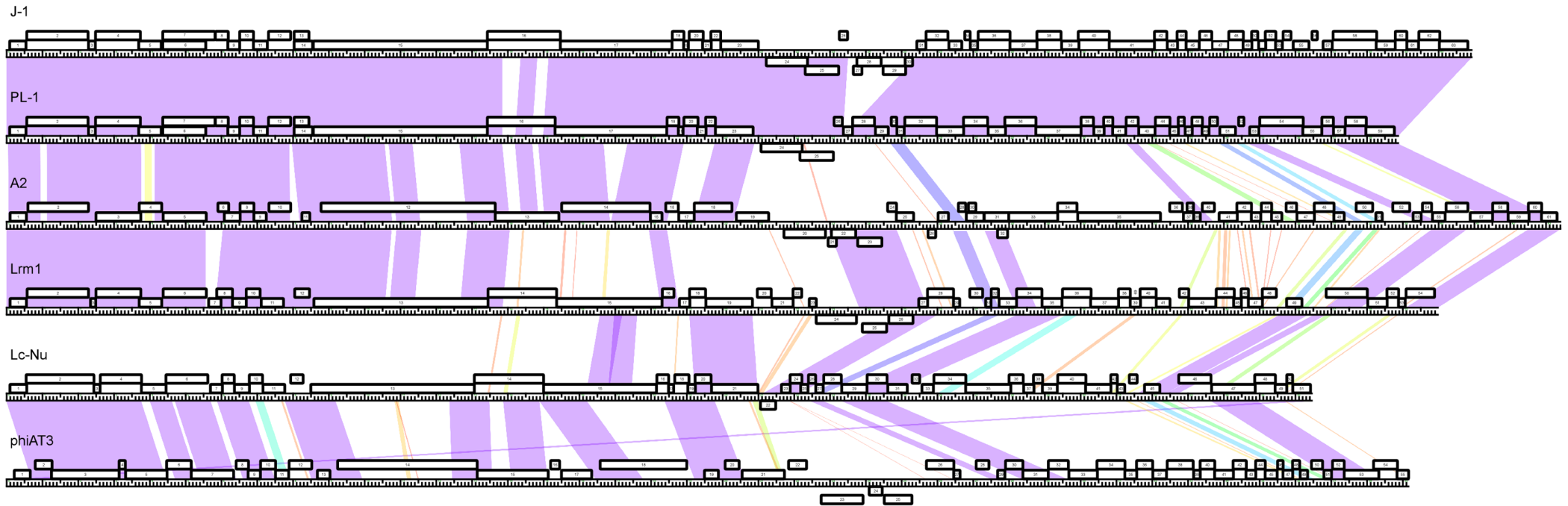


Figura 20. Comparación genómica de fagos de *Lactobacillus*. Alineamiento nucleotídico de los fagos J-1, PL-1, Lrm1, A2, phiAT3 y Lc-Nu usando Phamerator (Cresawn et al., 2011). Los genomas están representados por líneas horizontales con los genes en rectángulos arriba (transcriptos de izquierda a derecha) o debajo de cada genoma (transcriptos de derecha a izquierda).

Tabla 8. Posibles genes y productos de los fagos de *Lactobacillus* PL-1 y J-1

Gen	Inicio - Fin (aa)	Gen	Inicio - Fin (aa)	Mejor homología encontrada	%	Posible Función
cad.				(organismo, gen)	Ident.	
PL-1		J-1				
1F	90 - 545 (152)	1F	90 - 545 (152)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 1	97	Terminasa, sub. pequeña
2F	567 - 2279 (571)	2F	567 - 2279 (571)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 2	96	Terminasa, sub. grande
3F	2291 - 2482 (64)	3F	2291 - 2482 (64)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1,3	96	
4F	2488 - 3741 (418)	4F	2488 - 3741 (418)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 3	96	Portal
5F	3695 - 4324 (210)	5F	3695 - 4324 (210)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 4	85	Proteasa
6F	4366 - 5568(401)	6F	4366 - 5568(401)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 5a	99	Cápside
7F	4366 - 5825 (487)	7F	4366 - 5825 (487)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 5b	99	Cápside
8F	5836 - 6195 (120)	8F	5836 - 6195 (120)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 6	75	Unión cabeza-cola
9F	6185 - 6514 (110)	9F	6185 - 6514 (110)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 7	92	Unión cabeza-cola
10F	6514 - 6900 (129)	10F	6514 - 6900 (129)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 9	98	
11F	6900 - 7286 (129)	11F	6900 - 7286 (129)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1,10	98	
12F	7320 - 7937 (206)	12F	7320 - 7937 (206)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 10	98	MTP
13F	8036 - 8449 (138)	13F	8036 - 8449 (138)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 12	99	Chaperonas de la cola
14F	8036 - 8550 (172)	14F	8036 - 8550 (172)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 12	90	Chaperonas de la cola
15F	8572 - 13434 (1621)	15F	8572 - 13434 (1621)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 13	97	TMP
16F	13435 - 15327 (631)	16F	13435 - 15474 (680)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 13	45	Dit
17F	15324 - 18443 (1040)	17F	15471 - 18590 (1040)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 15	85	Tal
18F	18453 - 18782 (110)	18F	18600 - 18923 (108)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 15	100	
19F	18769 - 18900 (44)	19F	18916 - 19047 (44)	<i>Lactobacillus</i> rhamnosus Lc-Nu, 17	84	
20F	18925 - 19317 (131)	20F	19072 - 19464 (131)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 18	97	
21F	19298 - 19540 (81)	21F	19445 - 19687 (81)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 19	79	
22F	19530 - 19802 (91)	22F	19677 - 19949 (91)	<i>Lactobacillus</i> phage PL1	99	Holina
23F	19804 - 20856 (351)	23F	19951 - 21003 (351)	<i>Lactobacillus</i> phage PL1	100	Lisina
24R	22228 - 21077 (384)	24R	22375 - 21224 (384)	<i>Lactobacillus</i> casei BL23	100	Integrasa
25R	23099 - 22164 (312)	25R	23246 - 22311 (312)	<i>Lactobacillus</i> casei BL23	96	
26F	23118 - 23348 (77)	26F	23265 - 23495 (77)	<i>Lactobacillus</i> casei BL23	100	
		27R	23632 - 23564 (24)	<i>Lactobacillus</i> casei ATCC334	95	
		28R	23895 - 23656 (74)	<i>Lactobacillus</i> Phage A2, 21	66	
		29R	25117 - 24488 (210)	<i>Latobacillus</i> phage phiAT3, 25	88	Represor
		30R	25311 - 25105 (69)	<i>Lactobacillus</i> rhamnosus LMS2-1	100	HTH dominio de unión
27F	23379 - 23633 (85)	31F	25430 - 25684 (85)	<i>Latobacillus</i> rhamnosus LMS2-1	100	Represor
28F	23636 - 24247 (204)	32F	25687 - 26298 (204)	<i>L. paracasei</i> ATCC 25302	89	Anti-Represor
29F	24275 - 24634 (120)	33F	26326 - 26685 (120)	<i>Lactobacillus</i> phage phiAT3, 25	97	
30F	24716 - 24868 (51)	34F	26767 - 26919 (51)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 31	98	
31F	24873 - 25076 (68)	35F	26924 - 27127 (68)	<i>Lactobacillus</i> phage phiAT3, 26	91	
32F	25094 - 25981 (296)	36F	27145 - 28032 (296)	<i>Enterococcus</i> phage phief11	29	
33F	25981 - 26736 (252)	37F	28032 - 28787 (252)	<i>Lactobacillus</i> phage LBR48	59	ssDNA proteína de unión
34F	25094 - 25981 (225)	38F	28784 - 29458 (225)	<i>Lactobacillus</i> rhamnosus HN001	94	
35F	27422 - 27907 (162)	39F	29473 - 29958 (162)	<i>L.paracasei</i> subsp. paracasei 8700:2	88	ssDNA proteína de unión
36F	27888 - 28757 (290)	40F	29936 - 30808 (290)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 34	78	HTH dominio de unión
37F	28754 - 30016 (421)	41F	30805 - 32067 (421)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 35	98	DnaB Helicasa
38F	30018 - 30362 (115)	42F	32069 - 32413 (115)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 36	90	
39F	30375 - 30662 (96)	43F	32426 - 32713 (96)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 37	91	HTH proteína de unión
40F	30649 - 30903 (85)	44F	32700 - 32954 (85)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 38	93	RusA like
41F	30900 - 31265 (122)	45F	32951 - 33316 (122)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 39	99	
42F	31277 - 31615 (113)	46F	33328 - 33666 (113)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 43	96	
43F	31627 - 32082 (152)	47F	33678 - 34133 (152)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 40	96	Metiltransferasa
44F	32093 - 32500 (136)	48F	34144 - 34551 (136)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 48	57	
45F	32493 - 32738 (82)	49F	34544 - 34789 (82)	<i>L. paracasei</i> ATCC 25302	94	
46F	32731 - 32901 (57)	50F	34782 - 34952 (57)	<i>L. paracasei</i> ATCC 25302	56	
47F	32926 - 33123 (66)	51F	34977 - 35174 (66)	<i>L.paracasei</i> ATCC 25302	88	
48F	33113 - 33406 (98)	52F	35164 - 35457 (98)	<i>Lactobacillus</i> phage Lb338-1	81	RNA dominio de unión
49F	33399 - 33590 (64)	53F	35450 - 35641 (64)	<i>Haemophilus parasuis</i> SH0165	38	
50F	33611 - 33829 (73)	54F	35662 - 35880 (73)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu,44	90	HTH dominio de unión
51F	33894 - 34331 (146)	55F	35945 - 36382 (146)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 49	96	Familia ArpU
52F	34417 - 34566 (50)	56F	36471 - 36617 (50)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 54	98	
53F	34728 - 34982 (85)	57F	36779 - 37033 (85)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 57	89	
54F	35007 - 36224 (406)	58F	37058 - 38275 (406)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 47	96	
55F	36211 - 36741 (177)	59F	38262 - 38792 (177)	<i>Lactobacillus</i> phage A2,60	97	HNH endonucleasa
56F	36745 - 37065 (107)	60F	38796 - 39116 (107)	<i>Lactobacillus</i> phage phi AT3, 52	78	
57F	37068 - 37391 (108)	61F	39119 - 39442 (108)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 61	89	
58F	37404 - 37985 (194)	62F	39455 - 40036 (194)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 62	95	
59F	37975 - 38769 (265)	63F	40026 - 40820 (265)	<i>Lactobacillus</i> phage Lrm1, 54	98	HNH endonucleasa / dominio P-loop NTPasa

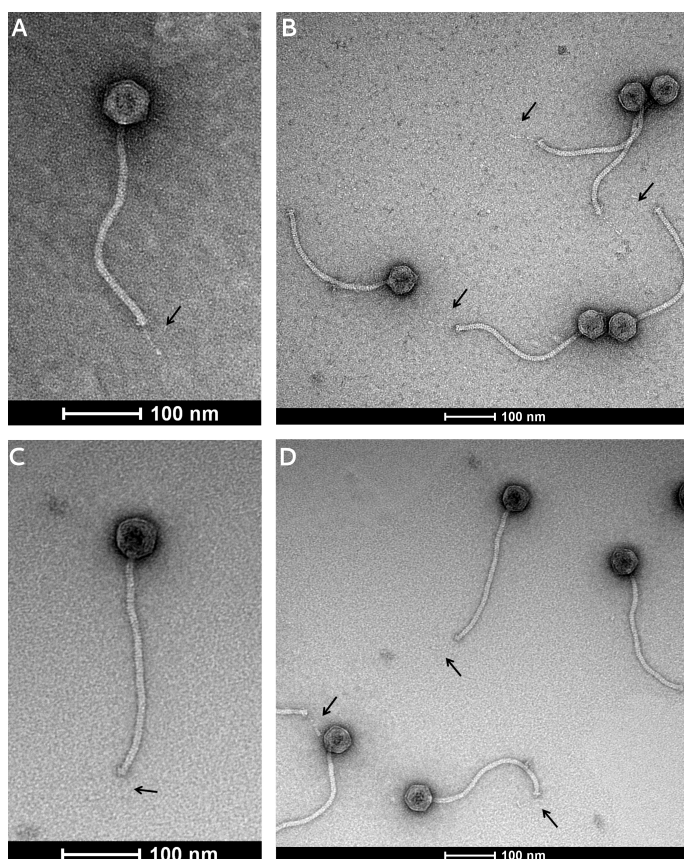


Figura 21. MET de los fagos J-1 y PL-1. MET del fago J-1 (A-B), MET del fago PL-1 (C-D). Las flechas indican la prolongación tipo espícula observada en la mayoría de los fagos.

1.3.1. Empaquetamiento y Morfología del virión

Las proteínas involucradas en el empaquetamiento y la estructura del virión se encuentran codificadas por los genes 1 a 17 (figura 18, genes coloreados en celeste y amarillo). En el módulo de empaquetamiento, los genes 1 y 2 presentan homología a las terminasas, subunidad pequeña y grande, respectivamente. Se ha descrito que la subunidad pequeña reconoce y se une a secuencias específicas del ADN a encapsidar y posiciona a la subunidad grande que finalmente corta al ADN (Kutter *et al.*, 2005). gp1 de PL-1 es similar a la terminasa del fago Lrm1 aunque difiere de la del fago A2 que está codificada por el gen 61. Se demostró que el producto del *orf* 61 forma un complejo con el sitio COS del ADN en presencia de ATP induciendo ligaciones intramoleculares en presencia de la ligasa del fago T4 (García *et al.*, 1997). En los fagos J-1 y PL-1, el último gen sobre el final derecho del genoma (genes 63 y 59 respectivamente) corresponde a la fusión del *orf* 60 y *orf* 61 de A2, similar a lo que ocurre en el *orf* 54 del fago Lrm1 (Durmaz *et al.*, 2008).

Aún hoy, no contamos con información biológica sobre si el producto de este gen tiene un rol en el empaquetamiento del ADN junto con gp1 y gp2 pese a tener una posible función de endonucleasa HNH.

El módulo de morfogénesis comienza con el gen 4 que codificaría para la proteína portal seguido de la proteasa (gen 5) y las proteínas de la cápside (genes 6 y 7). Estas proteínas están involucradas en la morfogénesis de la cabeza que resulta de un procedimiento complejo. En los fagos con cola, el ensamblaje generalmente comienza con el complejo de iniciación de la proteína portal en el que la proteína *scaffold* (o andamio) y las cápsides son ensambladas. Primero, se forma una estructura de pre-cabeza formada alrededor de la *scaffold* y posteriormente hay un proceso de maduración que involucra la proteólisis de la *scaffold* y clivaje de proteínas virales mayores precursoras. El ADN se encapsida previo a que las estructuras de la cola se adosen a la partícula (Kutter et al., 2005) Las proteínas del virión se observaron en un *SDS-PAGE* y fueron sometidas a espectrometría de masa (MS) con el objeto de atribuirles identidad (figura 22, tabla 9).

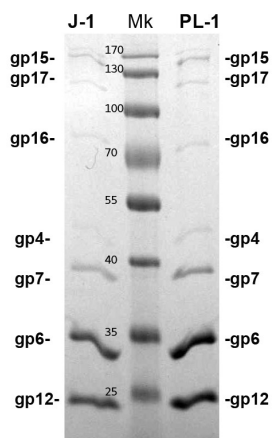


Figura 22. Identificación de las proteínas asociadas al virión.
SDS-PAGE mostrando a las proteínas virales de PL-1 y J-1.

Tabla 9. Proteínas presentes en el virión identificadas por espectrometría de masa.

gp	PM	Cobertura ^a	# PSMs ^b	PM	Coberatur	# PSMs ^b
	[kDa]			[kDa]		
	J-1			PL-1		
gp4 (Portal)	46,3	51,91	45	46,3	52,39	51
gp6 (Cápside_S)	29,90	55,44	837	29,9	82,54	561
gp7 (Cápside_L)	38,3	69,61	644	38,3	74,33	548
gp12 (MTP)	22,1	74,27	220	22,1	80,58	337
gp15 (TMP)	173,2	60,27	882	173,2	59,04	476
gp16 (Dit)	75,1	51,91	91	69,2	25,99	29
gp17 (Tal)	112,7	43,17	45	113,0	39,90	88

^aPorcentaje de secuencia identificada en función de los péptidos.

^bPSMs, número de péptidos totales encontrados.

De acuerdo a la secuencia nucleotídica, el gen que codifica para la proteína mayor de la cápside podría presentar un cambio en el marco de lectura que permitiría la traducción de dos proteínas de la cabeza con regiones C-terminales diferentes. La secuencia *slippery* CCCAAAA está presente sobre el final del gen 6 en el que a través de un cambio en la programación traduccional (-1) facilitaría la formación de un producto final 86 aminoácidos más largo. Además, ambos genes presentan similitud de secuencia con los respectivos genes en A2 que son necesarios para la infectividad del virión (García *et al.*, 2004). El análisis de la separación electroforética por *SDS-PAGE* de las proteínas del virión (figura 22) y el posterior análisis por MS evidenciaron que se traducen dos productos (gp6 y gp7) a partir de la misma secuencia (figura 23, tabla 9). La cuantificación de los productos proteicos reveló que la proporción de gp6 (forma corta) está 2,5 veces más representada que gp7 (forma larga) en la partícula viral. Asimismo, resultó llamativo que los tamaños de las bandas de estas proteínas en el gel de *SDS-PAGE* eran menores que los tamaños esperados a partir de la traducción de la secuencia de ADN. Los resultados de MS indicaron que las proteínas gp6 y gp7 también son procesadas proteolíticamente y no contienen los primeros 123 residuos, similar a lo reportado para la subunidad gp5 de A2 (García *et al.*, 2003). El análisis de MS (tabla 9) indicó la presencia de un péptido comenzando en AVPTADAS como posible N-terminal, pero como el residuo previo era una arginina (R), este péptido podría haber sido el resultado de la digestión por tripsina (corta péptidos del lado C-terminal del residuo lisina K o arginina R). Con el objetivo de corroborar si existía un clivaje proteico postraduccional, ambas proteínas fueron extraídas individualmente del gel, digeridas por Lys-C (que solo corta después de K) y nuevamente se realizó un análisis por MALDI-TOF. En este caso, la única forma de obtener el péptido que comenzaba en AVPTADAS era si este se encontraba en el comienzo de la proteína porque R (aminoácido previo a la secuencia AVPTADAS) no es reconocido por Lys-C. El péptido fue identificado sin inconvenientes y posteriormente sometido a MS/MS para confirmar su identidad. La secuencia N-terminal (1-123) de la proteína gp6 o gp7 no se detectó. La herramienta bioinformática HHpred localiza homologías entre proteínas y predice estructuras (Söding *et al.*, 2005). Utilizando esta herramienta, para los residuos 1-123 de gp6 y gp7 se encontró homología máxima con el dominio N-terminal (2-103) de gp5 del colifago HK97 (conocido como dominio Delta). Durante el ensamblaje de HK97, estos residuos son removidos para formar una pro-cabeza II precursora de la cabeza madura (Hendrix y Johnson, 2012). Estos

aminoácidos formarían una estructura predominantemente de α hélices pareciéndose a las proteínas *scaffold* del fago P22 de *Salmonella* y el fago phi29 de *Bacillus* (Benevides et al., 2004) sugiriendo un rol similar para el N-terminal de gp6- gp7 en el ensamblaje de las cápsides de J-1 y PL-1.

El producto de los genes 8-11 han sido propuestos como adaptadores cabeza-cola debido a su ubicación en el genoma; sin embargo, no existe análisis experimental que pueda confirmarlo. No pudieron detectarse péptidos correspondientes a estas proteínas por MS sugiriendo que están en muy baja cantidad o no son componentes del virión. En esta región, el genoma es altamente compacto y es probable que ocurra la transcripción acoplada de todos estos genes.

Los fagos de *Siphoviridae* presentan colas largas no contráctiles formadas por numerosas copias de la proteína mayor de la cola que forman un tubo donde, en el momento apropiado, el ADN genómico atraviesa el canal para ser inyectado en la bacteria. En PL-1, existen 6 posibles proteínas relacionadas con la cola. El gen 12 codifica para la proteína mayor de la cola con una alta identidad de secuencia al fago A2 (*orf 10*) aunque sin rastros de cambios en el marco de lectura como el encontrado informáticamente en A2 y Lrm1. Los genes 13 y 14 probablemente codifiquen para chaperonas con el típico cambio en el marco de lectura conservado en fagos de *Caudovirales* (5'-AAAAAAT). Estas proteínas ayudan al ensamblaje de la cola y su identificación suele ser dificultosa debido a que no tienen una secuencia nucleotídica conservada (Xu et al. 2004). Aunque no resulta habitual encontrarlas en el virión, pudimos detectar a las dos chaperonas (en una frecuencia baja) con el análisis por MS (figura 23, tabla 9). La proteína gp15 sería la proteína cinta métrica (TMP) debido a su posición y tamaño y por la similitud de secuencia con A2. Luego le siguen los genes que forman parte de las proteínas de la punta de la cola encargadas del reconocimiento del receptor. En este caso codificadas por el gen 16 y 17 que serán discutidas en detalle a lo largo de esta tesis y en el punto 1.4 de este capítulo.

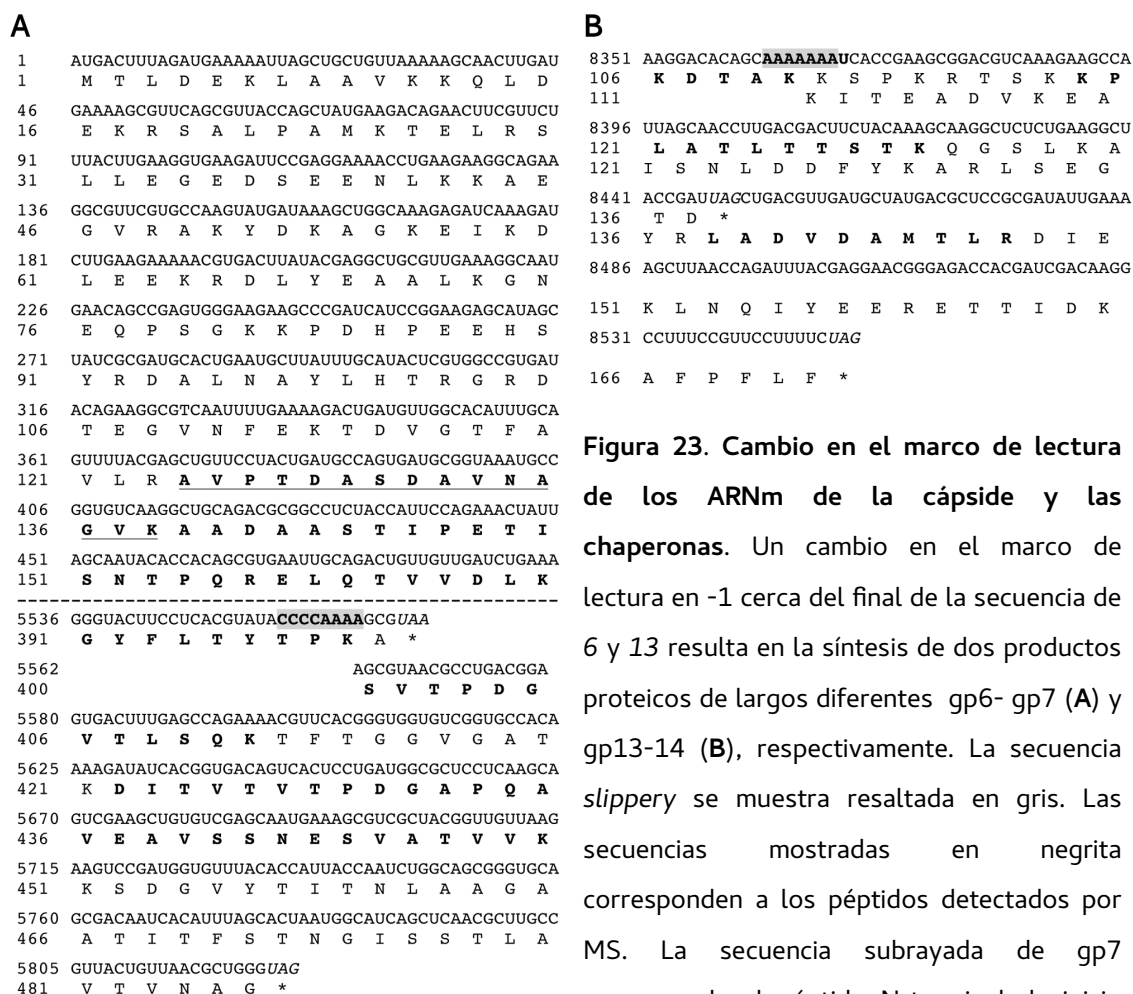


Figura 23. Cambio en el marco de lectura de los ARNm de la cápside y las chaperonas. Un cambio en el marco de lectura en -1 cerca del final de la secuencia de 6 y 13 resulta en la síntesis de dos productos proteicos de largos diferentes gp6- gp7 (A) y gp13-14 (B), respectivamente. La secuencia *slippery* se muestra resaltada en gris. Las secuencias mostradas en negrita corresponden a los péptidos detectados por MS. La secuencia subrayada de gp7 corresponde al péptido N-terminal de inicio de la proteína detectado por MS que confirma el procesamiento proteolítico.

1.3.2. Lisis

El *casette* de lisis se encuentra a continuación de la región estructural conteniendo a la gp22 como la posible holina debido a la presencia de dos posibles hélices transmembranas y un C-terminal cargado. El gen que codifica para la gp23 es una endolisina con una actividad N-acetil muramoil-L-alanina amidasa. Previamente, se demostró que el producto correspondiente a gp23 de PL-1 puede hidrolizar la unión amida en el peptidoglicano de *L. casei* (Kashige *et al.*, 2000).

1.3.3. Integración e inmunidad

El gen 24 se transcribe de derecha a izquierda y codifica para una integrasa de tipo tirosina. Presenta la misma identidad de secuencia nucleotídica que la de una posible integrasa encontrada en el genoma de *L. casei* BL23 (LCABL_10790), y también tiene alta homología con la integrasa del fago Lrm1. En la región C-terminal (dominio catalítico) se encuentran los aminoácidos conservados RKHRH (Groth and Calos, 2004) encontrados en las posiciones 210, 250, 325, 328 y 352 respectivamente. La tirosina catalítica se encontraría en la posición 362 (posición 342 en el fago lambda). En la región 5' posterior al gen de la integrasa, existe una secuencia de aproximadamente de 221 pb sin región codificante y probablemente sea la localización del sitio de unión o *attP*. La comparación de esta región usando BLASTN reveló una identidad de secuencia de 49 pb sobre 50 pb con una región intergénica ubicada entre la endolisina y una posible proteína no caracterizada en *L. casei* BL23, BDII, LC2W y ATCC 334. Esta homología sugiere que las secuencias encontradas en los genomas bacterianos podrían ser posibles *attB*. Pese a varios intentos, no hemos podido aislar lisógenos en la cepa *L. casei* BL23 (datos no mostrados). Es interesante destacar que este *attB* encontrado corresponde también al *attR/ attL* del profago PLE2 presente en *L. casei* BL23 y que será detallado en el capítulo 2. Esta secuencia esta también parcialmente presente en los fagos AT3, FSW y Lrm1, fagos temperados inducidos de *L. casei* ATCC 393, *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y la cepa *L. rhamnosus* M1, respectivamente (Shimizu Kadota et al., 1983; Lo et al., 2005; Durmaz et al., 2008). No hemos podido asignarles una función a los genes 25 y 26 y tampoco hay proteínas homólogas en la bases de datos proteicas. En el genoma de PL-1 aparece la delección de 1,9 kpb en su genoma ubicado en las posiciones 23513 a 25418 en J-1, correspondiendo a los genes 27 a 30 en este fago. Los genes 27 y 28 de J-1 se transcriben de derecha a izquierda y resultan similares a los *orfs* 21 y 22 del fago A2. La región N-terminal de gp27 de J-1 muestra similitudes con la proteína gp21 del fago A2 predicha como una escisionasa aunque no existe validación experimental. La proteína siguiente (gp28) es similar al producto del *orf* 25 de Lrm1 con homología al regulador negativo del operón *tcd* (TcdC) encontrados en varias bacterias Gram positivas. Estos reguladores han sido estudiados en *Clostridium difficile* regulando la expresión de los genes *tcdA* y *tcdB* (Matamouros et al., 2007; Dupuy et al., 2008; Carter et al., 2011). Usando la herramienta HHpred, se encontró que los productos de los genes 29 de J-1 que se transcriben de

derecha a izquierda y el gen 31 (gen 27 en PL-1) que se transcribe en dirección contraria tienen homología máxima con CI y Cro de Lambda. Esta organización se corresponde con la sintenia encontrada en otros fagos tipo lambda. Por último, los genes 30 y 32 (28 en PL-1) presentan un dominio HTH (hélice vuelta hélice, de sus siglas en inglés *helix turn helix*) indicando que podrían actuar como reguladores de la transcripción.

1.3.4. Módulo de Replicación y extremo derecho

Esta región abarca probablemente los genes 33 a 37 en PL-1 (37 a 41 en J-1). El gen 33 codifica para una proteína de la familia de las Erf involucrada en la unión de ADN simple cadena (SSAPs *singles stranded annealing protein*) como RecT, Red-beta, ERF y Rad52 y funcionan en caminos de recombinación RecA-dependientes o independientes (Lyer *et al.*, 2004). El gen 35 (39 en J-1) podría codificar para una posible proteína de unión al ADN simple cadena que se une y protege al ADN en procesos metabólicos y probablemente formen oligómeros en su estado funcional (Arcus, 2002).

Los genes 36 al 40 (40 a 44 in J-1) son similares a los 34 al 38 del fago Lc-Nu localizados en la misma posición y que posiblemente tengan funciones similares. gp36 de PL-1 tiene un dominio HTH en la región N-terminal y presenta homología a proteínas de replicación en fagos. En el gen 36 (40 en J-1) se encontraron 19 pb de una región rica en AT flanqueado por varias regiones repetidas en forma directa e invertidas, patrones regularmente encontrados en orígenes de replicación fágicos (Schnos *et al.*, 1989). Róo arriba de esta secuencia, existen tres repeticiones directas seguida por otras repeticiones directas e invertidas. Estas regiones serían capaces de formar una estructura tipo bucle similar a la encontrada en el fago Lc-Nu (Tuohimaa *et al.*, 2006). El gen 37 (41 en J-1) presenta similitudes de secuencia a helicasas DnaB y el gen 39 es una posible proteína de unión a ADN. El gen 40 presenta un dominio perteneciente a la familia de las resolvasas tipo RusA (Tuohimaa *et al.*, 2006).

La mayoría de los genes del extremo derecho codifican para proteínas pequeñas sin función asignada y poco se conoce de esta región en general. PL-1 43 (47 en J-1) codifica para una metil-transferasa de citosina. gp44 (48 en J-1) pertenece a una familia de proteínas fágicas conservada encontradas en fagos y profagos de bacterias Gram positivas. Los genes 50 y 51 (54 y 55 en J-1) codifican para potenciales reguladores transcripcionales,

el primero con un dominio de hélice vuelta hélice característico de las proteínas Xre y el segundo con un dominio de la familia ArpU. El gen 55 (59 en J1-1) codifica para una HNH endonucleasa. El gen 59 (63 en J-1) se ha descrito con anterioridad (sección 1.3.1)

1.4. Proteínas de la placa base

Además de la delección encontrada en el genoma, los fagos J-1 y PL-1 presentan diferencias aminoacídicas en gp16 con tamaños de 75 y 69 kDa para J-1 y PL-1, respectivamente (figura 24 A) y unos pocos residuos diferenciales en gp 17 (113 kDa). La secuenciación mostró que estas proteínas son las únicas presentes en la placa base careciendo de las canónicas RBPs. Ambas proteínas fueron corroboradas en el virión por MS (figura 22, tabla 9) que también permitió corroborar los péptidos diferenciales entre J-1 y PL-1.

1.4.1. gp16 o Dit evolucionada

gp16 tiene similitud con la proteína gp13 del fago A2 y con varios *orfs* anotados como proteínas de la cola en varias cepas de *Lactobacillus* que acarrean profagos en su genoma. Luego de realizar un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas con proteínas homólogas de otros fagos del grupo *L. casei* con el propósito de detectar dominios homólogos, observamos que existían 3 regiones conservadas y dos regiones variables (figura 24 B). La región N-terminal de gp16 resultó idéntica entre J-1 y PL-1 (residuos 1 a 142) y también se encontró conservada en los otros fagos analizados (Figura 24 B, verde claro). Luego, se identificó una región de 171 aminoácidos en J-1 y 122 aminoácidos en PL-1 con baja homología entre ellas (figura 24 A). Esta divergencia también se detectó en Lrm1, Lc-Nu, A2 y phiAT3 (figura 24 B, amarillo). Posteriormente, se encontró otra región conservada entre todos los fagos analizados (Figura 24, B verde oscuro) y a continuación, una región de 237 aminoácidos con alta identidad de secuencia entre J-1 y PL-1 y una menor similitud entre los otros fagos (Figura 24 B, negro). Finalmente, la región C-terminal es altamente similar entre todos los fagos comparados (Figura 24 B, violeta).

En concordancia, cuando se utilizó la herramienta bioinformática Pfam con el objeto de encontrar familias de proteínas (representadas por alineamientos múltiples de secuencias

y HMM), se identificó un dominio *Sipho_tail* abarcando todo el gen. Sin embargo, el *Sipho_tail* HMM logo presentó dos inserciones con alta probabilidad, correspondientes a la segunda y cuarta región descriptas para los fagos del grupo *L. casei* (Figura 24 B, amarillo y negro, respectivamente).

De la misma forma, el análisis con HHpred reveló similitudes entre la región N-terminal de gp16 y la proteína Dit del fago de *Bacillus subtilis* SPP1 y de *L. Lactis* TP901-1 (Figura 25 A), a continuación se observó una inserción y finalmente la región C-terminal de Dit conservada aunque con otra inserción. En las proteínas cristalizadas de estos fagos, tal como se describió con anterioridad, la región N-terminal de la Dit forma un anillo hexamérico y se une por uno de los extremos al último hexámero conformado por la proteína mayor de la cola y por el otro lado a la proteína trimérica Tal y a las RBP para formar la placa base (Sciara *et al.*, 2010; Veesler *et al.*, 2010; Veesler *et al.*, 2012). La extensión C-terminal, se proyecta como un módulo tipo galectina (aunque sin esa función asociada) o un dominio OB-fold (Flayhan *et al.*, 2014) que también está presente en gp16 de J-1/ PL-1 aunque, como muestra la figura 25 A, en forma fraccionada. Pese a estas similitudes, es evidente que las Dit de J-1 y PL-1 son mucho más largas (679 aa para J-1 y 630 aa para PL-1) que las Dit clásicas (~260-300 aas) descriptas hasta el momento, por lo que decidimos nombrarlas Dit "evolucionadas".

Como una primera aproximación, usando un enfoque bioinformático para intentar de explicar estas diferencias, se modeló la región conservada de J-1 Dit (el dominio de *Sipho_tail*) utilizando un modelado comparativo con SPP1 Dit (PDB 2x8k_A) con una probabilidad de 98%. La región N-terminal y el cinturón de la proteína Dit de SPP1 se pudo superponer sin ambigüedades con la región N-terminal de J-1 Dit (figura 26 B). Esta estructura conservada sugiere que los monómeros de J-1 Dit, similar a lo que ocurre con otras proteínas Dit, se conectarían entre sí para formar un hexámero. Además, en el modelo, en analogía con lo observado para la Dit del fago SPP1, el dominio C-terminal protrude hacia afuera del cilindro (figura 26 A).

Luego, estudiamos las dos regiones identificadas como inserciones en el dominio *Sipho_tail*. La primera inserción (Dom1), ubicada justo después del cinturón de la región N-terminal, resulta de la región variable entre J-1 y PL-1 (129-322 aa en J-1). Cuando el Dom 1 de J-1 y PL-1 se analizaron por HHpred, se encontró similitud con dominios de unión a

carbohidratos (CBM) pertenecientes a enzimas que depolimerizan las paredes celulares a azúcares simples. Estos dominios ayudan a la eficiencia catalítica acercando las enzimas a sus sustratos (Shoseyov *et al.*, 2006). Los Dom1 de J-1 y PL-1 se modelaron usando como templado el CBM de la endo- β -1,4-galactanasa de *Thermotoga maritima* (PDB 2xon) que presentó el máximo puntaje por HHpred (figura 25 B, figura 26 B-círculo).

Pese a que los Dom1 de J-1 y PL-1 parecerían tener un plegado similar a CBMs y entre sí, las diferencias entre J-1 y PL-1 son evidentes. En caso de que esta parte de la proteína reconozca efectivamente azúcares, el Dom1 de gp16 podría ser responsable de diferencias en la afinidad a azúcares e incluso en el reconocimiento de diferentes azúcares. Estas disimilitudes podrían ser responsables de otorgar un rango de huésped diferencial entre ambos fagos.

La segunda región variable (Dom2) tiene 237 aa y está ubicada dentro del primer *loop* del dominio de tipo galectina correspondiente al C-terminal de las Dit clásicas. Este dominio no presentó homología con ninguna estructura depositada en el PDB y por ende no pudo ser modelado. Sin embargo, la estructura secundaria contiene principalmente hojas β asemejándose a galectinas, que también podrían unirse a carbohidratos.

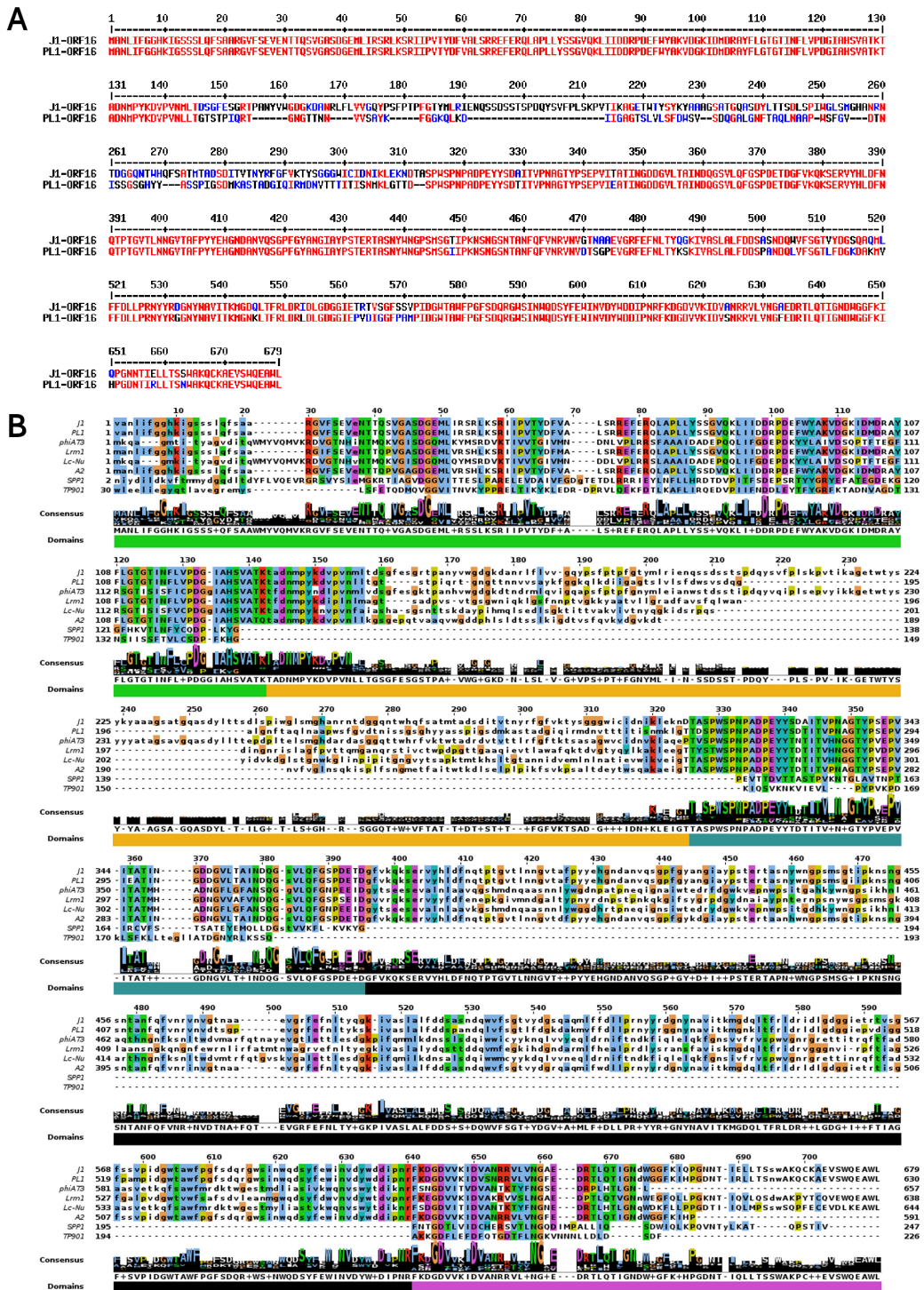


Figura 24. Alineamiento aminoacídico de la proteína Dit entre J-1, PL-1 y sus homólogos en otros fagos del grupo *L. casei*. **A.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína Dit de los fagos J-1 y PL-1. En rojo se muestran los aminoácidos que comparten mientras que en azul los que no presentan similitud. **B.** Alineamiento múltiple de secuencia entre algunos fagos del grupo *L. casei* y las proteínas Dit estudiadas de los fagos SPP1 y TP901-1.



Figura 25. Análisis por HHpred de la proteína DIT de J-1. **A.** La figura muestra los resultados obtenidos para J-1 DIT con estructuras cristalizadas detectándose dos inserciones sin homología. **B.** Resultados obtenidos por HHpred para el Dom1 donde el mejor puntaje corresponde al CBM de la estructura cristalizada de la endo-β-1,4-galactanasa de *Thermotoga maritima* (PDB 2xon).

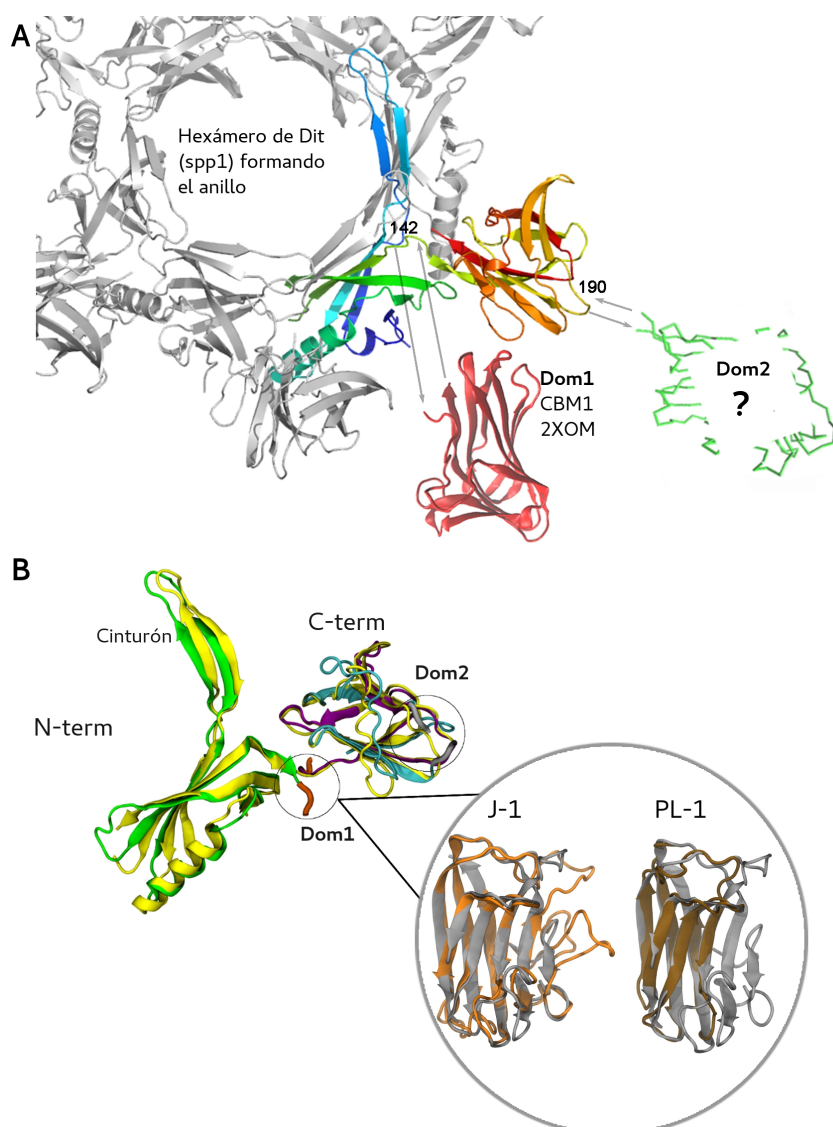


Figura 26. Análisis topológico de la proteína DIT de J-1 y PL-1. **A.** Análisis topológico de la proteína DIT mostrando las inserciones de los Dom1 y Dom2. Se muestra la proteína DIT clásica Orf19.1 del fago SPP1 formando un hexámero y particularmente se resaltan las ubicaciones de las inserciones en J-1 respectivas a las posiciones de SPP1. En la posición 142 (SPP1) se inserta el Dom1 (rojo) y en la posición 190 (SPP1), se inserta el Dom2 (verde). **B.** Estructura predicha para DIT monomérica de J-1 o PL-1 usando como templado la estructura cristalizada de SPP1 Orf19.1 (PDB 2x8k). El Dom1 y Dom2 corresponden a las regiones que no pudieron ser modeladas con este templado. El templado se muestra en amarillo y los colores en el modelo corresponden a los dominios mostrados en la figura 24 B. **B círculo.** Estructura predicha para el Dom1 de J-1 (anaranjado) o el Dom1 de PL-1 (marrón) de DIT basado en el CBM de la estructura cristalizada de la endo- β -1,4-galactanasa de *Thermotoga maritima* (PDB 2xon, cadena L) (gris).

1.4.2. gp17 o Tal

La proteína gp17 de J-1 y PL-1 tiene similitud con proteínas de los fagos Lrm1 y A2 que han sido anotadas como proteínas de reconocimiento del hospedador. Las proteínas de J-1 y PL-1 comparten el 98% de identidad entre sí (figura 27 A) y están contenidas en la familia Pfam *prophage_tail*.

El análisis por HHpred reveló que los residuos de 1 a 400 tienen similitud con la proteína gp44 del fago Mu y por ende se modeló la estructura considerando a este templado (PDB 1wru) como lo muestra la figura 27 B. La estructura predicha también es similar a gp27 de T4 (PDB 1k28) y al ORF 16 del fago de *Lactococcus* p2 (PDB 2wzp y 2x53). Todas estas proteínas han sido caracterizadas como proteínas de la cola asociadas a lisinas o Tal que se ensamblan en forma trimérica. Aunque las diferencias entre gp17 de J-1 y PL-1 (19 residuos en total) están en la región N-terminal, la estructura es casi idéntica. El resto de la proteína se asemeja a proteínas de reconocimiento del receptor en fagos de *S. thermophilus* (Duplessis y Moineau, 2001; Dupont, Vogensen, et al., 2004) y contiene 5 repeticiones tipo colágeno (Gly-X-Y). El número de Gly-X-Y presentes en gp17 difiere entre estos fagos y las proteínas homólogas analizadas en otros fagos. Recientemente, mediante un nuevo análisis con la herramienta HHpred se identificó entre los residuos 450-470 a un posible dominio con homología a BppA del fago Tuc2009 que infecta a *L. lactis*. En el fago Tuc2009, esta proteína tiene homología a CBMs (PDB 1gu1 y 1gu3) y contribuiría a la especificidad del receptor junto con la RBP (Kenny et al., 2004).

El análisis genómico y proteómico realizado en este capítulo, indica que las proteínas gp16 y gp17 predichas como Dit y Tal, respectivamente serían parte de la placa base. El tamaño de estas proteínas que duplican a sus homólogas hasta hoy reportadas en otros fagos y la ausencia de proteínas de tipo RBP, sugiere que estas proteínas “evolucionadas” cumplirían con el rol de reconocimiento del hospedador. A nivel estructural, ambos fagos solo difieren en la Dit sin diferencias aparentes en la Tal. Los dominios extra de la proteína Dit evolucionada resultan de particular interés. El Dom1 difiere entre ambos fagos y es variable en otros fagos del grupo *L. casei*. Dom1 presenta homología a CBMs mientras que el Dom2 es similar entre ambos pero sin función conocida. En resumen, esta información sugiere que en estos fagos la proteína Dit, además de presentar una función estructural, podría actuar como anti-receptora. A su vez, las discrepancias encontradas a nivel aminoacídico podrían estar involucradas en la determinación del rango de huésped.

Por otro lado, la homología encontrada entre J-1 y PL-1 y el genoma de *L. casei* BL23 muestra que esta última es una cepa lisogénica lo que implicaría un riesgo para su uso como potencial cepa probiótica. En el capítulo 2 se estudiarán en detalle a los profagos presentes en esta cepa y el potencial riesgo de inducción de los mismos. Asimismo, se analizarán los posibles genes vinculados con la síntesis de la placa base de estos profagos y las similitudes y diferencias con las posibles estructuras de reconocimiento del receptor descritas en este capítulo.

Capítulo 2

Evaluación del riesgo de inducción de profagos presentes en la cepa modelo *L. casei* BL23

2. Evaluación del riesgo de inducción de profagos presentes en la cepa modelo *L. casei* BL23

2.1. Aportes previos desarrollados en el laboratorio

Utilizando la herramienta bioinformática Phast (Zhou *et al.*, 2011), que encuentra posibles profagos en genomas bacterianos, en combinación con una búsqueda manual sobre la secuencia genómica de *L. casei* BL23; detectamos la presencia de cuatro profagos (figura 28): PLE1, PLE2, PLE3, PLE4. La existencia de profagos en la cepa *L. casei* BL23 fue también recientemente reportada por Mercanti *et al.*, (2015). Los profagos PLE1 a 3 se encontraron también en las cepas comerciales *L. casei* BDII (Ai *et al.*, 2011) y *L. casei* W56 (Hochwind *et al.*, 2012). Asimismo, PLE1 y PLE2 se detectaron en la cepa probiótica patentada *L. casei* LCW2 (Chen *et al.*, 2011). La presencia de cepas lisogénicas en los cultivos utilizados a escala industrial representan un riesgo pudiendo generar graves problemas en la fermentación. PLE1 a 3 presentaron todos los módulos característicos (integración e inmunidad, replicación, empaquetado, estructura del virión y lisis, según aparecen en el genoma una vez integrados) pero PLE4 parecía estar incompleto careciendo de los genes vinculados con la lisis.

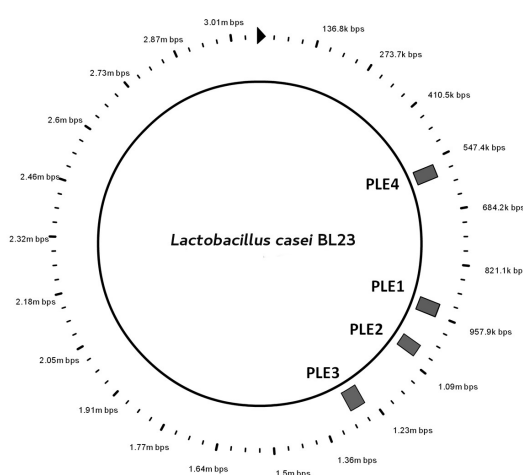


Figura 28. Localización de los profagos en el genoma de *L. casei* BL23

En la tabla 10 se pueden visualizar los tamaños y los sitios de integración de cada uno de los profagos. Mientras que PLE1 y PLE2 están integrados en genes ARNt, PLE3 se integra en una región intergénica. PLE1 es 99% idéntico al profago inducido de la cepa *L. paracasei* A y recientemente secuenciado iA2 (Mercanti *et al.*, 2015). PLE1 y PLE2 comparten un 48% de su secuencia de ADN. Mediante ensayos de PCR pudimos determinar las secuencias involucradas en la integración sitio específica en los profagos presentes en *L. casei* BL23 y la figura 29 muestra los correspondientes sitios *attP/attB/attL/attR* de cada profago (Dieterle, 2012).

Tabla 10. Profagos en *L. casei* BL23

Nombre	Posición en el genoma	Tamaño (kb)	Sitio de integración
PLE1	928670-962834	34,16	3´ ARNt ^{leu}
PLE2	1043251-1078318	35,07	3´ ARNt ^{arg}
PLE3	1248384-1289388	41,01	Región intergénica
PLE4*	559249-602091	42,84	-

(LCABL 05480-LCABL06050)

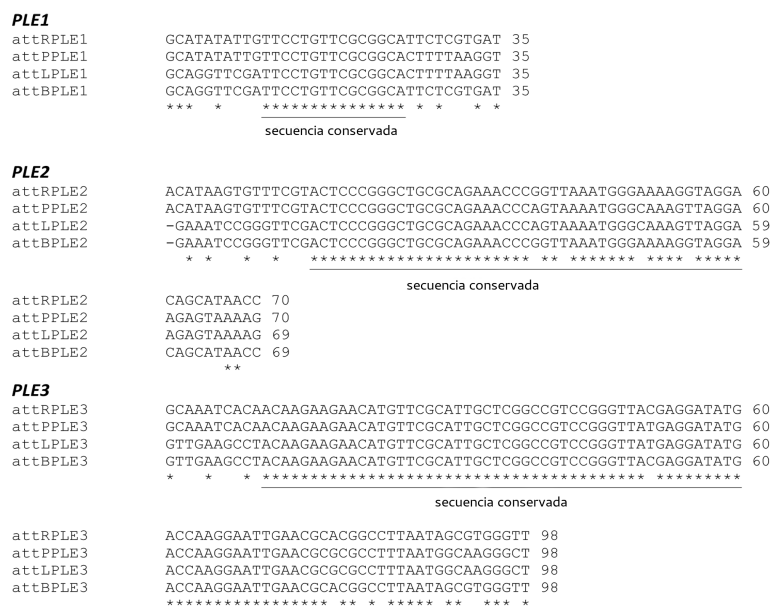


Figura 29. Escisión de PLEs. Alineamiento de las secuencias *attR*, *attP*, *attL* y *attB* de PLE1, PLE2 y PLE3 usando la herramienta ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) La secuencia conservada se encuentra subrayada.

Con el objetivo de determinar si uno o más profagos podían ser inducidos en la cepa *L. casei* BL23, los cultivos en crecimiento exponencial temprano se expusieron a MC y a UV, dos clásicos agentes mutagénicos involucrados en el daño al ADN y en la inducción del ciclo lítico (Lamont *et al.*, 1989; Durmaz *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2008). El agente mutagénico UV no generó cambios aparentes de crecimiento. Por otro lado, la DO_{600nm} de los cultivos control y expuestos a distintas concentraciones de MC fueron monitoreadas en el tiempo y se observó una disminución en el crecimiento en los cultivos tratados con MC 0,1 µg/ml. Aunque la lisis bacteriana no fue evidente, los resultados de este último ensayo indicarían que en estas condiciones sólo una parte de la población bacteriana sufre lisis por la inducción de uno o varios profagos o que el efecto bacteriostático observado proviene de la capacidad mutagénica de la MC (Dieterle, 2012).

2.2. Estrategia de análisis de profagos inducidos

Los ensayos realizados con MC 0,1 µg/ml se repitieron a mayor escala y se tomaron alícuotas pertenecientes al cultivo control y al tratado con MC a distintos tiempos (0, 3, 6, 9 horas). El objetivo del ensayo fue determinar el grado de escisión de los distintos profagos a lo largo del tiempo y la posibilidad de recuperar partículas fágicas en el sobrenadante si las hubiere. A los tiempos indicados, las alícuotas se centrifugaron y los pellets bacterianos se emplearon para extraer ADN. Al mismo tiempo, el sobrenadante del punto final (9 horas) se recolectó y concentró para recuperar partículas de fago si las hubiere. La figura 30 resume el esquema de trabajo.

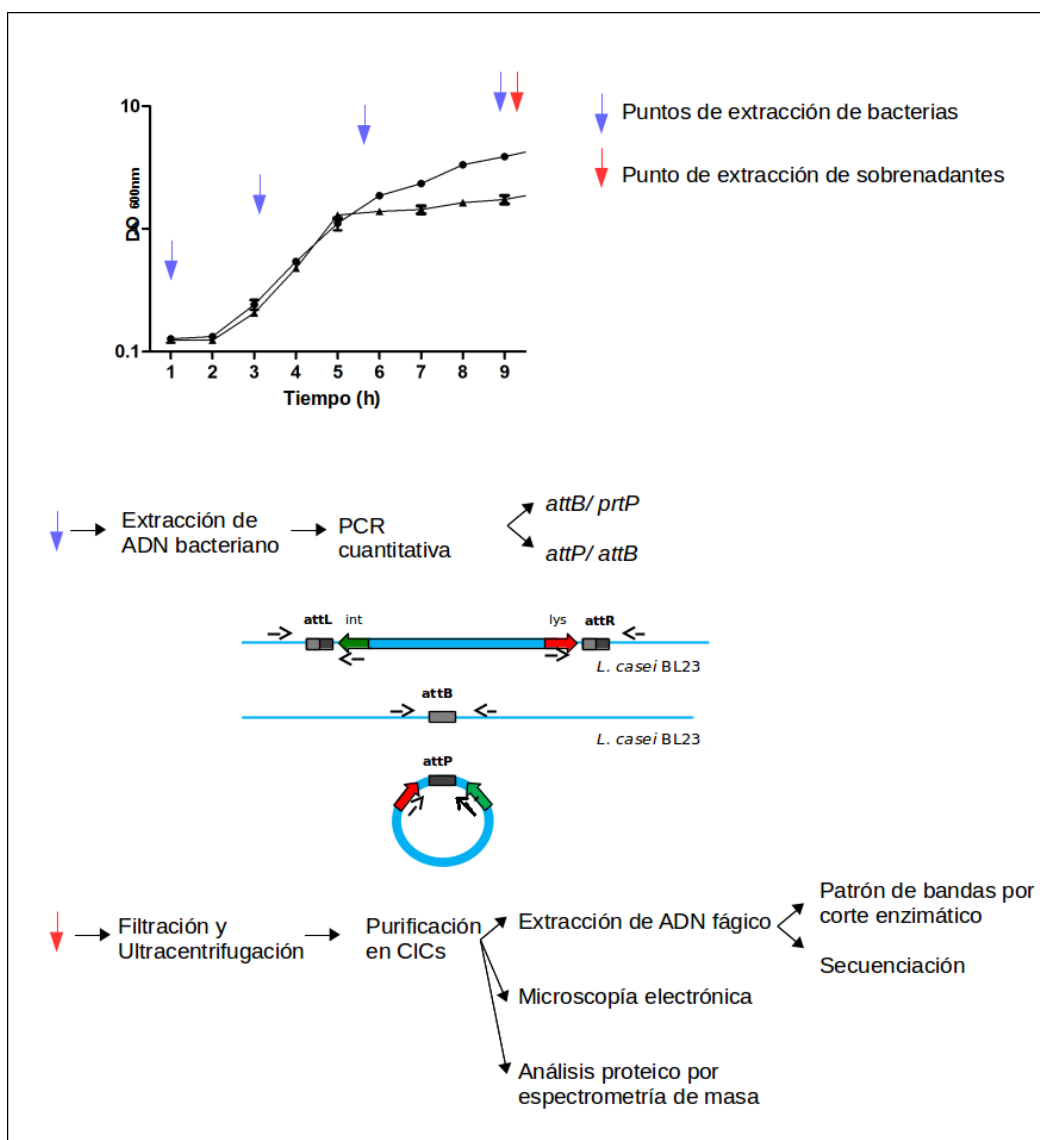


Figura 30. Esquema de trabajo utilizado para evaluar el nivel de inducción de profagos

2.3. Nivel de escisión de los profagos

La estabilidad de los profagos en la cepa *L. casei* BL23 se evaluó determinando la capacidad de los mismos de escindirse del genoma bacteriano. Para ello, se utilizó el ADN genómico bacteriano correspondiente a los distintos tiempos (0, 3, 6 y 9 h) con y sin el agregado de MC. Luego de la extracción del ADN de los pellets bacterianos de *L. casei* BL23, éste se empleó como templado para una PCR cuantitativa en tiempo real usando el SYBR Green 1. Este método es utilizado ampliamente para estimar el número de copias de un gen. Sin embargo, es necesario considerar que la fluorescencia varía dependiendo del

largo del amplicón y por ende debe disminuirse al mínimo las diferencias entre los fragmentos a amplificar. Para el diseño de oligos se consideraron los *attP* (presentes en la forma circularizada) de los tres profagos (PLE1, PLE2 y PLE3), el correspondiente *attB* (reestablecido en el cromosoma bacteriano después de la escisión) y *prtp* (gen cromosómico presente en una sola copia en el genoma de *L. casei* BL23) usado como referencia del total de ADN bacteriano presente. En todos los casos, se amplificaron entre 145-148 pb con el objeto de disminuir las diferencias en el tamaño de los amplicones. El ensayo utilizado es una adaptación al descrito en Lunde *et al.* (2002) y Sozhamannan *et al.* (2006). Primero, se evaluó que los templados usados para la comparación entre profagos tuvieran la misma eficiencia de amplificación (Sozhamannan *et al.*, 2006). Para ello se hicieron diluciones seriadas de los genomas bacterianos y se calculó la eficiencia de amplificación empleando la siguiente fórmula: $E = \exp^{-1/m}$, donde E es la eficiencia de amplificación y m es la pendiente de la curva. En estas condiciones, las eficiencias de las PCRs con los distintos *primers* utilizados fueron comparables y con valores mayores a 95%.

Luego, se generó una curva estándar con el logaritmo de las distintas concentraciones de ADN en el eje de las ordenadas y los valores de Ct del gen cromosómico *prtp* en el eje de las abscisas (Lunde *et al.*, 2002). El valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin y Mueller, 2005). Los valores de Ct se transformaron en concentración utilizando la siguiente fórmula que resultó de la curva estándar: $\text{Conc} = 10^{((\text{Ct} - 45.113) / -3.315)}$, con una intercepción de 45.113 y una pendiente de -3.315; $R^2 = 0.997$. Esta ecuación nos permitió calcular posteriormente la concentración de los fragmentos de ADN de los profagos circularizados y del genoma con los respectivos profagos escindidos a distintos tiempos.

Se determinó la tasa de inducción de los profagos calculando la relación *attB/prtp* a diferentes tiempos. En otras palabras, calculamos la fracción bacteriana en el cultivo en la que ocurrió la escisión de los profagos y se regeneró el sitio *attB*. Como se observa en la figura 31, la condición Control (C) reflejando la inducción espontánea, es decir aquella que ocurre en forma natural sin el agregado del agente inductor, fue imperceptible en todos los profagos y tiempos estudiados (<0.007). Este resultado indica una estabilidad de los profagos en la población bacteriana estudiada o que la escisión solo ocurre en una pequeña fracción de la misma y no es posible detectarla por esta técnica. Con el agregado de MC, la relación *attB/prtp* se incrementó para todos los profagos aunque de manera diferencial; el

valor máximo se observó a las 6 horas para los tres profagos (0,1 para PLE1, 1,1 PLE2 y 0,5 PLE3) correspondiéndose con la fase de crecimiento exponencial de la bacteria (Figura 31). Para PLE2, este valor fue cercano a 1 sugiriendo que en toda la población bacteriana el profago fue liberado del cromosoma. En el punto de las 9 horas, se observó una leve disminución de la tasa de escisión siendo consistente con el estado dinámico de escisión/integración del profago. Este patrón también se detectó en los fagos philC3 y en el fago lambda debido a que la respuesta lisogénica se favorece en un estado estacionario (Echols, 1972; Lunde et al., 2005). Considerando estos resultados, solo PLE2 y PLE3 son inducidos en forma significativa luego de la exposición a MC aunque en diferentes proporciones.

Durante la secuenciación del genoma de *L. casei* BL23 y el posterior ensamblado de los datos, Mazé et al. (2010) encontraron un *gap* localizado en el sitio de inserción de un profago. Los datos de secuenciación se corresponden con la forma integrada y circularizada del fago PLE2. Además, describieron que aparentemente sólo algunas células contenían un fago escindido.

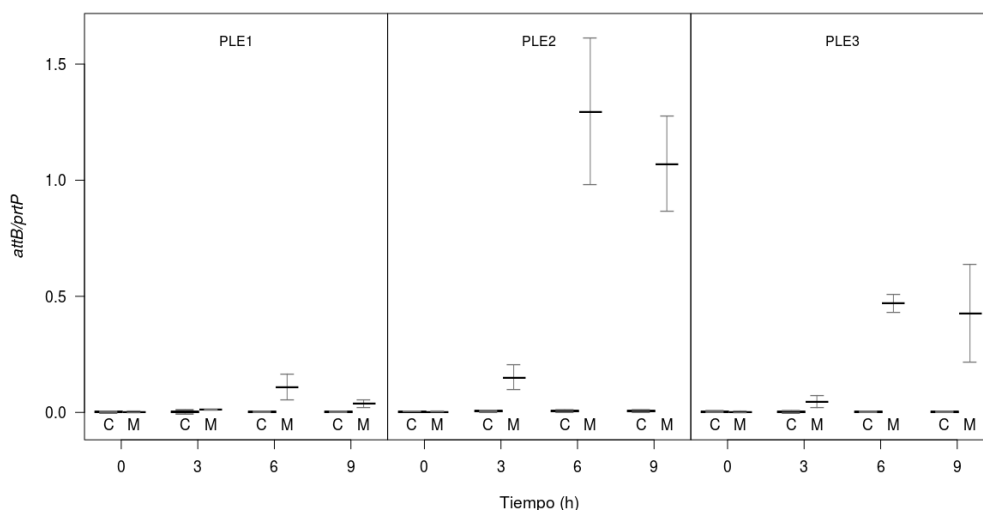


Figura 31. Nivel de escisión de los PLEs. Utilizando un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real, se calculó la relación entre la frecuencia de inducción (*attB*) de cada PLE y el nivel de un gen cromosomal de una sola copia (*prtP*) a los distintos tiempos con (M) o sin (C) el agregado de MC. Las barras horizontales indican la media de la relación *attB/prtP* y las barras de error representan los intervalos de confianza de 95% de tres réplicas realizadas de forma independiente.

2.4. Estimación de la replicación fágica

Una vez que el fago se escinde del genoma, puede comenzar el ciclo lítico. Este ciclo comienza con la replicación del genoma, síntesis de las proteínas estructurales y encapsidación del ADN para culminar con la liberación de la progenie viral. Aunque la forma particular en la que estos fagos replican su ADN se desconoce, es posible evaluar si las copias del genoma del profago circularizado aumentan en número, siendo éste un indicativo de una replicación activa.

En este caso, se determinó la relación $attP/attB$ para los tres profagos durante los mismos tiempos evaluados anteriormente. Esta relación considera los niveles del profago circularizado ($attP$) respecto de la huella dejada en el cromosoma bacteriano si el profago se escindió ($attB$). Como se muestra en la figura 32, los círculos blancos indican la relación $attP/attB$ sin el agregado del inductor mientras que los puntos negros muestran los valores luego del agregado de MC. Tanto para PLE1 como para PLE3 (figura 32, panel 1 y 3) no se observa un aumento en el número de copias luego del agregado de MC. En cambio, la relación aumenta en el tiempo para el profago PLE2 obteniéndose, dentro de los puntos estudiados, el máximo número de copias del genoma circularizado a las 9 horas post inducción (figura 32, panel 2).

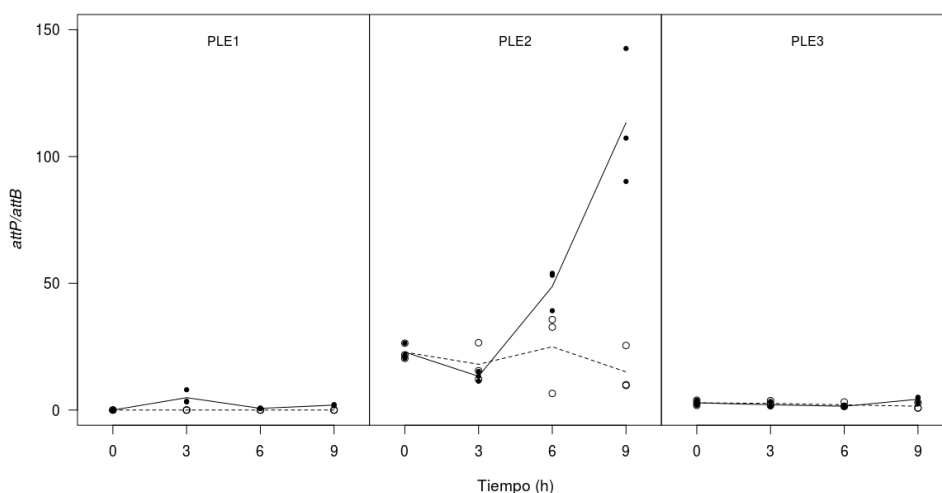


Figura 32. Replicación de los profagos después de la escisión. Utilizando PCR cuantitativa en tiempo real se calculó la relación entre la forma circularizada del profago ($attP$) y el genoma bacteriano sin el profago ($attB$) a los tiempos indicados (0, 3, 6, 9 h). Los círculos blancos representan el control sin MC y los círculos negros con el agregado del inductor MC.

En la figura 31 se observa que la relación $attB/prtp$ para PLE2 es cercana a 1 a las 6 y 9 horas. Este valor reflejaría que el fragmento $attB$ está representado en cantidades iguales al control $prtp$ de copia única. En otras palabras, PLE2 solo se encontraría en la forma circularizada (el profago se escindió en toda la población). Con lo precedente, hipotetizamos que el incremento en la relación $attP/attB$ de PLE2 (figura 32, panel central) evidenciaría exclusivamente la replicación de la forma circularizada a nivel poblacional. Asimismo, resulta interesante destacar que el aumento en las relaciones $attP/attB$ de PLE2 con el agregado de MC se acerca a una curva exponencial (figura 33), fortaleciendo nuestra hipótesis. Es necesario remarcar que esta técnica solo determina el comportamiento global de la población por lo que no podemos descartar que existan diferencias célula a célula y que sólo una subpoblación bacteriana sea la responsable del incremento en la tasa de replicación observada.

El comportamiento observado para PLE3, donde se evidencia una escisión activa (figura 31, panel 3) pero no una replicación evidente (figura 32, panel 3) podría ser un ejemplo donde la replicación ocurre en una pequeña proporción de células pero no se ve representada al mirar a toda la población.

Para PLE1, los resultados son inequívocos dado que no hay replicación pero tampoco se observó escisión del profago (figura 31 y figura 32, panel 1).

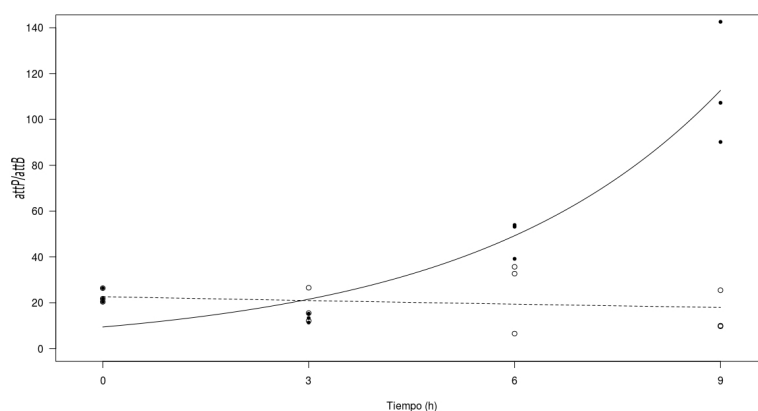


Figura 33. Tasa de replicación de PLE2 aproximada a una curva exponencial.

2.5. Análisis genómico y estructural de PLE2 y PLE3

La ausencia de lisis celular completa luego de la inducción de los cultivos de *L. casei* BL23 con MC no permitió determinar si hubo una liberación de partículas fágicas al sobrenadante de los cultivos.

Para evaluar la formación de la partícula viral, los sobrenadantes se concentraron y se examinaron al microscopio electrónico. Como se muestra en la figura 34 A, se observaron mayoritariamente colas y cabezas sueltas y pocas partículas de fago enteras. Este resultado podría deberse a una falta en la formación o estabilidad de los fagos completos y es consistente con la ausencia de una disminución abrupta en la DO_{600nm} luego de la inducción con MC. Posteriormente, y con el objetivo de mejorar la calidad y separar las colas y cabezas no ensambladas, se hizo una purificación en Cloruro de Cesio (ClCs) y los viriones se volvieron a observar al microscopio electrónico. El profago inducido tiene una morfología típica de *Siphoviridae*, con una cabeza isométrica de ~62 nm y una cola larga no contráctil de ~178 nm de largo (figura 34 B).

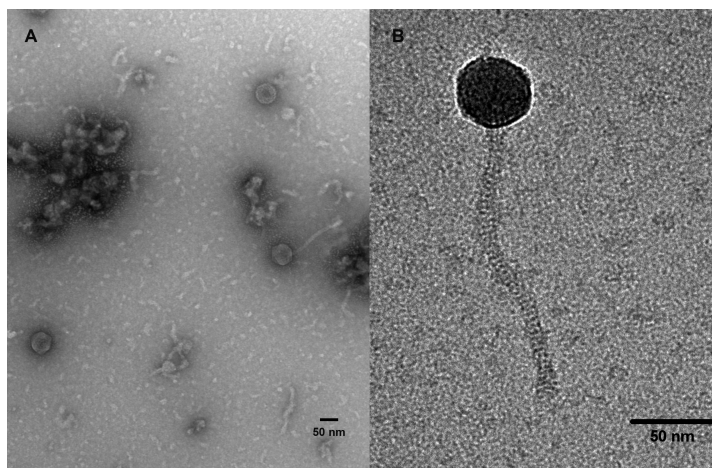


Figura 34. Microscopía electrónica de los fagos obtenidos post-inducción con MC de la cepa *L. casei* BL23. A. Imagen mostrando fagos como también colas y cabezas sueltas. **B.** MET del fago de *Siphoviridae* encontrado en el sobrenadante luego de la purificación en ClCs.

El sobrenadante (antes y después de la concentración) se desafió ante 12 cepas de *L. casei* con el objeto de hallar un hospedador del o de los profago/s inducido. No fue posible encontrar un hospedador susceptible entre las cepas *L. casei* evaluadas(CRL706,

CRL900, CRL76, CRL1232, CRL1004, CRL678, CRL1777, CRL87, CRL1110, CRL1410, CRL1411, CRL997). Sin embargo, es necesario hacer un análisis más exhaustivo de cepas a futuro.

Los lisados purificados en gradiente de ClCs se usaron para extraer ADN y secuenciar el genoma fágico. Anteriormente, se había realizado un análisis por restricción del ADN con las enzimas PstI, AgeI y BglI. El patrón de bandas obtenido se aproximó al esperado para PLE2 aunque no era idéntico (Dieterle, 2012). La discordancia entre el patrón de bandas obtenido a partir de la restricción del ADN aislado y el esperado para los posibles profagos, podía estar indicando que el fago inducido era un producto de recombinación de diferentes regiones del genoma como se sugirió en trabajos anteriores (Durmaz et al., 2008) o que existía una mezcla de ADN proveniente de más de un profago inducido. La secuenciación del ADN permitió resolver esta controversia. Un análisis preliminar de las lecturas crudas, comparándolas con las secuencias de los profagos del genoma de *L. casei* BL23, mostró que tanto la secuencia de PLE2 como la secuencia de PLE3 estaban presentes en la muestra. Como indica la figura 35, no se encontró ADN perteneciente a PLE1. Es necesario remarcar que las regiones donde hay una alta cobertura para PLE1 son solo aquellas que coinciden con la secuencia de PLE2 confirmando que este profago no es inducido por el tratamiento con MC (figura 35 A, observar que solo aparecen lecturas de PLE1 cuando son homólogas a PLE2 tal como lo muestra el resultado del BLASTN del NCBI). En concordancia con los resultados obtenidos por PCR cuantitativa, PLE2 está aproximadamente 13-14 veces más representado que PLE3. Posteriormente, se refinaron los resultados para PLE2 y se mejoró la cobertura de PLE3 con el objetivo de obtener un solo *contig* final. En la figura 36 se muestra la representación esquemática de los genomas de PLE2 y PLE3 y en la tabla 11 los genes predichos para estos profagos inducidos.

Los genes se dividen en los siguientes módulos: empaquetamiento, estructura, lisis, inmunidad y replicación. PLE2 tiene 51 potenciales ORFs y no hay ARNt asociados, 45 ORFs se transcriben de izquierda a derecha y 6 de derecha a izquierda. Por otro lado, PLE3 presenta 60 potenciales ORFs (46 de izquierda a derecha y 14 de derecha a izquierda) y codifica para un ARNt^{le}.

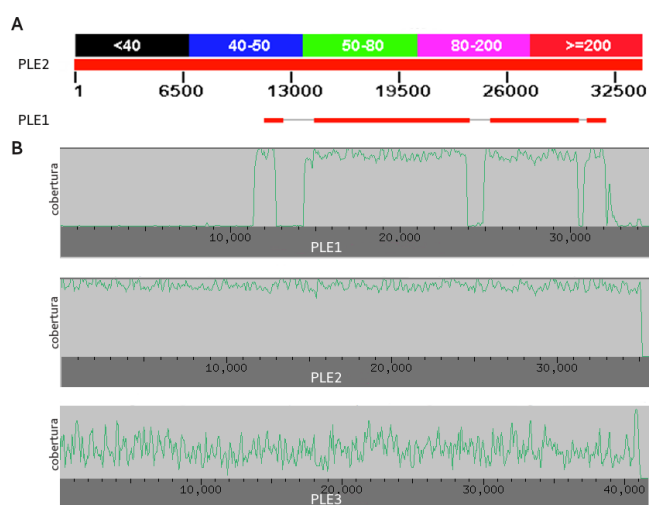


Figura 35. Análisis preliminar de la secuenciación de los profagos inducidos. **A.** Alineamiento entre la secuencia de PLE2 y el genoma del profago PLE1 de *L. casei* BL23 usando la herramienta bioinformática BLASTN. **B.** Alineamiento entre las lecturas provenientes de la muestra de ADN y los tres profagos completos encontrados en el genoma de *L. casei* BL23.

El análisis comparativo de secuencia con otros fagos de BAL muestra que PLE3 está relacionado al fago de *Lactobacillus* iLp84 (cobertura de 90%, identidad 99%) mientras que PLE2 presenta un 48% de cobertura de secuencia y un 98% de identidad con el fago iA2.

En PLE2 se identificó una secuencia de tipo *slippery* sobre el final del gen 11. Un cambio en el marco de lectura en -1 en el transcripto del gen 11 (CCAAAA), daría origen a dos proteínas de la cola, la proteína mayor de la cola (gp11) y una proteína más larga (gp12) de 215 y 236 aminoácidos, respectivamente (Seegers et al., 2004; Rodríguez et al., 2005). Adicionalmente, se identificó un segundo *frameshift*, conservado en *Siphoviridae*, que llevaría a la síntesis de dos chaperonas de ensamblaje en PLE2 (Xu et al., 2004). La secuencia de tipo *slippery* que se encuentra en el gen 13 (AAAAAATA) facilitaría la expresión de la forma larga (gp14). En PLE3 en cambio, no hay *frameshift* asociado sino que las dos chaperonas estarían codificadas en dos genes separados por una pequeña región intergénica (genes 15 y 16, figura 36).

Ambos fagos presentaron en sus genomas integrasas de la familia de las tirosinas (gen 24 para PLE2; gen 26 para PLE3). El análisis por HHpred mostró una alta homología con la integrasa del fago lambda (PDB 1z1b, probabilidad=100%, identidad 17% para PLE2 y probabilidad=100%, identidad 25% para PLE3). En la región C-terminal (dominio catalítico), la tirosina se ubicaría en la posición 361 y la posición 373 para PLE2 y PLE3, respectivamente. Los aminoácidos conservados RKHRH también pudieron ser identificados. En PLE2, el sitio *attP* se identificó en la posición 19589-19658 en una región intergénica entre la lisina (gen 23) y la integrasa (gen 24). En PLE3, el sitio *attP* está

ubicado en la posición 22006-22103 del gen 25 que es interrumpido cuando se produce la integración en el genoma bacteriano. A diferencia de lo que ocurre en otros profagos, PLE3 se integra en una región intergénica.

En paralelo se realizó un análisis por espectrometría de masa con el objetivo de identificar las proteínas pertenecientes al virión maduro. La tabla 12 muestra las proteínas encontradas. La mayoría de las proteínas correspondieron a PLE2 y solo dos a PLE3 (incluyendo la proteína de la cápside). Estos resultados en su conjunto muestran la capacidad de ensamblar y liberar partículas fágicas tanto de PLE2 como de PLE3 sin que haya una recombinación aparente entre los genomas de ambos fagos. En concordancia con los niveles de escisión y replicación, PLE2 es el fago mayormente representado. Debido a la similitud en los tamaños de la TMP (proteína responsable del largo de la cola) de ambos fagos, es difícil determinar si la MET corresponde a PLE2 o PLE3. El análisis por MS indicaría que el fago PLE2 es más estable, ya que la mayoría de los péptidos encontrados pertenecen a éste (tabla 12).

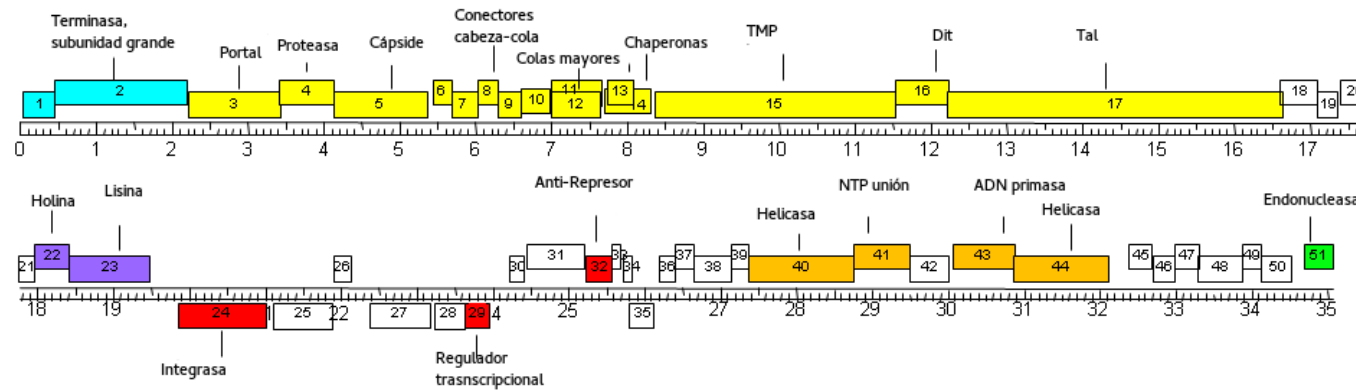
En resumen, la lisis parcial de los cultivos en presencia del inductor y la baja proporción de viriones completos indicarían, en principio, un bajo riesgo de lisis al utilizar esta cepa. En concordancia con nuestros resultados, en varios trabajos se describió una baja capacidad de inducción de profagos en cepas de *Lactobacillus* (Ventura *et al.*, 2003; Ventura *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2006). Sería necesario repetir este estudio en presencia de diferentes factores físico-químicos presentes durante los procesos fermentativos (osmolaridad, pH, cambios de temperatura) para evaluar el riesgo real en el uso de esta cepa como iniciadora o probiótica. Este mismo tipo de análisis podría hacerse extensivo a otras cepas de *Lactobacillus* empleadas en la industria láctea.

Tabla 11. Anotación de los genes a partir de la secuenciación de los fagos PLE2 y PLE3

PLE2	Inicio- Fin	Mejor homología con virus	% aa Ident.	Posible Función
gen	(Largo-aa)	(organismo, gen)		
1F	57 - 443 (128)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 1	99	
2F	446 - 2176 (576)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 2	99	Terminase, subunidad grande
3F	2195 - 3430 (411)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 3	99	Portal
4F	3408 - 4115 (235)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 4	97	Proteasa
5F	4120 - 5349 (409)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 5	99	Cápside
6F	5423 - 5671 (82)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 6	99	
7F	5685 - 6011 (108)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 7	100	
8F	6001 - 6288 (95)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 8	99	Unión cabeza-cola
9F	6272 - 6601 (109)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 9	99	
10F	6591 - 6974 (127)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 10	99	
11F	6986 - 7633 (215)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 11	99	Cola mayor S
12F	6986 - 7695 (236)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 11	99 (QC 90))	Cola mayor L
13F	7710 - 8075 (121)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 12	99	Chaperona de la cola
14F	7710 - 8313 (202)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 12	99 (QC 59)	Chaperona de la cola
15F	8337 - 11507 (1056)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 14	95 (QC 60)	TMP
16F	11514 - 12209 (231)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 15	97	Dit
17F	12206 - 16609 (1467)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 16	89	Tal
18F	16587 - 17063 (158)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 17	99	
19F	17066 - 17335 (89)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 18	97	
20F	17383 - 17769 (128)	<i>Lactobacillus</i> phage J-1, 20	97	
21F	17750 - 17956 (68)	<i>Lactobacillus</i> phage CL1, 23	94 (QC 77)	
22F	17953 - 18414 (153)	<i>Lactobacillus</i> phage CL2, 23	97	Holina
23F	18416 - 19468 (350)	<i>Lactobacillus</i> phage J-1, 23	95	Lisina
24R	21000 - 19849 (383)	<i>Lactobacillus</i> phage J-1, 24	99	Integrasa
25R	21872 - 21111 (253)	<i>Lactobacillus</i> phage PL-1, 25	99	
26F	21891- 22121 (76)	<i>Lactobacillus</i> phage PL-1, 26	100	
27R	23156 - 22377 (259)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
28R	23632 - 23228 (134)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 32	53 (QC 97)	
29R	23955 - 23629 (108)	<i>Enterococcus</i> phage phiFL3A, 3	47 (QC 97)	Regulador Trans. /Represor
30F	24212 - 24424 (70)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	47 (QC 97)	
31F	24427 - 25200 (257)	<i>Brochothrix</i> phage BL3, 34	45 (QC 95)	
32F	25232 - 25555 (107)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 30	38 (QC 72)	Anti-represor
33F	25555 - 25686 (43)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
34F	25700 - 25834 (44)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
35R	26134 - 25823 (103)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
36F	26195 - 26386 (63)	<i>Lactobacillus</i> phage CL2, 37	60 (QC 75)	
37F	26400 - 26639 (79)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
38F	26644 - 27138 (164)	<i>Lactobacillus</i> phage Lc-Nu, 28	46 (QC 94)	
39F	27150 - 27380 (76)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
40F	27380 - 28747 (455)	<i>Lactobacillus</i> phage LfeSau, 36	66	Helicasa
41F	28749 - 29489 (246)	<i>Lactobacillus</i> phage LfeSau, 37	60	NTP dominio de unión
42F	29494 - 30001 (169)	<i>Lactobacillus</i> phage LfeSau, 38	40	
43F	30068 - 30865 (265)	<i>Lactobacillus</i> phage phiJB, 21	49	ADN primasa
44F	30855 - 32105 (416)	<i>Lactobacillus</i> phage LfeSau, 40	54	Helicasa
45F	32380 - 32694 (104)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 40	79 (QC 86)	
46F	32701 - 32985 (94)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 43	99	
47F	32972 - 33301 (109)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 44	91	
48F	33294 - 33881 (195)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 45	90	
49F	33868 - 34122 (84)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
50F	34119 - 34523 (134)	<i>Lactobacillus casei</i> BL23,W56,BDII	100	
51F	34688 - 35068 (126)	<i>Lactobacillus</i> phage IA2, 50	96	HNH endonucleasa

PLE3 gen	Inicio- Fin (Largo-aa)	Rejos homología con virus (organismo, gen)	% aa Ident.	Posible Función
1F	1 - 573 (190)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 1	100	Terminasa, subunidad pequeña
2F	557 - 1810 (417)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 2	100	Terminasa, subunidad grande
3F	1770 - 3242 (490)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 3	100	Portal
4F	3208 - 4200 (330)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 4	100	Andamiaje
5F	4325 - 4963 (212)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 5	100	
6F	4976 - 5290 (104)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 6	100	
7F	5304 - 6344 (346)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 7	100	Cápside
8F	6474 - 6851 (125)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 8	100	
9F	6855 - 7733 (292)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 9	100	
10F	7733 - 8107 (124)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 10	100	
11F	8112 - 8414 (100)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 11	100	Unión cabeza-cola
12F	8411 - 8776 (121)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 12	100	Unión cabeza-cola
13F	8777 - 9181 (134)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 13	100	
14F	9193 - 9792 (199)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 14	100	Cola mayor
15F	9931 - 10266 (111)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 15	100	Chaperona de la cola
16F	10311 - 10718 (135)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 16	100	Chaperona de la cola
17F	10711 - 14046 (1112)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 17	100	TMP
18F	14049 - 16013 (654)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 18	100	Dit
19F	16010 - 19129 (1039)	<i>Lactobacillus</i> phage PL-1, 17	100	Tal
20F	19139 - 19462 (107)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 15	100	
21F	19567 - 19917 (116)	<i>Lactobacillus</i> phage A2, 16	100	
22F	19932 - 20345 (137)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 22	99	Holina
23F	20356 - 21540 (394)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 23	100	Lisina
24F	21585 - 21809 (74)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 24	100	
25R	22197- 21904 (97)	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> lpp48	76 (QC 90)	
26R	23403 - 22219 (394)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 25	100	Integrasa
27R	23862 - 23533 (109)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 26	100	
28R	24313 - 23855 (152)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 27	100	
29R	24590 - 24387 (67)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 28	100	
30R	25039 - 24614 (141)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 29	100	
31R	26031 - 25138 (297)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 30	100	
32R	27437 - 26082 (451)	<i>Clostridium</i> phage CDMH1	43 (QC81)	Replicación
33R	27865 - 27515 (116)	<i>Lactobacillus</i> prophage Lj928 (Ljo_1464)	49 (QC 75)	
34R	28500 - 27922 (192)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 31	29 (QC 47)	
35R	28975 - 28559 (138)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 32	93	
36R	29306 - 28968 (112)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 33	53	Regulador Transcriptional
37F	29446 - 29646 (66)	<i>Listeria</i> phage vB_LmoS_293, 36	50 (QC 90)	Regulador Transcriptional
38F	29683 - 29994 (103)	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> lpp48 (04356)	98	
39R	30209 - 29991 (72)	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CNCM I-4649 (Lpp124_00315)	100	
40F	30288 - 30434 (48)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 37	98	
41F	30500 - 31048 (182)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 38	98	
42F	31027 - 31248 (73)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 39	99	
43F	31261 - 31389 (42)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 40	100	
44F	31483 - 31896 (137)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 42	99	
45F	31909 - 32772 (287)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 43	92	Unión a ADN
46F	32852 - 33553 (233)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 44	96	
47F	33569 - 34534 (321)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 45	95 (QC 57)	
48R	35041 - 34661 (126)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 47	100	
49F	35376 - 35588 (70)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 49	100	
50F	35585 - 36034 (149)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 50	100	
51F	36081 - 36335 (84)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 51	100	
52F	36332 - 36697 (121)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 52	100	Endodeoxiribonucleasa
53F	36710 - 37003 (97)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 53	100	
54F	37009 - 37206 (65)	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> Lpp125, Lpp125_00822	86	
55F	37244-37364 (46)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 55	96	
56F	37577 - 38020 (147)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 56	89	Regulador Transcriptional
tRN	38484 - 38559	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84	97	tRNA- Ile
A				
57F	38616 - 38996 (126)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 57	100 (QC 76)	
58F	39090 - 39281 (63)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 58	78	
59F	39505 - 40653 (382)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 59	89	
60F	40646 - 40969 (107)	<i>Lactobacillus</i> phage ilp84, 60	95	ribonucleósido difosfato reductasa

PLE2



PLE3

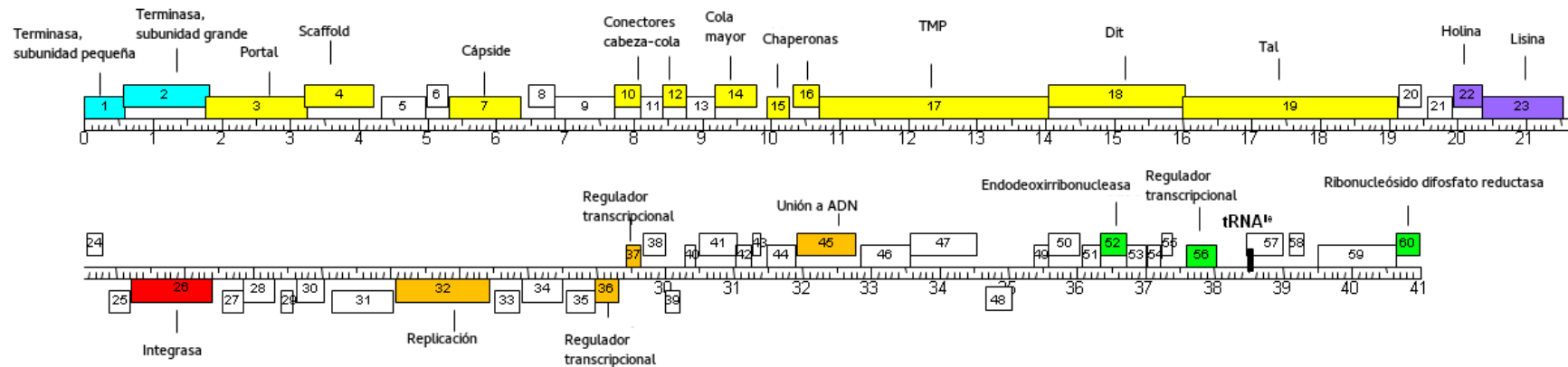


Figura 36. Mapas genómicos de PLE2 y PLE3. Los genomas virales de PLE2 y PLE3 están representados en cuatro filas con los espaciadores de 1kpb y 100 pb. Los genes encontrados se muestran en rectángulos sobre o debajo del genoma dependiendo si se transcriben de izquierda a derecha o de derecha a izquierda respectivamente. Los genes se pueden dividir en los siguientes módulos: empaquetamiento (celeste), estructura del virión (amarillo), lisis (violeta), integración e inmunidad (rojo) y replicación (anaranjado). Los genes que codifican para las proteínas en el extremo derecho están coloreadas en verde o sin coloración cuando no se pudo asignar función asociada.

Tabla 12. Identificación de las proteínas asociadas al virión por MS

gp	PM [kDa]	Cobertura	PSMs ^b
PLE2			
gp3 (Portal)	45.7	0.59	161
gp5 (Cápside)	43.7	0.22	15
gp9 (Unión cabeza cola?)	12.5	0.22	5
gp11/12 (MTP)	15.9	0.24	14
gp15 (TMP)	112.4	0.03	7
PLE3			
gp6 (Unión cabeza cola?)	10.7	0.40	2
gp7 (Cápside)	38.2	0.36	15

^a Porcentaje de la secuencia identificada a través de los péptidos ^b PSMs, número totales de péptidos encontrados.

2.6. Proteínas de la placa base de PLE1, PLE2, PLE3

En el capítulo anterior, a partir del análisis bioinformático de las secuencias genómicas de J-1 y PL-1, se describieron diferencias interesantes entre estos fagos y otros fagos del grupo *L. casei* en comparación con aquellos que han sido ampliamente estudiados a nivel estructural como los fagos de *Lactococcus*. Observamos que en J-1 y PL-1, como también en otros fagos del grupo *L. casei* de secuencia conocida (*phiAT3*, *Lrm1*, *Lc-Nu* y *A2*), las estructuras de las proteínas *Dit* y *Tal* parecen estar conservadas. En ningún caso fue posible identificar un gen que codifique para una proteína con función RBP o proteínas periféricas que cumplan con la función de reconocimiento del receptor como ocurre en los fagos de *Lactococcus*. Por el contrario, estos fagos codifican en su genoma sólo dos proteínas: *Dit* y *Tal*, de peso molecular mucho mayor a las anteriormente estudiadas y con dominios adicionales con posible función de CBM.

El análisis de los genomas de los profagos encontrados en el genoma de *L. casei* BL23 sugiere que tampoco presentan proteínas periféricas, como las RBPs, involucradas en la unión a receptores sacarídicos. De este análisis se advirtió también que la proteína *Dit* de PLE3 presenta ciertas características similares a J-1 y PL-1 y podría incluirse en la categoría de *Dit* “evolucionada”. Estas inserciones de CBMs podrían reemplazar y cumplir el rol de RBPs. En cambio, las proteínas *Dit* de PLE1 y PLE2 conservan las características de las *Dit* clásicas, y en este caso, las proteínas *Tal* presentan al menos dos posibles CBMs que podrían estar involucrados en la unión al receptor sacarídico. A continuación, se explican con más detalle las similitudes y diferencias encontradas.

2.6.1. Dit

Las proteínas Dit de PLE1 y PLE2, como también de iA2, son prácticamente idénticas y pertenecen a la estructura típica ya estudiada de los fagos SPP1 (Veesler et al., 2010) y TP901-1 (Bebeacua et al., 2010; Veesler et al., 2012) Como se mencionó con anterioridad, es probable que estas proteínas Dit clásicas formen un hexámero circular con la región N-terminal proyectando una estructura de tipo galectina en el C-terminal. La figura 37 muestra el resultado del análisis por HHpred con las respectivas homologías mostrando los valores de similitud más altos con los PDB 2x8k y 4div, que corresponden a la Dit del fago SPP1 y TP901-1, respectivamente.

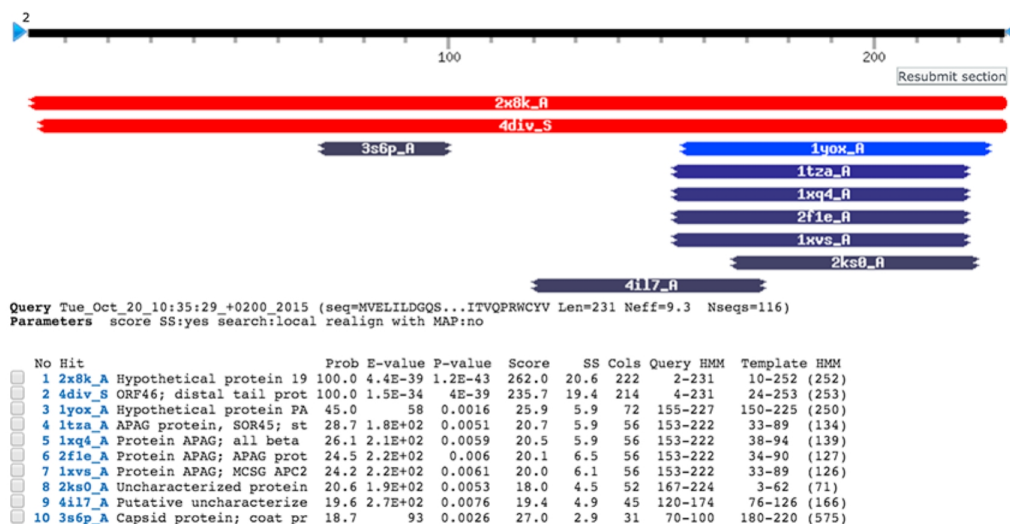


Figura 37. Homologías identificadas por HHpred para las proteínas Dit de PLE1/ PLE2

En cambio, la proteína Dit de PLE3 (gp 18) presenta dos inserciones de forma similar a lo observado en J-1 y PL-1. La primera inserción se ubica luego de la región N-terminal conservada y la segunda después del primer *loop* del dominio de tipo galectina. En este caso, no fue posible asignarle identidad a la primera inserción a diferencia de lo descrito para J-1 y PL-1 en el capítulo anterior. Sin embargo, el alineamiento entre el CBM1 de J-1 y esta primera inserción mostró que tienen una alta similitud (figura 38 A) sugiriendo que también podría ser un dominio de tipo CBM. A su vez, la comparación de la primera inserción y la segunda presentan un 32% de similitud y un 25% de identidad aminoacídica entre sí (figura 38 B) sugiriendo un plegado similar. El análisis de las secuencias de diferentes profagos inducidos de *Lactobacillus* muestra un CBM1 que varía de cepa a cepa y un CBM2

más conservado (figura 39). Nuevamente, estos dominios podrían estar vinculados con el reconocimiento de receptores específicos en la envoltura bacteriana.

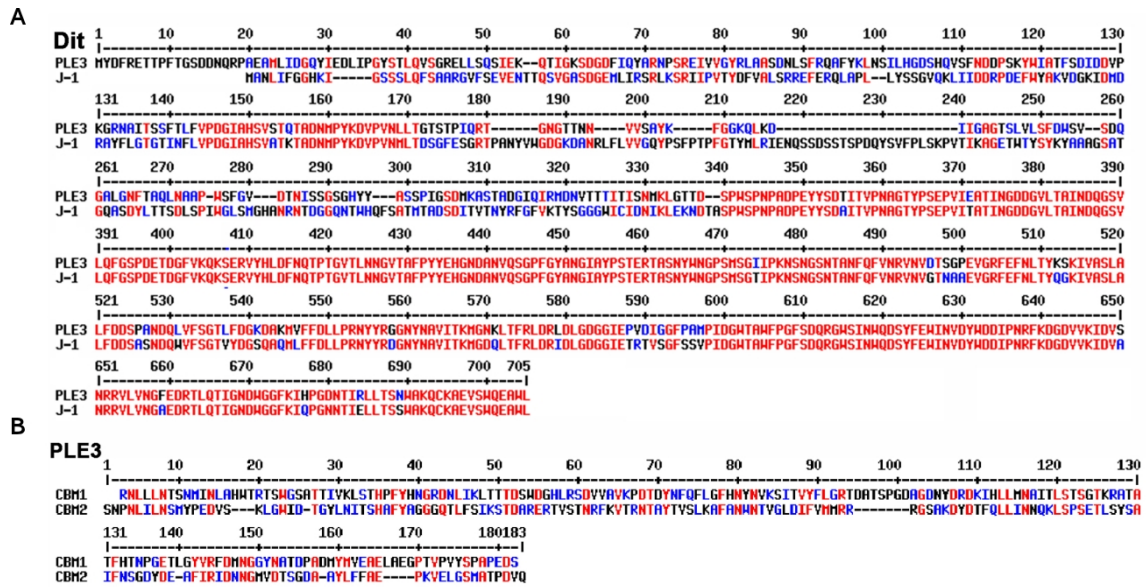


Figura 38. Similitud de secuencia entre las proteínas DIT evolucionadas de PLE3 y J-1. **A.** Comparación aminoacídica de DIT de PLE3 y J-1. En rojo se muestran los aminoácidos que comparten mientras que en azul los que no presentan similitud. **B.** Similitud de secuencia entre los dos dominios CBM localizados en el profago PLE3.

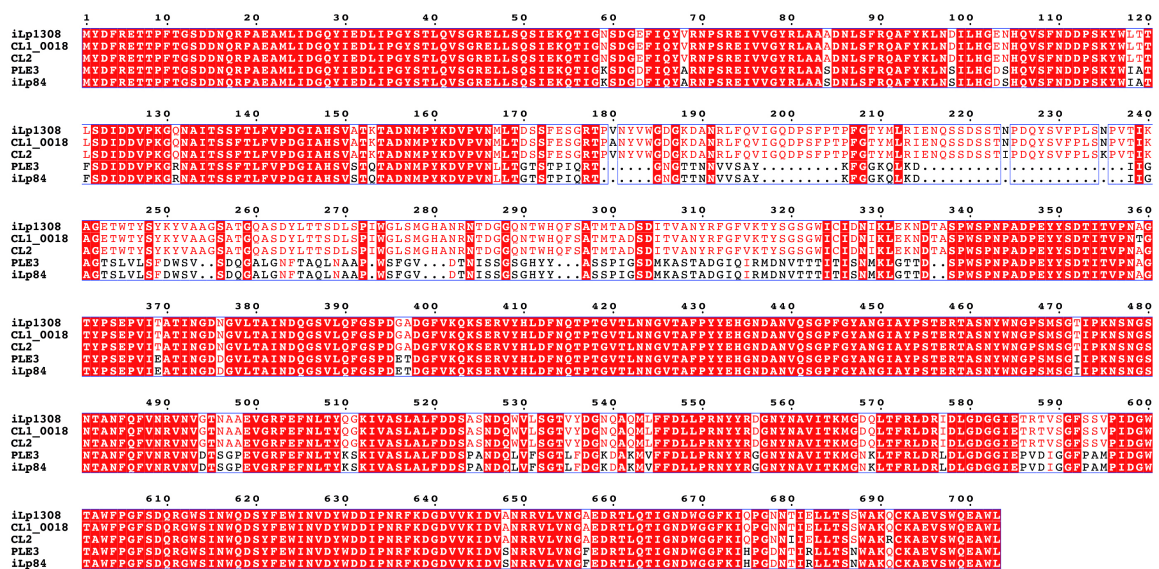


Figura 39. Alineamiento múltiple de DIT proveniente de profagos inducidos del grupo *L. casei*. IA2 (*L. paracasei* A), ilp1308 (*L. paracasei* cnrz 1308), CL1 y CL2 (*L. paracasei* A) e ilp84 (*L. paracasei* 84)

2.6.2. Tal

Los primeros 370 aa de la proteína Tal de PLE1-3 tienen una posible estructura similar a gp27 (Kanamaru *et al.*, 2002; Kondou *et al.*, 2005), al ORF 16 del fago p2 (Sciara *et al.*, 2010) y a la Tal de J-1 y PL-1.

Las proteínas Tal de CL1, CL2 e iLp1308 son similares a la de PLE3 (gp19). A su vez, iLp84 presenta exactamente la misma secuencia que la Tal de PLE3. La región C-terminal no presentó homología con proteínas cristalizadas; sin embargo, contiene las regiones de tipo colágeno repetidas también identificadas en las proteínas Tal de J-1 y PL-1. La proteína Tal de PLE3 (figura 40 B) presenta el dominio N-terminal conservado (1-374), seguido de la estructura de tipo colágeno (375-790) y una región C-terminal sin una homología aparente (921-1040). Recientemente, el mismo análisis arrojó que entre las posiciones 545-758 presenta homología con la estructura proteica resuelta por rayos X BppA del fago Tuc2009 con posible función de unión a carbohidratos.

Por otro lado, las proteínas Tal de PLE1 (como también iA2) y PLE2 (gen 17) presentan un dominio N-terminal conservado (1-374) seguido de un dominio *fibrin like tail needle* (residuos 375-649) identificado por HHpred (Figura 40 A). Este dominio, probablemente extendido, conecta a la región N-terminal con un CBM predicho por HHpred (650-817). Esta región es seguida de una zona sin determinar (818-880) y posteriormente una glicosidasa o un dominio CBM (881-1060). El siguiente fragmento no determinado (1061-1292) (Figura 40 A) es seguido por un dominio asignado por HHpred como una chaperona que ayudaría al plegado correcto de una glicosidasa (1293-1468) (García-Doval *et al.*, 2015). Aunque la identidad de secuencia está lejos de las glicosidas/ CBMs identificadas en los residuos 881-1060, es probable que la estructura sin identificar posicionada en 1061-1292 sea una proteasa/glicosidasa con una estructura no documentada en PDB. Las secuencias de las Tals de PLE1/iA2 y PLE2 (Figura 40 A) son 99% idénticas entre sí exceptuando el segmento anterior a las chaperonas (1170-1350). Esta región podría ser responsable de una especificidad diferencial del sustrato a hidrolizar en la pared bacteriana entre PLE1 y PLE2. La figura 40 resume los dominios analizados y sus posibles funciones.

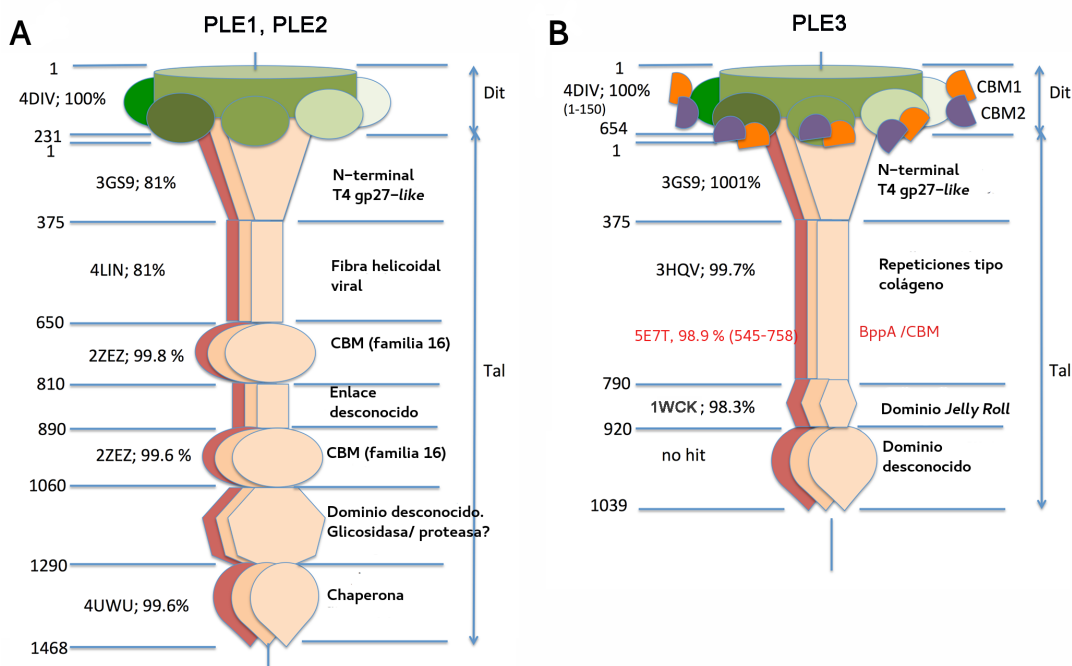


Figura 40. Representación esquemática de las proteínas de la placa base de PLE1/PLE2 y PLE3 basado en el análisis por HHpred. A. Placa base de PLE1 y PLE2. B. Placa base de PLE3. Se indican los resultados de PDB obtenidos por la herramienta HHpred junto con la probabilidad indicada en porcentaje (%). En rojo se destaca un nuevo resultado que incluye un dominio tipo CBM. Las proteínas Dit clásicas están mostradas como un anillo verde cilíndrico y los círculos verdes indican el dominio galectina. La proteína Dit evolucionada de PLE3 presenta los dominios CBM1 y CBM2 coloreados en anaranjado y violeta respectivamente. Las proteínas Tal triméricas están coloreadas en salmón.

Capítulo 3

Análisis funcional de la placa base de los fagos

J-1 y PL-1

3. Análisis funcional de la placa base de los fagos J-1 y PL-1

El análisis de la secuencia genómica y los resultados bioinformáticos, junto al análisis proteómico de los viriones presentados en el capítulo 1 indicaron que los productos de los genes 16 y 17 (Dit y Tal, respectivamente) son los únicos componentes de la placa base en J-1 y PL-1. La bibliografía hasta el momento sugería que la proteína Dit tenía una función meramente estructural en donde otras proteínas denominadas RBPs se anclaban y eran las responsables de la interacción con los receptores bacterianos. A su vez, la Tal se describió como una proteína con actividad hidrolítica de la pared bacteriana. Sin embargo, en los genomas de J-1, PL-1 y otros genomas de fagos y profagos del grupo *L. casei* (capítulo 1 y capítulo 2), las proteínas Dit y Tal presentaron un tamaño excesivamente mayor en comparación con las proteínas anteriormente caracterizadas que sugerían funciones adicionales. En este capítulo se intentará demostrar el rol de la Dit y la Tal en los fagos J-1 y PL-1 haciéndolo extensivo a otros fagos del grupo *L. casei*.

3.1. Primeros ensayos: reconocimiento fago-hospedador

El fago J-1 y PL-1 presentan una menor identidad de secuencia aminoacídica en la proteína Dit. A su vez, la morfología de las placas de lisis difiere entre ambos fagos dependiendo del hospedador empleado. J-1 produce placas grandes de 2 mm en *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (huésped de J-1) y en *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 (huésped de PL-1). Mientras que PL-1 forma placas con la misma morfología pero más pequeñas (aproximadamente 1,5 mm) en *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27092; las placas son casi imperceptibles (*pinplaques*) en *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27139 (figura 41). En base a estos resultados decidimos comparar la cinética de adsorción en ambas cepas.

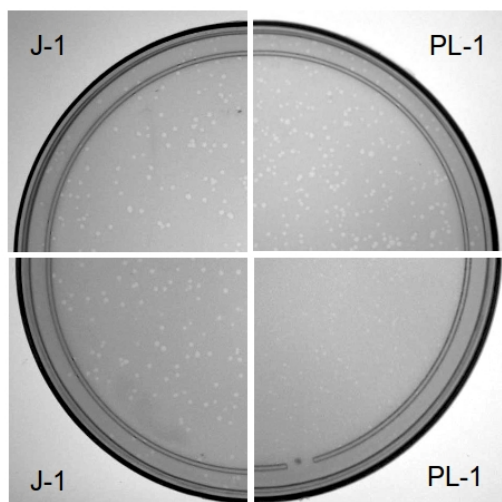


Figura 41. Placas de lisis de J-1 y PL-1 en *L. paracasei* y *L. casei*. Los paneles superiores corresponden a la infección en placa realizada con la cepa *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 y los paneles inferiores a las placas de lisis obtenidas con la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139.

La cinética de adsorción resultó similar entre ambos fagos en *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092, teniendo el 90 % de los fagos adsorbidos después de 5 minutos de incubación. Sin embargo, cuando se utilizó la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 sólo el 40% de los fagos se adsorbieron luego de 5 minutos. A los 30 minutos, todos los fagos J-1 estaban adsorbidos, mientras que el mismo fenómeno ocurrió luego de una hora para PL-1 (figura 42). Estos resultados sugieren que aunque J-1 y PL-1 son muy similares, las pequeñas diferencias que presentan a nivel de las proteínas estructurales, en particular en la placa base, podrían ser las responsables de las diferencias observadas en los primeros pasos de la infección. Pese a infructuosos intentos, no logramos encontrar bacterias que fueran resistentes a PL-1 pero sensibles a J-1.

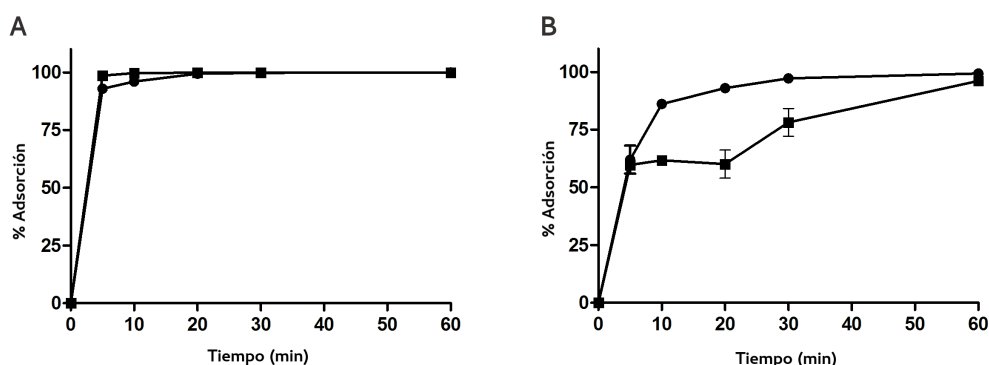


Figura 42. Cinética de adsorción de J-1 y PL-1. Células de *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 (A) o *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (B) se incubaron con J-1 (círculos) o PL-1 (cuadrados). En los puntos indicados (0, 5, 10, 30, 60 min), se calculó el porcentaje de adsorción.

En trabajos previos, se mostró que el azúcar ramnosa podía ser un receptor de J-1 y PL-1 (Ishibashi *et al.*, 1982; Yokokura, 1971; Yokokura, 1977). Cuando se realizaron ensayos de adsorción de J-1 y PL1 con células enteras de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 no se observaron diferencias en la adsorción en ausencia y en presencia de diferentes azúcares. Al repetir estos ensayos de adsorción empleando paredes celulares de esta bacteria, de todos los azúcares evaluados, la L-ramnosa tuvo un efecto inhibitorio en la adsorción de ambos fagos (figura 43). Sin embargo, no se observó un efecto inactivante de este azúcar como había sido reportado por Yokokura (datos no mostrados) (Yokokura, 1977).

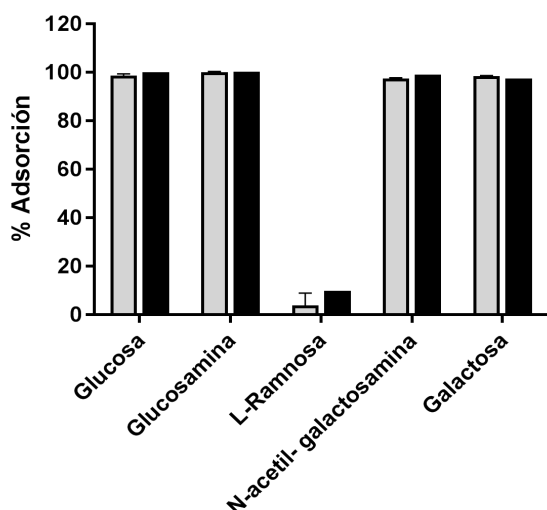


Figura 43. Ensayo de adsorción en presencia de azúcares. Los fagos J-1 (barras grises) y PL-1 (barras negras) fueron pre incubados con 0,25 M de los azúcares indicados y luego con paredes celulares de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. Se midieron las UFP/ml en el sobrenadante y el porcentaje de adsorción se comparó con el control. Las barras de error muestran las desviaciones estándar de los experimentos hechos por triplicado.

3.2. Unión de la proteína Dit a *L. casei/ paracasei*

Con el objeto de estudiar la posibilidad de interacción de las proteínas de la placa base con la superficie bacteriana, se expresaron las proteínas Dit y Tal recombinantes de manera independiente empleando una fusión a la proteína verde fluorescente o GFP. Seguidamente, las células bacterianas crecidas en un estado exponencial se desafiaron con las respectivas proteínas (1 μ g) y luego de sucesivos lavados, se observaron al microscopio de fluorescencia. Si las células bacterianas se observan verdes, es decir decoradas con las proteínas fusionadas a GFP, entonces el ensayo indica la interacción con algún ligando en la superficie bacteriana.

Los tamaños de las proteínas de J-1 y PL-1 son de 75,1 kDa y 69, 2 kDa para Dit y 113 kDa para Tal. La proteína Dit forma un hexámero (450 kDa aproximadamente) mientras que Tal un trímero (339 kDa aproximadamente) dificultando la expresión y purificación de las mismas de forma adecuada. En particular, se presentaron varios problemas en la expresión de la proteína Tal y por ese motivo durante este capítulo nos abocaremos principalmente a la proteína Dit (J-1 GFP-Dit y PL-1 GFP-Dit).

Las imágenes de fluorescencia mostraron que tanto J-1 GFP-Dit como PL-1 GFP-Dit recubrían a la superficie bacteriana de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (figura 44 A-B) y *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 (figura 44 C-D). La localización uniforme de la fluorescencia en la superficie celular sugería que las moléculas receptoras de Dit estaban homogéneamente distribuidas en las células, sin tener una localización particular. Como control negativo, se utilizó la proteína GFP sin observarse interacción con las bacterias lácticas (figura 45 A). En paralelo, las proteínas J-1 GFP-Dit y PL-1 GFP-Dit se incubaron con células de *L. acidophilus* (no presentan sensibilidad frente a los fagos J-1 o PL-1). En este ensayo, las bacterias no mostraron fluorescencia indicando una ausencia en la interacción *L. acidophilus*- Dit en las condiciones evaluadas (figura 44 E-F). En resumen, estos ensayos sugieren que la proteína Dit tiene la capacidad de reconocer específicamente a algún receptor presente en la superficie de *L. casei/ paacasei*.

Previamente, empleando ensayos de inhibición de la adsorción de J-1 y PL-1 en presencia de azúcares, mostramos que el azúcar L-ramnosa era al menos uno de los posibles receptores vinculados con la adsorción del fago a la bacteria. Decidimos repetir los ensayos de unión de las proteínas Dit pero, en este caso, en presencia de azúcares. Solo el agregado de L-ramnosa como competidor (figura 44 G-H), inhibió la interacción entre la proteína Dit y la bacteria. Al incubar con otros azúcares como glucosa (figura 44 I-J) y N-acetil glucosamina (no mostrado) la proteína siguió recubriendo la superficie bacteriana. La inhibición de la adsorción de Dit en presencia de L-ramnosa sugiere que este azúcar es un componente importante del receptor bacteriano reconocido por los fagos J-1 y PL-1.

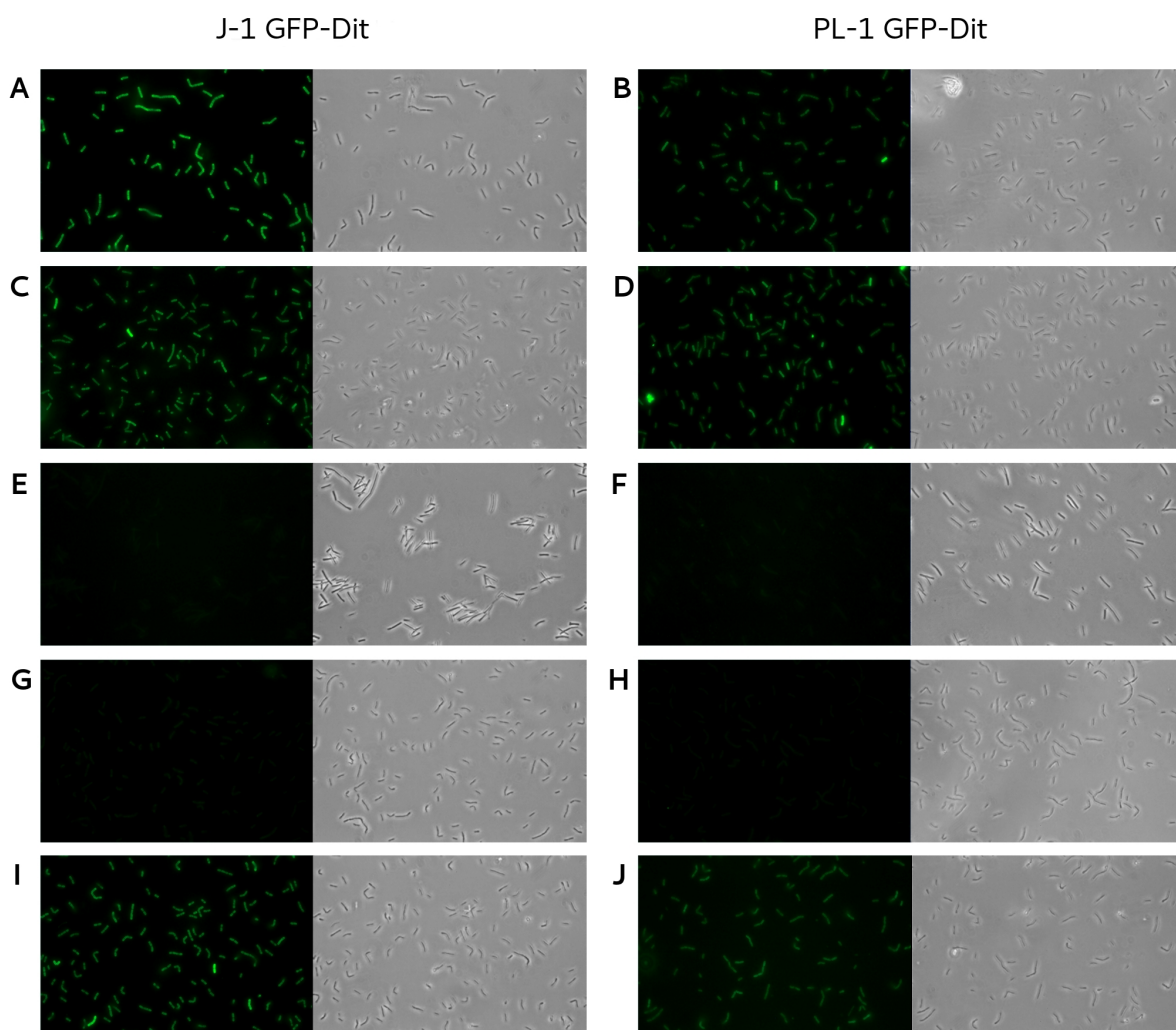


Figura 44. Unión de GFP-Dit a células de *Lactobacillus*. Las proteínas recombinantes J-1 GFP-Dit (panel izquierdo) y PL-1 GFP-Dit (panel derecho) se incubaron con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (A-B), *L. paracasei* subsp. *paracasei* ATCC 27092 (C-D), *Lactobacillus acidophilus* (E-F) y *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en presencia de L-ramnosa (G-H) o glucosa (I-J). Las células se visualizaron al microscopio con contraste de fase (imagen derecha) y fluorescencia (imagen izquierda). Magnificación de 1000X.

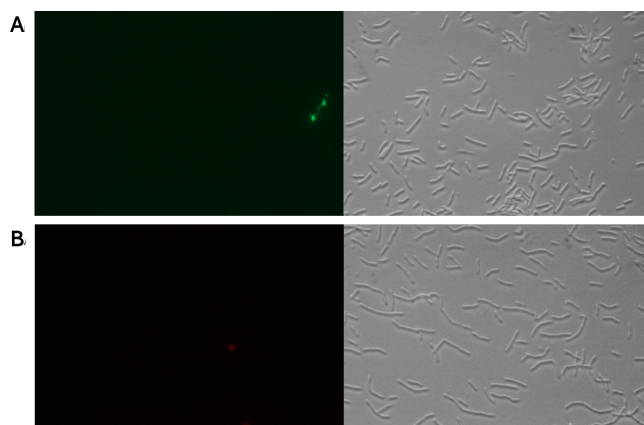


Figura 45. Ensayos control con las proteínas GFP y mCherry. Las proteínas GFP (A) y mCherry (B) se incubaron con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y se visualizaron al microscopio con contraste de fase (imagen derecha) y fluorescencia (imagen izquierda).

3.3. Inhibición de la adsorción de Dit

Los resultados mostrados en el punto 3.2 sugieren que la proteína Dit se une específicamente a la superficie celular reconociendo a un receptor que al menos contiene al azúcar L-ramnosa. Decidimos evaluar si la proteína recombinante Dit producía un efecto inhibitorio en la adsorción del fago a través de una competencia por estos sitios en la superficie bacteriana. Las paredes celulares de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína J-1 GFP-Dit y PL-1 GFP-Dit (0,01; 0,04; 0,16 y 0,64 μM). Luego, se agregaron los fagos J-1 y PL-1 y se midió la inhibición de la adsorción respecto a un control en ausencia de proteína.

Con ambos fagos, a partir de una concentración de 0,04 μM de Dit, se observó un efecto inhibitorio dependiente de la cantidad de proteína agregada. En presencia de 0,16 μM y 0,64 μM de Dit, se observaron diferencias significativas en el efecto inhibitorio de J-1 GFP-Dit y PL-1 GFP-Dit para ambos fagos. En particular, a la máxima concentración evaluada (0,64 μM) en presencia del fago J-1, la media de inhibición de la adsorción fue del 48% en presencia de la proteína J-1 GFP-Dit y 20 % con la proteína PL-1 GFP-Dit (Figura 46 A).

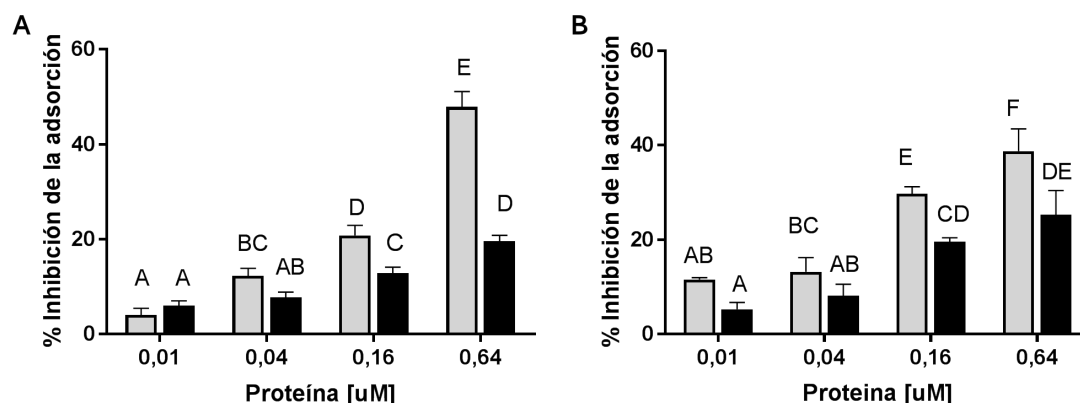


Figura 46. Inhibición de la adsorción de Dit en los fagos J-1 y PL-1. Las concentraciones indicadas de proteína J-1 GFP-Dit (gris) y PL-1 GFP-Dit (negro) se incubaron con paredes celulares de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 y posteriormente se realizó el ensayo de adsorción en presencia de J-1 (A) o PL-1 (B). Las barras de error representan las desviaciones estándar de los experimentos realizados por triplicado. Las comparaciones se efectuaron utilizando la prueba de Tukey y se consideraron significativas aquellas pruebas con $p < 0.05$, indicadas con distintas letras.

Cuando el ensayo de inhibición se realizó con el fago PL-1, la proteína Dit de PL-1 inhibió la adsorción un 25% en presencia de 0,64 μM de proteína mientras que la competencia generada por la proteína Dit de J-1 se redujo mínimamente respecto al fago J-1 (38%) (Figura 46 B). Estos ensayos sugerirían una mayor afinidad de la proteína J-1 GFP Dit en comparación con PL-1 GFP Dit por los receptores presentes en la pared de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139.

3.4. Anticuerpos anti-Dit

Con el objeto de complementar los resultados descritos en 3.2 y 3.3, se desarrollaron anticuerpos anti J-1 GFP-Dit en ratón. Para evaluar la inmunogenicidad de distintos sueros se realizó un ensayo de *dot blot* con diluciones seriadas de los sueros provenientes de 5 ratones (datos no mostrados). La dilución 1/2000 resultó óptima para los ensayos de *western blot* (WB). La figura 47 A muestra cómo empleando este anticuerpo pudo identificarse a la proteína Dit proveniente de los viriones PL-1 y J-1 en un ensayo de *western blot*.

3.4.1. Ensayo de inmunoelectromicroscopía

Considerando la localización de la proteína Dit en el genoma, su homología a otras proteínas y nuestros propios resultados, esperábamos que su localización fuera en la punta de la cola del bacteriófago. Los ensayos de inmunoelectromicroscopía resultan óptimos para corroborar fehacientemente la localización de una proteína en la partícula viral. Para este ensayo, los fagos PL-1 y J-1 se incubaron con anticuerpos primarios específicos anti-Dit y se realizó una segunda incubación con un anticuerpo anti-ratón marcado con oro. Las fotografías de microscopía electrónica permitieron determinar que la proteína Dit se ubicaba en el extremo distal de la cola del fago observándose entre una a tres partículas de oro por fago en J-1 (figura 47 B) y también en PL-1 (figura 47 C). En la mayoría de los campos se observaron fagos aglomerados por sus colas siendo esto un indicativo de la interacción bivalente del primer anticuerpo con las proteínas de la cola del virus (Figura 47 D).

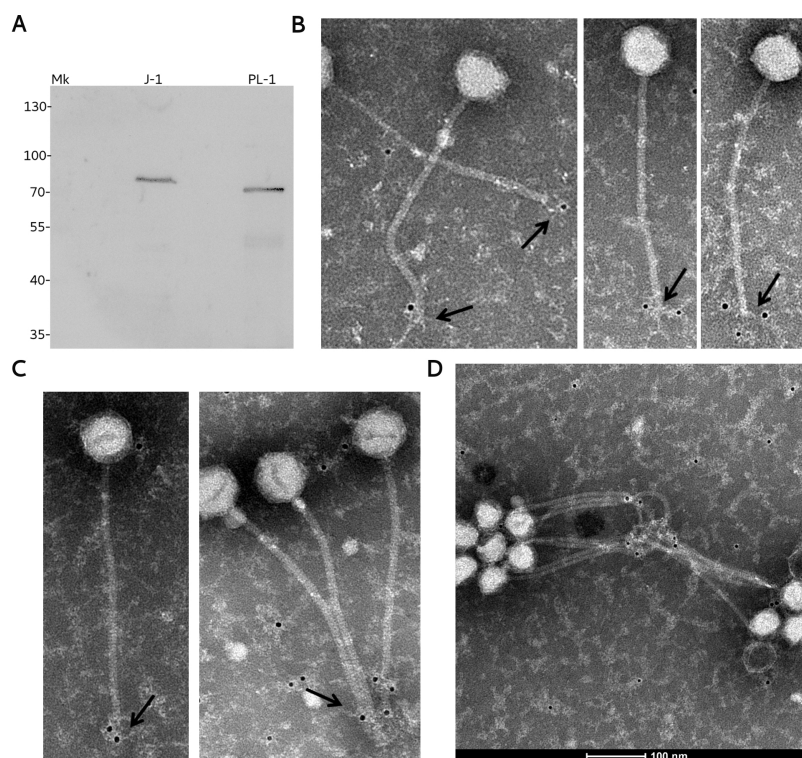


Figura 47. Proteína Dit en el virión. A. Ensayo de WB empleando las proteínas del virión completo de J-1 y PL-1. B-D. Ensayo de inmunoelectromicroscopía. Las flechas indican la localización de la proteína Dit en la punta de la cola de J-1 (B y D) y PL-1 (C).

3.4.2. Neutralización e inhibición de la adsorción

Los anticuerpos anti-Dit se utilizaron en ensayos de neutralización en medio líquido y también en ensayos de inhibición de la adsorción. Los ensayos de neutralización mostraron una reducción en la infectividad dependiente de la concentración de anticuerpo utilizada (figura 48 A).

Una dilución 1/200 del anticuerpo fue suficiente para inhibir por completo la infección viral. Cuando los ensayos de inhibición de la adsorción se llevaron a cabo con células enteras de *L. casei subsp. casei* ATCC 27139, se logró inhibir hasta un 60% la adsorción de J-1 con el agregado de una dilución 1/10 de anticuerpo (figura 48 B). Es necesario aclarar que los ensayos son complementarios, aunque no comparativos, dado que las condiciones en las que cada ensayo se realiza y el efecto que se cuantifica es diferente (en el primer caso se inhibe la infección mientras que en el segundo sólo se evalúa el efecto en la adsorción).

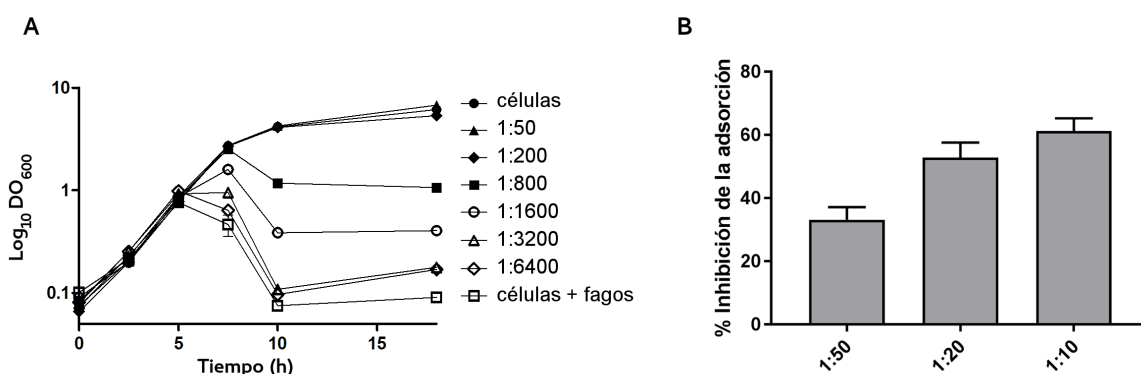


Figura 48. Ensayos con anticuerpos anti-Dit. **A.** Ensayo de neutralización del fago J-1 utilizando diferentes concentraciones del anticuerpo anti-Dit. Los fagos se incubaron con distintas concentraciones del anticuerpo y luego se adicionaron las bacterias sensibles en medio líquido. Se determinó la curva de crecimiento de *L. casei subsp. casei* ATCC 27139 en presencia de las distintas diluciones del anticuerpo. **B.** Ensayo de inhibición de la adsorción del fago J-1 en presencia del anticuerpo anti-Dit. El fago J-1 fue pre incubado con diferentes diluciones del anticuerpo y luego se adicionaron las células de *L. casei subsp. casei* ATCC 27139. Se midieron las UFP/ml en el sobrenadante y se calculó el porcentaje de inhibición de la adsorción. Las barras de error representan las desviaciones estándar de los experimentos realizados por triplicado y en forma independiente.

3.5. Ensayos de unión del CBM1 y CBM2 al huésped

En el capítulo 1, observamos que dos inserciones en la proteína Dit en el extremo C-terminal sugerían la presencia de dos dominios extra (Dom1 y Dom2) que la diferenciaban de las proteínas Dit clásicas. El Dom1 se modeló utilizando como templado a un CBM (módulo de unión a carbohidratos) mientras que para el Dom2 no pudo encontrarse un templado lo suficientemente homólogo que contara con una estructura resuelta (a partir de este punto al Dom1 lo denominaremos CBM1 y al Dom2 de la forma CBM2). A su vez, los ensayos mostrados en 3.1 y 3.2 indicaron que Dit no solo tenía una función estructural como las Dit clásicas, sino la capacidad de unirse a receptores específicos presentes en la superficie bacteriana. Con el objetivo de evaluar si estos dominios adicionales podían ser los responsables del reconocimiento del receptor, empleando las herramientas bioinformáticas anteriormente utilizadas (ver también sección 4.1), identificamos los extremos de los mismos en el fago J-1 y las secuencias correspondientes se clonaron en forma conjunta (*GFP-CBM1-CBM2*) y también por separado (*GFP-CBM1*, *mCherry -CBM2*) en un vector para su expresión en *E. coli*.

Los dominios GFP-CBM1-CBM2 interactuaron con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 decorándola de color verde. En este caso, para poner en evidencia la interacción se requirió una mayor cantidad de proteína (2 µg) en comparación al mismo ensayo empleando la proteína Dit entera (1 µg). Asimismo luego del pegado, la fluorescencia observada no fue homogénea como en el caso de la proteína Dit completa (figura 49 A). Debido a la falta de la región N-terminal de Dit en esta construcción, los monómeros no pueden interactuar unos con otros y por ende la estructura hexamérica no puede formarse. Es esperable que los dominios en forma monomérica no presenten la misma avidéz que la estructura completa y por ende se requiera una mayor cantidad de proteína para visualizar el pegado a la bacteria.

Luego, se ensayaron los dominios por separado (*GFP-CBM1*, *mCherry-CBM2*) empleando el mismo ensayo. La proteína *mCherry-CBM2* interactuó con la superficie de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 recubriéndola, en este caso, de color rojo (figura 49 C). En cambio, la proteína *GFP-CBM1* no fue capaz de decorar a la bacteria aún cuando se utilizaron concentraciones elevadas de la proteína (figura 49 B). Estos resultados indican que el CBM2 pero no el CBM1 interactúa con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139.

Considerando que el plegado del CBM1 podría estar afectado por la fusión traduccional con GFP o el *His tag* presentes en el vector empleado, decidimos expresar a las regiones de interés desprovistas de estos dominios adicionales y realizar un ensayo de inmunofluorescencia. De esta forma quisimos evaluar si la falta de reconocimiento de este dominio a la bacteria se debía a un problema de la estructura tridimensional adquirida por la proteína recombinante. Para ello, realizamos nuevas construcciones en el vector pLic07 que contiene las etiquetas 6 x *his tag*, el gen *trx* y el sitio de clivaje TEV río arriba del sitio de clonado. De esta forma, clonamos las secuencias que codifican para los dominios CBM1 y CBM2 en el mismo (ver sección 4.1 y sección 7 de materiales y métodos para más detalle). Luego de la expresión y la purificación en columna de Ni²⁺, el dominio de interés se pudo separar por un clivaje proteolítico utilizando la proteasa TEV.

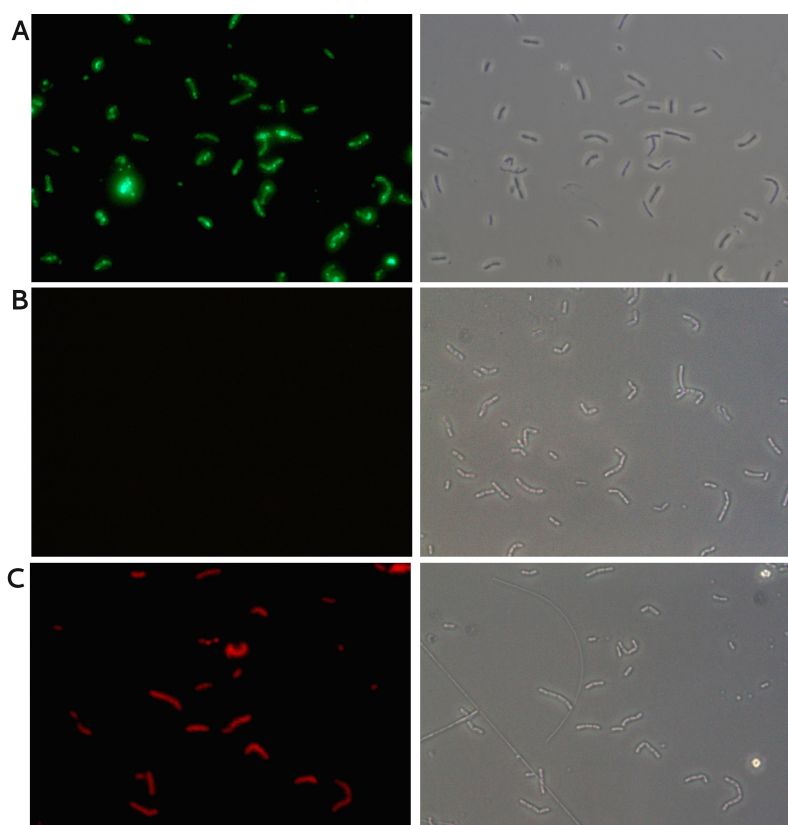


Figura 49. Dominios de la proteína Dit de J-1 e interacción con células de *L. casei*. Las proteínas recombinantes GFP-CBM1-CBM2 (A), GFP-CBM1 (B) y mCherry-CBM2 (C) se incubaron con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. Las células se visualizaron al microscopio con contraste de fase (imagen derecha) y fluorescencia (imagen izquierda). Magnificación de 1000X.

Una vez confirmado que los dominios proteicos CBM1 y CBM2 eran reconocidos por el anticuerpo primario anti-Dit mediante un ensayo de WB (figura 50 A), se procedió a realizar la inmunofluorescencia. Para ello *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 se incubó con el CBM1 o con el CBM2 y la unión a la bacteria se determinó utilizando el anticuerpo anti-Dit como anticuerpo primario y un anti-ratón conjugado a un fluoróforo rojo como secundario. Como se observa en la figura 50 B y C, el resultado fue coincidente con lo observado anteriormente: el CBM2 recubrió a las bacterias decorándolas de rojo al microscopio de fluorescencia (figura 50 C) mientras que el CBM1 no mostró interacción con las bacterias (figura 50 B).

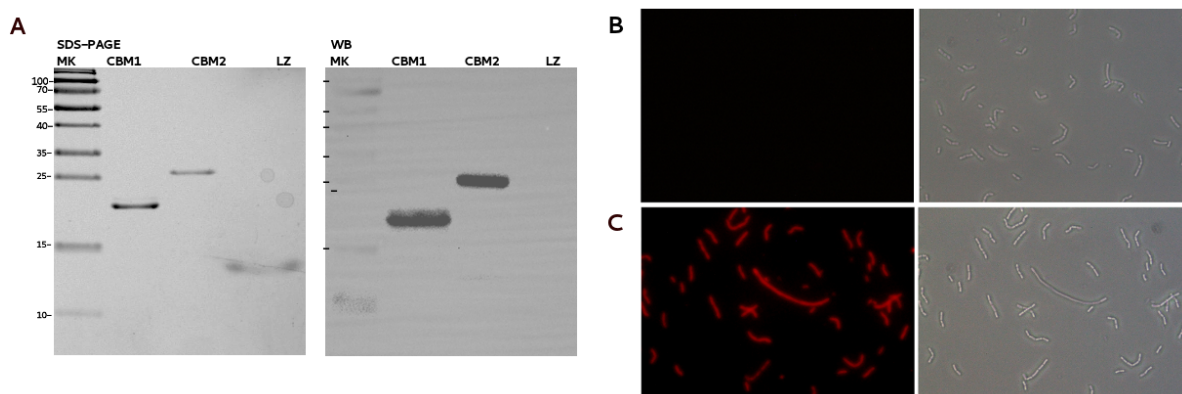


Figura 50. Ensayo de inmunofluorescencia. A. Análisis por SDS-PAGE (panel izquierdo) y WB (panel derecho) de las proteínas CBM1, CBM2 y lisozima (LZ), empleada como control negativo, usando el anticuerpo anti-Dit. Ensayo de inmunofluorescencia de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 con el CBM1 (B) o el CBM2 (C).

3.6. Ensayo de inhibición de la adsorción del CBM2

Empleando los ensayos descritos con anterioridad (3.2), evaluamos la inhibición de la adsorción de J-1 y PL-1 por los dominios CBM1 y CBM2 por separado. Para ello, se incubaron diferentes concentraciones de CBM1 y CBM2 con paredes bacterianas de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. Luego, se agregó el fago J-1 y se procedió a calcular la adsorción en ausencia y presencia de estos dominios proteicos. Consistente con lo observado en el ensayo de microscopía, solo el CBM2 logró inhibir la interacción entre el fago y las paredes bacterianas sin observarse efecto alguno con el CBM1 (figura 51). Sin embargo, la inhibición observada en presencia del CBM2 fue menor que la de la proteína Dit entera sugiriendo

nuevamente que la avidéz del complejo hexamérico Dit (con seis CBM2) supera ampliamente la afinidad de un solo dominio (figura 46).

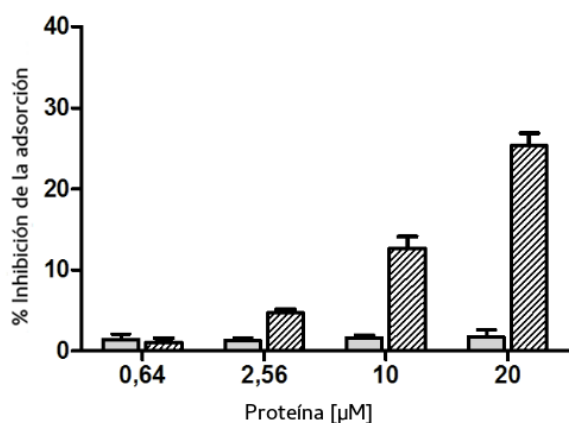


Figura 51. Inhibición de la adsorción del CBM1 y CBM2 de Dit. Se incubaron paredes celulares de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 con concentraciones crecientes del dominio CBM1 (barras grises) o CBM2 (barras rayadas), seguido del agregado de J-1 y medición de la inhibición de la adsorción. Las barras de error representan desviaciones estándar de los experimentos realizados por triplicado.

3.7. Ensayos preliminares con la proteína Tal

Se realizó la construcción *J-1 GFP-Tal* con el objeto de evaluar posteriormente la unión GFP-Tal a *L.casei/paracasei* como se describió para la proteína Dit en 3.2. Los niveles de expresión de esta proteína fueron bajos y coincidentes con la observación de cuerpos de inclusión de coloración verde en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) pLysS al microscopio de fluorescencia (datos no mostrados). Se evaluaron diferentes condiciones para mejorar la expresión en la fracción soluble aunque no se logró mejorarla significativamente. Sin embargo, al realizar la expresión proteica a volúmenes mayores, se logró purificar la proteína a partir de los extractos celulares empleando una columna de Ni²⁺ y así obtener material suficiente para el trabajo posterior. El análisis del SDS-PAGE de la fracción purificada mostró la presencia de múltiples bandas que podrían indicar problemas en el paso de purificación (figura 52 A, carril 2). Sin embargo, cuando el gel de poliacrilamida se irradió con luz UV a 302nm, se observó que la mayoría de las bandas proteicas presentes en la muestra del gel SDS-PAGE eran fluorescentes sugiriendo que las bandas observadas eran producto de la proteólisis de *J-1 GFP-Tal* (figura 52 A, carril 3). Kenny *et al.* (2004), han reportado que la proteína Tal de Tuc 2009 sufre un procesamiento postraducciona autocatalítico con actividad de endopeptidasa que reconoce específicamente la secuencia Gly-Gly. Sin embargo, en *J-1 GFP-Tal* los cortes péptidicos

parecen más promiscuos y es necesario realizar una mejor caracterización de este proceso. Asimismo, la banda de mayor intensidad, cercana a 100 kDa, como aquellas presentes en el rango de 35 - 40 kDa, se sometieron a un análisis por MS con el objeto de darles identidad. En el primer caso, se obtuvo la secuencia completa de J-1 GFP-Tal mientras que, en las bandas de menor peso molecular, se identificó la proteína GFP y la proteína Tal hasta la posición aminoacídica 277.

El N-terminal de la Tal de J-1 y PL-1 mostró homología estructural con la proteína gp27 de T4 vinculada a la lisis de la pared celular durante la penetración fágica. En la proteína Tal de Tuc2009 también se describió un dominio funcional de la familia M37 asociado a la hidrólisis del peptidoglicano (Kanamaru *et al.*, 2002; Kenny *et al.*, 2004). Considerando estos antecedentes, se evaluó de forma exploratoria la actividad hidrolítica de la Tal a través de un ensayo de zimograma utilizando como sustrato células enteras de *Micrococcus lysodeikticus*. El ensayo de zimograma reveló actividad hidrolítica de peptidoglicano de un fragmento de bajo peso molecular (aproximadamente 35-40 kDa) (figura 52 A, carril 4). Es importante resaltar que no se observó lisis celular con este ensayo en la región correspondiente a la proteína entera (aproximadamente 100 kDa). Esto sugiere que el replegado de la proteína, necesario para que sea activa, no ocurrió en las condiciones de este ensayo o que es necesaria la proteólisis para que un fragmento de esta proteína pueda ejercer su actividad hidrolítica.

Por último, para estudiar la unión de la proteína Tal a la superficie bacteriana, se realizó el mismo ensayo descrito en 3.2. Cuando fueron incubadas con la proteína Tal, las bacterias *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 resultaron verdes al microscopio de fluorescencia indicando que esta proteína también estaría vinculada con el reconocimiento de receptores en la superficie bacteriana (figura 52 B). En el capítulo 1, el análisis bioinformático determinó la presencia de un dominio con homología a la proteína BppA del fago Tuc2009 vinculada con un dominio tipo CBM en la proteína Tal (C-terminal, 544-757 aa).

Este resultado muestra la complejidad del sistema de interacción fago-bacteria que podría presentar más de un ligando involucrado. No obstante, es necesario resaltar que los resultados vinculados con la proteína Tal son preliminares y necesitan ser corroborados con

ensayos más exhaustivos que permitan asignarle las funciones correspondientes a este componente dentro del complejo multimérico de la placa base.

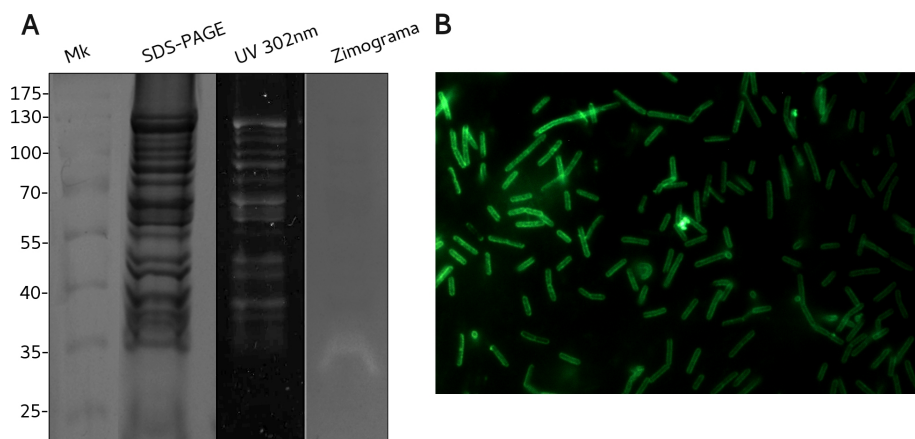


Figura 52. Ensayos preliminares J-1 GFP-Tal. A. La imagen muestra los ensayos de SDS-PAGE, exposición a la luz UV y zimograma para la proteína J-1 GFP-Tal. B. Ensayo de interacción de J-1 GFP-Tal con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139.

3.8. Identificación de posibles receptores

En la sección 3.2 mostramos que con el agregado de L-ramnosa, la proteína Dit perdía la capacidad de unirse y decorar a las células bacterianas. A su vez, los resultados expuestos en 3.5 y 3.6 indicaron que el dominio CBM2 de la proteína Dit tenía la capacidad de unión a bacterias *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. Se evaluó la unión del CBM2 (mCherry-CBM2) a *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en presencia y ausencia de L-ramnosa. Como se muestra en la figura 53, en presencia de L-ramnosa no se observaron bacterias fluorescentes, es decir que las células no se decoraron con mCherry-CBM2.

Teniendo en consideración que varios receptores de fagos de *Lactococcus* se encuentran en el polisacárido asociado a la pared y nuestros propios resultados donde observamos inhibición de la adsorción en presencia de L-ramnosa, buscamos en bibliografía si en la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 el polisacárido de pared podía estar presente. La presencia de L-ramnosa fue demostrada en las paredes de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 pero la composición del CWPS no ha sido analizada y la secuencia genómica aún no está disponible. Además de las cepas empleadas en este estudio, el fago J-1 también infecta a *L. casei* BL23 y la eficiencia de plaqueo es comparable a la observada en *L. casei*

subsp. *casei* ATCC 27139 (dato no mostrado). Recientemente se describió la estructura detallada del polisacárido de pared de la cepa modelo *L. casei* BL23 (Vinogradov et al. 2016) (figura 13, figura 54). Es interesante observar que la composición del polisacárido es rica en ramnosas.

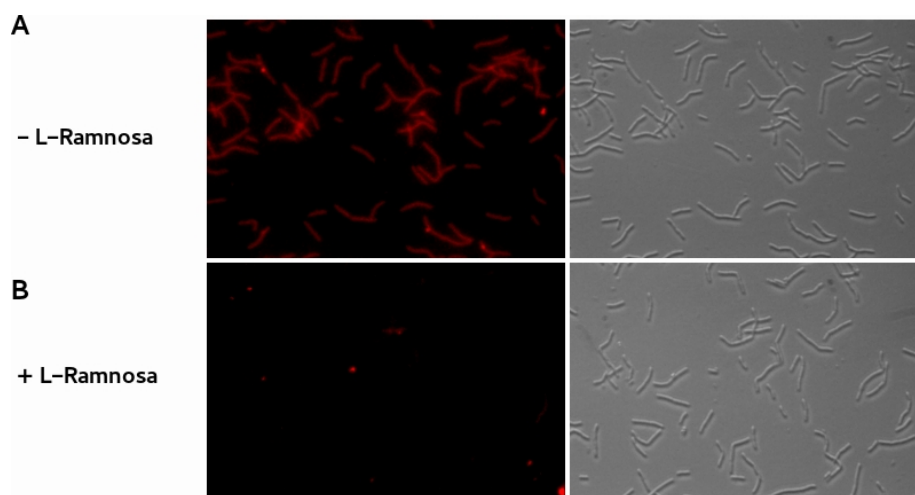


Figura 53. Interacción del CBM2 de J-1 con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en presencia del azúcar L-ramnosa. La proteína recombinante mCherry-CBM2 se incubó con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en ausencia (A) y presencia (B) del azúcar L-ramnosa. Las células se visualizaron al microscopio con contraste de fase (imagen derecha) y fluorescencia (imagen izquierda). Magnificación de 1000X.

Como se describió en la introducción, en *L. casei* YIT9018 se determinó la estructura de dos polisacáridos: PS-1 y PS-2. Los genes responsables de la síntesis de PS-1 fueron identificados en esta cepa. Se encontró un *cluster* de 10 genes en la misma dirección, probablemente formando parte de dos operones (uno de 7 genes y otro con los tres 3 genes restantes). Llamativamente, el *cluster* de genes de biosíntesis de dTDP-ramnosa se pudo identificar río abajo de estos genes probablemente formando parte del segundo operón. Empleando herramientas bioinformáticas, encontramos que ambos *clusters* completos también se encuentran en el genoma de *L. casei* BL23 con una identidad del 99% aunque ubicados en dirección opuesta en el genoma.

Finalmente, se intentaron obtener mutantes naturales de la adsorción en *L. casei* BL23 con el objeto de encontrar los genes vinculados a las rutas biosintéticas encargadas de la síntesis de los receptores. Sin embargo, los resultados fueron negativos. Las

dificultades surgieron en primera instancia debido a la falta de estabilidad de las mutantes resistentes a J-1. Es decir, luego del aislamiento correspondiente, la mayoría de las mutantes no mantenían el fenotipo resistente por más de tres pasajes en presencia de los fagos. Aquellas mutantes resistentes a J-1 que pudieron ser seleccionadas en medio líquido durante tres pasajes sucesivos, no mostraron luego diferencias en la adsorción respecto a la cepa sensible. Este resultado indica que posiblemente sea otro el mecanismo involucrado en la resistencia de estas cepas y en este trabajo de tesis no se estudiaron en mayor profundidad.

Se procedió a realizar un ensayo de unión de GFP-Dit o mCherry-CBM2 a la cepa *L. casei* BL23, en ausencia y presencia del CWPS purificado proveniente de la misma cepa (el polisacárido se incubó previamente con la proteína con la intención de bloquear los sitios de unión en la misma). Los ensayos mostraron que con el agregado de 300 µg de polisacárido de pared purificado, la interacción de Dit y el CBM2 con la bacteria desaparecía (figura 54 A-B). Este CWPS también inhibió el pegado de estas proteínas a *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (figura 54 C-D).

Estos resultados sugieren que en el CWPS, que recubre la superficie de la bacteria, se encontrarían los receptores para los fagos J-1 y PL-1.

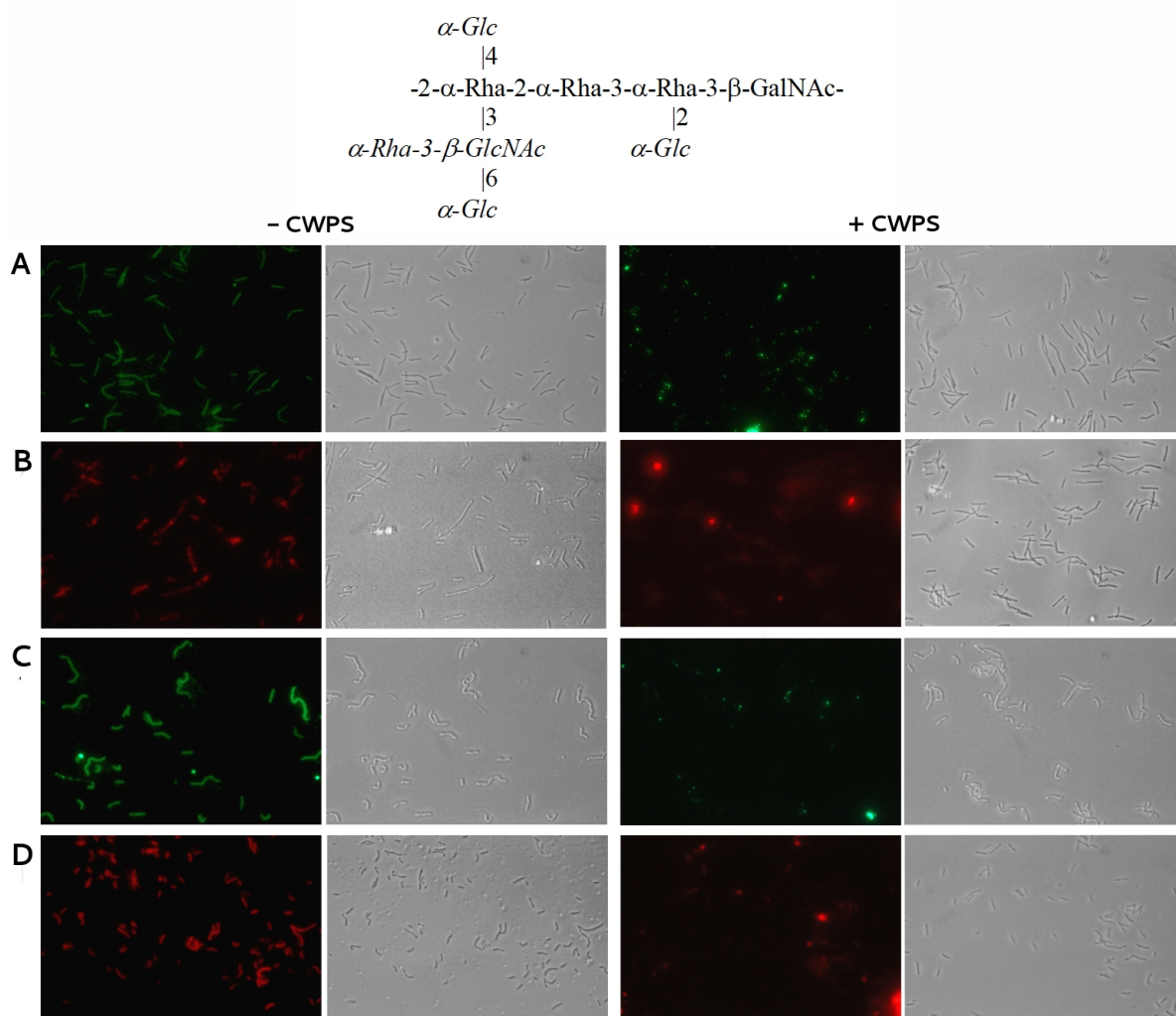


Figura 54. Ensayo de fluorescencia en presencia y ausencia del polisacárido de pared de *L. casei* BL23. A *L. casei* BL23 con el agregado de Dit en presencia (panel derecho) y ausencia del polisacárido (panel izquierdo) **B.** *L. casei* BL23 con el agregado del CBM2 en presencia (panel derecho) y ausencia del polisacárido (panel izquierdo) **C** *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 con el agregado de Dit en presencia (panel derecho) y ausencia del polisacárido (panel izquierdo) **D.** *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 con el agregado del CBM2 en presencia (panel derecho) y ausencia del polisacárido (panel izquierdo).

Capítulo 4

Análisis estructural de la placa base del fago J-1

4. Análisis estructural de la placa base del fago J-1

Previo a este trabajo, no existía en la bibliografía información estructural de las placas base, o de sus componentes, en fagos de *Lactobacillus* spp. Las diferencias encontradas en los fagos J-1 y PL-1 respecto a las proteínas de la punta distal de la cola resueltas por rayos X en otros fagos y los resultados funcionales detallados en el capítulo 3, incitaron al estudio estructural de las mismas. Las características distintivas de estas proteínas podrían revelar nuevos mecanismos involucrados en los primeros pasos del ciclo infectivo. En esta sección, se abordarán los avances estructurales obtenidos sobre las proteínas de la placa base del fago J-1.

4.1. Determinación de los fragmentos a clonar y ensayos preliminares

Cuando se expresó la proteína recombinante J-1 GFP-Dit en *E. coli*, los niveles de expresión obtenidos fueron bajos (aproximadamente 0,4 g/l) y podía distinguirse cierta proteólisis (figura 55, carril 2 y ensayo de WB -dato no mostrado-). Con el objeto de determinar la estructura de la proteína Dit, el clonado del gen de la proteína entera desprovista de GFP no parecía una buena opción. Se evaluó el clonado de los dominios de Dit por separado para intentar mejorar los niveles de expresión, solubilidad y en consecuencia las probabilidades de su posterior cristalización. La proteólisis controlada es una técnica frecuentemente utilizada para determinar los dominios proteicos estables frente a los segmentos lábiles y más expuestos que son propensos al corte por la acción enzimática. Así, este ensayo se empleó como una guía para la selección de los dominios proteicos potencialmente cristalizables.

La proteína GFP-Dit se trató con la proteinasa tripsina (que corta péptidos hacia el C-terminal de los residuos Lys y Arg) a diferentes concentraciones ($2,5 \times 10^{-3}$ g/l, $2,5 \times 10^{-2}$ g/l y 0,25 g/l) durante 45 minutos a temperatura ambiente y seguidamente se analizó el resultado de la proteólisis mediante un SDS-PAGE (figura 55, panel izquierdo). La concentración óptima ($2,5 \times 10^{-2}$ g/l) se eligió para el corte enzimático a diferentes tiempos (45min, 90min, 16hs). En esta ocasión, la separación por SDS-PAGE reveló una estabilidad en los cortes de las bandas realizados por la tripsina a lo largo del tiempo (figura 55, panel derecho). Los fragmentos fueron analizados por espectrometría de masa y se identificaron

la región C-terminal de la proteína Dit (129-679 aa) y casi la totalidad de la proteína GFP (1-259 aa). Con esta información y considerando los resultados del análisis bioinformático realizado en el capítulo 1, se clonaron los fragmentos A-C detallados en la tabla 13, los cuales contenían al dominio C-terminal y sus posibles variantes en el vector plic07 (Aclaración: el clonado y expresión de la región N-terminal de Dit no se realizó dado que los resultados de homología con proteínas resueltas estructuralmente eran lo suficientemente convincentes como para asignarle su función en el armado del anillo hexamérico). Esta tabla también muestra los niveles de expresión de todos estos fragmentos realizados en las mismas condiciones luego de la primera purificación en columna de Ni²⁺ (purificación parcial). Las proteínas fueron sometidas posteriormente a un desalado, corte enzimático con la enzima Tev proteasa y una filtración en gel con el objeto de tener a las proteínas purificadas para los ensayos de cristalización.

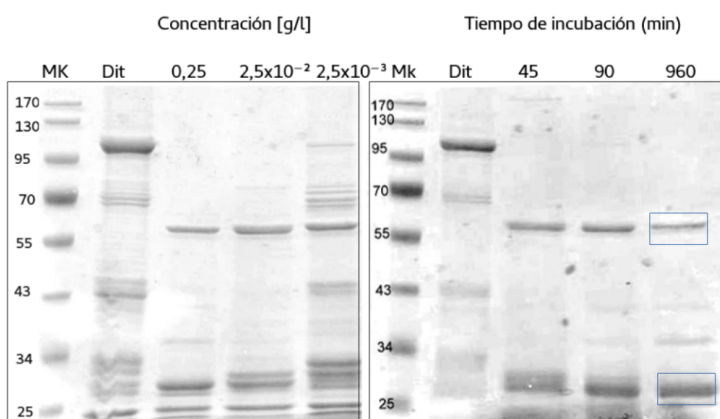


Figura 55. Proteólisis controlada de Dit. Ensayos de proteólisis de la proteína Dit utilizando distintas concentraciones de tripsina (panel izquierdo). Posteriormente 2,5x10⁻² g/l de tripsina se incubaron con Dit a diferentes tiempos (panel derecho). Las bandas recuadradas se identificaron por MS.

Tabla 13. Construcciones de los dominios proteicos correspondientes a Dit /Tal. La tabla muestra las posiciones de los aminoácidos en la proteína utilizadas para el clonado del dominio/función posiblemente asociado y los niveles de expresión proteicos obtenidos.

Proteína y posición (aa)	Dominio proteico	Niveles de Expresión (g/l)
A-Dit (129-679)	Dominio C-terminal (CBM1 +Galectina 1 +CBM2+Galectina 2)	1,8
B-Dit (129-322)	CBM1	8,5
C-Dit (368-614)	CBM2	7,5
D-Dit (1-322)	Dominio N-terminal +CBM1	Cuerpos de Inclusión
E-Dit (114-358)	Cinturón N-terminal+CBM1 Extendido	7,2
F-Dit (1-679)-Tal (1-393)	Dit- Tal (Dominio N-terminal)	0,4

Las proteínas A-C fueron sometidas a un cribado primario utilizando la técnica de caracterización de *Stura*, con el objeto de identificar la solubilidad de las mismas en una variedad de agentes precipitantes (PEGs y sales) y tres valores de pH (5,5; 7; 8,5) a 20°C. En cada condición en donde se observó un indicio de cristal proteico, se procedió a la optimización correspondiente o se evaluaron diferentes *kits* comerciales de cribado.

4.2. Estructura del dominio CBM2 (C-Dit 368-614)

Los resultados previos asignaron un rol relevante al CBM2 en la interacción fago-huésped y nos incitaron a encontrar la naturaleza de esta segunda inserción para la que no se había encontrado homología con ninguna estructura presente en el PDB. El panel central de la figura 56 muestra la separación proteica obtenida tras la filtración en gel del dominio proteico CBM2 (posiciones aminoácidas 368-614 en Dit) en la que se observa un solo pico de absorbancia UV a 280nm y el correspondiente gel de *SDS-PAGE* con la proteína de 27,7 kDa purificada. El dominio proteico CBM2 resuspendido en PBS se concentró finalmente a 8 g/l para el proceso de cristalización. El dominio CBM2 cristalizó luego de 4 días de incubación a 20°C en la condición 10 mM borato de sodio y 1,2 M de citrato de sodio como precipitante a pH 8,5 con el método de la gota sentada. Se optimizaron las condiciones con el objeto de mejorar los cristales (figura 56, panel derecho). Finalmente, se sometieron a difracción los cristales obtenidos. Debido a la falta de modelo estructural de una proteína con una secuencia de aminoácidos homóloga, se optó por la introducción de átomos que sean grandes dispersores de los rayos X. Los cristales se pusieron en contacto con diferentes metales pesados. En particular, los datos colectados en el ESRF, línea BM14, correspondieron al cristal de CBM2 en CsI/Nal. La estructura fue resuelta en el grupo espacial $P2_1 2_1 2_1$ con los datos colectados de este cristal, a una resolución de 1,7 Å. La resolución a 1,28 Å se obtuvo colectando posteriormente los datos del cristal de la forma nativa en la línea Próxima 1 (Soleil, France) y se utilizó el modelo derivado de CsI/Nal para resolver la estructura por reemplazo molecular (tabla 7, materiales y métodos).

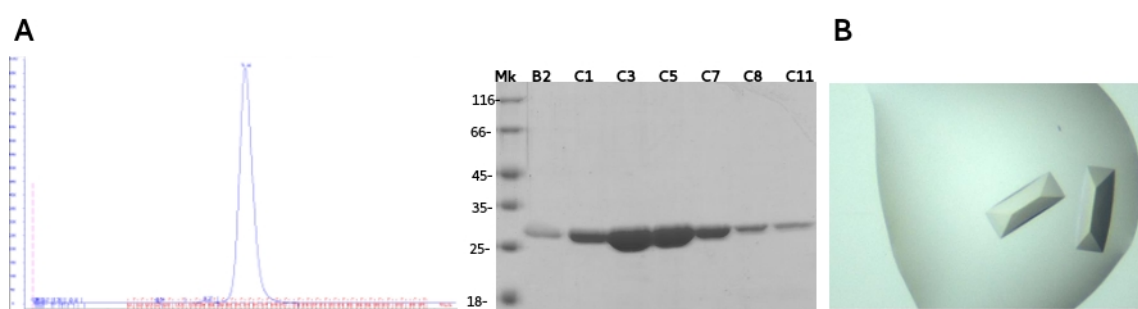


Figura 56. Purificación y cristalización del CBM2. **A.** Cromatograma de la filtración en gel y SDS-PAGE del CBM2 con las respectivas fracciones que fueron sembradas previo al proceso de cristalización. **B.** Cristales obtenidos del CBM2.

La cadena de aminoácidos se pudo trazar en su totalidad desde el aminoácido 10 hasta el 239 (378 a 607 de la proteína Dit). La estructura de CBM2 se compone de 18 estructuras tipo β y unas pequeñas elongaciones y bucles (figura 57). El núcleo de la estructura es un β -sándwich de 2 hojas β reuniendo 12 hebras tipo β : 2, 17, 8, 13, 14 y 15 para la primera, y 7, 16, 9, 10, 11 y 12 para la segunda (figura 57). Esta segunda lámina β es cóncava -desde la perspectiva del lector en la figura 3- y cubierta por otros segmentos de la molécula CBM2 (ver más adelante). Los extremos N- y C-terminales forman dos hebras β anti paralelas que unen el CBM2 al resto de la proteína Dit (1, 18). Seguido de la hebra β 2, una extensión de aproximadamente 20 residuos cruza la cara cóncava (coloreado en azul en la figura 57), gira a la altura de la hebra β 12 y continúa en sentido contrario formando, en parte, dos hebras β cortas (3 y 4). Luego la estructura en hebra β 5 se extiende en forma anti paralela a la hebra β 4 seguida de aproximadamente 10 aminoácidos que forman un giro largo y desestructurado. Este giro es seguido por la hebra β 6 hasta llegar a la estructura en β 7 de la segunda hoja en β . Bucles largos conectan las hebras β 7-8, 15-16, 10-11, 12-13 y 16-17. Las hebras tipo β 1 y 18 conectan el dominio CBM2 al resto de la proteína ubicándose dentro del primer giro del dominio galectina de la proteína Dit.

4.3. Potencial sitio de unión del sacárido en el CBM2

La estructura del cristal resuelta por rayos X se comparó con otras estructuras similares depositadas en el PDB usando el servidor DALI que compara estructuras proteicas en 3D (Holm y Rosenström, 2010). A partir de la estructura del CBM2 se obtuvo una larga

lista de estructuras con valores Z mayores a 15 y valores de r.m.s.d. entre 2,5 -3.2 Å. La mayoría de las estructuras identificadas correspondieron a lectinas.

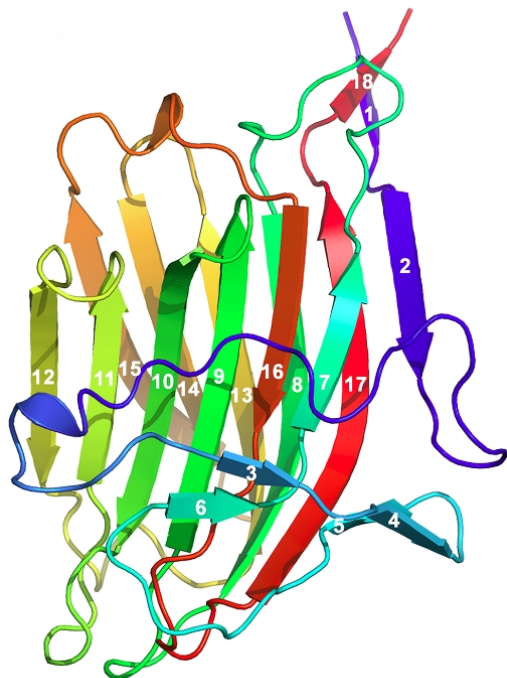


Figura 57. Estructura de CBM2. Representación en cintas de la estructura resuelta por rayos X coloreada en el modo arco-iris desde el azul (extremo N-terminal) al rojo (extremo C-terminal). La numeración indica las 18 hebras tipo β dispuestas en el β -sándwich. Las hebras tipo β 1 y 18 conectan el dominio al resto de la proteína.

De particular interés resultaron la lectina ERGIC-53 ($Z=16.8$; r. m. s. d. 2.5 Å; 3wht, 3whu, 3wnx) y una lectina ácida ($Z=16.3$; r. m. s. d. 2.8 Å; 1fay) cristalizadas con sacáridos (manotriosa y α -metil-D-galactosa, respectivamente). Ambas estructuras se superpusieron con el CBM2 (figura 58 A). La α -metil-D-galactosa, correspondiente al PDB 1fay, se importó a la estructura del CBM2 para encontrar el posible sitio de interacción. El azúcar pudo ubicarse en una cavidad opuesta a la región N y C-terminales, sobre el final de la superficie cóncava de la segunda lámina tipo β . Esta cavidad está delimitada en parte por esta lámina y también por la extensión de aminoácidos y la vuelta que incluye las hebras β 3 y 4 (coloración azul-celeste en figura 57 y figura 58 B y C) que cruzan a la superficie cóncava. Estos resultados, junto con los descritos para el CBM2 en el capítulo 3, sustentan nuestra hipótesis según la cual la segunda inserción corresponde también a un plegado de tipo CBM o dominio de unión a carbohidratos.

Observando en más detalle el posible sitio de unión a azúcares, notamos características consistentes con las características descritas para la interacción azúcar y bolsillo de unión en la proteína (Hudson *et al.*, 2015) La galactosa se posiciona anillo-anillo

contra la Phe 216, perpendicularmente al Trp 73, y las posibles uniones hidrógeno están a una distancia aceptable al NH₂ del Gln 219, el NH del Trp 73 y la cadena lateral de Asn 45 (figura 58 C). Sin embargo, no corresponde intentar deducir a partir de este modelo los puntos de interacción exactos del sacárido en el CBM2 dado que el sitio de unión a hidratos de carbono puede cambiar de conformación tras la unión del ligando.

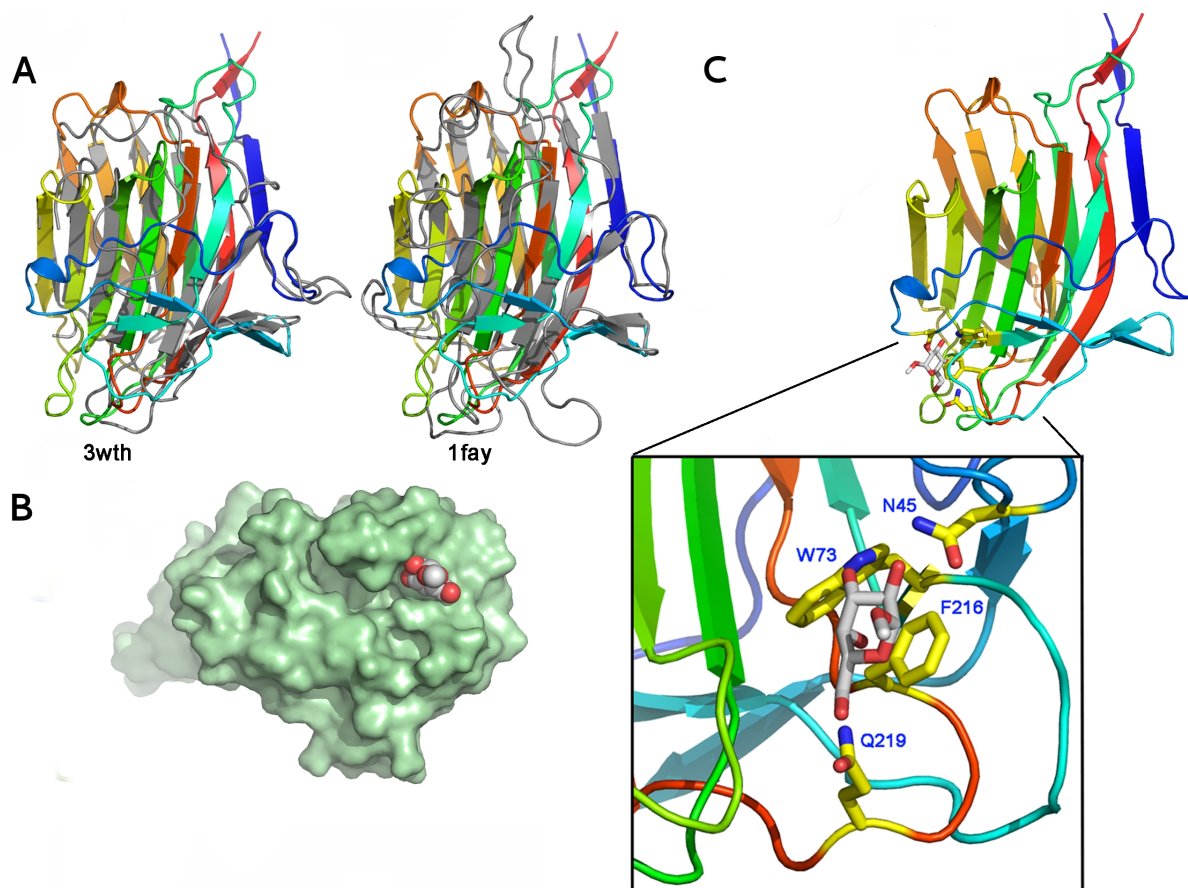


Figura 58. Comparación de la estructura del CBM2 con otros dominios tipo CBM. A Superposición del CBM2 (coloreado tipo arco-iris) con 3wth (gris, panel izquierdo) o 1fay (gris, panel derecho). **B.** Representación en modo superficie del CBM2 en complejo con un sacárido. El azúcar - α -metil-D-Galactosa - pertenece al PDB: 1fay que se superpuso al CBM2. **C.** Representación en cintas del complejo entre el CBM2 (coloración tipo arco-iris) y el azúcar α -metil-D-Galactosa perteneciente al PDB: 1fay. En el recuadro se muestran los posibles aminoácidos en contacto con el sacárido. Los números del recuadro corresponden a los de la estructura depositada en el PDB. Las posiciones en la proteína Dit son N412 (N45), W440 (W73), F583 (F216) y Q586 (Q219).

4.4. Tentativa de cristalización del CBM1

Con la estructura del CBM2 resuelta por rayos X, Los esfuerzos se centraron en optimizar la cristalización del dominio CBM1 que se expresó en forma correcta y se purificó con facilidad observándose un pico único de Abs_{280nm} en la correspondiente filtración en gel. Este resultado se condijo con la aparición de una única banda del tamaño esperado en el *SDS-PAGE* (figura 59). Pese a varios intentos de optimización, los mejores cristales (figura 59, panel derecho) no difractaron más allá de los 7 Å sin posibilidad de resolver la estructura.

Posteriormente, se intentaron expresar dominios diferentes que incluían al CBM1 (tabla 13, construcción D-E) para poder obtener una mejor cristalización. Sin embargo, la estructura del dominio sigue aún hoy sin resolverse.

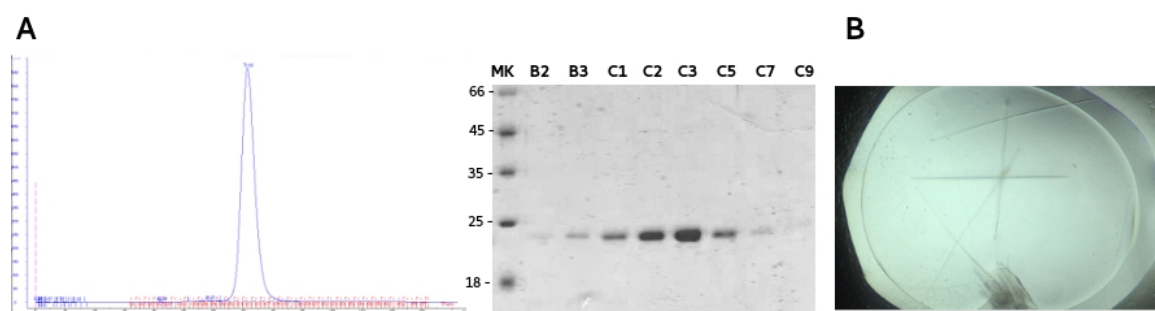


Figura 59. Purificación y cristales del dominio CBM1. A. Cromatograma de la filtración en gel y *SDS-PAGE* del dominio CBM1 con las respectivas fracciones que fueron sembradas previo al proceso de cristalización. B. Cristales obtenidos del dominio CBM1.

4.5. Nanoanticuerpos: anti CBM1 y anti CBM2

Los nanoanticuerpos son ampliamente utilizados en biología estructural ya que pueden proveer acceso a epítopes, mayormente en regiones cóncavas, estabilizándolos y permitiendo una correcta cristalización. Además, estos sitios suelen estar asociados a la inhibición de enzimas o a la neutralización de receptores, haciendo la utilización de los mismos aún más atractiva. En vista a sus futuras aplicaciones, se generaron nanoanticuerpos hacia determinados dominios de la placa base con el objeto de facilitar la cristalización de nuevas regiones, cristalizar al dominio CBM1 mejorando su difracción y

encontrar posibles sitios de interacción con el ligando en el CBM2. La figura 60 muestra un esquema simplificado de la generación de nanoanticuerpos desde la inmunización en llama hasta la expresión del mismo en *E. coli* (Desmyter et al., 2015),

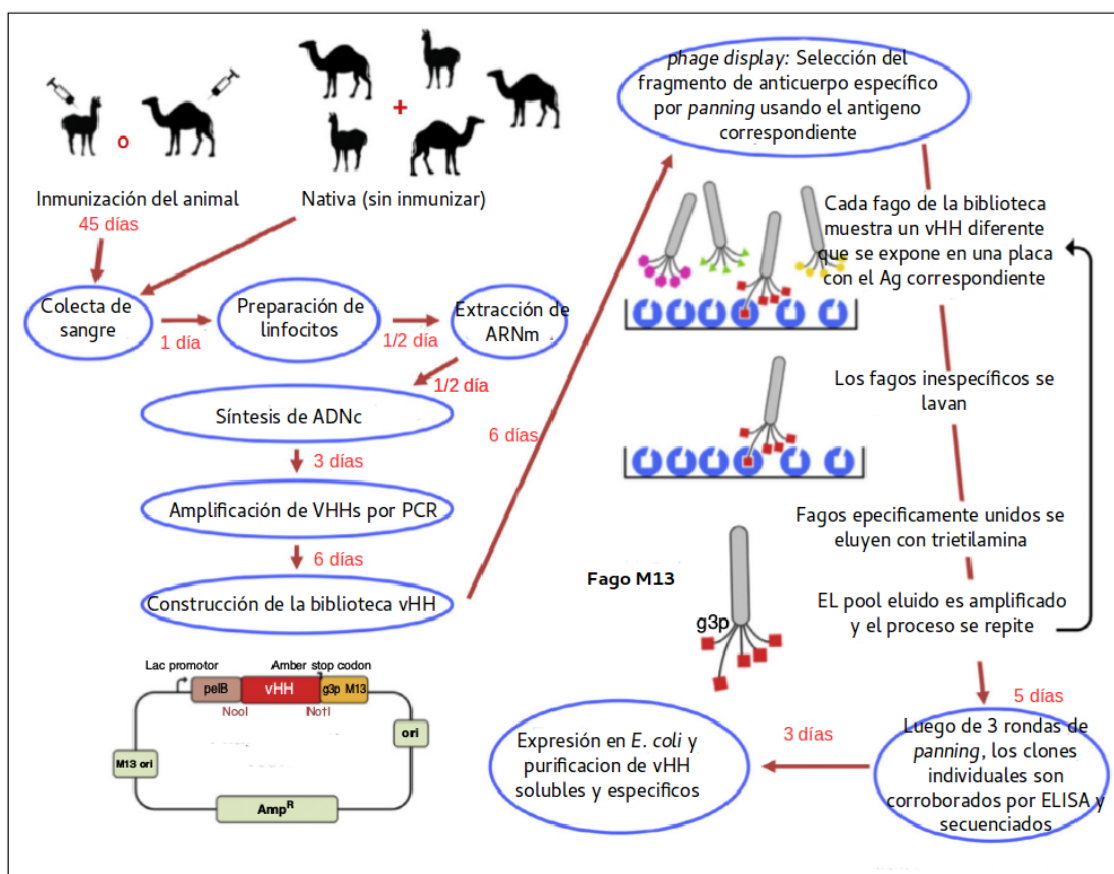


Figura 60. Generación de nanoanticuerpos. Representación esquemática de la generación de un nanoanticuerpo específico a partir de una biblioteca específica o nativa y selección por el método de *phage display*. Adaptado de Desmyter et al. (2015).

4.5.1. Nanoanticuerpos: generación

La proteína Dit y el dominio N-terminal de la proteína Tal se expresaron en bloque (ambas proteínas se clonaron como aparecen en el genoma del fago J-1 pese a su solapamiento, construcción F) y se purificaron en principio para la generación de nanoanticuerpos y para refinar a medio plazo, la reconstrucción de la placa base (sección 4.6). La figura 61 muestra a modo ilustrativo una imagen de MET del complejo multiproteico

correspondiente a la placa base del fago J-1. Para la generación de nanoanticuerpos se inmunizó una llama con cuatro inyecciones de 1 mg cada una del complejo Dit - N-terminal Tal en forma subcutánea a intervalos de una semana seguida de una última inyección dos semanas más tarde. Los linfocitos se aislaron de la muestra de sangre obtenida 5 días después de la última inmunización. Se generó una librería tipo *phage display* de los nanoanticuerpos usando procedimientos estándar en el fagémido PHEN4 (ver materiales y métodos).

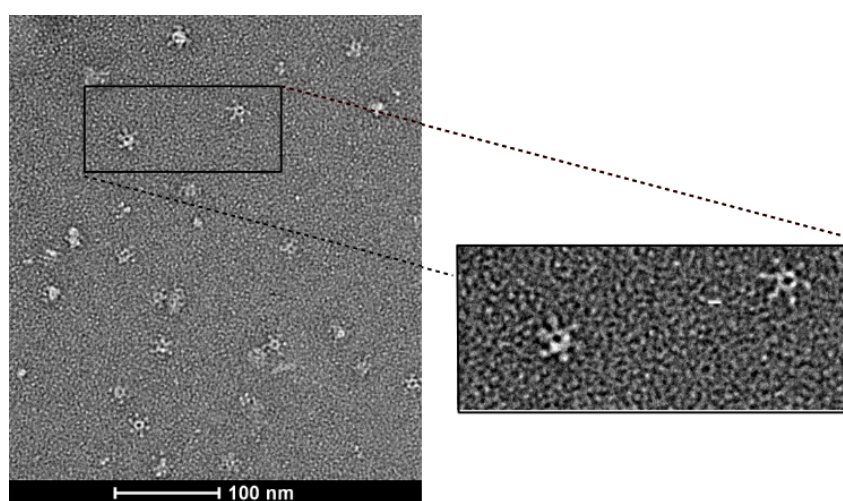


Figura 61. Microscopía electrónica de la placa base. MET por tinción negativa de la estructura multimérica Dit-N-terminal Tal. El recuadro muestra una ampliación de la imagen.

Se realizaron 3 rondas de *panning* utilizando como antígeno el dominio C-terminal de la proteína Dit (construcción A- Dit) resultando en el enriquecimiento/ aislamiento de nanoanticuerpos que se unen específicamente a este dominio de la proteína (que contiene al CBM1 y al CBM2). Luego, aislamos y analizamos los nanoanticuerpos en forma específica contra los antígenos CBM1 o CBM2 a través de un ELISA partiendo de las colonias pertenecientes al *panning* 2 y *panning* 3. En este paso, se expresaron 48 clones en placas de 24 pocillos y posteriormente se hizo el revelado por ELISA. Se secuenció el ADN plasmídico de 40 clones que contenían señal positiva entre los cuales encontramos 14 secuencias diferenciales (figura 62). Los seis clones de mayor respuesta en el ELISA (3 que reconocen al CBM1 y 3 reconociendo al CBM2) se subclonaron en el vector de expresión PHEN6. La

expresión de los clones en el vector PHEN6 se realizó en la cepa *E. coli* wk6, se extrajeron los VHH de la fracción periplásmica por choque osmótico y posteriormente se purificaron.



Figura 62. Alineamientos de las secuencias VHH. Las regiones hipervariables (CDR) se muestran en rojo (CDR1), verde (CDR2) y azul (CDR3). Las sustituciones aminoacídicas están en violeta mientras que los residuos cisteína involucrados en la formación del intradominio en anaranjado (c22 y c92).

A modo preliminar y para corroborar los resultados obtenidos del ELISA, ensayamos la capacidad de los distintos nanoanticuerpos de reconocer a las proteínas CBM1 y CBM2 usando interferometría en biocapas (BLI). Para ello, los dominios CBM1 y CBM2 se anclaron al chip y se ensayaron soluciones de 200 nM de cada anticuerpo contra ambas proteínas. Los resultados coincidieron con lo observado en el ELISA. Los VHH 52, 57 y 04 se unen específicamente al CBM1 mientras que el VHH 01, 07 y 18 reconocen al CBM2 (figura 63).

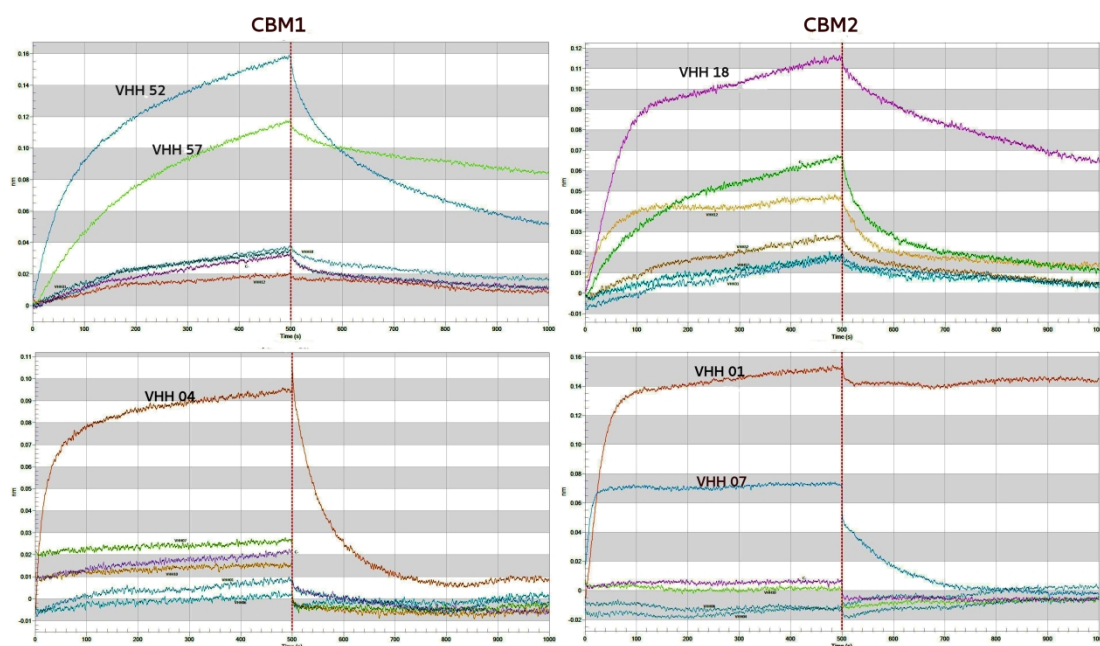


Figura 63. Interferometría en biocapas (BLI). Interacción de los distintos nanoanticuerpos con el CBM1 o el CBM2 inmovilizados en el sensor. Se muestran las curvas de ajuste de la asociación con la molécula inmovilizada (CBM1 panel izquierdo y CBM2, panel derecho) y su posterior disociación. Las variaciones de la respuesta se reportan en el eje de ordenadas versus el tiempo de reacción en el eje de abscisas (segundos). Aclaración: este ensayo se realizó a modo de prueba para corroborar la interacción de cada nanoanticuerpo (200 nM) con su antígeno (CBM1 o CBM2). Todos los nanoanticuerpos se probaron contra ambos antígenos.

4.5.2. Nanoanticuerpos: formación de complejo con el CBM1

Debido a los intentos frustrados de obtener una buena difracción con el dominio CBM1, decidimos formar un complejo con uno de los nanoanticuerpos. Originalmente se optó por el VHH52, se midió la unión entre este último y el dominio CBM1 mediante un ensayo de BLI. En este caso, el nanoanticuerpo se inmovilizó en el sensor y se agregaron distintas concentraciones del antígeno (0-400 nM). Se realizó una curva de ajuste de la asociación del dominio CBM1 con la molécula inmovilizada (VHH52) y luego la disociación en ausencia del dominio CBM1. Los resultados del análisis se graficaron en una curva de respuesta en función del logaritmo de la concentración. La K_d (constante de disociación) calculada fue de aproximadamente 37 nM siendo índice de una buena interacción entre el nanoanticuerpo y el antígeno (Figura 64 B). Para realizar el complejo, se dejó interactuar al CBM1:VHH52 en una relación 1:1,2 y se procedió a realizar nuevamente la filtración en gel

con el objetivo de eliminar el exceso de VHH. Tanto la filtración en gel como el *SDS-PAGE* mostraron la formación del complejo (Figura 64 A). Considerando que las proteínas acomplejadas con los nanoanticuerpos facilitan la cristalización, sometimos el complejo a una concentración de 5,2 g/l en PBS a varios kits comerciales de cristalización. Se espera a la brevedad poder optimizar algunas condiciones prometedoras.

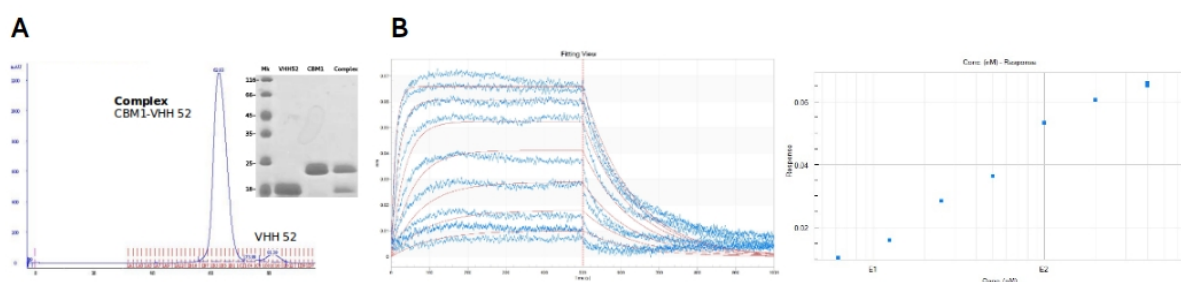


Figura 64. Purificación y ensayo de interacción del complejo CBM1-VHH52. A. Cromatograma de la filtración en gel y *SDS-PAGE* del complejo previo al proceso de cristalización. **B.** Interferometría de biocapas (BLI). Interacción del dominio CBM1 con el nanoanticuerpo 52 inmovilizado en el sensor. Se muestran la curva de ajuste de esta asociación y luego la disociación sin el dominio CBM1. Las variaciones de la respuesta se reportan en el eje de ordenadas (en azul los datos experimentales y en rojo las curvas de ajuste) versus el tiempo de reacción en el eje de abscisas (s). En el panel derecho se muestran los resultados del análisis en una curva de respuesta en función el logaritmo de la concentración.

4.5.3. Nanoanticuerpos: Ensayos de unión a Dit y CBMs

Con el objeto de evidenciar el efecto inhibitorio de los nanoanticuerpos en la unión entre la proteína Dit y las bacterias, se realizaron los ensayos de unión similares a los reportados en el capítulo 3 pero en presencia de los nanoanticuerpos y los resultados se evaluaron por citometría de flujo. Esta técnica permite diferenciar de manera cuantitativa poblaciones de bacterias fluorescentes (que han sido decoradas por la proteína GFP-Dit) de aquellas que no presentan fluorescencia debido a la inhibición del pegado de la misma (Figura 65). Las muestras se observaron también al microscopio de fluorescencia corroborando los resultados.

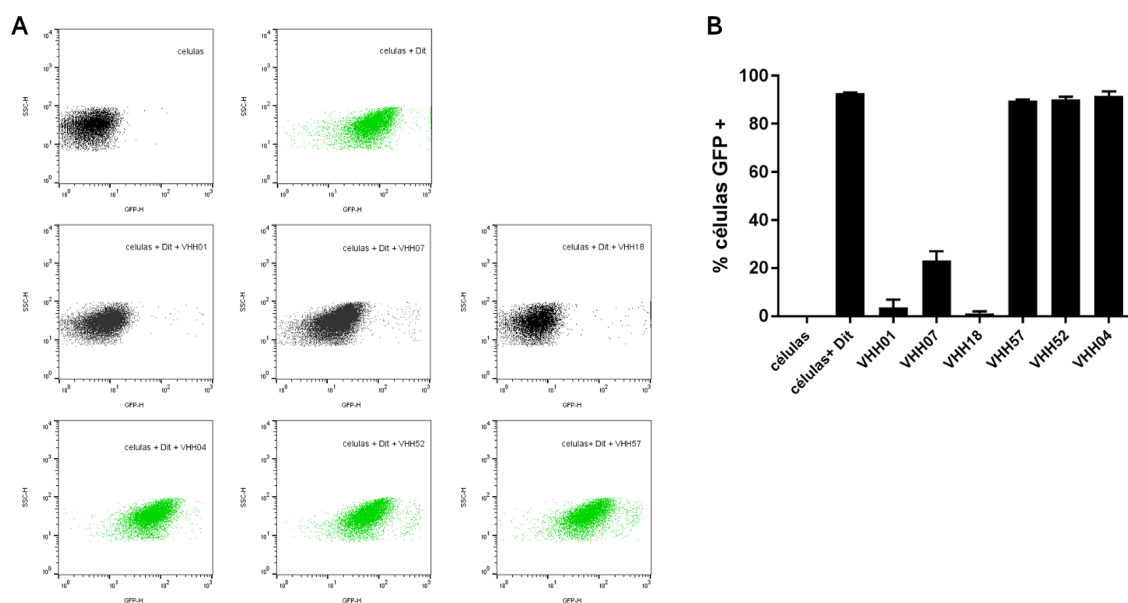


Figura 65. Ensayos de unión de GFP-Dit en presencia de nanoanticuerpos por citometría. A. *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (panel superior izquierdo) y *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 incubada con GFP-Dit (panel superior derecho). Los paneles centrales e inferiores muestran el ensayo realizado en presencia de nanoanticuerpos (VHH). Se muestran los valores de dispersión de luz lateral en función de la intensidad de fluorescencia. En el ángulo superior derecho se indica el nanoanticuerpo (VHH) evaluado. **B** Porcentaje de células *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 GFP positivas en presencia de la proteína GFP-Dit y los distintos nanoanticuerpos (VHH) ensayados. Los ensayos fueron realizados por triplicado y de forma independiente.

Como se observa en la figura 65, todos los nanoanticuerpos que reconocen los dominios CBM2 (VHH01, 07 y 18) inhibieron (en mayor o menor medida) la interacción de GFP-Dit con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 (figura 65 A, paneles centrales). Por otro lado, cuando la incubación de GFP-Dit con las bacterias se realizó en presencia de los nanoanticuerpos anti-CBM1 (VHH04, 52 y 57), las bacterias no perdieron la señal fluorescente (figura 65 A, paneles inferiores). La cuantificación de estos resultados se muestra en la figura 65 B. En otras palabras, el bloqueo del CBM1 a través de los VHH no impide el reconocimiento de Dit hacia los receptores bacterianos. Estos resultados corroboran los ensayos realizados en el capítulo 3 por microscopía de fluorescencia con las construcciones GFP-CBM1 y por inmunofluorescencia con el dominio CBM1 en los que se demostró que este dominio no interactuaba con *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en ninguna de las condiciones ensayadas. A diferencia de los ensayos anteriores, éstos se

hicieron con la proteína Dit entera bloqueando específicamente el CBM1 o el CBM2. Nuevamente sólo la interacción con los nanoanticuerpos anti-CBM2 logró inhibir la interacción Dit- bacteria.

4.5.4. Nanoanticuerpos: Ensayos de neutralización

Para los ensayos de neutralización en medio líquido, el fago se pre-incubó con los diferentes VHHs y posteriormente se realizó la infección de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139. Si el nanoanticuerpo se une a un componente estructural clave para la infección, puede bloquear la entrada y evitar la lisis del cultivo. Como se muestra en la figura 66, en ausencia de anticuerpos se produce la lisis del cultivo aproximadamente a las 7 horas post infección (figura 66 A). Llamativamente, sólo se observó neutralización de la infección cuando se usó una mezcla de los VHHs anti CBM1. En particular, el VHH 57 sería el responsable del efecto inhibitorio observado (Figura 66 A). Los nanoanticuerpos anti CBM2 (VHHs anti CBM2) no lograron la neutralización, comportándose igual que el control sin nanoanticuerpos (figura 66 A). La neutralización fue dependiente de la concentración del nanoanticuerpo (VHH 57) agregado siendo casi total a una concentración de 500 nM (figura 66 B).

Contrariamente a lo que se mostró en el capítulo 3, estos ensayos le asignan un rol significativo al dominio CBM1 en la interacción con el huésped bacteriano. Asimismo, demuestran que el mecanismo de interacción fago-bacteria es complejo y probablemente exista más de un interactor responsable del reconocimiento de los receptores. No obstante, los ensayos de citometría de la sección anterior (4.5.3) mostraron que el VHH57 no evitó la unión de la proteína Dit a las bacterias mientras que sí lo hicieron los nanoanticuerpos anti CBM2 .

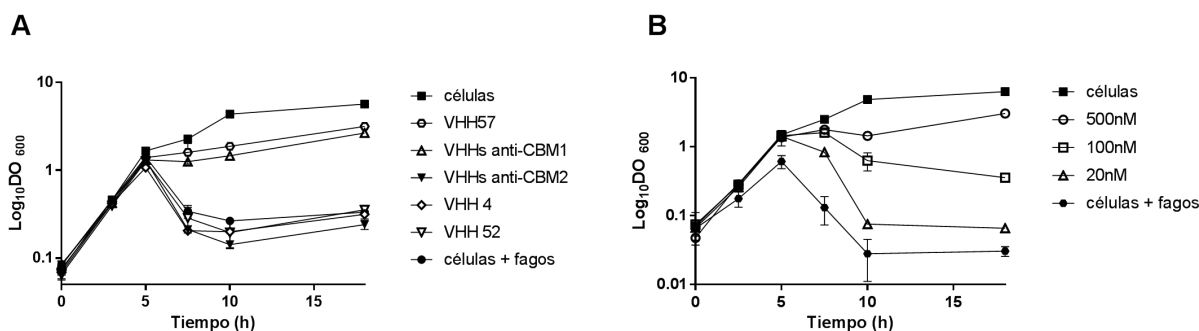


Figura 66. Ensayos de neutralización usando nanoanticuerpos. A. Ensayo de neutralización con los distintos nanoanticuerpos (500 nM) **B.** Ensayo de neutralización a diferentes concentraciones del VHH57 (20nM-500nM). En ambos casos, los fagos se incubaron con los nanoanticuerpos y luego se adicionaron las bacterias sensibles en medio líquido. Se determinó la curva de crecimiento de *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139 en presencia de los distintos nanoanticuerpos. Los ensayos se realizaron por triplicado de forma independiente.

4.6. Reconstrucción por microscopía electrónica de la placa base

En el capítulo 1 (Figura 21) se mostraron imágenes de MET por tinción negativa del fago J-1. Conociendo la naturaleza del CBM2 y la relevancia de este dominio en la interacción de Dit con la superficie de *L. casei/paracasei* (capítulo 3 y sección 4.5.3), nos propusimos determinar la localización exacta del CBM2 en el complejo multiproteico que forma la placa base del virión. Para ello, investigamos la estructura de la placa base del fago J-1 usando MET. Se colectaron 200 imágenes de los fagos J-1 y se seleccionaron 865 partículas de la placa base.

Como se observa en la Figura 67 A, la estructura de la placa base pudo ser identificada fácilmente en la punta de la cola de J-1. En la MET, se observa claramente una extensión en forma de espícula de 600 Å que probablemente corresponda al C-terminal de la Tal.

La reconstrucción por microscopía electrónica se resolvió a una resolución de 20 Å (Figura 67 C- D, 68 A-D). Utilizando Chimera, y considerando la homología obtenida por HHpred, pudimos posicionar la estructura resuelta por rayos X del complejo Dit/ Tal del fago p2 en la estructura obtenida por MET. De la estructura de la placa base de p2 se eliminó la extensión “brazo y mano” del dominio galectina ausentes en J-1. El complejo

Dit/Tal de p2 se muestra en celeste en la figura 68 correspondiéndose con la estructura “clásica” de las Dit y el dominio N-terminal de la proteína Tal (T4 gp27-like). Una vez ubicado el complejo Dit/Tal de p2 en la reconstrucción, calculamos las diferencias en volúmenes electrónicos entre ellos e identificamos dos series de 6 volúmenes de densidades electrónicas que pudieron ser asignadas a los dos CBMs (Figura 68 A). El primer grupo de densidades electrónicas se localizó en el extremo del dominio galectina y nos permitió ubicar al CBM2 sin inconvenientes basándonos en su posición en la secuencia de Dit (Figura 68, en verde). Esta densidad electrónica es menor comparada con el tamaño real del CBM2 (no se superpusieron en su totalidad), y esto probablemente se deba a su movilidad. El segundo grupo de densidades electrónicas se localizó entre el anillo hexamérico y el dominio galectina que conforman las proteínas Dit. A esta región se le asignó el dominio CBM1 debido nuevamente a su posición en la secuencia de la proteína Dit (Figura 68, en rojo). Las dos series correspondientes a los CBM1 y CBM2 se agregaron en forma manual entre las diferencias de densidades electrónicas usando nuevamente el programa Chimera.

Se realizaron las mediciones correspondientes en el modelo híbrido que comprende no solo a la reconstrucción de la placa base por ME sino también, a la estructura del CBM2 resuelta por rayos X, al modelo de la estructura del CBM1 (PDB: 2xom) y a las coordenadas de p2 Dit/Tal. La placa base del fago J-1 presenta ~125-210 Å de ancho y ~110 Å de alto (figura 68 C-D). La extensión en forma de espícula de la Tal más allá de los 400 primeros aminoácidos se eliminó del análisis debido a su flexibilidad que no permite visualizarla en la estructura y solo se observa un pequeño bulbo de densidades en la base de la placa.

La ubicación del CBM1 adyacente al trímero Tal nos permite hipotetizar que el VHH57 también podría interactuar con éste último. Además, la disposición del CBM2 en la placa base mostró que este dominio con plegamiento tipo lectina y con la capacidad de unirse a la superficie bacteriana, está posicionado en la región más externa de la placa base del fago J-1 (figura 68). Esta disposición hacia el lado exterior, le permitiría una interacción eficiente con el CWPS que recubre la bacteria y actuaría como receptor para estos fagos.

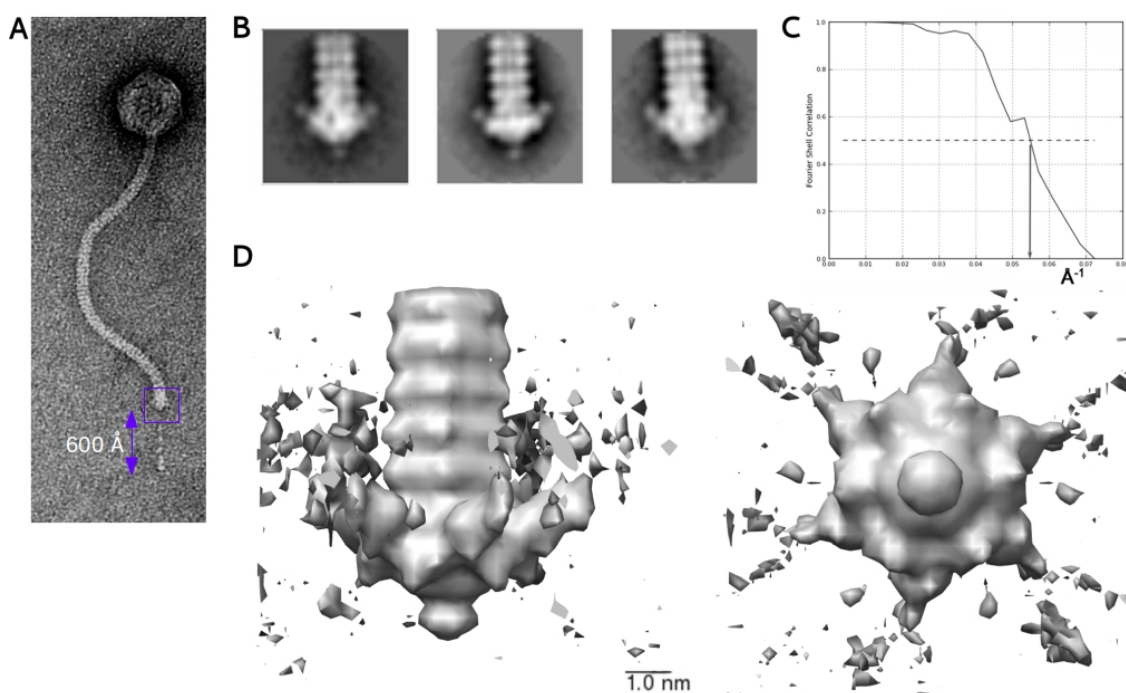


Figura 67. Microscopía electrónica de la placa base del fago J-1 **A.** MET del fago J-1 destacando la placa base en azul. **B.** Promedio de las distintas clases de placas base del fago J-1 en 2D **C.** Curva de correlación de la celda de Fourier (FSC) vs $1/\text{resolución}$ (Å). El corte de la FSC a 0.5 genera una resolución de 20 Å. **D.** Reconstrucción de la placa base del fago J-1 mostrando la superficie con un nivel de contorno de 0,0305.

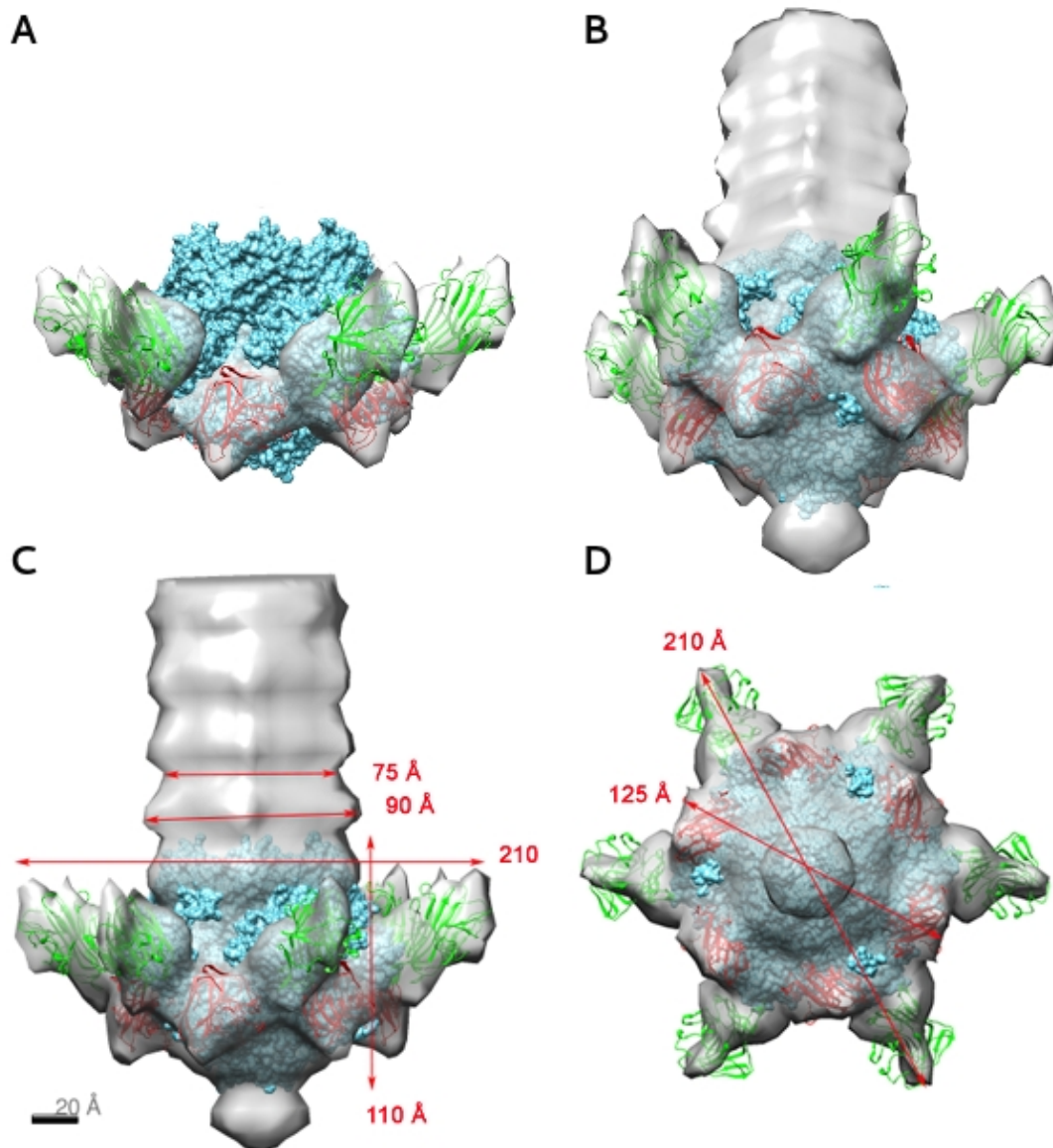


Figura 68. Reconstrucción de la placa base del fago J-1 por microscopía electrónica de transmisión **A.** Vista de la región clásica de la DIT y el N-terminal de la Tal proveniente de p2 (celeste, representación en modo superficie) y las densidades electrónicas correspondientes al CBM1 (rojo) y al CBM2 (verde). **B.** Vista lateral inclinada de la reconstrucción completa realizada conteniendo el extremo distal de la MTP, la DIT y la región N-terminal de la Tal. **C.** Vista lateral de la placa base con sus respectivas dimensiones. **D.** Vista desde abajo de la placa base con sus respectivas dimensiones. Las proteínas DIT y Tal “clásicas” se colorearon en celeste, CBM2 se representó en verde y el CBM1 (PDB:2xom, modelo utilizado) en rojo.

DISCUSIÓN

La problemática de los fagos de *Lactobacillus* spp. en la industria láctea

Los fagos que infectan BAL son una de las principales causas de fallas en la fermentación generando cambios en las propiedades organolépticas de los productos y afectando los esquemas de producción de las plantas principalmente en la industria láctea. En particular, los fagos de *L. lactis* y *S. thermophilus* han sido intensamente estudiados por la predominancia de estas cepas en la industria láctea. Los estudios correspondientes a fagos que infectan *Lactobacillus* spp. se incrementaron en esta última década debido a su persistencia como NSLAB, proliferando durante la maduración del queso, y a que muchas cepas del género *Lactobacillus* se encuentran como parte de la formulación de productos fermentados por sus propiedades probióticas. Así, nos enfrentamos frente a dos escenarios diferentes con la misma problemática: alta susceptibilidad fágica.

Por un lado, un alto número de bacterias provienen de los sustratos crudos usados como materia prima para la elaboración de los productos. Por ende, la diversidad genética bacteriana es alta y desconocida que conlleva a un espectro aún mayor de potenciales nuevos fagos que las infecten.

Por otro lado, las cepas probióticas han sido estudiadas y sus resultados validados durante años permitiendo su uso en productos comerciales con algún efecto benéfico para la salud. La problemática de las cepas probióticas pareciera encontrarse en el otro extremo, donde contamos con cepas secuenciadas, seguras y con un abordaje fisiológico, bioquímico y genético exhaustivo tanto de la cepa como de su interacción con el consumidor. Sin embargo, su reemplazo o un esquema de rotación con otras bacterias resistentes a fagos resulta impracticable debido a que los estudios realizados deberían ser revalidados implicando costos altísimos y años de investigación.

Este dilema nos presenta un gran desafío en el estudio de las interacciones fago-bacteria del género *Lactobacillus* con la necesidad de recurrir a un enfoque multidisciplinario para caracterizar y poder minimizar el impacto de los fagos en los procesos fermentativos.

1. Genómica de fagos

Las secuencias genómicas y las proteínas presentes en el virión de los fagos J-1 y PL-1 se describieron en el capítulo 1. Aunque estos fagos se aislaron en los años 50 y se estudiaron con cierta asiduidad, sus genomas estuvieron disponibles recién en el año 2014 (Dieterle *et al.*, 2014). Su aparición en las plantas de fermentación interrumpiendo la producción de la leche fermentada Yakult resulta históricamente interesante dado que J-1 se aisló primero y PL-1 dos años más tarde usando una cepa resistente a J-1 que no forma parte de los ceparios actuales conocidos. En particular, la secuenciación reveló que ambos genomas eran idénticos exceptuando cuatro productos génicos en la región de inmunidad y la proteína Dit (componente de la placa base de estos fagos y que ha sido el foco principal de estudio durante esta tesis). La delección en el genoma de PL-1 corresponde a los genes 27-30 de J-1 (o la inserción en el genoma de J-1 corresponde a los genes 27-30). La presencia de una integrasa (gen 24) sugiere fuertemente que estos fagos son temperados o derivan de algún fago temperado. En la cepa *L. casei* ATCC 334 se aislaron con éxito lisógenos de PL-1 (Stetter, 1977) en *L. casei* ATCC 334. También se encontró un posible sitio *attB* en el genoma de *L. casei* BL23, sin embargo no hemos podido aislar lisógenos en esta cepa. En particular, este *attB* corresponde también al *attR/ attL* del profago PLE2 (capítulo 2) que podría ser la causa de la falta de integración de J-1 /PL-1 en ese sitio. Sería interesante estudiar los componentes del módulo lisis/ lisogenia con el objeto de proponer un mecanismo de regulación del cambio genético en estos fagos.

La caracterización de muchas proteínas a nivel molecular y fisiológico se inició con la comparación de los genomas de donde provienen. En la actualidad, la secuenciación y anotación de genomas con tecnologías rápidas y de bajo costo han permitido un frenético aumento de genomas secuenciados. No obstante, debido a la autonomía asociada a la anotación de genomas, en muchas ocasiones la funcionalidad asignada a los ORFs no es precisa. Asimismo, la diversidad de los fagos se refleja en el alto número de genes novedosos que no presentan homología con los depositados en las bases de datos (Hatfull, 2015). En los últimos años se han desarrollado poderosas herramientas de uso *in silico*, como Pfam o HHpred, que colaboran con las anotaciones de los genes permitiendo a la vez descifrar funciones alejadas a nivel de secuencia, pero con un plegado similar. Incluso aquellas regiones “en blanco”, es decir, sin identidad estructural asignada, contribuyen a

encontrar dominios con funciones novedosas. En esta tesis y para la mayoría de los fagos con morfología *Siphoviridae*, se ha observado que existe una sintenia conservada en los módulos de los genomas que facilita la predicción de algunas funciones en ausencia de homología. En otros casos, la homología aparece con proteínas que presentarían un rol poco habitual en fagos, sin embargo su función podría ser interesante en términos evolutivos.

Según datos pertenecientes a la base de datos de secuencias de virus del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/) hasta la fecha se secuenciaron casi 200 fagos que infectan BAL. En marzo de 2017 se reportaron treinta y nueve secuencias pertenecientes a fagos que infectan *Lactobacillus* spp. (en la base de datos aparecen tres secuencias más, aunque son solo anotaciones de profagos no inducidos y no fueron consideradas). Estos números son ampliamente mayores a los que fueron reportados en el último *review* extensivo de fagos de *Lactobacillus* de Villion y Moineau de 2009 donde solo se habían secuenciado un total de 9 genomas de *Lactobacillus* spp. En esta tesis, no solo secuenciamos a los fagos J-1 y PL-1 sino también contribuimos con la secuencia de los fagos inducidos PLE2 y PLE3 provenientes de la cepa *L. casei* BL23. Dentro de los fagos que infectan *Lactobacillus* spp, existen representantes de la familia *Myoviridae* (3 genomas) y *Siphoviridae* (36 genomas). Los genomas de fagos de *Lactobacillus* spp. pertenecientes a *Siphoviridae* presentan entre 29- 49 kpb y uno de ellos 71 kpb (Ldl1 que infecta a *L. delbrueckii*). La mayoría de los genomas secuenciados pertenecen a fagos del grupo *L. casei* seguido de *L. delbrueckii* y luego encontramos representantes de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. brevis* y *L. johnsonii* con 1 a 4 contribuciones de secuencia para cada uno de los hospedadores reportados.

Los estudios filogenéticos de bacteriófagos también requieren de la comparación genómica entre los miembros con el objeto de agrupar fagos con características comunes (Smith K phage cluster relationship). Un análisis de *dot plot* de todos los fagos secuenciados de *Lactobacillus* spp. sin incluir los 3 fagos descriptos pertenecientes a *Myoviridae*, se muestra en la figura 69 en un intento de contribuir con la clasificación. Los genomas individuales fueron concatenados en una secuencia única y posicionados de tal forma que los genomas con mayor similitud queden juntos. Luego se realizó un *dot blot* contra la misma secuencia concatenada. Este tipo de representación refleja la relación más

simple donde los fagos genéticamente más cercanos pertenecen al mismo grupo y aquellos sin homología son parte de grupos diferentes. Sin embargo, este análisis no contempla casos con homologías, aunque débiles, a lo largo de todo el genoma o regiones con alta identidad pero de corta extensión como se ha descrito en otros fagos (Hatfull et al., 2010).

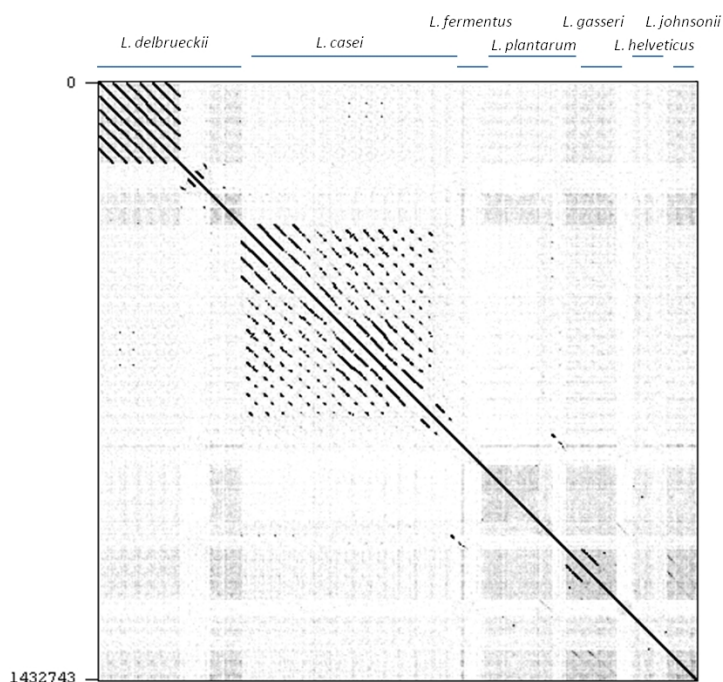


Figura 69. Dot plot de los 36 genomas de *Lactobacillus* spp. Los genomas de los fagos de *Lactobacillus* spp. se concatenaron y se compararon unos a otros utilizando el programa Gepard (Krumstiek et al., 2007). Los grupos a los cuales pertenecen o infectan se indican en la zona superior.

De la figura 69 podemos deducir que los genomas de *Lactobacillus* spp. de la familia de *Siphoviridae* no son uniformemente diversos. En la región superior izquierda se observa un alto grado de conservación entre los fagos de *L. delbrueckii* demostrando que están genéticamente muy relacionados (a excepción de phiJB, LLH y Ld11). Luego, entre los fagos del grupo *L. casei*, aunque con mayor variabilidad en la identidad de secuencia, es posible diferenciar un *cluster*. Sin embargo, para el resto de los genomas analizados la homología fue baja sin permitir agruparlos. La alta diversidad de las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* en concordancia con una alta heterogeneidad de los fagos que las infectan representada en la figura 69 dificulta la clasificación como se ha descrito con anterioridad

(Claesson *et al.*, 2007, Villion y Moineau, 2009). Esto último también puede ser consecuencia de la falta de genomas disponibles en la base de datos para las otras especies de *Lactobacillus* spp. siendo 4 el máximo encontrado. Los ejemplos de *L. delbrueckii* y el grupo *L. casei* demuestran que es posible agruparlos cuando el número de secuencias aumenta.

El grupo *L. casei* se muestra en detalle en la figura 70. Pese a que prácticamente todos estos genomas comparten ciertas regiones de homología, observamos dos regiones diferenciales o subgrupos. En el subgrupo I (arriba a la izquierda) encontramos a los fagos caracterizados en el capítulo I de esta tesis (J-1, PL-1, A2, Lrm1). Estos fagos presentan una alta similitud de secuencia en la zona de las terminasas y la región morfológica aunque después la identidad es menor (Figura 20, capítulo 1). Otro subgrupo puede distinguirse en el ángulo inferior derecho donde están los profagos inducidos CL1, CL2, Ilp84, Ilp1308 y PLE3, este último caracterizado en el capítulo 2. Lc-Nu y Phi AT3 se encontrarían entre ambos subgrupos. Finalmente, las secuencias pertenecientes a los fagos iA2 y PLE2 parecerían ser parte de otro subgrupo (donde también encontraríamos a PLE1, que tiene un 99% de identidad con iA2). Este análisis se condice con el realizado por Mercanti *et al.* (2015) en el cual se comparan las relaciones a través de la subunidad mayor de la terminasa, considerado uno de los genes más conservados y propuesto para clasificación filogenética de fagos de acuerdo al posible sistema de encapsidación de ADN. En este trabajo, los fagos J-1, PL-1, A2 y Lrm1 (subgrupo I en este análisis), PhiAT3 y Lc-Nu se agruparon de acuerdo al sistema de empaquetamiento tipo cos con extremos cohesivos en el extremo 3'. El fago iA2 también se encontró en este grupo. Por otro lado, los genomas CL1, CL2, Ilp84, Ilp1308 se agruparon en el sistema de tipo P22 de empaquetamiento del ADN por cabeza llena.

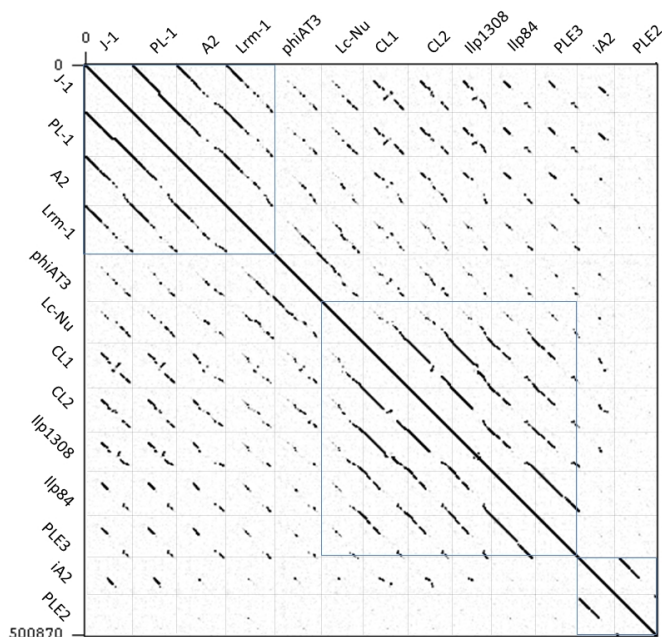


Figura 70. Dot plot de los fagos del grupo *L. casei*. En el borde superior se encuentran los nombres de los genomas de los fagos comparados utilizando el programa Gepard (Krumsiek et al., 2007). En negrita se resaltan los posibles subgrupos.

2. El riesgo de las cepas lisogénicas

Como se ha reiterado a lo largo de este trabajo, cuando los fagos atacan cepas probióticas, el problema a resolver es más complejo. Los fagos virulentos no son los únicos problemáticos en este caso ya que las propias cepas pueden contener profagos que sean liberados durante la fermentación generando nuevos fagos con potencial de infectar otras cepas presentes en el cultivo. En este trabajo, nos focalizamos en el estudio de la cepa polilisogénica *L. casei* BL23 que ha sido estudiada exhaustivamente a nivel fisiológico, bioquímico y genético (Bourand et al. 2013; Munoz-Provencio et al. 2012; Piuri et al. 2003; Revilla-Guarinos et al. 2013) y mostró tener propiedades probióticas (Rochat et al., 2007).

En el capítulo 2 describimos la presencia de tres profagos (PLE1-3). PLE2 y PLE3 lograron inducirse aunque con diferentes tasas. El elemento movilizable reportado durante la secuenciación del genoma en *L. casei* BL23 coincide con las posiciones del fago PLE2 (Mazé et al., 2010). La estrategia utilizada (análisis por PCR cuantitativa en tiempo real) reveló que la tasa de escisión luego del agregado del agente mutagénico MC fue mayor

para PLE2 que para PLE3, y que además el genoma de PLE2 replica sugiriendo que las partículas de este fago podrían ser ensambladas. Este resultado también se correlacionó con la mayor proporción de ADN de PLE2 proveniente de las partículas fágicas del sobrenadante de los cultivos lisados parcialmente. Más aún, el análisis por MS mostró que la mayoría de los péptidos encontrados correspondían a PLE2. Estos resultados sugieren que los viriones observados por microscopía electrónica corresponden mayoritariamente a PLE2.

Resultó llamativo no encontrar rastros de escisión de PLE1. Incluso la relación *attB/prtP* fue levemente superior con el agregado de MC. Mientras que en *L. casei* BL23 la inducción de PLE1 fue casi imperceptible, el fago iA2 (que tiene una homología de secuencia del 99% con PLE1) logró inducirse de la cepa probiótica *L. paracasei* A (Capra *et al.*, 2010). El análisis de la secuencia de PLE1 reveló que este profago presenta una pequeña delección de 5 pb en la región de integración/inmunidad, que podría ser la causa del comportamiento diferencial entre ambos profagos.

En *L. gasserii* ADH se describió que uno de los profagos de esta cepa tiene la capacidad no solo de inducirse sino también de adquirir genes bacterianos y transducirlos a cepas emparentadas. Esto sugiere que el fago temperado ϕ ADH posiblemente contribuya con la transferencia horizontal de genes (Raya *et al.*, 1989; Baugher *et al.*, 2014). En nuestro trabajo, los niveles de inducción espontánea en las condiciones probadas fueron bajos. No obstante, los genomas de los profagos PLE1 a 3 se encontraron en las cepas comerciales *L. casei* BDII (Ai *et al.*, 2011) y *L. casei* W56 (Hochwind *et al.*, 2012). En la cepa probiótica patentada *L. casei* LCW2 (Chen *et al.*, 2011) también se detectaron los profagos PLE1 y PLE2. Los múltiples profagos encontrados en *L. casei* BL23, la similitud de su secuencia entre ellos y con otros fagos y profagos presentes en *Lactobacillus* contribuyen con la idea de que los intercambios recombinatorios ocurren con cierta frecuencia. Es necesario realizar estudios complementarios en presencia de otros factores vinculados directamente con el proceso en una planta, como altas concentraciones de sal y cambios de temperatura, para determinar el riesgo en el empleo de estas cepas. En caso de conocerse la secuencia genómica de la bacteria, la estrategia de PCR cuantitativa podría ser una opción eficaz de evaluación dado que su correlación fue positiva con los virus finalmente caracterizados como inducidos.

Desde otra perspectiva, la falta de una eficiente escisión espontánea de profagos en esta especie y liberación de partículas virales podría ser consecuencia de una inusual represión del ciclo lítico compatible con una baja tasa de respuesta SOS y de recombinación en *L. casei* BL23. Estudios de transcripción realizados en *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus* han mostrado que la mayor parte del ADN correspondiente a los profagos que acarrean se encuentra silente pero que los genes cercanos al sitio de unión (*attL* y *attR*) se transcriben en niveles altos (Ventura *et al.*, 2004). En *L. gasseri* por ejemplo, se identificaron ARNm específicos para putativas proteínas represoras y de exclusión a la superinfección pero no el ARNm de genes tipo Cro vinculados con el ciclo lítico (Ventura *et al.*, 2006). En un trabajo recientemente publicado, describen en la cepa *Corynebacterium glutamicum* una proteína de silenciamiento codificada en un profago denominada *cgpS* (Pfeifer *et al.*, 2016). La delección del gen correspondiente permite la inducción del propio profago a tasas mucho mayores. Los autores sugieren que genes ortólogos se encuentran en otros fagos y profagos. Pese a esto, un análisis preliminar indicaría que al menos en PLE2 y PLE3, el gen no parecería estar presente. Esto tampoco descarta que los otros profagos (PLE1 y PLE4) o la propia bacteria puedan codificar para un gen de silenciamiento u otro sistema regulatorio.

Como se describió con anterioridad, gran parte de las bacterias del género *Lactobacillus* son lisógenas. Debido a esto, resulta difícil encontrar la cepa óptima con las características de interés y que además esté libre de profagos, por ende la estabilidad individual de cada cepa debería evaluarse (Emond y Moineau, 2007).

3. La placa base de los fagos J-1 y PL-1

En el extremo distal de la cola de los fagos de *Siphoviridae* se encuentra la maquinaria proteica dedicada al reconocimiento específico de la bacteria, paso clave para el éxito infeccioso. Probablemente, las organelas más estudiadas a nivel estructural en *Siphoviridae* sean, por un lado, la estructura de la punta de la cola del fago SPP1 de *B. subtilis* que interactúa con la proteína YueB, por otro lado, las placas base de los fagos que reconocen compuestos sacarídicos. Los complejos macromoleculares presentes en p2 y TP901-1 que infectan a *L. lactis* son los que más se conocen en cuanto a su estructura. En este trabajo, a través de la reconstrucción por microscopía electrónica, y a una resolución de

20 Å, contribuimos con la estructura de placa base de J-1 que infecta a cepas de *L. casei/paracasei*. La placa base del fago J-1 presenta ~125-210 Å de ancho y ~110 Å de alto, mucho más pequeña que las anteriormente descritas. Aunque las secuencias no tienen identidad y todas muestran morfologías diferenciales (figura 71), probablemente vinculadas con su propia estrategia de adsorción; un análisis más exhaustivo de sus proteínas revela plegados similares entre las estructuras (Veesler y Cambillau, 2010).

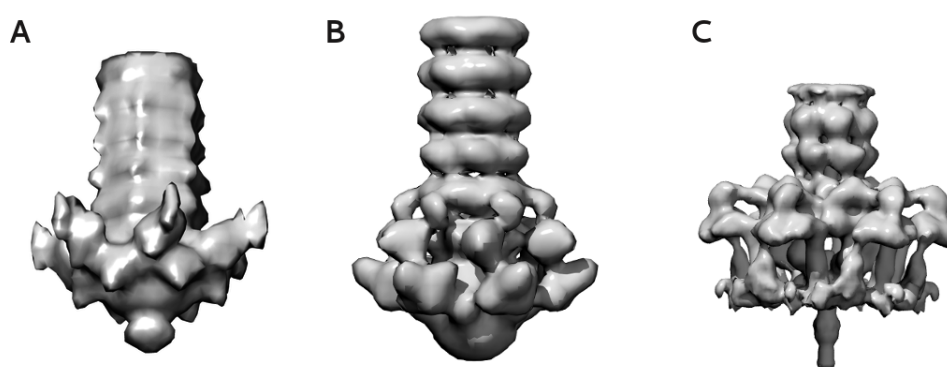


Figura 71. Reconstrucción en tres dimensiones de la placa base de J-1 (A), p2 (B) y TP901-1 (C). Las imágenes son a modo ilustrativo y no están a escala.

La tabla 14 retoma los datos presentados en la introducción y añade los datos deducidos en esta tesis en cuanto a los componentes y a la estructura de la placa base de J-1 y PL-1. Recordemos que la placa base de p2 está formada por seis Dit, seis RBPs (triméricas) y tres Tal y, TP901-1 presenta seis Dit, rodeada de 18 copias de BppU, 18 trímeros de RBP y tres Tal, mientras que la placa base de J-1 está conformada por seis Dit y tres Tal.

En J-1 y PL-1, el módulo de morfogénesis que codifica para los genes de la cola -con el terminador de la cola, la MTP, las chaperonas (con el *frameshift* traduccional conservado), la TMP y las proteínas de la placa base Dit y Tal está conservado en su sintenia aunque no se encontraron registros de las RBP.

Proteína /Fago	p2	TP901-1	Tuc2009	J-1 / PL-1-1
TMP	ORF 14	ORF 45	ORF 48	Gp15
Dit	ORF 15	ORF 46	ORF 49	Gp16
Tal	ORF 16	ORF 47	ORF 50	Gp17
BppU (o placa base superior)	-	ORF 48	ORF 51	-
BppA	-	-	ORF 52	-
RBP (o placa base inferior)	ORF 18	ORF 49	ORF 53	-

Tabla 14. Proteínas de la placa base en fagos de BAL. Se muestran los nombres generales de las proteínas de la placa base y los nombres de cada proteína en el fago caracterizado. En negrita se destacan los fagos caracterizados en este trabajo.

La falta de una proteína específica con capacidad de unirse a los receptores bacterianos, nos alentó a buscar secuencias proteicas que podían compensar esa pérdida. En J-1 y PL-1 las proteínas DIT presentaron un peso molecular mayor que las DIT clásicas, con dos inserciones correspondientes a dos dominios extra y que denominamos DIT evolucionadas. Además de atribuirle identidad a la proteína DIT como componente estructural del virión por análisis de MS, mediante un ensayo de inmunoelectromicroscopía pudimos localizarla en la punta de la cola de la partícula viral (figura 47). En J-1 y PL-1, empleando herramientas bioinformáticas, fue posible encontrar homología entre el primer dominio extra de DIT y CBMs o dominios de unión a carbohidratos, mientras que para el segundo no se encontró homología con proteínas conocidas. No obstante, el Dom2 (luego llamado CBM2) y no el CBM1, presentó capacidad de unión específica a las bacterias *L. casei/ paracasei*. Los resultados obtenidos empleando diferentes aproximaciones que incluyeron, ensayos de inhibición de la adsorción, ensayos de unión de proteínas de fusión fluorescentes a bacterias visualizadas por microscopía, citometría con nanoanticuerpos y ensayos de inmunofluorescencia, se revalidaron unos a otros concluyendo en su conjunto que el CBM2 podía unirse específicamente a las células de *L. casei/ paracasei*. La naturaleza de esta segunda inserción en la DIT se confirmó determinando la estructura por rayos X a una resolución de 1.28 Å. La estructura del cristal permitió corroborar que se trataba de un CBM, con homología a lectinas. A su vez, la comparación con estructuras similares permitió localizar un posible sitio de unión del carbohidrato. La falta de actividad *in vitro* del CBM1

en el contexto particular evaluado podría llevar a resultados equívocos en cuanto a su función en la naturaleza donde las condiciones de infectividad son diferentes. Hatfull *et al.* (2015) sostienen que dada la continua batalla fago-bacteria, un determinado fago pudo haber adquirido una función particular para multiplicarse en una bacteria infectada en el pasado sin aportar diferencias en la bacteria de estudio actual. De esta forma, tampoco debería sorprender que el CBM1 resulte funcional pero en otra cepa bacteriana con otras características en su envoltura.

Según nuestros conocimientos, es la primera vez que se reporta que la proteína DIT (anteriormente solo caracterizada como el centro estructural de anclaje para otras proteínas) puede participar en el reconocimiento del receptor. Estas proteínas DIT evolucionadas no parecen ser una excepción sino más bien un mecanismo de reconocimiento conservado en fagos del grupo *L. casei*. De igual modo a lo observado para J-1 y PL-1, un análisis comparativo de secuencias aminoacídicas mostró que en ninguno de los fagos del *L. casei* hasta hoy secuenciados, la RBP están presente. En los fagos A2, Lrm1, Lc-Nu y PhiAT3 la proteína DIT también mostró inserciones que son atribuibles a CBMs. A su vez, los profagos inducidos y recientemente secuenciados CL1, CL2, iLp1308, Ilp84 y PLE3 (Mercanti *et al.*, 2015; Dieterle *et al.*, 2016) presentaron el mismo patrón. Por otro lado, las DIT clásicas también aparecen dispersas en secuencias conocidas de profagos de *Lactobacillus* y analizadas en el capítulo 2 (PLE2, PLE1, iA2). La tabla 15 resume estos resultados mostrando la ubicación de los CBMs en las placas base.

Más aún, las DIT evolucionadas parecen no estar restringidas al entorno de los fagos del grupo *L. casei*, en un estudio reciente en el que se secuenciaron 38 fagos del grupo 936 de *Lactococcus* (Murphy *et al.*, 2016), dieciséis de ellos presentaban una proteína DIT con un largo aminoacídico compatible con las DIT evolucionadas.

En resumen, hoy se sabe que existen dos tipos de DIT presentes en BAL: DIT cortas o clásicas (con aproximadamente 300 aminoácidos) de función estructural formando un hexámero y que delinea un canal para el pasaje del ADN y las DIT evolucionadas o largas (aproximadamente 400 aminoácidos más largas que las clásicas) que además de presentar los primeros 300 aminoácidos vinculados en la formación del hexámero presentan dominios CBM como posibles anti-receptores.

Tabla 15. Posibles CBMs en las placas base de fagos del grupo *L. casei*. Se muestra la lista de fagos del grupo *L. casei* donde se han encontrado posibles CBMs y se comparan con los fagos conocidos de *L. lactis* (p2, TP901-1 y Tuc2009). En negrita se destacan los fagos caracterizados en este trabajo. También se muestran los posibles CBMs a modo de ejemplo de un fago de *Lactococcus* recientemente secuenciado. Rosa indica CBM, gris indica ausencia de CBM pero existencia de la proteína. Las citas bibliográficas hacen referencia a los trabajos donde se describe el genoma o si hay evidencia experimental de las placas base *per se*.

Fago	N.º acceso (Refseq)	Dit	Tal	BppU	BppA	RBP	Grupo	Referencia Bibliográfica
p2	GQ979703 (GB)						Grupo 936 <i>L. lactis</i>	(Sciara et al., 2010)
Tp901-1	NC_002747						Grupo P335 <i>L. lactis</i>	(Veesler et al., 2012)
Tuc2009	NC_002703						Grupo P335 <i>L. lactis</i>	(Vegge et al., 2006)
J-1	NC_022756.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Dieterle et al., 2017)
PL-1	NC_022757.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Dieterle et al., 2014)
A2	NC_004112.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(García et al., 2003)
Lrm1	NC_011104.1						<i>L. rhamnosus</i>	(Durmaz et al., 2008)
phiAT3	NC_005893.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Lo et al., 2005)
Lc-Nu	NC_007501.1						<i>L. rhamnosus</i>	(Tuohimaa et al., (2005)
CL1	NC_028888.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Mercanti et al., 2015)
CL2	NC_028835.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Mercanti et al., 2015)
ilp1308	NC_028911.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Mercanti et al., (2015)
ilp84	NC_028783.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Mercanti et al., 2015)
PLE3	NC_031125.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Dieterle et al., 2016)
PLE2	NC_031036.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Dieterle et al., 2016)
iA2	NC_028830.1						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Mercanti et al., 2015)
PLE1*	-						<i>L. casei/ paracasei</i>	(Maze et al., 2010)
Phim1127	KP793132 (GB)						Grupo 936 <i>L. lactis</i>	(Murphy et al., 2016)

Legrand et al. (2016) resolvieron la estructura atómica de la proteína BppA que forma parte de la placa base de Tuc2009 pero está ausente en TP901-1. BppA también mostró tener un dominio CBM sugiriendo que esta proteína participaría en la unión al receptor junto con la proteína RPB. Un trabajo que se encuentra en revisión, que involucra el análisis de 114 fagos de *Lactococcus* del grupo 936, muestra que los CBMs se pueden encontrar en diferentes lugares del virión. Además de la estructura clásica RBP, los fagos del grupo 936 decoran con CBMs las estructuras de Dit, MTP o NPS. En general, estos módulos CBMs se encuentran en una o dos estructuras proteicas al mismo tiempo (Hayes, comunicación personal).

Aunque es necesaria mayor información *in vitro* que complemente los resultados bioinformáticos y estructurales realizados en otros fagos, este análisis revela la promiscuidad de los CBMs e incita a investigar si funcionan solos o en conjunto durante el proceso de adhesión. Dada la dispersión de los CBMs en los fagos de *Siphoviridae* de BAL, se presume que tienen un rol positivo y son una forma habitual de colaboración en el reconocimiento del hospedador. Es posible que su posicionamiento en la estructura viral dependa de los mecanismos propios del virión para infectar a la bacteria hospedadora. Además, la omnipresencia de los CBMs en estos fagos podría aportar un ejemplo más para la teoría modular planteada por Botstein en 1980, donde sugiere que la transferencia de unidades ocurre a través de dominios y no de estructuras mayores mejorando la adaptabilidad genética en un determinado ambiente (Botstein, 1980).

La proteína Tal de J-1 y PL-1 se estudió de forma preliminar durante este trabajo. En primera instancia se observó que su longitud también excedía las longitudes clásicas de las Tal descritas con anterioridad (Vegge *et al.*, 2006; Sciara *et al.*, 2010; Goulet *et al.*, 2011). Con la resolución de la estructura de BppA mostrando un plegado de tipo CBM (Legrand *et al.* 2016), un nuevo análisis realizado por HHpred mostró que en la proteína Tal también podría existir un CBM. La región C-terminal de la proteína Tal se asemeja a proteínas de reconocimiento del receptor en fagos de *S. thermophilus* (Duplessis y Moineau, 2001). En estos virus, la construcción de fagos quimera conteniendo dominios de unión al receptor no propios permitió invertir su rango de huésped (Duplessis y Moineau, 2001). Los ensayos de unión de Tal a *L. casei* mostrarían su capacidad de adherirse a la superficie bacteriana. Además, un ensayo de zimograma reveló que parte de esta proteína tendría actividad hidrolítica, necesaria para generar poros en la pared bacteriana durante la inyección del ADN del fago. En la proteína Tal del fago Tuc2009 se demostró con anterioridad la funcionalidad de un dominio perteneciente a la familia M37 asociado a la hidrólisis del peptidoglicano (Kenny *et al.*, 2004). Cornelissen *et al.* (2016) demostraron funcionalmente que un homotrímero presente en la placa pase del fago Ld17 de *L. delbrueckii* presenta un dominio glicerofosfodiesterasa y que esta estructura podría estar involucrada en la interacción fago-bacteria (Cornelissen *et al.*, 2016).

Los fagos coexisten con las bacterias hospederas, es por eso que el reconocimiento de receptores de la envoltura resulta crucial para desencadenar la infección. La superficie

bacteriana de Gram positivas presenta diferentes componentes que pueden ser reconocidos por el fago como WTA, LTA, CWPS y EPS. Ensayos previos del laboratorio sugerían que en la fracción polisacáridica de la envoltura de *L. casei* BL23 se encontraba el receptor bacteriano (Malone, 2015). En concordancia, los ensayos de adsorción en presencia de azúcares determinaron que al menos la ramnosa era uno de los receptores como se había demostrado con anterioridad (capítulo 3, Yokokura, 1971). En el transcurso de esta tesis, Vinogradov *et al.* (2016) caracterizaron estructuralmente el polisacárido de pared de *L. casei* BL23 y determinaron que era particularmente rico en el azúcar ramnosa. Observamos que la interacción de la proteína Dit, y precisamente del CBM2, con *L. casei* BL23 desaparecía en presencia del polisacárido de pared purificado de la misma bacteria. El mismo efecto inhibitorio se obtuvo en presencia del monosacárido L- ramnosa. Estos resultados colocan al CWPS como al menos uno de los receptores involucrados en los primeros pasos de la infección de los fagos J-1 y PL-1. Finalmente, la estructura reconstruida de la placa base, mostró que el CBM2 está ubicado externamente, completamente disponible para una interacción eficiente con el polisacárido de pared. Por otra parte, el dominio CBM1 se encontró posicionado de forma adyacente a la proteína Tal. El efecto de neutralización generado con el VHH57 (anti-CBM1) en el fago J-1 fue impredecible, pues todos los ensayos realizados *in vitro* (capítulo 3) no le asignaban a este dominio un rol de unión a la superficie bacteriana. Este nanoanticuerpo podría también interactuar con la Tal o inhibir la apertura/cierre del trímero, que ha sido descrito en otros fagos, evitando la infección. La ubicación precisa del nanoanticuerpo en el dominio CBM1, a través de la resolución de la estructura del complejo, podría resultar clave para comprender los primeros pasos del ciclo de multiplicación en los fagos de *L. casei/ paracasei*.

Aunque hemos avanzado en el entendimiento del mecanismo de interacción fago bacteria en J-1 y PL-1, quedan aún muchas preguntas por responder que servirán de base para futuros proyectos. La observación de tres CBMs (dos en el C-terminal de Dit y uno en el C-terminal de Tal) y la posible funcionalidad de dos de ellos, conducen a cuestionarnos si existe más de un receptor involucrado en la interacción. Si varios CBMs son funcionales; ¿Actuarán a través de varios pasos en la adsorción del fago? En el fago SPP1, por ejemplo, se postula que en primera instancia hay una interacción débil con receptores sacarídicos y luego la interacción fuerte sucede con la proteína YueB (Baptista *et al.*, 2008). En el fago p2

también se ha sugerido una interacción lábil a través de las decoraciones presentes en la MTP y luego el reconocimiento del receptor sacarídico con sus RBPs. Los ensayos de inhibición de la adsorción del fago en presencia de Dit, que no superan un 60% de inhibición (Figura 46) o los resultados obtenidos con los anticuerpos anti-Dit (Figura 48), donde no logramos obtener una inhibición de la adsorción total de J-1 o PL-1 aún aumentando la cantidad de Dit/ anticuerpo anti-Dit agregado, apoyarían esta teoría. También nos resulta interesante saber si algunos de estos CBMs (como el CBM1) resultan funcionales en otras cepas. Evaluar a través de un *array* de azúcares (de diferente complejidad y considerando los glicanos conocidos de las paredes celulares) la especificidad de reconocimiento de cada CBM, nos brindaría información muy valiosa respecto a qué tipo de bacterias pueden ser decoradas con estos dominios ampliando su utilización hacia fines biotecnológicos como el anclaje de otras moléculas de interés. Otra de las preguntas aún sin resolver es a través de qué mecanismo la estructura trimérica Tal, que protruye unos 600 Å por fuera de la placa base, eventualmente se desprende y se abre para eyectar el ADN a la bacteria generando una infección exitosa.

4. Desarrollo de estrategias racionales para el control fágico

Varios trabajos apuntan al diseño de estrategias innovadoras, muchos de ellos incluyendo la manipulación genética bacteriana para contraatacar a los fagos. Pese a grandes esfuerzos, la principal falencia encontrada en la mayoría de los casos pareciera ser que solo funcionan para un fago en particular o un grupo de fagos relacionados. Este problema concuerda con la gran plasticidad que tienen los genomas fágicos que les permite sobreponerse a las barreras naturales o incluso artificiales impuestas por las bacterias (Koskella y Brockhurst, 2014). En un *review* reciente de Mahony y Van sinderen (2016), se plantea la posibilidad de usar los complejos macromoleculares de las placas base como competidores de los fagos por los sitios de adsorción. Al menos para J-1 y PL-1, no pareciera ser una estrategia apropiada. Como luego se discute en el mismo trabajo, la inhibición de la adsorción es probable que no sea total, desechando la posibilidad de usar a las placas base como herramienta. Como se dijo con anterioridad, los ensayos de competencia con Dit no muestran una inhibición total de la adsorción del fago. A su vez, la

expresión de los complejos de estas estructuras multiméricas suele ser baja no siendo una alternativa a escala industrial.

El empleo de VHH también fue planteado como una alternativa anti fágica. Los resultados de este trabajo sugieren que el nanoanticuerpo VHH57 (figura 66) podría ser utilizado como agente neutralizante de los fagos dado que la infección se redujo casi en su totalidad. Los VHH anti-RBP en TP-901-1 también neutralizaron completamente la infección (Desmyter *et al.*, 2013). La facilidad con la que se expresan y la capacidad de obtenerlos en altas cantidades facilitando un escalado a nivel industrial, resulta prometedor. Para el fago p2, se expresó con éxito un VHH anti-RBP en una cepa de *L. paracasei*, considerada GRAS, que fue capaz de limitar la infección de células de *Lactococcus* (Hultberg *et al.*, 2007). El nanoanticuerpo también fue efectivo cuando se probó durante la elaboración del queso (Ledebøer *et al.*, 2002). Sin embargo, los VHHs son nuevamente específicos de fago y se debería evaluar económicamente la posibilidad de ampliarlo a los fagos más recurrentes de la planta. Esto tampoco asegura que aparezcan eventualmente fagos sobrepasando el efecto neutralizante del nanoanticuerpo.

El aislamiento de BIMs, sea probablemente una de las estrategias más eficaces. Con el conocimiento biológico de las interacciones, es posible contribuir con la generación de BIMs (mutantes en genes de la vía biosintética de la envoltura, por ejemplo). El sistema CRISPR-Cas propone una herramienta natural más que interesante y su uso en la industria parecería ser actualmente un éxito.

Hoy en día no existe una forma única de controlar las infecciones. Un monitoreo constante para evaluar de forma inminente la presencia de fagos en combinación con el conocimiento generado sobre los mismos, permitiría una solución racional anti-fágica para esa población particular (Mahony y van Sinderen, 2015). Un ejemplo interesante usando esta metodología, consistió en el análisis detallado de las zonas conservadas y variables codificadas en el *cluster* de genes vinculados a la síntesis del polisacárido de pared que permitió la clasificación de las cepas de *L. lactis* en tres subgrupos (CWPS A, B y C). En paralelo, un panel con fagos del grupo 936 clasificados de acuerdo a su rango de huésped y RBP (diferentes genotipos de la proteína), reveló una buena correlación entre el tipo de película genotípica de un huésped en particular y el rango de huésped probado (Mahony

et al., 2013). Mahony *et al.* (2013) sugieren que este tipo de análisis permitiría la selección racional de cepas que tuvieran la menor probabilidad de infectarse en una planta si se conocen los fagos aislados con mayor asiduidad. De esta forma, estudios exhaustivos que caracterizan tanto a los fagos como a las bacterias hospedadora, permiten realizar este tipo de deducciones aportando soluciones que minimicen los problemas en las plantas de la industria láctea.

CONCLUSIONES

-
- Los fagos J-1 y PL-1 se aislaron y estudiaron durante años debido a sus efectos negativos en los procesos fermentativos del producto Yakult. En este trabajo describimos y comparamos el genoma de PL-1 y el recientemente secuenciado J-1 junto con las estructuras proteicas del virión. Los fagos solo difieren en cuatro genes de la región de cambio genético y en las proteínas de los genes de la cola (principalmente Dit).
 - En los genes que codifican para los componentes de la placa base de los fagos J-1 y PL-1 no se encontraron las canónicas RBPs. En su lugar, la secuencia de la proteína Dit mostró tener dos inserciones ausentes en las Dit clásicas sugiriendo la existencia de dominios con funciones adicionales. Solo el Dom1 presentó homología a CBMs. A esta proteína se la denominó “Dit evolucionada”.
 - El análisis e inducción de profagos indicó que, en las condiciones ensayadas, la cepa polilisogénica *L. casei* BL23 no es fácilmente inducible y su utilización en la planta no presentaría un riesgo. Sin embargo, debería ensayarse la inducción de profagos en condiciones vinculadas al proceso fermentativo. Los fagos inducidos PLE2 y PLE3 se secuenciaron mostrando que las RBPs tampoco estaban presentes pero existían dominios con homología a CBMs en las proteínas Dit y Tal.
 - La proteína Dit tiene capacidad de unión a la superficie de cepas de *L. casei* / *L. paracasei*. En particular, se demostró que el Dom2 (y no el Dom1) es el responsable de reconocer al menos un receptor en la bacteria y lo denominamos CBM2.
 - El polisacárido de pared, rico en ramnosa, inhibió la interacción bacteria-proteína Dit al igual que lo hizo el monosacárido L-ramnosa. Estos resultados corroboran ensayos previos en donde este azúcar inhibía la adsorción fágica. Asimismo, identifica a la Dit evolucionada como uno de los anti-receptores en los fagos J-1 / PL-1 y a la L-ramnosa como uno de los receptores involucrados en el proceso de reconocimiento fago-hospedador.
 - Se resolvió por rayos X la estructura proteica de CBM2 a una resolución de 1.28 Å mostrando que tiene un plegado similar a lectinas y corroborando su función de

-
- CBM. La comparación con estructuras similares en el PDB sugiere un posible sitio de unión del carbohidrato.
- La reconstrucción por microscopía electrónica del extremo distal de la cola del virión de J-1 permitió localizar el CBM2 en el exterior de la placa base posicionándose en un modo apto para reconocer al receptor en el hospedador.
 - La proteína Tal también presentó un dominio C-terminal ausente en las Tal hasta hoy caracterizadas con un posible dominio CBM. Los ensayos preliminares indicarían que la Tal presenta actividad hidrolítica y capacidad de unión a la superficie bacteriana.
 - Los nanoanticuerpos generados que reconocen componentes de la placa base de J-1, ayudarán, a futuro, a resolver nuevas estructuras o encontrar los sitios de unión a carbohidratos. En particular, el VHH57 inhibió la infección y su posicionamiento podría revelar datos importantes sobre su rol en el mecanismo de adsorción.
 - Las Dits evolucionadas también se identificaron *in silico* en otros fagos del grupo *L. casei* incluyendo al recientemente inducido PLE3. A su vez, las Tals también presentarían dominios de tipo CBMs.
 - Los CBMs presentes en las Dits evolucionadas deberían considerarse como dispositivos *bona-fide* de adhesión en los primeros pasos de la infección y no solo como proteínas con mera función estructural como habían sido descritas hasta hoy.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, H.W., y Prangishvili, D. (2012) Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol* **157**: 1843-1849.
- Adams, P.D., Afonine, P. V, Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., et al. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D* **66**: 213-221.
- Ai, L., Chen, C., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W., y Guo, B. (2011) Complete genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus casei* BD-II. *J Bacteriol* **193**: 3160-3161.
- Ainsworth, S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Courtin, P., Guerardel, Y., Mahony, J., et al. (2014) Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity. *MBio* **5**: e00880-14.
- Alemayehu, D., Ross, R.P., O'Sullivan, O., Coffey, A., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., y McAuliffe, O. (2009) Genome of a virulent bacteriophage Lb338-1 that lyses the probiotic *Lactobacillus paracasei* cheese strain. *Gene* **448**: 29-39.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Arbabi Ghahroudi, M., Desmyter, A., Wyns, L., Hamers, R., y Muyldermans, S. (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* **414**: 521-526.
- Arcus V. (2002) OB-fold domains: a snapshot of the evolution of sequence, structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:794-801.
- Atamer, Z., y Hinrichs, J. (2010) Thermal inactivation of the heat-resistant *Lactococcus lactis* bacteriophage P680 in modern cheese processing. *Int Dairy J* **20**: 163-168.
- Baptista, C., Santos, M.A., y São-José, C. (2008) Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *J Bacteriol* **190**: 4989-4996.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Patrick Boyaval, Moineau, S., et al. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-)* **315**: 1709-1712.
- Barrangou, R., y Marraffini, L. a (2014) CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* **54**: 234-244.
- Baugher, J.L., Durmaz, E., y Klaenhammer, T.R. (2014) Spontaneously Induced Prophages in *Lactobacillus gasserii* Contribute to Horizontal Gene Transfer. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3508-3517.
- Bebeacua, C., Lai, L., Vegge, C.S., Brøndsted, L., Heel, M. van, Velesler, D., y Cambillau, C. (2013) Visualizing a complete Siphoviridae member by single-particle electron microscopy: the structure of lactococcal phage TP901-1. *J Virol* **87**: 1061-1068.
- Bebeacua, C., Tremblay, D., Farenc, C., Chapot-Chartier, M.-P., Sadovskaya, I., Heel, M. van, et al. (2013) Structure, Adsorption to Host, and Infection Mechanism of Virulent Lactococcal Phage p2. *J Virol* **87**: 12302-12312.
- Benevides, J.M., Bondre, P., Duda, R.L., Hendrix, R.W., y Thomas, G.J. (2004) Domain Structures and Roles in Bacteriophage HK97 Capsid Assembly and Maturation. *Biochemistry* **43**: 5428-5436.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N. a, Brennan, N.L., y Cogan, T.M. (2001) Recent Advance in Cheese Microbiology. *Int Dairy J* **11**: 259-274.

-
- Bergh, O., BØrsheim, K.Y., Bratbak, G., y Haldal, M. (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467-468 .
- Bermúdez-Humarán, L.G., Kharrat, P., Chatel, J.-M., y Langella, P. (2011) Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb Cell Fact* **10**: S4.
- Bissonnette, F., Labrie, S., Deveau, H., Lamoureux, M., y Moineau, S. (2000) Characterization of mesophilic mixed starter cultures used for the manufacture of aged cheddar cheese. *J Dairy Sci* **83**: 620-627.
- Blanc, E., Roversi, P., Vonrhein, C., Flensburg, C., Lea, S.M., y Bricogne, G. (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in {it BUSTER}{--}TNT}. *Acta Crystallogr Sect D* **60**: 2210-2221.
- Boge, T., Rémigy, M., Vaudaine, S., Jérôme, T., Bourdet-Sicard, R., y Werf, S. van der (2009) A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. *Vaccine* **27**: 5677-5684.
- Borodovsky, M., y McIninch, J. (1993) Recognition of genes in DNA sequence with ambiguities. *Biosystems* **30**: 161-171.
- Botstein, D. (1980) A theory of modular evolution for bacteriophages. *Ann N Y Acad Sci* **354**: 484-491.
- Bouchard, J.D., y Moineau, S. (2000) Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology* **270**: 65-75.
- Bourand, A., Yebra, M.J., Boël, G., Mazé, A., y Deutschera, J. (2013) Utilization of D-Ribitol by *Lactobacillus casei* BL23 requires a mannose-type phosphotransferase system and three catabolic enzymes. *J Bacteriol* **195**: 2652-2661.
- Breitbart, M., y Rohwer, F. (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* **13**: 278-284.
- Briggiler Marcó, M., Moineau, S., y Quiberoni, A. (2012) Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* **2**: 149-158.
- Broadbent, J.R., Neeno-Eckwall, E.C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., et al. (2008) Analysis of the *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**: 1764-1765.
- Brüssow, H., Canchaya, C., Hardt, W., y Bru, H. (2004) Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens : from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 560-602.
- Brüssow, H., y Kutter, E. (2005) Genomics and evolution of tailed phages. In *Bacteriophages: Biology and Application*. Kutter, E., y Sulakvelidze, A. (eds). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 91-128.
- Bustin, S.A., y Mueller, R. (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci* **109**: 365 LP-379.
- Campanacci, V., Veesler, D., Lichière, J., Blangy, S., Sciara, G., Moineau, S., et al. (2010) Solution and electron microscopy characterization of lactococcal phage baseplates expressed in *Escherichia coli*. *J Struct Biol* **172**: 75-84.
- Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., y Brüssow, H. (2003) Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 238-276.
- Capra, M.L., Binetti, A.G., Mercanti, D.J., Quiberoni, A., y Reinheimer, J.A. (2009) Diversity among *Lactobacillus paracasei* phages isolated from a probiotic dairy product plant. *J Appl Microbiol* **107**: 1350-1357.

-
- Capra, M.L., Mercanti, D.J., Reinhamer, J.A., y Quiberoni, A.L. (2010) Characterization of three temperate phages released from the same *Lactobacillus paracasei* commercial strain. *Int J Dairy Technol* **63**: 396-405.
- Capra, M.L., Mercanti, D.J., Rossetti, L.C., Reinheimer, J.A., y Quiberoni, A. (2011) Isolation and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* bacteriophage-resistant mutants. *J Appl Microbiol* **111**: 371-381.
- Capra, M.L., Patrignani, F., Quiberoni, A.D., Reinheimer, J.A., Lanciotti, R., y Guerzoni, M.E. (2009) Effect of high pressure homogenization on lactic acid bacteria phages and probiotic bacteria phages. *Int Dairy J* **19**: 336-341.
- Capra, M.L., Quiberoni, A., y Reinheimer, J. (2006) Phages of *Lactobacillus casei/paracasei*: Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *J Appl Microbiol* **100**: 334-342.
- Cardarelli, L., Maxwell, K.L., y Davidson, A.R. (2011) Assembly mechanism is the key determinant of the dosage sensitivity of a phage structural protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10168-10173.
- Carter, G.P., Douce, G.R., Govind, R., Howarth, P.M., Mackin, K.E., Spencer, J., et al. (2011) The Anti-Sigma Factor TcdC Modulates Hypervirulence in an Epidemic BI/NAP1/027 Clinical Isolate of *Clostridium difficile*. *PLOS Pathog* **7**: e1002317.
- Chapot-Chartier, M.-P. (2014) Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Front Microbiol* **5**: 66-75.
- Chapot-Chartier, M.P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M.Y., Trieu-Cuot, P., et al. (2010) Cell surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *J Biol Chem* **285**: 10464-10471.
- Chappell, J.D., Prota, A.E., Dermody, T.S., Stehle, T., Barton, E., Connolly, L., et al. (2002) Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO J* **21**: 1-11.
- Chen, C., Ai, L., Zhou, F., Wang, L., Zhang, H., Chen, W., y Guo, B. (2011) Complete genome sequence of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* LC2W. *J Bacteriol* **193**: 3419-20.
- Chopin, M.C., Chopin, A., y Bidnenko, E. (2005) Phage abortive infection in lactococci: Variations on a theme. *Curr Opin Microbiol* **8**: 473-479.
- Claesson, M.J., Sinderen, D. Van, y O'Toole, P.W. (2007) The genus *Lactobacillus* - A genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* **269**: 22-28.
- Collins, B., Bebeacua, C., Mahony, J., Blangy, S., Douillard, F.P., Veessler, D., et al. (2013) Structure and Functional Analysis of the Host Recognition Device of Lactococcal Phage Tuc2009. *J Virol* **87**: 8429-8440.
- Cornelissen, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Blangy, S., Spinelli, S., Casey, E., et al. (2016) The baseplate of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophage Ld17 harbors a glycerophosphodiesterase. *J Biol Chem* **291**: 16816-16827.
- Cresawn, S.G., Bogel, M., Day, N., Jacobs-Sera, D., Hendrix, R.W., y Hatfull, G.F. (2011) Phamerator: a bioinformatic tool for comparative bacteriophage genomics. *BMC Bioinformatics* **12**: 395
- Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., y Salzberg, S.L. (1999) Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res* **27**: 4636-4641.

-
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, E., Palumbo, E., y Hols, P. (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 159-184.
- Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., y Brüssow, H. (2002) Comparative Genomics of Phage and Prophages of Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 73-91.
- Desmyter, A., Farenc, C., Mahony, J., Spinelli, S., Bebeacua, C., Blangy, S., et al. (2013) Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: E1371-1379
- Desmyter, A., Spinelli, S., Roussel, A., y Cambillau, C. (2015) Camelid nanobodies: Killing two birds with one stone. *Curr Opin Struct Biol* **32**: 1-8.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., et al. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**: 1390-1400.
- Deveau, H., Labrie, S.J., Chopin, M.C., y Moineau, S. (2006) Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4338-4346.
- D'Herelle, F. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. 373-375.
- Dieterle, M.E., Jacobs-Sera, D., Russell, D., Hatfull, G., y Piuri, M. (2014) Complete genome sequences of Lactobacillus Phages J-1 and PL-1. *Genome Announc* **2**: e00998-13
- Dieterle, M.E. (2012) Análisis de elementos tipo profagos en *L. casei* BL23 y su relación con el genoma del fago J-1. Disertación tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Dieterle, M.E., Fina Martin, J., Durán, R., Nemirovsky, S.I., Sanchez Rivas, C., Bowman, C., et al. (2016) Characterization of prophages containing "evolved" DIT/Tal modules in the genome of *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 9201-9215.
- Dieterle, M.E., Spinelli, S., Sadovskaya, I., Piuri, M., y Cambillau, C. (2017) Evolved Distal Tail carbohydrate binding modules of *Lactobacillus* phage J-1: A novel type of anti-receptor widespread among Lactic Acid Bacteria phages. *Mol Microbiol* 1-14.
- Djordjevic, G.M., y Klaenhammer, T.R. (1997) Bacteriophage-triggered defense systems: Phage adaptation and design improvements. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4370-4376.
- Douillard, F.P., Ribbera, A., Kant, R., Pietilä, T.E., Järvinen, H.M., Messing, M., et al. (2013) Comparative Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Strain GG. *PLoS Genet* **9**: e1003683.
- Duplessis, M., y Moineau, S. (2001) Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol Microbiol* **41**: 325-336.
- Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., y Josephsen, J. (2004) Identification of *Lactococcus lactis* Genes Required for Bacteriophage Adsorption Identification of *Lactococcus lactis* Genes Required for Bacteriophage Adsorption. *Society* **70**: 5825-5832.
- Dupont, K., Vogensen, F.K., Neve, H., Bresciani, J., y Josephsen, J. (2004) Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5818-5824.
- Dupuy, B., Govind, R., Antunes, A., y Matamouros, S. (2008) *Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC. *J Med Microbiol* **57**: 685-689.
- Durmaz, E., Miller, M.J., Azcarate-Peril, M. a., Toon, S.P., y Klaenhammer, T.R. (2008) Genome Sequence and Characteristics of Lrm1, a Prophage from Industrial *Lactobacillus rhamnosus* Strain M1. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4601-4609.

-
- Echols, H. (1972) Developmental pathways for the temperate phage: lysis vs lysogeny. *Annu Rev Genet* **6**: 157-190.
- Emond, E., y Moineau, S. (2007) Bacteriophages and food fermentations. In *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. McGrath, S., y Sinderen, D. van (eds). Horizon Scientific Press/Caister Academic Press, pp. 9-124.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., y Cowtan, K. (2010) Features and development of {lit Coot}. *Acta Crystallogr Sect D* **66**: 486-501.
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., et al. (2017) Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 1-18.
- Esposito, D., y Scocca, J.J. (1997) The integrase family of tyrosine recombinases: evolution of a conserved active site domain. *Nucleic Acids Res* **25**: 3605-3614.
- FAO/WHO (2006) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. .
- Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., et al. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* **44**: D279-D285.
- Flayhan, A., Vellieux, F.M.D., Lurz, R., Maury, O., Contreras-Martel, C., Girard, E., et al. (2014) Crystal Structure of pb9, the Distal Tail Protein of Bacteriophage T5: a Conserved Structural Motif among All Siphophages. *J Virol* **88**: 820-828.
- Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., et al. (2007) Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J Gastroenterol* **13**: 236-243.
- Forde, A., y Fitzgerald, G.F. (1999) Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19--23 September 1999, Veldhoven, The Netherlands*. Konings, W.N., Kuipers, O.P., y Veld, J.H.J.H. In 't (eds). Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 89-113.
- Francius, G., Alsteens, D., Dupres, V., Lebeer, S., Keersmaecker, S. De, Vanderleyden, J., et al. (2009) Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy. *Nat Protoc* **4**: 939-946.
- Freeman, V.J. (1951) Studies on the virulence of bacteriophage infected strains of *Corynebacterium diptheriae*. *J Bacteriol* **61**: 675-688.
- García, E., Ladero, V., y Suárez, J.E. (2003) Analysis of the morphogenetic cluster and genome of the temperate *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. *Arch Virol* **148**: 1051-1070.
- García, P., Alonso, J., y Suarez, J. (1997) Molecular analysis of the cos region of the *Lactobacillus casei* bacteriophage A2. Gene product 3, gp3, specifically binds to its downstream cos region. *Mol Microbiol* **23**: 505-514.
- García, P., Rodríguez, I., y Suárez, J.E. (2004) A -1 ribosomal frameshift in the transcript that encodes the major head protein of bacteriophage A2 mediates biosynthesis of a second essential component of the capsid. *J Bacteriol* **186**: 1714-1719.
- García-Cayuela, T., Cadiñanos, L.P.G. De, Mohedano, M.L., Palencia, P.F. De, Boden, D., Wells, J., et al. (2012) Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **96**: 171-181.

-
- García-Doval, C., Castón, J.R., Luque, D., Granell, M., Otero, J.M., Llamas-Saiz, A.L., et al. (2015) Structure of the Receptor-Binding Carboxy-Terminal Domain of the Bacteriophage T5 L-Shaped Tail Fibre with and without Its Intra-Molecular Chaperone. *Viruses* **7**: 6424-6440.
- Geller, B.L., Ngo, H.T., Mooney, D.T., Su, P., y Dunn, N. (2005) Lactococcal 936-Species Phage Attachment to Surface of *Lactococcus lactis*. *J Dairy Sci* **88**: 900-907.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., et al. (2001) Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* (80-) **294**: 849-852.
- Gobbetti, M., Cagno, R. Di, y Angelis, M. De (2010) Functional Microorganisms for Functional Food Quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* **50**: 716-727.
- Goulet, A., Lai-Kee-Him, J., Veessler, D., Auzat, I., Robin, G., Shepherd, D.A., et al. (2011) The opening of the SPP1 bacteriophage tail, a prevalent mechanism in Gram-positive-infecting siphophages. *J Biol Chem* **286**: 25397-25405.
- Greene, J.D., y Klaenhammer, T.R. (1994) Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* **60**: 4487-4494.
- Groth, A.C., y Calos, M.P. (2004) Phage integrases: Biology and applications. *J Mol Biol* **335**: 667-678.
- Guglielmotti, D.M., Mercanti, D.J., Reinheimer, J.A., y Quiberoni, A. del L. (2012) Review: Efficiency of physical and chemical treatments on the inactivation of dairy bacteriophages. *Front Microbiol* **2**: 1-11.
- Haaber, J., Moineau, S., Fortier, L.C., y Hammer, K. (2008) AbiV, a novel antiphage abortive infection mechanism on the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Appl Environ Microbiol* **74**: 6528-6537.
- Haard, H.J.W. De, Bezemer, S., Ledebouer, A.M., Müller, W.H., Boender, P.J., Moineau, S., et al. (2005) Llama antibodies against a lactococcal protein located at the tip of the phage tail prevent phage infection. *J Bacteriol* **187**: 4531-4541.
- Habann, M., Leiman, P.G., Vandersteegen, K., Bossche, A. Van den, Lavigne, R., Shneider, M.M., et al. (2014) *Listeria* phage A511, a model for the contractile tail machineries of SPO1-related bacteriophages. *Mol Microbiol* **92**: 84-99.
- Hatfull, G.F. (2015) Dark Matter of the Biosphere: the Amazing World of Bacteriophage Diversity. *J Virol* **89**: 8107-8110.
- Hatfull, G.F., Cresawn, S.G., y Hendrix, R.W. (2008) Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. *Res Microbiol* **159**: 332-339.
- Hatfull, G.F., Jacobs-Sera, D., Lawrence, J.G., Pope, W.H., Russell, D.A., Ko, C.C., et al. (2010) Comparative Genomic Analysis of 60 Mycobacteriophage Genomes: Genome Clustering, Gene Acquisition, and Gene Size. *J Mol Biol* **397**.
- Hendrix, R.W., y Johnson, J.E. (2012) Bacteriophage HK97 Capsid Assembly and Maturation BT - Viral Molecular Machines. In Rossmann, M.G., y Rao, V.B. (eds). Springer US, Boston, MA. pp. 351-363.
- Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford, and G. F. Hatfull. (1999) Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and pro- phages: all the world's a phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**:2192-2197.

- Hino, M., y Ikebe, N. (1965) Lactic acid bacteria employed for beverage production. II. Isolation and some properties of a bacteriophage isolated during the fermentation of lactic acid beverage. *J Chem Soc Jpn* 472-476.
- Hinrichs, J. (2001) Incorporation of whey proteins in cheese. *Int Dairy J* **11**: 495-503.
- Hochwind, K., Weinmaier, T., Schmid, M., Hemert, S. van, Hartmann, A., Rattei, T., y Rothballer, M. (2012) Draft genome sequence of *Lactobacillus casei* W56. *J Bacteriol* **194**: 6638.
- Holm, L., y Rosenström, P. (2010) Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res* **38**: W545-W549.
- Holubová, J., y Josephsen, J. (2007) Potential of AbiS as defence mechanism determined by conductivity measurement. *J Appl Microbiol* **103**: 2382-2391.
- Hudson, K.L., Bartlett, G.J., Diehl, R.C., Agirre, J., Gallagher, T., Kiessling, L.L., and Woolfson, D.N. (2015) Carbohydrate-aromatic interactions in proteins. *J Chem Soc* **137**: 15152-15160.
- Hultberg, A., Tremblay, D.M., Haard, H. de, Verrips, T., Moineau, S., Hammarstrom, L., y Marcotte, H. (2007) Lactobacilli expressing llama VHH fragments neutralise Lactococcus phages. *BMC Biotechnol* **7**:
- Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996) VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graph* **14**: 33-38.
- Hyman, P., y Abedon, S.T. (2010) *Bacteriophage host range and bacterial resistance*. 1.ª ed., Elsevier Inc.
- Ishibashi K, Takesue S, Watanabe K, Oishi K. (1982) Use of lectins to characterize the receptor sites for bacteriophage PL-1 of *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2251-2259.
- Jarvis, A.W. (1984) Differentiation of lactic streptococcal phages into phage species by DNA-DNA homology. *Appl Environ Microbiol* **47**: 343-349.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125-132.
- Kakita, Y., Kashige, N., Murata, K., Kuroiwa, A., Funatsu, M., y K, W. (1995) Inactivation of *Lactobacillus* bacteriophage PL-1 by microwave irradiation. *Microbiol Immunol* **39**: 571-576.
- Kanamaru, S., Leiman, P.G., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Mesyanzhinov, V. V, Arisaka, F., y Rossmann, M.G. (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* **415**: 553-557.
- Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **49**: 209-224.
- Kashige, N., Kakita, Y., Nakashima, Y., Miake, F., y Watanabe, K. (2001) Mechanism of the photocatalytic inactivation of *Lactobacillus casei* phage PL-1 by Titania thin film. *Curr Microbiol* 184-189.
- Kashige, N., Nakashima, Y., Miake, F., y Watanabe, K. (2000) Cloning, sequence analysis, and expression of *Lactobacillus casei* phage PL-1 lysis genes. *Arch Virol* **145**: 1521-1534.
- Kato-kataoka, A., Nishida, K., Takada, M., Kawai, M., Kikuchi-hayakawa, H., Suda, K., et al. (2016) Fermented Milk Containing. **82**: 3649-3658.
- Kenny, J.G., McGrath, S., Fitzgerald, G.F., y Sinderen, D. Van (2004) Bacteriophage Tuc2009 encodes a tail-associated cell wall-degrading activity. *J Bacteriol* **186**: 3480-3491.
- Khosaka, T. (1977) Physicochemical Properties of a Virulent *Lactobacillus* Phage Containing DNA with Cohesive Ends. *J Gen Virol* 209-214.
- Kleerebezem, M., y Hugenholtz, J. (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 232-237.

-
- Kondou, Y., Kitazawa, D., Takeda, S., Tsuchiya, Y., Yamashita, E., Mizuguchi, M., et al. (2005) Structure of the central hub of bacteriophage Mu baseplate determined by X-ray crystallography of gp44. *J Mol Biol* **352**: 976-985.
- Koskella, B., y Brockhurst, M.A. (2014) Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 916-931.
- Krumsiek, J., Arnold, R., y Rattei, T. (2007) Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics* **23**: 1026-1028.
- Krupovic, M., Dutilh, B.E., Adriaenssens, E.M., Wittmann, J., Vogensen, F.K., Sullivan, M.B., et al. (2016) Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch Virol* **161**: 1095-1099.
- Kutter, E., Raya, R.R., y Carlson, K. (2005) Molecular Mechanism of Phage Infection. In *Bacteriophages: Biology and Application*. Kutter, E., y Sulakvelidze, A. (eds). CRC PRESS, Boca Raton, Florida. pp. 165-222.
- la Rosa-Trevín, J.M. de, Otón, J., Marabini, R., Zaldívar, A., Vargas, J., Carazo, J.M., y Sorzano, C.O.S. (2013) Xmipp 3.0: An improved software suite for image processing in electron microscopy. *J Struct Biol* **184**: 321-328.
- Labrie, S.J., y Moineau, S. (2007) Abortive Infection Mechanisms and Prophage Sequences Significantly Influence the Genetic Makeup of Emerging Lytic Lactococcal Phages. *J Bacteriol* **189**: 1482-1487.
- Labrie, S.J., Samson, J.E., y Moineau, S. (2010) Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* **8**: 317-327.
- Lamont, I., Brumby, A.M., y Egan, J.B. (1989) UV induction of coliphage 186: prophage induction as an SOS function. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 5492-5496.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., et al. (2009) Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4154-4159
- Lauwereys, M., Ghahroudi, M.A., Desmyter, A., Kinne, J., Hölzer, W., Genst, E. De, et al. (1998) Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* **17**: 3512-3520.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Francius, G., Schoofs, G., Lambrichts, I., Dufrêne, Y., et al. (2009) Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl Environ Microbiol* **75**: 3554-3563.
- Ledeboer, A.M., Bezemer, S., Haard, J.J.W. de, Schaffers, I.M., Verrips, C.T., Vliet, C. van, et al. (2002) Preventing Phage Lysis of *Lactococcus Lactis* in Cheese Production Using A Neutralizing Heavy-Chain Antibody Fragment from Llama. *J Dairy Sci* **85**: 1376-1382.
- Lenoir, M., Carmen, S. del, Cortes-Perez, N.G., Lozano-Ojalvo, D., Muñoz-Provencio, D., Chain, F., et al. (2016) *Lactobacillus casei* BL23 regulates Treg and Th17 T-cell populations and reduces DMH-associated colorectal cancer. *J Gastroenterol* **51**: 862-873.
- Lepeuplel, A.-S., Gemert, E. Van, y Chapot-Chartier, M.-P. (1998) Analysis of the Bacteriolytic Enzymes of the Autolytic *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Strain AM2 by Renaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Identification of a Prophage-Encoded Enzyme. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4142-4148.
- Lima-Mendez, G., Toussaint, A., y Leplae, R. (2011) A modular view of the bacteriophage genomic space: identification of host and lifestyle marker modules. *Res Microbiol* **162**: 737-746.

-
- Lo, T.C., Shih, T.C., Lin, C.F., Chen, H.W., y Lin, T.H. (2005) Complete genomic sequence of the temperate bacteriophage phiAT3 isolated from *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Virology* **339**: 42-55.
- Long, A., McDaniel, L.D., Mobberley, J., y Paul, J.H. (2008) Comparison of lysogeny (prophage induction) in heterotrophic bacterial and *Synechococcus* populations in the Gulf of Mexico and Mississippi River plume. *ISME J* **2**: 132-144.
- Lortal, S., y Chapot-Chartier, M.P. (2005) Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int dairy J*
- Lunde, M., Aastveit, A.H., Blatny, J.M., y Nes, I.F. (2005) Effects of diverse environmental conditions on phiLC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 721-727.
- Lunde, M., Blatny, J.M., Lillehaug, D., Aastveit, A.H., y Nes, I.F. (2002) Use of real-time quantitative PCR for the analysis of phiLC3 prophage stability in lactococci. *Appl Environ Microbiol* **69**: 41-48.
- Lyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E. V., y Aravind, L. (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**: 11-31.
- Madera, C., Monjardín, C., y Suárez, J.E. (2004) Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of *Lactococcus lactis* bacteriophages in dairies. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7365-7371.
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S., y Sinderen, D. van (2012) Phages of lactic acid bacteria: The role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology* **434**: 143-150.
- Mahony, J., Kot, W., Murphy, J., Ainsworth, S., Neve, H., Hansen, L.H., et al. (2013) Investigation of the relationship between lactococcal host cell wall polysaccharide genotype and 936 phage receptor binding protein phylogeny. *Appl Environ Microbiol* **79**: 4385-4392.
- Mahony, J., McDonnell, B., Casey, E., y Sinderen, D. van (2016) Phage-Host Interactions of Cheese-Making Lactic Acid Bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* **7**:
- Mahony, J., y Sinderen, D. van (2014) Current taxonomy of phages infecting lactic acid bacteria. *Front Microbiol* **5**: 7.
- Mahony, J., y Sinderen, D. van (2015) Novel strategies to prevent or exploit phages in fermentations, insights from phage-host interactions. *Curr Opin Biotechnol* **32**: 8-13.
- Malone L. (2015) Envolturas de *Lactobacillus*: Influencia en la interacción con Bacteriófagos. Disertación tesis de licenciatura. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Marchler-Bauer, A., y Bryant, S.H. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**: W327-W331.
- Marrec, C. Le, Sinderen, D. Van, Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., et al. (1997) Two Groups of bacteriophages Infecting *Streptococcus thermophilus* can be distinguished on the basis of mode of packaging and genetic determinants for major structural proteins. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3246-3253.
- Matamouros, S., England, P., y Dupuy, B. (2007) *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* **64**: 1274-1288.
- Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., et al. (2010) Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol* **192**: 2647-2648.

- Mc Grath, S., Neve, H., Seegers, J.F.M.L., Eijlander, R., Vegge, C.S., Brondsted, L., et al. (2006) Anatomy of a Lactococcal Phage Tail. *J Bacteriol* **188**: 3972-3982.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., y Fitzgerald, G.F. (2007) The New Phage Biology: From Genomics to Applications. In *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Mcgrath, S., y Sinderen, D. van (eds). Caister Academic Press, Poole, United Kingdom.
- McGrath, S., Seegers, J.F.M.L., Fitzgerald, G.F., y Sinderen, D. van (1999) Molecular Characterization of a Phage-Encoded Resistance System in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1891-1899.
- McIntyre, K., Heap, H.A., Davey, G.P., y Limsowtin, G.K.Y. (1991) The distribution of lactococcal bacteriophage in the environment of a cheese manufacturing plant. *Int Dairy J* **1**: 183-197.
- Mercanti, D.J., Carminati, D., Reinheimer, J. a., y Quiberoni, A. (2011) Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *Int J Food Microbiol* **144**: 503-510.
- Mercanti, D.J., Rousseau, G.M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Tremblay, D.M., Labrie, S.J., y Moineau, S. (2015) Genomic diversity of phages infecting probiotic strains of *Lactobacillus paracasei*. *Appl Environ Microbiol* **82**: 95-105.
- Moineau, S., y Lévesque, C. (2005) Control of Bacteriophages in Industrial Fermentation. In *Bacteriophages: Biology and Application*. Kutter Elizabeth, S.A. (ed.). Boca Raton, Florida. pp. 285-296.
- Moineau, S., Pandian, S., y Klaenhammer, T.R. (1994) Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1832-1841.
- Moroni, O., Jean, J., Autret, J., y Fliss, I. (2002) Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *Int dairy J* **12**: 907-913.
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T., y Hinrichs, J. (2005) Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int Dairy J* **63**: 777-784.
- Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M.C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., y Monedero, V. (2012) Functional analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 sortases. *Appl Environ Microbiol* **78**: 8684-8693.
- Murphy, J., Bottacini, F., Mahony, J., Kelleher, P., Neve, H., Zomer, A., et al. (2016) Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages. *Sci Rep* **19**: 21345.
- Nakashima, Y., Ikeda, H., Kakita, Y., Miake, F., y Watanabe, K. (1994) Restriction map of the genomic DNA of *Lactobacillus casei* bacteriophage PL-1 and nucleotide sequence of its cohesive single-stranded ends. *J Gen Virol* **75**: 2537-2541.
- Neve, H., Kemper, U., Geis, A., y Heller, K.J. (1994) Monitoring and characterization of lactococcal bacteriophages in a dairy plant. *Kieler Milchwirtschaft Forschungsberichte* **46**: 167-178.
- Nguyen, V.K., Desmyter, A., y Muyldermans, S. (2001) Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol* **79**: 261-296.
- OECD/FAO (2016) Dairy and dairy productsMarket situation. Paris.
- Otwinowski, Z. (1993) DENZO: oscillation data and reducing program. In Data Collection and Processing. Sawyer, L., Isaacs, N.W., and Bailey, S. (eds). Warrington, UK: SERC Daresbury Laboratory
- O'Sullivan, D.J., Hill, C., y Tod, K. (1993) Effect of Increasing the Copy Number of Bacteriophage Origins of Replication, in trans, on Incoming-Phage Proliferation. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2449-2456.

- Palomino, M.M., Allievi, M.C., Grundling, a., Sanchez-Rivas, C., y Ruzal, S.M. (2013) Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid. *Microbiology* **159**: 2416-2426.
- Pape, T., and Schneider, T.R. (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J Appl Crystallogr* **37**: 853-844.
- Pell, L.G., Kanelis, V., Donaldson, L.W., Howell, P.L., y Davidson, A.R. (2009) The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 4160-4165.
- Peluso, M.R., Peluso, M.R., Winters, T. a, Winters, T. a, Shanahan, M.F., Shanahan, M.F., et al. (2000) Nutrient Interactions and Toxicity. 2333-2342.
- Pfeifer, E., Unnefeld, M., Popa, O., Polen, T., Kohlheyer, D., Baumgart, M., y Frunzke, J. (2016) Silencing of cryptic prophages in *Corynebacterium glutamicum*. *Nucleic Acids Res* **44**: 10117-10131.
- Piuri, M., Jacobs Jr., W.R., y Hatfull, G.F. (2009) Fluoromycobacteriophages for Rapid, Specific, and Sensitive Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **4**: e4870.
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., y Ruzal, S.M. (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes. *J Appl Microbiol* **95**: 372-379.
- Plisson, C., White, H.E., Auzat, I., Zafarani, A., São-José, C., Lhuillier, S., et al. (2007) Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J* **26**: 3720-3728.
- Prevots, F., Mata, M., y Ritzenthaler, P. (1990) Taxonomic differentiation of 101 lactococcal bacteriophages and characterization of bacteriophages with unusually large genomes. *Appl Environ Microbiol* **56**: 2180-2185.
- Pujato, S.A., Guglielmotti, D.M., Ackermann, H.-W., Patrignani, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J.A., y Quiberoni, A. (2014) *Leuconostoc* bacteriophages from blue cheese manufacture: long-term survival, resistance to thermal treatments, high pressure homogenization and chemical biocides of industrial application. *Int J Food Microbiol* **177**: 81-88.
- Quiberoni, A., Guglielmotti, D.M., y Reinheimer, J.A. (2003) Inactivation of *Lactobacillus delbrueckii* bacteriophages by heat and biocides. *Int J Food Microbiol* **84**: 51-62.
- Raaij, M.J. van, Schoehn, G., Burda, M.R., y Miller, S. (2001) Crystal structure of a heat and protease-stable part of the bacteriophage T4 short tail fibre. *J Mol Biol* **314**: 1137-1146.
- Räisänen, L., Draing, C., Pfitzenmaier, M., Schubert, K., Jaakonsaari, T., Aulock, S. Von, et al. (2007) Molecular interaction between lipoteichoic acids and *Lactobacillus delbrueckii* phages depends on D-alanyl and ??-glucose substitution of poly(glycerophosphate) backbones. *J Bacteriol* **189**: 4135-4140.
- Räisänen, L., Schubert, K., Jaakonsaari, T., y Alatosava, T. (2004) Characterization of lipoteichoic acids as *Lactobacillus delbrueckii* phage receptor components. *J Bacteriol* **186**: 5529-5532.
- Ray, B. (2004) *Fundamental Food Microbiology*. 3.ª ed., CRC PRESS, Boca Ratón Florida.
- Raya, R.R., y H'bert, E.M. (2009) Isolation of Phage via Induction of Lysogens. In *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. Clokie, M.R.J., y Kropinski, A.M. (eds). Humana Press, Totowa, NJ. pp. 23-32.

- Raya, R.R., Klaenhammer, T.R., Scienc, F., y Daiuy, S. (1989) Characterization of the temperate bacteriophage phiadh and plasmid transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADH. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2206-2213.
- Remus, D.M., Kranenburg, R. van, Swam, I.I. van, Taverne, N., Bongers, R.S., Wels, M., et al. (2012) Impact of 4 *Lactobacillus plantarum* capsular polysaccharide clusters on surface glycan composition and host cell signaling. *Microb Cell Fact* **11**: 149.
- Revilla-Guarinos, A., Gebhard, S., Alcántara, C., Staroń, A., Mascher, T., y Zúñiga, M. (2013) Characterization of a regulatory network of peptide antibiotic detoxification modules in *Lactobacillus casei* BL23. *Appl Environ Microbiol* **79**: 3160-3170.
- Rizzardini, G., Eskesen, D., Calder, P.C., Capetti, A., Jespersen, L., y Clerici, M. (2012) Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12® and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. *casei* 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* **107**: 876-84.
- Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J.-J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., y Langella, P. (2007) Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* **6**: 22.
- Rodríguez, I., García, P., y Suárez, J.E. (2005) A second case of -1 ribosomal frameshifting affecting a major virion protein of the *Lactobacillus* bacteriophage A2. *J Bacteriol* **187**: 8201-8204.
- Rousseau, G.M., y Moineau, S. (2009) Evolution of *Lactococcus lactis* phages within a cheese factory. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5336-5344.
- Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., et al. (2005) The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17472-17477.
- Salmond, G.P.C., y Fineran, P.C. (2015) A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* **13**: 777-86.
- Samson, J.E., y Moineau, S. (2013) Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annu Rev Food Sci Technol* **4**: 347-368.
- Scheres, S.H.W., Nunez-Ramirez, R., Sorzano, C.O.S., Carazo, J.M., y Marabini, R. (2008) Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP. *Nat Protoc* **3**: 977-990.
- Schnos, M., Zahn, K., Blattner, F.R., y Inman, R.B. (1989) DNA looping induced by bacteriophage λ O protein: Implications for formation of higher order structures at the *gl* origin of replication. *Virology* **168**: 370-377.
- Schrödinger, LLC (2015) The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.8.
- Sciara, G., Bebeacua, C., Bron, P., Tremblay, D., Ortiz-Lombardia, M., Lichière, J., et al. (2010) Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6852-6857.
- Sechaud, L., Cluzel, P., Rousseau, M., Baumgartner, A., Accolas, J., Laiti, M., et al. (1988) Bacteriophages of *Lactobacilli*. **70**: 401-410.
- Seegers, J.F.M.L., Mc Grath, S., O'Connell-Motherway, M., Arendt, E.K., Guchte, M. van de, Creaven, M., et al. (2004) Molecular and transcriptional analysis of the temperate lactococcal bacteriophage Tuc2009. *Virology* **329**: 40-52.

- Sheldrick, G.M. (2008) A short history of SHELX. *Acta Crystallogr A* **64**: 112-122.
- Shepherd, D.A., Veessler, D., Lichiere, J., Ashcroft, A.E., y Cambillau, C. (2011) Unraveling Lactococcal Phage Baseplate Assembly by Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **10**: M111.009787.
- Shimizu Kadota, M., Sakurai, T., y Tsuchida, N. (1983) Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. *Appl Environ Microbiol* **45**: 669-674.
- Shoseyov, O., Shani, Z., y Levy, I. (2006) Carbohydrate Binding Modules: Biochemical Properties and Novel Applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 283-295.
- Smith, M.C.M., y Thorpe, H.M. (2002) Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* **44**: 299-307.
- Söding, J., Biegert, A., y Lupas, A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**: W244-W248.
- Sorzano, C.O.S., Marabini, R., Velázquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J.R., Scheres, S.H.W., Carazo, J.M., y Pascual-Montano, A. (2004) XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* **148**: 194-204.
- Sozhamannan, S., Chute, M.D., McAfee, F.D., Fouts, D.E., Akmal, A., Galloway, D.R., et al. (2006) The *Bacillus anthracis* chromosome contains four conserved, excision-proficient, putative prophages. *BMC Microbiol* **6**: 34.
- Spinelli, S., Bebeacua, C., Orlov, I., Tremblay, D., Klaholz, B.P., Moineau, S., y Cambillau, C. (2014) Cryo-electron microscopy structure of lactococcal siphophage 1358 virion. *J Virol* **88**: 8900-8910.
- Spinelli, S., Desmyter, A., Verrips, C.T., Haard, H.J.W. de, Moineau, S., y Cambillau, C. (2006) Lactococcal bacteriophage p2 receptor-binding protein structure suggests a common ancestor gene with bacterial and mammalian viruses. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 85-89.
- Stackebrandt, E., y Teuber, M. (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 317-324.
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., y McAuliffe, O. (2016) Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiol* **61**: 33-49.
- Stetter, K.O. (1977) Evidence for frequent lysogeny in lactobacilli: temperate bacteriophages within the subgenus *Streptobacterium*. *J Virol* **24**: 685-689.
- Stockdale, S.R., Collins, B., Spinelli, S., Douillard, F.P., Mahony, J., Cambillau, C., y Sinderen, D. van (2015) Structure and Assembly of TP901-1 Virion Unveiled by Mutagenesis. *PLoS One* **10**: e0131676.
- Sturino, J.M., y Klaenhammer, T.R. (2002) Expression of Antisense RNA Targeted against. *Appl Environ Microbiol* **68**: 588-596.
- Sturino, J.M., y Klaenhammer, T.R. (2004) Antisense RNA Targeting of Primase Interferes with Bacteriophage Replication in *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1735-1743.
- Sturino, J.M., y Klaenhammer, T.R. (2006) Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol* **4**: 395-404 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16715051>.
- Sturino, J.M., y Klaenhammer, T.R. (2007) Inhibition of bacteriophage replication in *Streptococcus thermophilus* by subunit poisoning of primase. *Microbiology* **153**: 3295-3302.
- Suarez, V.B., Capra, M.L., Rivera, M., y Reinhamer, J.A. (2007) Inactivation of Calcium-Dependent Lactic Acid Bacteria Phages by Phosphates. *J Food Prot* **70**: 1518-1522.

- Sun, X., Göhler, A., Heller, K.J., y Neve, H. (2006) The ltp gene of temperate *Streptococcus thermophilus* phage TP-J34 confers superinfection exclusion to *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Virology* **350**: 146-157.
- Sun, Z., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimón, S., Zhang, W., et al. (2015) Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nat Commun* **6**: 8322.
- Szczepankowska, A.K., Gorecki, R.K., Koakowski, P., y Bardowski, J.K. (2013) Lactic Acid Bacteria Resistance to Bacteriophage and Prevention Techniques to Lower Phage Contamination in Dairy Fermentation. In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology «Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes»*. Kongo, M. (ed.).
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Thunell, R.K., y Sandine, W.E. (1985) Types of starter cultures. In *Bacterial starter cultures for foods*. Boca Raton USA: CRC Press, pp. 127-144.
- Tremblay, D.M., Desmyter, A., Labrie, S., Moineau, S., y Cambillau, C. (2006) Receptor-Binding Protein of *Lactococcus lactis* Phages: Identification and Characterization of the Saccharide Receptor-Binding Site. **188**: 2400-2410.
- Tuohimaa, A., Riipinen, K.A., Brandt, K., y Alatossava, T. (2006) The genome of the virulent phage Lc-Nu of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*, and comparative genomics with *Lactobacillus casei* phages. *Arch Virol* **151**: 947-965.
- Twort, F.W. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet* **186**: 1241-1243.
- Unger, T., Jacobovitch, Y., Dantes, A., Bernheim, R., y Peleg, Y. (2010) Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *J Struct Biol* **172**: 34-44.
- Vagin, A., y Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement 832 with MOLREP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 833 22-25.
- Valyasevi, R., Sandine, W.E., y Geller, B.L. (1991) A membrane protein is required for bacteriophage c2 infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. **173**: 6095-6100.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., Vos, P. de, Kersters, K., y Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**: 407-438.
- Vasu, K., y Nagaraja, V. (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**: 53-72 <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3591985&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Veesler, D., y Cambillau, C. (2011) A common evolutionary origin for tailed-bacteriophage functional modules and bacterial machineries. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 423-433
- Veesler, D., Dreier, B., Blangy, S., Lichièrè, J., Tremblay, D., Moineau, S., et al. (2009) Crystal structure and function of a DARPIn neutralizing inhibitor of lactococcal phage TP901-1. Comparison of DARPIn and camelid VHH binding mode. *J Biol Chem* **284**: 30718-30726.

-
- Veesler, D., Spinelli, S., Mahony, J., Lichière, J., Blangy, S., Bricogne, G., et al. (2012) Structure of the phage TP901-1 1.8 MDa baseplate suggests an alternative host adhesion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 8954-8.
- Vegge, C.S., Brøndsted, L., Neve, H., McGrath, S., Sinderen, D. Van, y Vogensen, F.K. (2005) Structural characterization and assembly of the distal tail structure of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol* **187**: 4187-4197.
- Vegge, C.S., Vogensen, F.K., Mc Grath, S., Neve, H., Sinderen, D. Van, y Brøndsted, L. (2006) Identification of the lower baseplate protein as the antireceptor of the temperate lactococcal bacteriophages TP901-1 and Tuc2009. *J Bacteriol* **188**: 55-63.
- Ventura, M., Canchaya, C., Pridmore, R.D., y Brüssow, H. (2004) The prophages of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533: comparative genomics and transcription analysis. *Virology* **320**: 229-242
- Ventura, M., Ventura, M., Canchaya, C., Canchaya, C., Bernini, V., Bernini, V., et al. (2006) Comparative Genomics and Transcriptional Analysis of Prophages Identified in the Genomes of. *Society* **72**: 3130-3146.
- Verreault, D., Gendron, L., Rousseau, G.M., Veillette, M., Massé, D., Lindsley, W.G., et al. (2011) Detection of airborne lactococcal bacteriophages in cheese manufacturing plants. *Appl Environ Microbiol* **77**: 491-497.
- Villion, M., y Moineau, S. (2009) Bacteriophages of *Lactobacillus*. *Front Biosci* **14**: 1661-1683.
- Vinga, I., Baptista, C., Auzat, I., Petipas, I., Lurz, R., Tavares, P., et al. (2012) Role of bacteriophage SPP1 tail spike protein gp21 on host cell receptor binding and trigger of phage DNA ejection. *Mol Microbiol* **83**: 289-303.
- Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Grard, T., y Chapot-Chartier, M.-P. (2016) Structural studies of the rhamnose-rich cell wall polysaccharide of *Lactobacillus casei* BL23. *Carbohydr Res* **435**: 156-161.
- Viscardi, M., Capparelli, R., Matteo, R. Di, Carminati, D., Giraffa, G., y Iannelli, D. (2003) Selection of bacteriophage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*. *J Microbiol Methods* **55**: 109-119.
- Vrese, M. de, y Marteau, P.R. (2007) Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr* **137**: 803S-811S .
- Waldor, M., y Mekalanos, J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science (80-)* **272**: 1910-1914
- Watanabe, K., Ishibashi, K., Nakashima, Y., y Sakurai, T. (1984) A Phage-resistant Mutant of *Lactobacillus casei* which Permits Phage Adsorption but Not Genome Injection. *J Gen Virol* **65**: 981-986.
- Watanabe, K., Kakita, Y., Nakashima, Y., y Miake, F. (1995) Involvement of host cell energy in the transfection of *Lactobacillus casei* protoplasts with phage PL-1 DNA. *Curr Microbiol* 39-43.
- Watanabe, K., Takesue, S., Ishibashi, K., Iwamoto, T., y Kondo, T. (1982) Fine structure of PL-1 phage active against *Lactobacillus casei*. *J Gen Microbiol* 1-6.
- Watanabe, K., Takesue, S., Jin-Nai, K., y Yoshikawa, T. (1970) Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Appl Microbiol* **20**: 409-415.
- Watanabe K, Kakita Y, Nakashima Y, S.T. (1990) Protoplast transfection of *Lactobacillus casei* by phage PL-1 DNA. *Agric Biol Chem* 937-941.
- Watanabe K, Takesue S, I.K. (1977) Reversibility of the adsorption of bacteriophage PL-1 to the cell walls isolated from *Lactobacillus casei*. *J Gen Virol* **34**: 189-194.

-
- Webb, B., y Sali, A. (2014) Protein Structure Modeling with MODELLER BT - Protein Structure Prediction. In Kihara, D. (ed.). Springer New York, New York, NY. pp. 1-15.
- Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 127-181.
- Weitz, J.S., Poisot, T., Meyer, J.R., Flores, C.O., Valverde, S., Sullivan, M.B., y Hochberg, M.E. (2017) Phage-bacteria infection networks. *Trends Microbiol* **21**: 82-91.
- Whitehead, H.R., y Cox, G.A. (1936) Bacteriophage Phenomena in Cultures of Lactic Streptococci. *J Dairy Res* **7**: 55-62.
- Xu, J., Hendrix, R.W., y Duda, R.L. (2004) Conserved translational frameshift in dsDNA bacteriophage tail assembly genes. *Mol Cell* **16**: 11-21.
- Yasuda, E., Serata, M., y Sako, T. (2008) Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4746-4755.
- Yasuda, E., Tateno, H., Hirabarashi, J., Iino, T., y Sako, T. (2011) Lectin microarray reveals binding profiles of *Lactobacillus casei* strains in a comprehensive analysis of bacterial cell wall polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4539-4546.
- Yokokura T. (1971) Phage receptor material in *Lactobacillus casei* cell wall. I. Effect of L-rhamnose on phage adsorption to the cell wall. *Jpn. J. Microbiol.* **15**:457-463.
- Yokokura T. (1977) Phage receptor material in *Lactobacillus casei*. *J. Gen. Microbiol.* **100**:139-145.
- Yokokura, T., Kodaira, S., Ishiwa, H., y Sakurai, T. (1974) Lysogeny in lactobacilli. *J Gen Microbiol* **84**: 277-84 .
- Young, R., Wang, I.-N., y Roof, W.D. (2000) Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* **8**: 120-128.
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K.H., Dennis, J.J., y Wishart, D.S. (2011) PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Res* **39**: W347-W352.