

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica



Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Desarrollo de herramientas para la manipulación genética de *Lactobacillus casei* y sus bacteriófagos

Autor: Fabio Zon

Directora: Dra. Mariana Piuri

Laboratorio de Bacteriófagos y aplicaciones biotecnológicas.

Departamento de Química Biológica.

FCEyN, UBA

Julio 2019

Índice

Agradecimientos	4
Resumen.....	7
Abstract	8
Introducción	10
Bacterias ácido lácticas	10
Las bacterias ácido lácticas y su empleo en la elaboración de alimentos	11
<i>Lactobacillus casei</i>	11
Bacteriófagos.....	13
Bacteriófagos de BALs	15
Bacteriófagos de <i>Lactobacillus casei</i>	16
El bacteriófago J-1	17
Recombineering	18
BRED (<i>Bacterial Recombineering of Electroporated DNA</i>)	20
Hipótesis y objetivos	22
Materiales y métodos	23
1. Cepas y fagos empleados	23
2. Medios de cultivo y métodos de crecimiento	23
3. Técnicas en microbiología	23
3.1 Preparación de electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	23
3.2 Preparación de electrocompetentes de <i>Lactobacillus casei</i>	24
3.3 Protocolo de electroporación para <i>E. coli</i> y <i>L. casei</i>	24
3.4 Protocolo base de preparación de protoplastos de <i>Lactobacillus casei</i> BL23	24
3.5 Obtención de stocks de alto título de J1 en medio líquido	25
3.6 Titulación en placa	25
3.7 Spot test	26
3.8 Ensayo de centros infecciosos.....	26
3.9 Microscopía de epifluorescencia y ajustes de imagen	27
4. Técnicas moleculares	27
4.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	27
4.2 Aislamiento de ADN de fago	27
4.3 Aislamiento de ADN cromosómico de <i>Lactobacillus</i>	28
4.4 Oligonucleótidos utilizados como <i>primers</i>	29
4.4 Plásmidos utilizados	29
4.5 Cuantificación del ADN.....	30
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30

4.7 Geles de agarosa	31
4.8 Digestión con enzimas de restricción.....	31
4.9 Recuperación y purificación de amplicones desde geles de agarosa	32
4.10 Protocolo de ligación.....	32
4.11 Microscopía electrónica de transmisión	33
4.12 Análisis de secuencias	33
ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES	34
Resultados.....	35
Capítulo 1: producción y transformación de protoplastos con DNA viral	35
Capítulo 1.1: Optimización del protocolo de preparación de protoplastos.....	35
Capítulo 1.2: transfección con el DNA de J-1	37
Capítulo 1.3: transfección con el DNA de un bacteriófago novedoso.	39
Capítulo 2: clonado de los genes de <i>recombineering</i> en un vector inducible de <i>Lactobacillus casei</i>	41
Capítulo 2.1: análisis del vector a utilizar, diseño de primers y clonado virtual	41
Capítulo 2.2: Amplificación de los genes de <i>recombineering</i>	44
Capítulo 2.3: Procesamiento de pMSP3535 y del amplicón de genes de <i>recombineering</i> . 45	
Capítulo 2.4: Transformación de <i>E. coli</i> competentes y observación de los productos de ligado.	46
Capítulo 2.5: Evaluación de la presencia de los genes de <i>recombineering</i>	48
Capítulo 3: clonado del gen <i>mrfp</i> en un vector de expresión inducible en <i>Lactobacillus casei</i>	50
Capítulo 3.1: Caracterización del gen <i>mrfp</i> de la proteína mCherry desde el pTLGR y clonado virtual en el vector pMSP3535.	50
Capítulo 3.2: Amplificación del gen <i>mrfp</i> mediante PCR.	52
Capítulo 3.3: Clonado del gen <i>mrfp</i> en pMSP3535.	52
Capítulo 3.4: Transformación de <i>L. casei</i> BL23 con el plásmido pMSP3535R.....	55
Capítulo 3.5: Expresión inducida de mCherry en <i>L. casei</i> BL23.....	55
Discusión	57
Bibliografía	63

Agradecimientos

Completar una carrera de 7 años no es una tarea sencilla. Si bien el título estará a mi nombre, me gustaría que quede asentado en algún lugar que de ninguna manera me corresponde a mí sólo. Que, sin la ayuda, compañía, aliento, comprensión, amor y paciencia (sobre todo paciencia) de un montón de personas, jamás podría haber llegado a obtenerlo. Me parece que este es un buen lugar para dar las gracias.

Agradezco todos los docentes que tuve a lo largo de la carrera. Sea por su pasión o por la ausencia total de la misma, me enseñaron no sólo contenidos que van desde lo fascinante hasta lo que olvidé al instante posterior de rendir, sino también valores, metodologías de trabajo y cosmovisiones. Algunos fueron ejemplos a seguir. Otros, lamentablemente por ellos/por suerte para mí, marcaron caminos que definitivamente quiero evitar.

Agradezco a Mariana, mi directora, que comenzó siendo una maravillosa docente (categoría ejemplos a seguir) y, afortunadamente, se convirtió más tarde en quien me introduciría a la labor que es la investigación científica. Le agradezco su profunda paciencia (de la cual necesitó mucha), su sincera emoción al obtener resultados positivos y su comprensiva respuesta al encontrar negativos. Entre tantas historias de terror que uno escucha de directores, no podría estar más feliz con quién me guió en este camino. Queda demás decir que, sin ella, este trabajo no hubiera sido posible.

Agradezco a mis compañeras de laboratorio, que no sólo me enseñaron una cantidad abismal de cosas, sino que me hicieron sentir parte del equipo desde el primer día. Me trataron con calidez, comprensión y paciencia. A Euge, cuyo trabajo y prolijidad me ayudaron, aunque no hayamos compartido ni un día de mesada. A Lili, nuestro ángel colombiano, por recibirme con brazos abiertos y explicarle a un obsesivo temeroso como yo cómo manejarme correctamente con los fagos, amplificarlos y manipular la ultracentrífuga (que aún me da miedo); siempre con constante alegría. A Estefi, bastión de la sabiduría, la cordura y la productividad, por cada palabra que salió de su boca. Por todas las veces que interrumpió lo que hacía para darme una mano, para explicarme o para ponerle el freno a mis dudas, miedos e inseguridades. A Feli, que desde su presencia itinerante no dejó de compartir sus conocimientos y fue la mano invisible que mantuvo el laboratorio andando sin palos en las ruedas. A Flor, mi hermana mayor por elección. Mi compañera canichín. Mi maestra en la mesada y cómplice de delirios en todo lo demás. Hizo que ir al laboratorio todos los días pareciera más una diversión que un deber. Realmente gracias.

Agradezco a todo el plantel asociado. A Sandra por su inabarcable y preciso conocimiento. A Mer por su calidez. A Marianita por su energía, su fuerza y por haber sido mi bastón cuando vacilaba entre bacilos. A Joaqui por ser compañera TOC, por sus lecciones de “cultura de higiene y seguridad”, por enseñarme y compartir y por ser la reina del dígalos con mímica. A ~~leherdi~~ Jordi por ser un personaje maravilloso en absolutamente todo sentido. A Chelo, que detrás de su aparente timidez esconde una personalidad sorprendente.

Agradezco a las grandes amistades que formé durante la carrera. Coursadas de 13hs, sesiones de traspase de estudio y horas interminables de biblioteca. También salidas, comidas, importantísimas charlas escatológicas y abundantes carcajadas. Ah, y mucho mucho *glitter*. Ana, Meli, Gala, Vale, Vale, Belu, Belu, Errepé, Flor, Gise y Marianita. A todas, gracias.

Agradezco a Rulo y a Calvo. Están de la croqueta, de eso no hay duda, pero sin ellos la última mitad de la carrera hubiera sido imposible y un completo bodrio.

Antes de entrar en la parte más melosa, hago una pausa para agradecer a mi psicólogo, Ariel. En una época tumultuosa de la vida como es esta, me ayudó a determinarme como persona, a tomar las riendas de mi vida, a dejar atrás miedos, inseguridades y prejuicios. A disfrutar más de la vida.

Agradezco al loquero portátil que son Les Herederos del Gil de Newton. Desde velorios hasta vacaciones, pasando por corazones rotos y quemaduras de segundo grado, estuvieron siempre presentes. A veces pienso que fueron lo único que me permitió sobrellevar la intensidad de esta maratón académica. A Cicu, el mejor robot. A Santi, la persona más divertida y desequilibrada que conozco. A Tincho, el mejor compinche para cualquier actividad, a cualquier hora, en cualquier lado y a cualquier temperatura. A Fripis, mi dictadora preferida. A Tami, la perfecta combinación entre acidez y ternura. A Cluri, la persona más suave del universo. A Agustinita, la mitad indispensable de la mejor persona. A KQ, la hermanita peleadora que conseguí a los 19 años y de la que aún no me despegué. A Luli, mi compañera de alegrías y tristezas, comidas y aventuras, quejas, quejas y quejas... y perritos, siempre perritos. Desde lo más profundo de mi ser, gracias.

Agradezco a mis amigos del secundario que, a esta altura, fueron todos más o menos adoptados por mis padres. A Juanete, un hermano entre hermanos, con el humor más hermosamente horrible que tuve el gusto de presenciar. A Nadu, mi mejor amiga hace 10 años, que con leer esto debe estar feliz. A mis soperas: Mechi, vecina y compañera de paseos, meriendas y resfríos. Agus, luminaria intergaláctica, conversadora de dinosaurios y dialogadora de pieles. A Clara, en quien conviven a la vez una sabiduría y empatía inalcanzables y una niña

de 4 años. Más de una década a su lado no deja más que una cantidad interminable de buenos recuerdos.

Agradezco tener a dos personas con quienes hace más de 20 años nos elegimos para atravesar esta vida juntos.

A Migue, mi hermano. Ni adoptivo, ni de mentiritas, ni nada. Clases, viajes, sueños, miedos, preguntas, juegos, arte y todo lo que lo rodea y está en el medio construyeron un vínculo inquebrantable. Eternas llamadas telefónicas, horas jugando videojuegos, debates filosóficos y composiciones musicales. Por estar siempre, por acompañar siempre. Por todo lo que puse y mucho más, gracias.

A Fei, que está más cerca de ser mi marido que cualquier otra cosa. Presencia eterna. Por desentramar conmigo la existencia. Por debatir todo hasta el último instante. Por la comprensión hasta en los silencios. Por viajar al otro lado del mundo. Por estar acá, aunque esté en la otra punta del planeta. Gracias.

Agradezco a mi abuela Elena, la persona que me dio el amor más grande y sincero que recibí en toda mi vida. Ejemplo de integridad, alegría y resiliencia. Siempre cuidando a todos, alimentando a todos, pensando siempre en el otro. Ella es parte de mi identidad, quizás la mejor parte de la misma. Aunque no esté aquí hoy, no me soltó la mano ni un minuto. Abuela, muchas muchas gracias.

Agradezco, finalmente, a mis papás: Eduardo Marcos Zon y María Ruth Nasielski. No me permitiría entregar este trabajo sin colocar en algún lugar sus nombres, ya que sin ellos ni me hubiera soñado capaz de completar tal tarea. Por su amor absolutamente incondicional, su presencia indudable, su apoyo indiscutido en todo lo que decidí hacer desde el día en que nací y su paciencia casi incomprensible. Por bancarme en todo siempre, desde lo emocional hasta lo material. Por darme la vida y guiarme en ella, gracias.

Resumen

Los bacteriófagos son las entidades biológicas más abundantes que se conocen con un número estimado de 10^{31} . Los bacteriófagos que infectan bacterias ácido lácticas (BAL) se asocian de manera casi inmediata con sus efectos deletéreos en la industria láctea. Sin embargo, debido a la alta eficiencia con que infectan a sus hospedadores, también pueden verse como una excelente alternativa para el *delivery* de ADN en estos microorganismos.

En los últimos años los fagos que infectan *Lactobacillus casei* han comenzado a cobrar relevancia ya que varias de sus cepas son probióticas y se utilizan como parte de formulaciones comerciales, como Yakult® o Actimel®. Por lo tanto, estas bacterias tienen un alto valor económico y son muy difíciles de reemplazar en la industria.

Tanto para el estudio de la biología general de los fagos como para su empleo como herramientas, la manipulación genética de estas entidades es un paso esencial. Aún hoy las herramientas genéticas que permiten la modificación o ingeniería de fagos son escasas, sobre todo en el caso de fagos que infectan *Lactobacillus* donde aún no han sido reportadas en bibliografía.

Una de las tecnologías que se emplea actualmente para la manipulación de fagos es BRED (*Bacteriophage recombineering of electroporated DNA*). En esta técnica el ADN del fago es introducido por electroporación en la bacteria junto a un sustrato de intercambio alélico. En presencia de proteínas (que también provienen de bacteriófagos y promueven una eficiente recombinación empleando regiones cortas de homología), se produce una recombinación homóloga en el genoma de los fagos. Luego de un posterior cribado de la progenie viral resultante es posible identificar y purificar el fago mutante.

Sin embargo, los Lactobacilos son bacterias que incorporan grandes moléculas de ADN de manera deficiente por electroporación y por ese motivo en este trabajo de tesis como primer paso se puso a punto un protocolo que permitió transformar protoplastos (bacterias deficientes de pared celular) de *L. casei* BL23 con ADN del bacteriófago J-1 y recuperar partículas virales infectivas de manera eficaz.

Tomando como base una publicación de Xin et al. (2017), se intentó construir un vector inducible que exprese las funciones de *recombineering* codificadas en el genoma de un profago de *L. casei* BL23, el profago PLE3, descrito previamente en nuestro laboratorio.

Finalmente, para demostrar la funcionalidad en *L. casei* BL23 del vector empleado, se clonó el gen que codifica para una versión de la proteína fluorescente mCherry que posee codones optimizados para su expresión en BAL y tolera pH ácido. Con esta construcción se evaluó la

expresión del sistema en presencia de concentraciones subletales del inductor, la nisina (una bacteriocina).

Los resultados aquí presentados son el punto de partida para el desarrollo de nuevas herramientas que permitan la ingeniería de bacteriófagos que infectan *Lactobacillus* y otras BAL.

Abstract

Bacteriophages are the most abundant biological entities, with an estimated number of 10^{31} . Bacteriophages that infect lactic acid bacteria (LAB) are typically associated with their deleterious effect on the dairy industry. Nevertheless, due to the high efficiency with which they infect their hosts, they can also be used as an alternative for delivery of DNA into these organisms.

In recent years, phages that infect *Lactobacillus casei* have gained increased relevance due to the widespread use of some strains in probiotic foods, such as Yakult or Actimel. Thus, these bacteria have a substantial economic importance and are difficult to replace in the dairy industry.

Still today, genetic tools that allow engineering or modification of phage genomes are scarce, more so of phages that infect the *Lactobacillus* genus, of which there are none reported yet. Genetic manipulation of these phages is not only the starting point for their study but also for developing derived tools for bacterial engineering.

BRED (*Bacteriophage recombineering of electroporated DNA*) is one of the techniques that is currently used to manipulate phage DNA. BRED relies on using electroporation to introduce the phage's DNA alongside an allelic exchange substrate into the bacteria. In the presence of certain proteins (also phage-derived and that enable an efficient recombination using short homology regions) homologous recombination with the desired target in the phage genome occurs. After screening the resulting phage progeny, it is possible to identify and purify the newly made mutant phage.

At the same time, Lactobacilli are particularly well known for their deficient uptake of large DNA molecules by electroporation. For this reason, the first step in this work was to fine-tune a protocol that allowed us to obtain *L. casei* BL23 protoplasts (cell wall deficient bacteria) and transfect them with bacteriophage J-1 DNA to efficiently obtain infective viral particles.

Furthermore, based on a publication by Xin et al. (2017), we tried to assemble an inducible vector expressing the *recombineering* functions carried by prophage PLE3, a prophage embedded in *L. casei* BL23's genome which was previously characterized in our laboratory.

Finally, to demonstrate this vector's functionality in *L. casei* BL23, a version of the mCherry fluorescent protein was cloned and expressed. This *mCherry* gene has been codon optimized for LAB and can fold and develop a fluorescent signal in acidic environments. This was later used to test the system's expression using sublethal concentrations of its inducer, nisin (a bacteriocin).

The results presented in this work are a starting point for the development of novel tools that will enable genetic engineering of *Lactobacillus* and other LAB phages.

Introducción

Bacterias ácido lácticas

El concepto de las bacterias del ácido láctico (BAL) surgió al principio del siglo XX, siendo descritas por primera vez por Joseph Lister en 1873 como *Bacterium lactis*. Las BAL son bacterias Gram (+), generalmente acidófilas, no esporoformadoras, catalasa-negativas y carentes de citocromos. Son organismos anaerobios aerotolerantes estrictamente fermentativos siendo el ácido láctico el producto final de mayor abundancia durante la fermentación de carbohidratos, aunque pueden surgir excepciones (Liu, Pang, Zhang, & Cai, 2014).

Las BAL pueden tener morfologías tanto de cocos como de bacilo y comprenden los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Enterococcus* (Vandamme et al., 1996). Se caracterizan, a su vez, por su deficiencia de proteínas que se encuentran involucrados en varias rutas de biosíntesis para componentes esenciales. Debido a esta limitante, las BAL se consideran auxótrofas para ciertos compuestos esenciales para su crecimiento y suelen encontrarse en ambientes ricos en aminoácidos, purinas y pirimidinas (Wyszyńska, Kobierecka, Bardowski, & Jagusztyn-Krynica, 2015). Analizando su diversidad metabólica de hidratos de carbono, las BAL incluyen bacterias homofermentativas, cuyo único producto de la fermentación es el ácido láctico, y heterofermentativas, que además de este compuesto liberan otros productos secundarios como el ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Kleerebezem & Hugenholtz, 2003) (Kandler, 1983).

Las BAL fueron originalmente caracterizadas por sus características morfológicas y fisiológicas. A partir de la llegada de herramientas moleculares que permitieron la secuenciación del ARN ribosomal 16s, varias de esas categorías se fueron redefiniendo. A partir de estos estudios se obtuvieron evidencias que mostraban que las similitudes que estas bacterias poseían se daban también a nivel filogenético (Stackebrandt & Teuber, 1988).

Distintas asociaciones internacionales como la FDA (*Food and drugs administration*) de Estados Unidos y la EFSA (*European Food Safety Authority*) le conceden a gran parte de estas bacterias el status conocido como GRAS (*generally recongnized as safe*), que avala su uso tanto en áreas alimenticias como de salud. Evidentemente, las BAL presentan características que resultan interesantes a niveles mayores que el molecular.

Las bacterias ácido lácticas y su empleo en la elaboración de alimentos

Las BAL tienen una relevancia social que trasciende el ámbito científico. Estas bacterias son una parte fundamental de la microbiota humana, son empleadas ampliamente en cultivos iniciadores en la industria láctea, en la fermentación del pan de masa madre, vegetales (sauerkraut, pickles, kimchi) y carnes (jamón crudo, salame) y han formado parte de diversas culturas alimenticias a lo largo de la historia y en todo el planeta (Rhee, Lee, & Lee, 2011). No sólo cumplen un rol cultural, sino que permitieron en la antigüedad el almacenamiento de comidas que de otro modo hubieran perecido y el enriquecimiento de las mismas en sabores y nutrientes, acompañando así el crecimiento de las poblaciones humanas. Es importante destacar que algunos de estos organismos también juegan un rol negativo en la industria, con algunas especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, y *Lactobacillus* están involucradas en el deterioro de alimentos envasados al vacío (Andreevskaya et al., 2018).

Hace más de 10 años la Organización Mundial de la Salud definió probióticos como “organismos vivos que confieren beneficios en la salud de quienes los consumen cuando son administrados en cantidad adecuadas” y lo ratificó recientemente (Hill et al., 2014). En las últimas décadas, resurgió la popularidad de las BALs en el sector médico y científico debido al descubrimiento de sus propiedades probióticas (Loveleen Kaur & Arora, 2015). Estas van desde la prevención y lucha contra infecciones de organismos patógenos como *Clostridium difficile* (Mills, Rao, & Young, 2018), la modulación del sistema inmune (Maldonado Galdeano, Novotny Nuñez, Carmuega, de Moreno de LeBlanc, & Perdígón, 2015) y hasta la regulación de nuestros estados de ánimo (Johnson & Foster, 2018). Estas propiedades no pertenecen a todas las bacterias de este diverso grupo, sino que resultan ser no sólo especie sino cepa-específicas.

Lactobacillus casei

Debido a la enorme cantidad y variedad de BAL que existen, resulta imposible abocarse al estudio de todas. De este modo, resulta crucial centrarse en algunas pocas o hasta una sola. Dentro de este grupo existe un género amplio y diverso que presenta varias cepas de interés: el género *Lactobacillus* (Stefanovic, Fitzgerald, & McAuliffe, 2017).

En cuanto a los aspectos probióticos, varias formulaciones comerciales dependen del uso de cepas específicas de *Lactobacillus* especialmente seleccionadas (Maldonado Galdeano et al., 2015). Una especie que incluye varias cepas probióticas es *L. casei* (Jacouton, Chain, Sokol,

Langella, & Bermúdez-Humarán, 2017; Sutula, Coulthwaite, Thomas, & Verran, 2013). El uso de estas cepas es el resultado de años de investigación que validan sus propiedades y su seguridad para el empleo en alimentos. En particular, varias cepas de *Lactobacillus casei* forman parte de productos de libre venta como Yakult® (*Lactobacillus casei* Shirota YIT9018) y Actimel® (*Lactobacillus casei* *defensis* DN-114001) debido a sus propiedades probióticas.

A pesar de que estos organismos hayan sido ampliamente estudiados por décadas, existen dos grandes limitantes a la hora de trabajar con ellos en el laboratorio. Por un lado, presentan dificultades a la hora de ser manipulados genéticamente y un protocolo que funcione en una especie o cepa no es directamente efectivo en otra (Leenay et al., 2019). Por otro lado, su incorporación de ADN es deficiente y empeora cuando se intentan transformar con ADN de mayor peso molecular (Palomino, Allievi, Prado-Acosta, Sanchez-Rivas, & Ruzal, 2010).

La razón principal de su dificultad para incorporar ADN es su gruesa pared celular. Esta está compuesta por un arreglo complejo de macromoléculas como el peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos y otra gran variedad de polisacáridos y proteínas (CUMMINS & HARRIS, 1956). Su componente principal es el peptidoglicano, un polímero lineal compuesto por bloques alterantes de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidos por enlaces β -1,4. A su vez, estas cadenas de peptidoglicano se unen covalentemente entre sí por medio de enlaces peptídicos entre los N-terminales del grupo lactil de las moléculas de ácido *N*-acteilmurámico, formando un entramado estrecho y resistente. Estos grupos pueden, a su vez, sufrir distintas modificaciones que rigidicen la pared aún más y hasta la vuelvan resistente a enzimas proteolíticas como la lisozima (Moynihan & Clarke, 2011). Otro componente sumamente importante son los ácidos lipoteicóicos, que se encuentran anclados a la membrana plasmática. (Weidenmaier & Peschel, 2008). Aunque en una gran cantidad de especies del género *Lactobacillus spp.* existan ácidos teicóicos de pared, en *L. casei* no han sido detectados (Chapot-Chartier, 2014). Existe una variedad enorme de otras moléculas esenciales de la pared de estos organismos, como los exopolisacáridos, los polisacáridos capsulares y una plétora de proteínas de pared (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). Es por esta robustez estructural que han tenido que desarrollarse distintos protocolos que permitan su fragilización con el objetivo de aumentar la eficiencia con la cual incorporan ADN (Palomino et al., 2010; Welker, Hughes, Steele, & Broadbent, 2015).

Teniendo todo esto en cuenta resulta imposible ignorar el gran peso que tienen estos organismos no sólo a nivel cultural, clínico y científico sino también a nivel económico. Esto

hace surgir una pregunta: ¿Qué podría poner en peligro la utilización rutinaria de estas bacterias?

Bacteriófagos

Los bacteriófagos, también conocidos como *fagos*, son virus exclusivamente bacterianos y son considerados las entidades biológicas más abundantes del planeta, con un número estimado de 10^{31} partículas (o viriones) en la biósfera (Breitbart & Rohwer, 2005). El sufijo de su nombre proviene del griego *φάγεῖν* (fagueín), que significa “aquel que devora”. Estos “comedores de bacterias” son, como todo virus, elementos biológicos incapaces de reproducirse independientemente y requieren de un hospedador, en este caso bacteriano, para su multiplicación. Los mecanismos de replicación de estos organismos son de una diversidad y complejidad sorprendente (Weigel & Seitz, 2006). A su vez, con sus hospedadores se encuentran en una relación presa-predador que actúa como motor de una constante coevolución (Hatfull, Cresawn, & Hendrix, 2008; Koskella & Brockhurst, 2014).

En cuanto a su estructura, si bien estos viriones pueden presentar simetría binaria, cúbica, helicoidal o ser pleomórficos (*Figura 1 (B)*), un 96% pertenece al grupo de los fagos con cola (orden *caudovirales*) (Ackermann, 2007). Los fagos de este orden poseen una “cabeza” proteica de estructura icosaédrica, que contiene su material genético en forma de ADN doble cadena, un cuello, una cola de forma helicoidal o formada por pequeños discos y una placa base con fibras terminales que permiten el reconocimiento de su hospedador y la correcta adsorción al mismo entre otras funciones. Dentro de este orden, el ICTV (*International Committee on Taxonomy of Virus*) reconoce tres familias distintivas: *Siphoviridae*, como el fago λ, cuyos miembros poseen colas largas y constituyen un 60% de los caudovirus, *Podoviridae*, como el T7, con colas muy cortas, y *Myoviridae* que se caracteriza por poseer una cola contráctil involucrada en la inyección de su material genético en la célula que infectan (Krupovic et al., 2016). Si bien la taxonomía de fagos se basa en información tanto estructural como genética y filogenética, aún hoy es un tema de amplio debate (Tolstoy, Kropinski, & Brister, 2018).

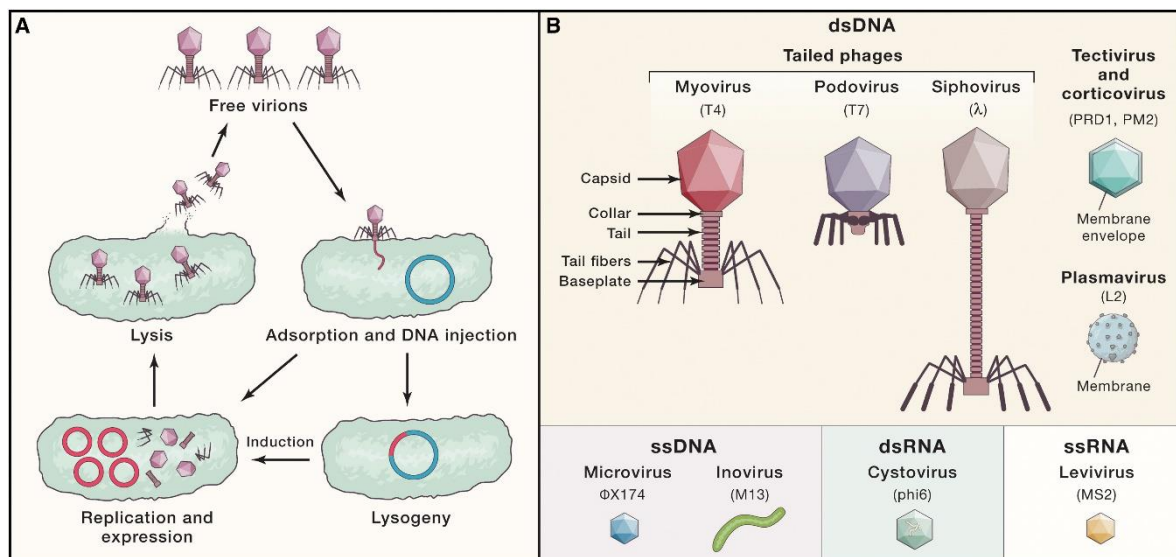


Figura 1: Esquema básico de propiedades de los fagos. (A): Representación simplificada de los ciclos de vida de un bacteriófago. (B): Representación gráfica de las categorías morfológicas de los fagos y la variedad de su material genético. (Ofir & Sorek, 2018)

Las proteínas de la placa base y las fibras terminales les permiten a los fagos una interacción fuerte y específica con sus hospedadores; es por esto que el rango de cepas o especies que puede infectar cada fago es muy estrecho. Tras la interacción entre estas proteínas y los receptores presentes en la envoltura bacteriana, se produce la transferencia del material genético del fago. Este proceso suele ser facilitado por proteínas con actividad hidrolítica, presentes generalmente en las fibras o en la placa base, que degradan la pared de la bacteria (María Eugenia Dieterle et al., 2016). Una vez ingresado el material genético, este se aprovecha de la maquinaria celular preexistente para expresar su contenido; desde las proteínas que conforman su cápside, que son sintetizadas por separado y posteriormente ensambladas, hasta sus propias enzimas de replicación. Cómo y cuándo expresa este contenido es dependiente de una variedad de factores externos y de su ciclo de vida.

Estas entidades infectivas pueden presentar dos ciclos de vida: el ciclo lítico, en el que causan la lisis celular y la liberación consecuente de cientos de nuevas partículas virales, (o *viriones*) que se encuentran listos para infectar a células vecinas, o el ciclo lisogénico, en el que integran su genoma dentro del de su hospedador o forman episomas, donde permanecen latentes como *profagos* hasta que se induzca nuevamente el ciclo lítico (Figura 1 (A)). Existen fagos que solo son capaces de realizar ciclos líticos y fagos que pueden presentar ambos; estos últimos se conocen como fagos temperados (Barksdale & Arden, 1974). Los profagos integrados en los genomas bacterianos pueden proveerles características novedosas a estos organismos, desde la expresión de nuevos factores de virulencia (Wagner & Waldor, 2002) y cambios metabólicos diversos (Feiner et al., 2015; Hargreaves, Kropinski, & Clokie, 2014; Koskella & Brockhurst,

2014) hasta resistencia a superinfecciones (Bondy-Denomy et al., 2016; Dedrick et al., 2017) de otros bacteriófagos. La decisión lisis-lisogenia es un fenómeno ampliamente estudiado (Herskowitz & Hagen, 1980; KAISER, 1957) que puede deberse a diversos motivos como la multiplicidad de infección (relación fago/bacteria), estrés fisiológico del hospedador y mecanismos de *quorum sensing* (Erez et al., 2017). Si bien hasta hace poco se creía que la inducción del ciclo lítico podía también ocurrir de manera espontánea, trabajos recientes señalan que existen mecanismos moleculares hasta entonces desconocidos que eran de carácter determinístico y no azaroso (Golding, 2016; Zeng et al., 2010).

Los bacteriófagos tienen una relevancia importante no sólo como interesantes objetos de estudio para la microbiología y la biología molecular sino también para la biotecnología aplicada (Salmond & Fineran, 2015). La importancia de las infecciones bacteriofágicas durante la producción de lácteos, por ejemplo, no se conoció hasta el año 1935 cuando Whitehead y Cox encontraron al primer bacteriófago específico para la cepa *L. lactis*.

A su vez, debido a la distribución casi ubicua de las BAL en nuestro microbioma, resulta de gran interés el estudio de sus fagos, sus interacciones específicas y el potencial uso de estos como futura herramienta biotecnológica.

Bacteriófagos de BALs

Las infecciones bacteriofágicas de BAL empleadas como iniciadoras en las fermentaciones de productos lácteos sigue siendo la causa más común de problemáticas clave en esa industria. Suele generar problemas como fermentaciones lentas, de baja calidad o inclusive la pérdida total del producto en el peor de los casos (Surono & Hosono, 2011). Algunas estimaciones asumen que los bacteriófagos son los principales responsables de las pérdidas económicas en estas fábricas, afectando entre el 0,1% y el 10% de los fermentos lácteos (Garneau & Moineau, 2011).

En general, las fermentaciones bacterianas están comprometidas cuando los títulos fágicos son mayores a 10^4 unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro. Indicadores típicos de una infección por fagos pueden ser valores altos de pH, concentraciones remanentes de lactosa e insuficiencia en el contenido de ácido láctico 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 no solo para satisfacer al cliente y generar la confianza en el producto sino también porque los residuos de lactosa pueden permitir el crecimiento de

microorganismos indeseados, alterando las cualidades del producto o inclusive dando lugar al crecimiento de patógenos (Moineau y Lévesque, 2005).

Siendo *L. lactis* y *S. thermophilus* las cepas más utilizadas para estos procesos, resulta razonable que los fagos que infecten esas cepas sean los más estudiados (de Melo, Levesque, & Moineau, 2018). Para *L. lactis* se conocen 10 grupos de fagos, todos pertenecientes a las familias *Siphoviridae* y *Podoviridae*. En la familia *Siphoviridae* se encuentran los grupos 936, P335, 1358, C2, Q54, P087, 949, 1706 y en *Podoviridae*, P034 y KSY1. Esta clasificación está basada en microscopía electrónica, reacciones serológicas, hibridización ADN-ADN y secuenciación, revalidándose unas a otras (Deveau, Labrie, Chopin, & Moineau, 2006). Desde hace décadas se conoce que un grupo de estos fagos, el 936, es el más nocivo y abundante en la industria láctea y aún hoy se confirma esa prevalencia (Moineau et al., 2010; Murphy et al., 2013; Prevots, Mata, & Ritzenthaler, 1990). En cuanto a los bacteriófagos que infectan *S. thermophilus*, todos pertenecen a la familia *Siphoviridae*. Hasta hace poco, estos se clasificaban en dos grandes grupos según cómo empaquetaban su ADN: los cos (extremos cohesivos) y los pac (empaquetamiento de tipo cabeza llena) (Le Marrec et al., 1997). Recientemente, dos nuevos grupos han sido descubiertos y descritos, los 5093 y los 987 (Lavelle et al., 2018), que presentan una marcada diversidad genética comparándolos con los cos y los pac.

Recién en la última década los fagos que infectan *Lactobacillus spp* han cobrado un rol más relevante (Capra, Binetti, Mercanti, Quiberoni, & Reinheimer, 2009). Su gran diversidad hace difícil contar con información taxonómica (Mahony, Ainsworth, Stockdale, & van Sinderen, 2012). Teniendo en cuenta que el género *Lactobacillus spp.* cuenta con más de 100 especies (Claesson, Van Sinderen, & O'Toole, 2007) esta dificultad aumenta aún más. De estos fagos, la gran mayoría pertenece a las familias *Siphoviridae* y *Myoviridae* mientras que sólo se conocen 2 que pertenecen a la familia *Podoviridae* (Ackermann, 2007; Villion & Moineau, 2009).

Dentro del género *Lactobacillus spp.* existe una cepa en particular que ha resultado atractiva históricamente y cuyos fagos se han estudiado desde hace décadas.

Bacteriófagos de *Lactobacillus casei*

En 1965, a partir de una fermentación anormal de la bebida Yakult® en Japón, que emplea a la cepa *L. casei* Shirota como iniciadora, se aisló el primer fago de *L. casei* denominado J-1 (Hino & Ikebe, 1965). Dos años más tarde, el fago PL-1 fue aislado a partir de una nueva cepa

resistente a J-1(K Watanabe, Takesue, Jin-Nai, & Yoshikawa, 1970). 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). 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 (Kakita *et al.*, 1995; Kenji Watanabe, Kakita, Nakashima, & Sasaki, 1990). También ha sido caracterizada la endolisina del fago PL-1 con actividad *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de potencial uso biotecnológico (Kashige, Nakashima, Miake, & Watanabe, 2000). Aunque J-1 y PL-1 se aislaron en los años '60 y se estudiaron por décadas, sus secuencias genómicas no estaban disponibles.

En nuestro laboratorio se han secuenciado, anotado y caracterizado en detalle los genomas de los fagos J-1 (*Figura 2*) y PL-1(M E Dieterle, Jacobs-Sera, Russell, Hatfull, & Piuri, 2014), tanto a nivel genómico como estructural(Maria Eugenia Dieterle *et al.*, 2014). En particular, estos trabajo se han enfocado en la caracterización estructural de la maquinaria de reconocimiento del hospedador, que no había sido estudiada hasta el momento en fagos que infectan *Lactobacillus spp* (Maria Eugenia Dieterle *et al.*, 2014).

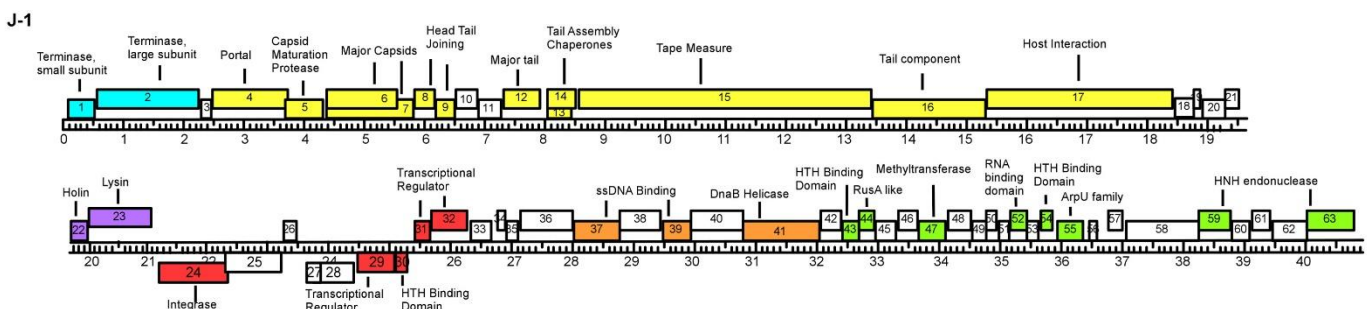


Figura 2: Genoma anotado del bacteriófago J-1.

El bacteriófago J-1

El fago J-1 pertenece al orden Caudovirales y a la familia Siphoviridae, como puede verse en la *Figura 3*, presentando una cabeza icosaédrica y una típica cola larga no contráctil. Posee ADN doble cadena. Es capaz de infectar diversas cepas de *Lactobacillus casei/paracasei* incluyendo cepas comerciales(Hino & Ikebe, 1965). A diferencia de la mayoría de los fagos del orden Caudovirales, en la placa base no pudieron identificarse proteínas específicas de unión al receptor (RBPs) sino que se vió que está formada por una proteína de cola distal, la proteína Dit “evolucionada”, que cumple a su vez un rol estructural y de reconocimiento y unión a carbohidratos de la pared de su hospedador(Maria Eugenia Dieterle, Spinelli, Sadovskaya, Piuri, & Cambillau, 2017).

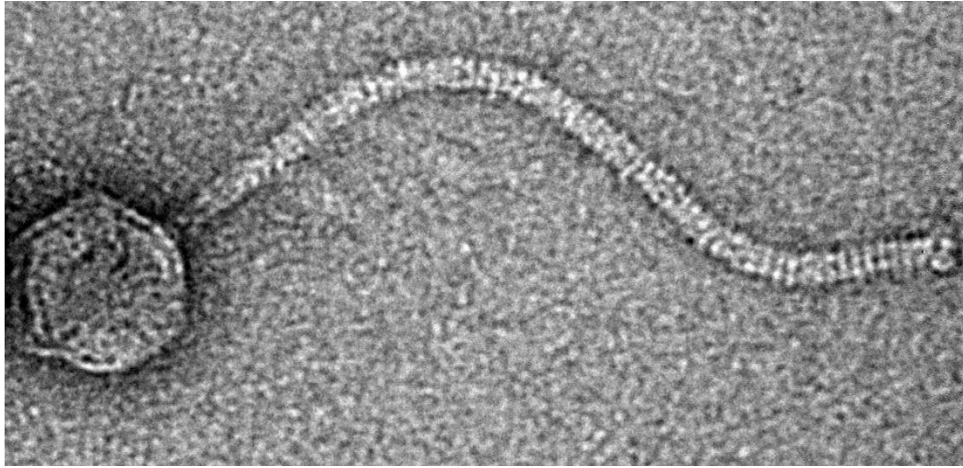


Figura 3: Microscopía electrónica de transmisión del bacteriófago J-1.

Si bien este bacteriófago ha sido ampliamente estudiado y caracterizado, una limitante en su estudio es la falta de herramientas que nos permitan su manipulación genética y la de otros bacteriófagos que infectan *Lactobacillus* spp.

Recombineering

El *recombineering* (***recombination-mediated genetic engineering***) es una técnica de ingeniería genética basada en el empleo de proteínas que emplean ciertos fagos durante la replicación de su genoma, que pueden mediar una recombinación homóloga utilizando secuencias cortas de homología (Court, Sawitzke, & Thomason, 2002). Este sistema, descrito originalmente para el profago lambda Red de *E. coli*, consiste en tres proteínas: Exo, Beta y Gam. Exo actúa como exonucleasa, degradando una de las hebras del sustrato de intercambio alélico y dejando como producto un fragmento de ADN simple cadena. El rol de Beta es facilitar el *annealing* del producto de Exo con la región de homología presente en el fragmento de ADN que se quiere modificar. Las evidencias más recientes sugieren que Beta estabiliza preferencialmente el apareamiento del sustrato de intercambio alélico con la *lagging strand* durante la replicación del ADN (Maresca et al., 2010; Mosberg, Lajoie, & Church, 2010) (Figura 4). Finalmente, Gam inhibe a las proteínas RecBCD y SbcD cuyo rol es degradar ADN doble cadena. Si bien es posible realizar *recombineering* con sustratos de ADN simple cadena, cuando el utilizado es de doble cadena resulta altamente conveniente la incorporación de la proteína Gam.

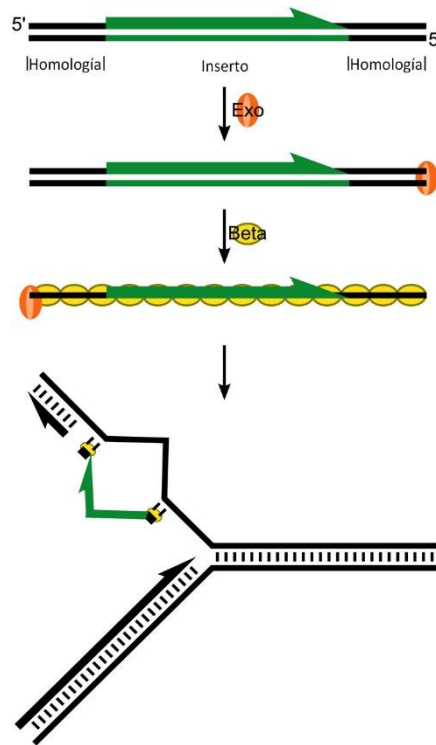


Figura 4: Esquema simplificado de acción del mecanismo de recombineering. Se observa como la proteína Exo (en naranja) degrada una de las hebras del sustrato doble cadena y como, posteriormente, la proteína beta (en amarillo) la estabiliza y facilita su annealing en la horquilla de replicación.

En una publicación del año 2017, nuestro laboratorio caracterizó varios profagos presentes en el genoma de *L. casei* BL23 (María Eugenia Dieterle et al., 2016). Basados en este trabajo, Xin et al. hallaron en el genoma de PLE3 (Figura 5), uno de los profagos caracterizados, un *cassette* de proteínas, codificadas en los genes LCABL_13040-50-60, que presentaba homología con las proteínas Exo, Beta y Gam del sistema lambda Red de *recombineering* en *E. coli* (Xin, Guo, Mu, & Kong, 2017). Clonando estas proteínas en un vector inducible, lograron expresar esas funciones y aumentar considerablemente la tasa de recombinación en *L. casei* BL23. Si bien la capacidad de realizar recombineering en *L. casei* constituye un gran avance en el área, esto no soluciona la incapacidad de realizar modificaciones dirigidas a genomas de los fagos que las infectan.

PLE3

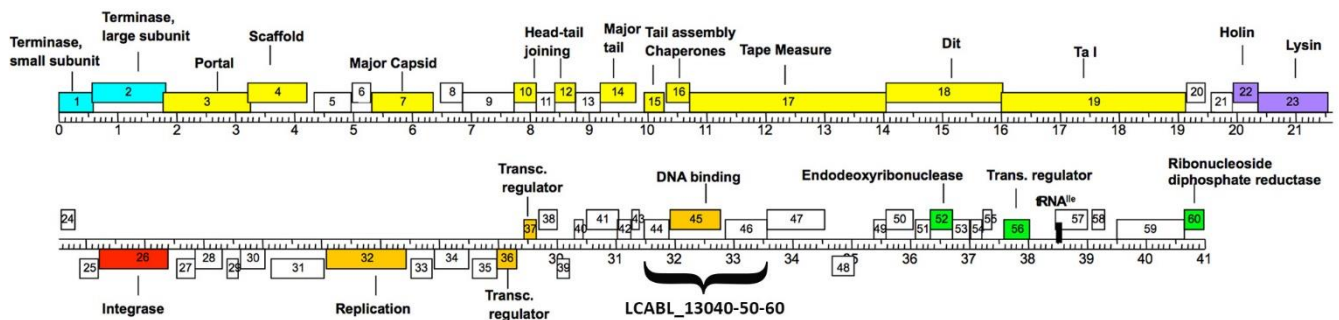


Figura 5: Genoma del profago PLE3. Se encuentra remarcado con una llave los genes que Xin et al. llamaron LCABL_13040_50_60 y a los que les adjudicaron las funciones de recombineering.

BRED (*Bacterial Recombineering of Electroporated DNA*)

Teniendo en cuenta que los fagos, durante su multiplicación, lisan las bacterias y que, a diferencia de lo que ocurre en éstas, no es posible utilizar marcadores (como genes de resistencia a antibióticos) para seleccionar los bacteriófagos modificados, resulta difícil identificar fagos mutantes. Con el fin de aplicar la alta eficiencia de recombinación que puede obtenerse empleando *recombineering*, Marinelli et al (2008) adaptaron esta técnica para la modificación de genomas de fagos y la denominaron BRED (*Bacterial Recombineering of Electroporated DNA*)(Marinelli et al., 2008). Esta consiste en la electroporación conjunta de un sustrato de recombinación alélica con el ADN purificado de un bacteriófago en un hospedador adecuado. El sustrato de intercambio alélico presenta regiones cortas de homología con el gen que se desea modificar. Si, previa a la electroporación, la bacteria se encontraba expresando las proteínas que pueden mediar *recombineering*, el producto final será la formación de partículas virales infectivas de las cuales un porcentaje poseerá la modificación buscada. Dada la alta eficiencia del recombineering, luego de un proceso de *screening* por PCR resulta posible identificar el fago mutante y aislarlo exitosamente (Figura 6).

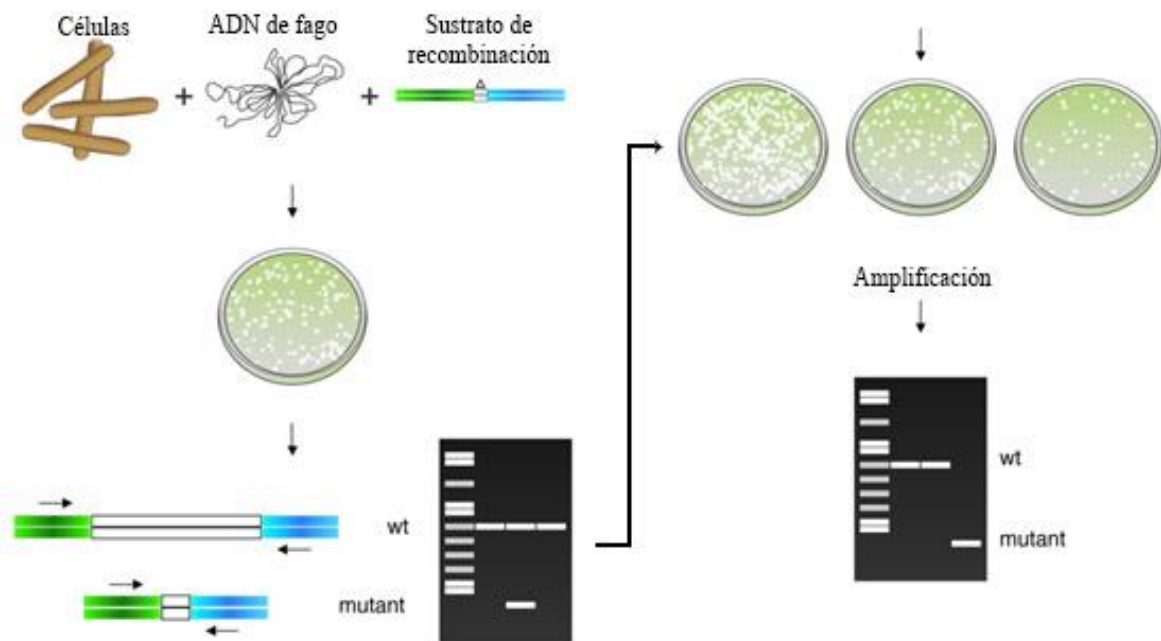


Figura 6: Esquema funcional del procedimiento de la técnica BRED. Se co-electroporan el ADN del fago con el sustrato de recombinación alélica en las células. Se realiza un ensayo de centros infecciosos, del cual se toman playas que se analizan por PCR para evaluar la presencia de la mutación deseada. Si se encuentra, se amplifican los fagos obtenidos de esa playa y se repite el screening, enriqueciendo la proporción del fago mutante hasta obtener una playa que ya no posea el genotipo original. A partir de esta se realiza un stock que solo poseerá al nuevo fago mutante.

Hipótesis y objetivos

La hipótesis original de este trabajo fue adaptar la metodología BRED para su empleo en la modificación genética de fagos que infectan *Lactobacillus* spp, usando como organismos modelo a la bacteria *Lactobacillus casei* BL23 y el bacteriófago J-1.

Para la correcta elaboración de esta hipótesis se plantearon 3 objetivos específicos:

1. Considerando la dificultad que tienen las bacterias del género *Lactobacillus* para incorporar grandes fragmentos de ADN por electroporación, se buscó poner a punto un protocolo de producción de protoplastos de la bacteria modelo y evaluar su eficiencia de transformación con ADN del bacteriófago J-1.
2. Basados en Xin *et al.* 2017, se buscó clonar en un vector de expresión inducible los genes LCABL_13040-50-60 que forman parte del genoma del profago PLE3 de *L. casei* BL23 y acarrean sus funciones de *recombineering*.
3. A partir de lo logrado en (1) y (2), poner a punto y evaluar la funcionalidad de esta nueva metodología basada en inducir las funciones de *recombineering* durante el proceso de protoplastización y posterior co-transfección de las bacterias con ADN del bacteriófago J-1 y un sustrato de recombinación alélica, esperando obtener una proporción de progenie viral con la mutación deseada.

En el desarrollo de este trabajo surgieron dificultades que impidieron la concreción de algunos de estos objetivos y los hicieron virar en otra dirección que, si bien no fue la deseada originalmente, contribuyeron al desarrollo de herramientas muy valiosas en el laboratorio y abrieron la posibilidad de emplear a futuro una novedosa metodología para la modificación genética de fagos que infectan *Lactobacillus* spp.

Materiales y métodos

1. Cepas y fagos empleados

-El bacteriófago utilizado es J-1. Es capaz de infectar diversas cepas de *Lactobacillus casei* y *paracasei* incluyendo cepas comerciales (Capra *et al.*, 2006). El fago J-1 fue cordialmente cedido por la Dra. Quiberoni del INLAIN (Instituto de lactología industrial), Universidad del Litoral.

- Las cepas de *Lactobacillus* utilizadas en este trabajo son:
 - *Lactobacillus casei* BL23 cedida por el Dr. Gaspar Perez-Martinez de la colección de cepas del IATA (Instituto de Agroquímica y Biotecnología de Alimentos, Valencia España).
 - *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 27139 cordialmente cedida por la Dra. Quiberoni del INLAIN, Universidad del Litoral.
- Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo son:
 - *Escherichia coli* top10:
F- mcrA Δ (mrr-hdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ -
 - *Escherichia coli* Hb101
supE44 hsdS20(rB-mB-) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1

2. Medios de cultivo y métodos de crecimiento

Las cepas de *Lactobacillus spp.* se propagaron en medio MRS (Man, Rogosa, Sharpe de Biokar). Las cepas de *Escherichia coli* se propagaron en medio LB (Luria-Bertrani). Ambas se utilizaron en su versión líquida o agarizada según corresponda. La composición exacta se encuentra en el anexo.

Las cepas de *Lactobacillus* se incubaron en condiciones de microaerobiosis (estáticas), mientras que las cepas de *E. coli* se incubaron en condiciones aerobias cuando fue posible (agitación del cultivo en medio líquido). Ambas se crecieron a 37°C.

3. Técnicas en microbiología

3.1 Preparación de electrocompetentes de *Escherichia coli*

Se creció *E. coli* en LB líquido hasta alcanzar una DO_{600nm}= (0,6-0,8), y el cultivo se colocó en un baño de hielo 1 hora. Pasado este tiempo se lo centrifugó a 4000 rpm x 15 min, se descartó el

sobrenadante y se resuspendió en 50 ml de agua bidestilada estéril a 4°C. Se repitió el centrifugado y el lavado 3 veces. Finalmente, las células se resuspendieron en una solución de 10% glicerol en agua bidestilada fría y se alicuotaron de a 100 µL para reservar a -70°C hasta su uso.

3.2 Preparación de electrocompetentes de *Lactobacillus casei*

Se siguió el protocolo descrito en *Palomino et al.* 2010 con algunas modificaciones: 100 ml de MRS 0,9 M NaCl fueron inoculados con 1 ml de un pre-cultivo de *Lactobacillus casei* BL23 a una $DO_{600nm} \geq (0,05)$ e incubados a 37°C en condiciones microaerófilas ON. Al alcanzar el cultivo una $DO_{600nm} = (2,0-2,5)$, se lo centrifugó a 4000 rpm x 5 min a 10°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 ml de agua bidestilada estéril fría. Se repitió el centrifugado y el lavado 3 veces, resuspendiendo cada vez en la mitad de volumen que la anterior. Finalmente, las células se resuspendieron en 1ml de una solución de 15% glicerol en agua MilliQ fría y se alicuotaron de a 100 µL para reservar a -70°C hasta su uso.

3.3 Protocolo de electroporación para *E. coli* y *L. casei*

Se utilizó para todos los casos un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) con cubetas BIO-RAD estériles de 0,2 cm de espesor. A 100 µl de una suspensión de bacterias electrocompetentes se les añadió una masa de entre 20 ng y 100 ng de plásmido y se las dejó reposar en frío por unos minutos. Posteriormente, se utilizó el electroporado para someterlas a un campo eléctrico con los siguientes parámetros: R=200 Ohms, C=25 µF y V=2,5 kV.

Luego de la electroporación, las células de *E. coli* se resuspendieron en 0,9 ml de LB caldo y se llevaron a 37°C por 3 horas en en agitación para su recuperación y la expresión de la resistencia a antibiótico correspondiente. Pasado este tiempo, las células fueron sembradas en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente, en este caso eritromicina 250 µg/ml. Para *L. casei*, luego de la electroporación, las células fueron resuspendidas en 0,9 ml de MRS caldo y la recuperación se realizó durante 3 horas a 37°C en microaerobiosis (cultivo estático). Las células fueron sembradas en placas de MRS agar con el antibiótico correspondiente, nuevamente eritromicina pero esta vez en una concentración de 5 µg/ml. En ambos casos las placas se incubaron a 37°C.

3.4 Protocolo base de preparación de protoplastos de *Lactobacillus casei* BL23

A partir de un cultivo fresco en MRS se inocularon células de *L. casei* BL23 en MRS NaCl 0.8M hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 1. Las células se centrifugaron, se lavaron con agua esteril y se llevaron a una $DO_{600nm} = 2.5$ en medio de protoplastización (0.5M Sacarosa; 10mM Cl_2Mg ; 0.02M maleato de sodio pH 6.5; 10mM Cl_2Ca , 0.2%Glicin-betaina). Se agregó

mutanolisina 25 U/ml y Lisozima 250 µg/ml y se incubó 2,5 hs a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se debe proceder con suma delicadeza ya que, al no poseer pared celular, los protoplastos son proclives a lisarse por estrés mecánico. Finalmente, se los alicuotó de a 1ml en tubos eppendorff y se los almacenó a -70°C donde se mantuvieron congelados hasta su uso.

3.5 Obtención de stocks de alto título de J1 en medio líquido

Se utilizó el protocolo de producción de stocks de alto título puesto a punto en una tesis de licenciatura de este laboratorio (Dieterle, E. 2012), detallado a continuación, utilizando *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 27139 como huésped para la amplificación del bacteriófago J-1.

En cultivo de 75 ml de MRS se inoculó la cepa *L. casei* subsp. *casei* ATCC 27139, en crecimiento exponencial, a DO_{600nm} de 0,1 y se la dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego, se agregó la cantidad correspondiente de fago para obtener una multiplicidad de infección de 0,05 junto con 10mM $CaCl_2$. Se incubó toda la noche en estufa a 37°C y posteriormente se cosechó, realizando dos centrifugaciones seriadas a 3200 x *g* durante 15 min a 10°C, conservando el sobrenadante y descartando las células. Luego, ese sobrenadante se filtró con filtros de 0,45 µm (Millipore), obteniendo así un stock de alto título. Con el fin de concentrar este stock, se lo centrifugó en ultracentrífuga a 31000 x *g* a una temperatura de 10°C. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en buffer de fagos y se lo filtró nuevamente usando un filtro de 0,22 µm de Millipore. Este stock concentrado se guardó a 4°C hasta su uso.

3.6 Titulación en placa

Para titular los stocks de fago utilizados se realizó el ensayo en placa descrito originalmente por d'Herelle (D'Hérelle, 1917). Las diluciones seriadas de fago a titular se realizaron en buffer de fago mientras que las bacterias indicadoras se diluyeron con medio MRS líquido. Como medio semisólido se utilizó el *MRS top agar* (ver anexo) mantenido a una temperatura de 55°C al cual, una vez fundido y estable a esa temperatura, se le agregó $CaCl_2$ 10mM. A 1 ml del top agar fundido se le agregaron 100µl de células indicadoras a $DO_{600nm}=1$, que se encontraban en crecimiento exponencial, que equivale aproximadamente a 10^8 células/ml, y 100 µl de la dilución correspondiente de fago. Finalmente, se vertió el *top agar* con las células indicadoras y la dilución de fago sobre una placa de MRS agar sólido. Esta placa se dejó sacar y se incubó en estufa a 30°C por 24 horas. A partir de esto se calcularon las UFP/ml de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$UFP/ml = \frac{\text{número de playas de lisis}}{\text{volumen de inóculo (ml)} * \text{dilución utilizada}}$$

3.7 Spot test

Para realizar mediciones semi-cuantitativas se recurrió a la técnica del spot test. En este caso las células indicadoras se agregaron al medio semisólido el cual se vertió directamente sobre el agar MRS. Una vez solidificado, se colocaron las diferentes diluciones seriadas del fago por gota (5-10µl) en la placa. Si bien este método resulta más simple, rápido y económico, suele mostrar diferencias en el título obtenido por el ensayo de placa, que es el método de referencia y el que más se utilizó en este trabajo.

3.8 Ensayo de centros infecciosos

Con el fin de evaluar la capacidad del DNA de fago de penetrar en los protoplastos y producir progenie viral funcional, se realizó un ensayo de centros infecciosos.

Se tomó 1ml de una suspensión de protoplastos de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS protegido que se encontraba en -80°C y, una vez a temperatura ambiente, se los centrifugó a 3500 RPM por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y suavemente se resuspendieron los protoplastos en 300 µL del mismo medio. Se agregó la masa deseada de DNA de fago y 450 µL de una solución de 50% PEG-4000, un polímero de cadena larga que permite la permeabilización parcial de la membrana protoplástica y facilita el ingreso del DNA, para obtener una concentración final del 30% (Kenji Watanabe et al., 1990). Tras homogeneizar delicadamente, la mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añadieron 750µL de MRS protegido y se centrifugó esta mezcla nuevamente a 3500 RPM por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1ml de MRS protegido. Estos protoplastos, ya transfectados con DNA viral y libres de PEG-4000, se incubaron a 37°C por distintos tiempos. Tomando una primer alícuota de 100 µL en $t_0=0$ hs al momento de colocarlas a 37°C, se fueron tomando otras alícuotas del mismo volumen cada 2 horas hasta $\Delta t=6$ hs como alícuota final. Apenas tomadas, se las utilizó como si fueran una suspensión de fagos que se quisiera titular usando el ensayo de titulación en placa descrito anteriormente (ver sección 3.6), cambiando el MRS top agar por MRS top agar protegido, ya que de otro modo los protoplastos estallarían por el desbalance osmótico y su falta de pared. Esto es esencial ya que el objetivo de este ensayo es obtener playas provenientes de partículas virales infectivas producto de la expresión de los genes del ADN transfectado originalmente y no de futuras rondas de infección.

3.9 Microscopía de epifluorescencia y ajustes de imagen

Se utilizó un microscopio de fluorescencia Carl Zeiss Axio Scope.A1 (Zeiss Argentina SA, Argentina), con un objetivo 40X y 100X con inmersión y contraste de fase. Las imágenes tanto de campo claro como de fluorescencia se tomaron con una cámara Photometrics COOLSNAP HQ. En todos los experimentos se trató de mantener el mismo tiempo de exposición. Para la detección de las células rojas fluorescentes se utilizó el juego de filtros 64 HE mPlum shift free (E) Carl Zeiss Excitación BP 587/25, BS FT 605, Emisión BP 647/70. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software de código abierto ImageJ.

4. Técnicas moleculares

4.1 Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli*

El ADN plasmídico de *E. coli* se aisló por el método de lisis alcalina. Para ello se resuspendió el pellet de un cultivo de 3-5 ml crecido ON a 37°C en 300 µl de solución I (Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNAsa 10 µg/ml), al cual se le agregó un volumen de solución II (NaOH 0,2 N; SDS 1%) y se invirtió las veces necesarias hasta obtener mucosidad. Esta solución provoca la lisis de la membrana y la pared celular y su pH elevado favorece la desnaturalización del ADN. En este estado, debido a su menor tamaño, el ADN plasmídico es más estable que el genómico. Este último es más susceptible a la ruptura mecánica.

Posteriormente, se agregó un volumen de solución III (Acetato de potasio 5 M pH 5) y se mezcló por inversión repetidas veces. Esta solución produce una neutralización brusca del pH que, junto con la alta concentración salina, ocasionan la re-naturalización del ADN plasmídico. Debido a su gran tamaño, el ADN genómico no re-naturaliza y permanece fuera de solución, formando una red insoluble y arrastrando consigo ARN y proteínas acomplejadas con SDS. Se centrifugó a 14000 rpm 20 minutos. El sobrenadante se recuperó y se agregó 0,6 de volumen de isopropanol frío y se invirtió. Se llevó -20° C (al menos 30 minutos) para favorecer la precipitación. El ADN plasmídico se recuperó por centrifugación a 14000 rpm 30 minutos. El pellet se secó y se resuspendió en buffer TE 10:1 pH 8.

4.2 Aislamiento de ADN de fago

La extracción de ADN se realizó empleando un protocolo convencional con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (F:C:I) en el cual el fenol desnaturaliza las proteínas y el cloroformo favorece la separación de fases. Se detalla a continuación.

A 100µl del stock de fago se le agregaron 400 µl de buffer TE pH 8. Se agregó 0,1 µg/ml RNAasa y se la dejó actuar por 15 minutos. Luego se adicionó un volumen de F:C:I (25:24:1), se

vortexeó y se centrifugó 5 minutos a 16000 g. Se tomó la fase acuosa y con esta se repitió la extracción con F:C:I por lo menos 2 veces más o hasta no observar una interfase. Luego, se realizaron dos extracciones con un volumen de cloroformo:isoamílico (24:1), se vortexeó y se centrifugó 5 min a 16000g.

A la fase acuosa obtenida se le adicionaron 2,5 volúmenes de etanol, que disminuye la polaridad y favorece la precipitación del ADN, y acetato de sodio 3M que neutraliza las cargas, y se dejó 30 minutos en hielo para favorecer la precipitación del material genético. Pasado este tiempo, se centrifugó 30 minutos a 16000g y se lavó con EtOH 70% para eliminar el exceso de sales. Se volvió a centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. Se resuspendió en 80 µl de buffer TE pH 8 y se guardó a -20°C

4.3 Aislamiento de ADN cromosómico de *Lactobacillus*

Se partió de un cultivo de *L. casei* BL23 en 10 ml de MRS en fase exponencial. Se recogieron las células por centrifugación y se lavaron con 10 ml de 50 mM EDTA pH8. El pellet lavado se resuspendió en 500 µL de una solución conteniendo 25Mm Tris HCl, 10Mm EDTA (que impide la acción de las DNAsas), 1mg/ml de lisozima y 30 U de mutanolisina, ambas enzimas degradadoras de la pared celular bacteriana, y se dejó incubando 2 hs a 37°C. Luego se agregó 0,1mg/ml RNasa y 0,2 mg/ml proteínasa K. Las células se lisaron añadiendo Sarkosyl e incubando 2 hs a 50°C o 16 hs a 42°C. La extracción se realizó agregando 1 volumen de F:C:I (25:24:1), vortexeando vigorosamente y centrifugando a 16000g por 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomó la fase acuosa y con esta se realizaron otras 2 extracciones consecutivas con 1 volumen de cloroformo/isoamílico (24:1). Al producto de extracción se le añadieron 2,5 volúmenes de etanol para precipitar los ácidos nucleicos. El ADN se recuperó enrollándolo en una varilla de vidrio. La varilla se dejó secar unos minutos y luego se sumergió en un tubo conteniendo 0,4 ml de TE pH 8, dejándola toda la noche a 4°C. Al día siguiente la varilla se lavó varias veces con el mismo buffer para desprender el ADN. El ADN cromosómico obtenido se guardó a 4°C. El método de la varilla de vidrio permite obtener ADN con una mínima cantidad de impurezas.

4.4 Oligonucleótidos utilizados como *primers*

Tabla 1: primers utilizados a lo largo del trabajo

Nombre	Secuencia	Tm	Producto	Descripción
FZ1	aa CTGCAG <u>ATG</u> ACC ATG CTT GAT TAC AAC ACA G	58°C	Genes de recombineering (LCABL 13040–50–60)	Primer forward. Posee el ATG del primer gen. Sitio de corte de PstI.
FZ2	aa TCTAGA <u>CTA</u> CTC GAC TAG CTC ATC CAT GCT	59°C		Primer reverse. Posee el STOP del último gen. Sitio de corte de XbaI
CD1	cgc CTGCAG <u>ATG</u> GTT TCA AAA G	33°C	<i>mrfp</i>	Primer forward. Posee el ATG de <i>mrfp</i> . Sitio de corte de PstI.
PD2	cgcg CTCGAG <u>TTA</u> TTT ATA TAA TTC GTC	36°C		Primer reverse. Posee el STOP de <i>mrfp</i> . Sitio de corte de XhoI.

Se subrayan los sitios de corte de las enzimas especificadas. Se subraya doble el codón de inicio o *stop* (reverso complementario) según corresponda. Se resalta en gris el fragmento del ORF que se encuentra dentro del *primer*. En minúscula se marcan las bases añadidas para mejorar la interacción con las enzimas de restricción. La separación en codones se encuentra en el marco de lectura del codón de inicio o *stop* correspondiente en cada caso. Las secuencias de los primers FZ1 y FZ2 son idénticas a la de los primers 456F y 456R del trabajo de Xin et al 2017 (Xin et al., 2017).

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de *Integrated DNA Technologies*, resuspendidos en agua estéril a una concentración de 250 µM y reservados a -20°C. A partir de esta dilución de almacenamiento se prepararon diluciones de trabajo con una concentración de 25 µM.

4.4 Plásmidos utilizados

El plásmido pMSP3535 fue obtenido del repositorio Addgene. Agradecimientos a Gary Dunny por su aporte (Addgene plasmid #46886 ; <http://n2t.net/addgene:46886> ; RRID:Addgene_46886)

El plásmido pTLGR se compró al CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) España (García-Cayuela et al., 2012).

4.5 Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó con el espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop de la empresa Thermo-Scientific. La pureza del ADN se estimó mediante mediciones de la relación $\frac{A_{260\text{ nm}}}{A_{280\text{ nm}}}$, donde la absorbancia a 280 nm estima la cantidad de proteínas y, a 260 nm, la de ADN. Esta relación fue de entre 1,8 y 2,0 para todas las extracciones realizadas.

Para obtener una medida cualitativa de las concentraciones de fragmentos de ADN en los geles se utilizó el método de la isodensidad en el cual se compara la banda de interés del gel con las bandas del marcador viendo cuál de estas posee la intensidad más similar a la de nuestra muestra. Las bandas de igual isodensidad poseen igual masa de DNA. El marcador *Gene-ruler* 1Kb de Fermentas (MK2) utilizado en las corridas electroforéticas presenta tanto marcadores indicadores de peso molecular como de masa.

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Con el objetivo de amplificar fragmentos de ADN se realizaron múltiples reacciones de PCR, variando en cada caso las condiciones de reacción y los *primers* utilizados para obtener los productos deseados. En las instancias en las que se usó la PCR como herramienta de clonado, se utilizó la enzima PFU ya que posee una habilidad de *proof-reading* que le confiere menor tasa de error. Cuando la técnica se usó con el fin de evaluar la mera presencia de las regiones de ADN de interés, se utilizó la encima GoTaq de Promega. Las condiciones de reacción dependieron de lo que se buscaba clonar y la enzima utilizada como se ilustra en la tabla 2.

Tabla 2: reactivos utilizados para las reacciones en cadena de la polimerasa:

Enzima	Buffer	Primers	Templado	dNTPs
GoTaq (Promega)	Buffer GoTaq 5X (Promega)	0,5 µM cada uno	20 ng	0,2 mM
PFU (ver fabricante)	Buffer PFU 10X (ver fabricante)			

En la Tabla 3 se presenta cómo se varió el programa de temperaturas utilizado para cada reacción, independientemente de la enzima utilizada. reacción se varió el programa de temperaturas utilizado, independientemente de la enzima utilizada

Tabla 3: programas utilizados en las reacciones en cadena de la polimerasa realizadas:

Secuencia	Molde	Ciclos		
		Temperatura (°C)	Tiempo	Repeticiones
LCABL_13040-50-60 (Genes de <i>recombineering</i>)	ADN genómico de <i>L. casei</i> BL23 que contiene al profago PLE3	95	5 min	x1
		95	15 seg	X30
		57	30 seg	
		70	2 min 30 seg	
		70	10 min	X1
<i>mrfp</i>	pTLGR	95	5 min	x1
		92	15 seg	X30
		35	30 seg	
		70	2 min 30 seg	
		70	10 min	X1

Cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa del porcentaje adecuado teñidos con bromuro de etidio (BrEt), siguiendo las instrucciones de los *markers* de peso molecular utilizados en cada caso para determinar el porcentaje de agarosa del gel. A continuación, se detalla el protocolo de preparación de los geles.

4.7 Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook *et al.*, 1989 (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). La concentración de los geles de agarosa varió entre 0,8% y 1,2%, según el tamaño del fragmento a analizar y el *marker* utilizado. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE 1X a voltaje constante, 100 V ~120 V, según el tamaño del fragmento de interés en cubas de Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se utilizaron *markers* de las empresas IDT y Dongsheng Biotech de 1kb, 500kb y 100kb. Posterior a la electroforesis, el ADN se visualizó colocando al gel en un transiluminador.

4.8 Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron:

*Pst*I (Promega), *Xho*I (Promega), *Xba*I (Promega), *Nde*I (New England Biolabs)

Cada enzima fue utilizada siguiendo las especificaciones del fabricante, con el buffer de reacción y condiciones de temperatura óptimas para su uso. En caso de realizar cortes simultáneos, se utilizó un buffer que fuera compatible con ambas. Para las enzimas termosensibles, se las inactivó incubando a 70 °C por 15 minutos. Para las termoresistentes, se procedió directamente al paso de purificación correspondiente a cada caso.

4.9 Recuperación y purificación de amplicones desde geles de agarosa

Los amplicones de ADN corridos en geles de agarosa se recuperaron por escisión con bisturí. Se purificaron utilizando el kit de extracción *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* de Promega. Este método de purificación se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en sílica, en presencia de sales caotrópicas. Si bien en condiciones nativas los ácidos nucleicos se encuentran recubiertos de una capa hidratante, la adición de iones caotrópicos a la solución desestabiliza la capa de moléculas de agua que rodean a los ácidos nucleicos lo cual desencadena su precipitación. Bajo estas condiciones, los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílica de las columnas del kit, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes permanecen en solución y son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Para producir el desprendimiento del ADN de la columna (elución) se utiliza una solución con baja concentración de sales y ligeramente alcalina o simplemente agua. Esto permite que se restaure la capa hidratante de los ácidos nucleicos, resolubilizándolos y liberándolos así de la membrana de sílica. (Vogelstein & Gillespie, 1979).

4.10 Protocolo de ligación

En todos los casos para el protocolo de ligación se utilizaron 100 ng de vector mientras que la cantidad de inserto a utilizar se estimó mediante el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{masa del vector (ng)} \times \text{largo del inserto (pb)}}{\text{largo del vector (pb)}} \times \text{relacion} \frac{\text{Inserto}}{\text{Vector}} = \text{masa del inserto (ng)}$$

La $\text{relacion} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}}$ fue siempre de 3:1 de acuerdo a lo indicado por el proveedor de la ligasa.

Se utilizó el kit de fermentas de ligación que utiliza la ligasa del fago T4. Para la reacción se siguieron las instrucciones del fabricante. La incubación de la reacción se realizó a 15°C en un termociclador durante ON. En todos los casos de ligación se realizaron reacciones sin inserto de forma paralela como control negativo.

4.11 Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras fueron preparadas por centrifugación en gradiente de CsCl seguido de una diálisis contra buffer SM.

El siguiente protocolo fue realizado y enviado por nuestros colaboradores del laboratorio del Dr. Martin Loessner del ETH-Zurich:

A partir de la suspensión de fagos (título de entre 10^{11} a 10^{12} pfu/ml) se realizó una tinción negativa con 2% acetato de uranilo, pH 8,0 por 20 segundos en grillas de cobre cubiertas de carbono (Quantifoil®).

Se observó en un dispositivo Hitachi HT 7700 equipado con una cámara CCD de 8 Mp AMT XR81B enfriada por celdas peltier.

4.12 Análisis de secuencias

Los análisis de las secuencias de ADN utilizadas fueron realizados con el programa de código abierto ApE, A plasmid Editor (disponible en <http://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>).

Los esquemas para visualizar los fragmentos de ADN utilizados fueron realizados el programa SnapGene viewer (GSL Biotech; disponible en <https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>)

ANEXO: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

MRS caldo(Biokar Diagnostic)	Peptona de caseína 19g/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 1g/L, acetato de sodio 5 g/L, sulfato de magnesio 0,2 g/L, sulfato de manganeso 0,04 g/L.
MRS protegido (Biokar Diagnostic)	MRS, 0,6M sacarosa, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂
MRS agar (Biokar Diagnostic)	MRS, 1,5% agar.
MRS agar protegido (Biokar Diagnostic)	MRS, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 0.6M Sacarosa , 1,5% agar.
MRS top agar	MRS, 0,75% agar
LB caldo	Triptona 10 g/L, Cloruro de Sodio 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L
LB Agar	LB caldo, 1,5% agar.
MRS top agar protegido	MRS, 0,3M sacarosa, 0,5% agar.
Buffer de fago	10 mM Tris HCl 20 pH 7,5, 100mM NaCl , 10 mM MgSO ₄ 10mM, 10 mM CaCl ₂ . Autoclavar por separado y luego mezclar
Buffer para electroforesis en geles de agarosa (Tris-Acetato-EDTA)	40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0
Buffer TE pH8	10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, pH 8,0
Buffer de protoplastización	0,5M Sacarosa, 10mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-HCl, pH 7

El solvente utilizado fue siempre H₂O Milli-Q o doble destilada a menos que se indique lo contrario.

Resultados

Capítulo 1: producción y transformación de protoplastos con DNA viral

Considerando que la hipótesis original de trabajo se basó en adaptar la metodología BRED para su empleo en la modificación de genomas de fagos de *Lactobacillus*, el primer paso clave fue evaluar la transformación de *Lactobacillus casei* con ADN del fago J-1 y la posterior recuperación de partículas virales. En esta técnica, luego de inducir las funciones de *recombineering* en la bacteria por el tiempo adecuado, se preparan células electrocompetentes que son co-electroporadas con ADN del fago y el sustrato de intercambio alélico.

Considerando que la electroporación como metodología para la transformación con ADN de fago es altamente ineficiente (Palomino et al., 2019), se decidió evaluar la transformación de protoplastos como técnica que permita una eficiente incorporación de ADN de alto peso molecular en *Lactobacillus*.

Capítulo 1.1: Optimización del protocolo de preparación de protoplastos

Basándonos en un protocolo desarrollado en el laboratorio para la preparación de protoplastos de *L. casei* BL23 (cita libro) en este trabajo se optimizaron las condiciones para mejorar su eficiencia minimizando a su vez el número de componentes empleados. Se partió siempre de cultivos frescos y crecidos toda la noche en un medio con altas concentraciones de cloruro de sodio, lo cual fragiliza la pared de estas bacterias (M. Piuri, Sanchez-Rivas, & Ruzal, 2005a). En primera instancia, se buscó evaluar si todos los componentes utilizados en el buffer de protoplastización eran necesarios. Así, se formuló un nuevo buffer de protoplastización mínimo (Tabla 4).

Tabla 4: comparación entre componentes del buffer original y el reducido.

Buffer original	Buffer mínimo
0.02M maleato de sodio (pH 6.5)	Tris-HCl (pH 6.8)
10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂
10 mM CaCl ₂	0,5 M Sacarosa
0,5 M Sacarosa	
0.2%Glicin-betaina	

Como se ve en la Tabla 4, se removieron de la composición original a la glicin-betaína, que actuaba como osmoprotector adicional, y al CaCl_2 . Se realizó el protocolo nuevamente, pero usando en la etapa de protoplastización al nuevo buffer y se hallaron resultados idénticos. De este modo, de allí en más se procedió a utilizar este nuevo buffer con componentes mínimos.

En segunda instancia, se intentó ajustar la cantidad de enzimas tal que permitieran obtener un porcentaje alto (>80%) de bacterias protoplastizadas en un lapso aproximado de 1-2 horas, que es el tiempo que tardarían en expresarse los genes de *recombineering* en *L. casei* BL23 (Xin et al., 2017). Se probaron, de este modo, distintas concentraciones de lisozima en este nuevo buffer. Se evaluó la eficiencia de protoplastización como la fracción de las células por campo que se observaban esféricas (debido a la fragilización o ausencia de pared) sobre el total de células de cada campo. En la Figura 7 (A) se observan las células sin tratar y en la (B) se pueden ver un campo representativo del tratamiento con 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisozima para un $\Delta t=2,5\text{hs}$.

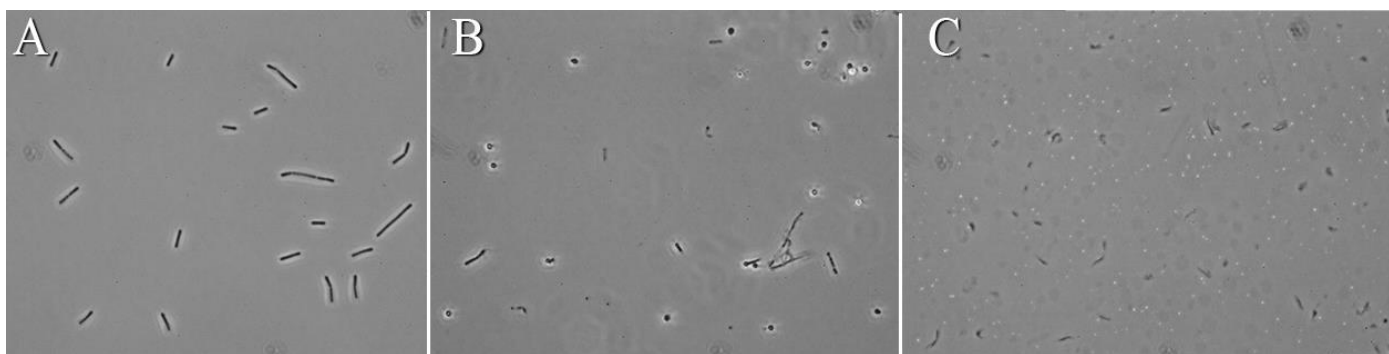


Figura 7: Fotografías de campo claro de *L. casei* BL23 en distintas etapas del proceso de protoplastización. (A): Bacilos sin tratamiento. (B): Campo representativo del tratamiento con 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisozima para un $\Delta t=2,5\text{hs}$. (C): Campo representativo del tratamiento con 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisozima para un $\Delta t=18\text{hs}$ (ON).

Como se observa en la Figura 8, la fracción de protoplastización crece con la concentración de enzima utilizada y con el tiempo. Se evaluaron distintos tiempos de incubación para compararlo con el protocolo previo porque, si bien el objetivo de este trabajo es obtener los protoplastos en el lapso necesario para que se expresen las funciones de *recombineering*, los protoplastos pueden usarse con otros fines para los cuales el tiempo no es determinante (ver sección 1.3 más adelante). Cabe destacar que, para la máxima concentración, el punto evaluado a las 18hs (ON) presentó un alto grado de células lisadas (Figura 7 (C))

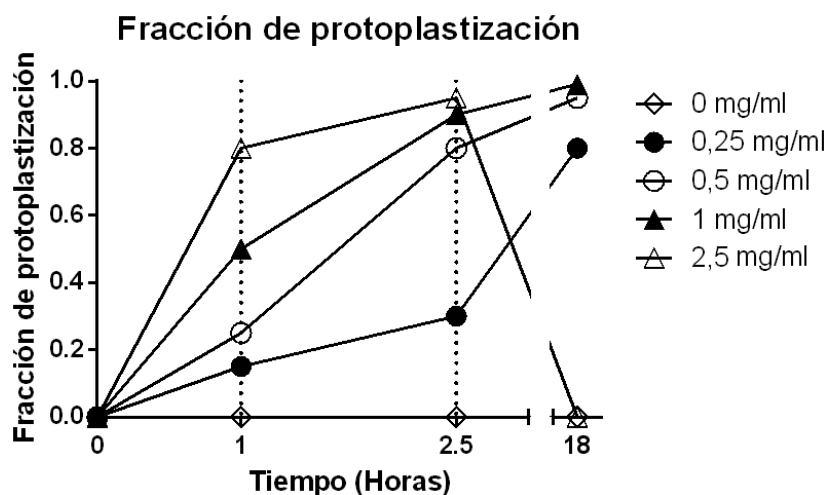


Figura 8: Fracción de protoplastización para tratamientos con la concentración de lisozima indicada en la leyenda. El buffer utilizado fue el mínimo y la concentración de mutanolisina y el resto de los componentes se mantuvieron constantes (ver sección de Materiales y Métodos)

Capítulo 1.2: transfección con el DNA de J-1

Con el protocolo de protoplastización puesto a punto, se procedió a realizar los ensayos de transfección con el ADN purificado del bacteriófago J-1. A partir de un ensayo no publicado del laboratorio realizado con el ADN del fago PL-1 se contaba con tiempos y masas aproximados para este experimento. Se comenzó evaluando la transformación con 500ng de ADN, como se había probado con anterioridad para el fago PL-1. Luego de la transformación, los protoplastos se recuperaron por distintos tiempos en medio protegido y las alícuotas correspondientes se plaquearon en un ensayo de centros infecciosos empleando *L. casei* BL23 como bacteria indicadora. Hallando un resultado exitoso en la producción de playas de lisis indistinguibles de las producidas por una infección convencional (ver Figura 9)), se procedió a repetir el experimento con cantidades decrecientes de ADN. El objetivo fue evaluar no sólo el comportamiento del sistema sino determinar la eficiencia de la transformación y posterior producción de progenie viral (UFP/ μ g ADN) en los protoplastos.

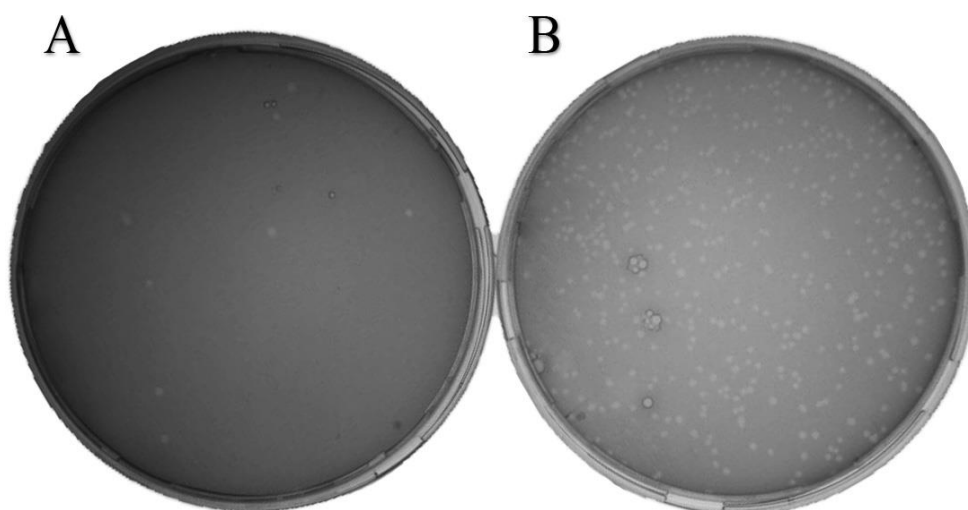


Figura 9: Fotografía representativa de playas de lisis de J-1 luego de la transformación de protoplastos de *L. casei* BL23 utilizando 250ng de ADN y tituladas en dilución 1:100 en medio protegido. (A): $\Delta t=4$ hs. (B): $\Delta t=6$ hs.

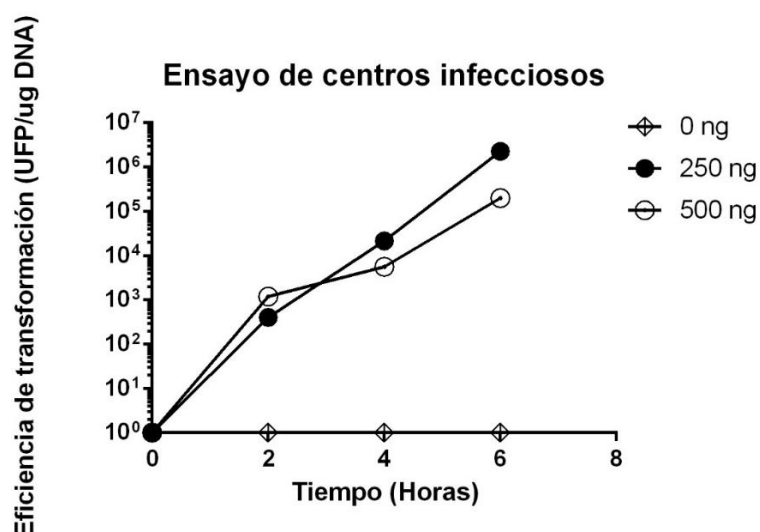


Figura 10: Eficiencia de transformación de los protoplastos con distintas cantidades de ADN de J-1 utilizadas, en función del tiempo.

En la Figura 10 se observa un claro aumento del número de playas de lisis en función del tiempo. No se observaron diferencias significativas en el número de UFPs al transformar con 250 ng y 500 ng de DNA. En un control sin agregado de ADN de fago, no se observaron playas de lisis. El ensayo debería repetirse con menores cantidades de ADN y las réplicas correspondientes para evaluar la concentración mínima de ADN requerida para recuperar partículas virales en los tiempos ensayados. En la Figura 9 se muestra una fotografía representativa de las muestras tomadas a $\Delta t=4$ hs y $\Delta t=6$ hs, tituladas en dilución 1:100.

Capítulo 1.3: transfección con el DNA de un bacteriófago novedoso.

Para evaluar esta técnica en otros fagos que infectan *L. casei*, se utilizó ADN de un fago recientemente aislado por nuestro laboratorio a partir de leche cruda sin pasteurizar. A diferencia del fago J-1, este fago presenta playas de lisis de un tamaño mucho más pequeño (*Figura 11 (A)*) pero solo ha sido caracterizado a nivel genómico y no ha sido estudiado en detalle. En este ensayo se empleó un único tiempo, $\Delta t=6\text{hs}$ desde el momento de transfección, punto en el que se realizó una titulación en placa empleando *L. casei* BL23 como bacteria indicadora.

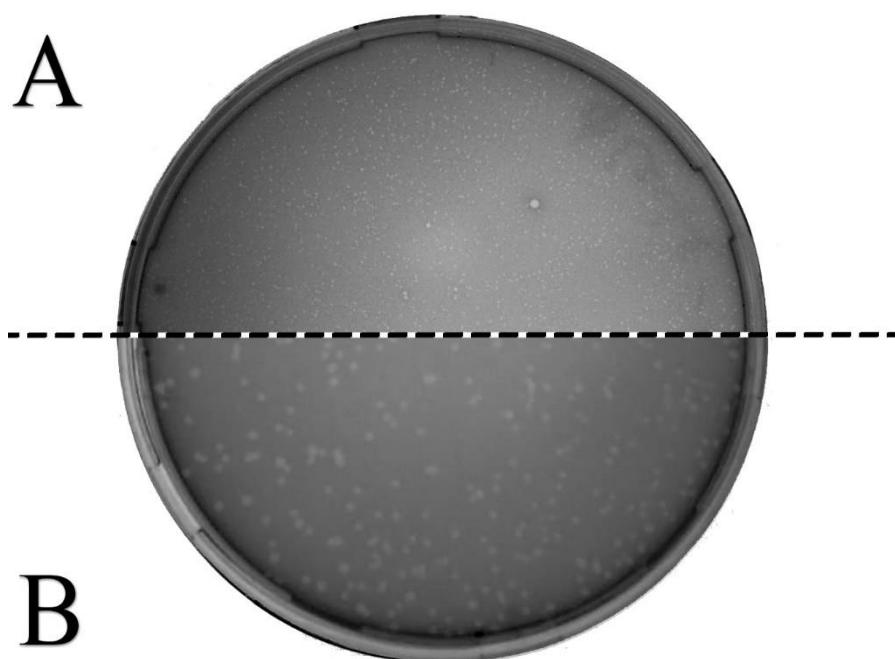


Figura 11: Fotografía de titulaciones en placa de los fagos J-1 y un fago de leche sin nombrar. (A): Playas formadas por el fago novedoso. (B): Playas formadas por el fago J-1.

Como se observa en la *Figura 11*, se logró obtener playas de lisis discretas, con forma circular y con un tamaño significativamente menor al de las producidas por el fago J-1 (*Figura 11 (B)*), validando el protocolo de transformación empleando ADN de un fago diferente.

En pos de seguir caracterizando a este nuevo fago, y en colaboración con el laboratorio del Dr. Loessner del ETH-Zurich, se logró tomar micrografías mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) que muestran la estructura del fago con una resolución en el orden de los 10nm (*Figura 12*).

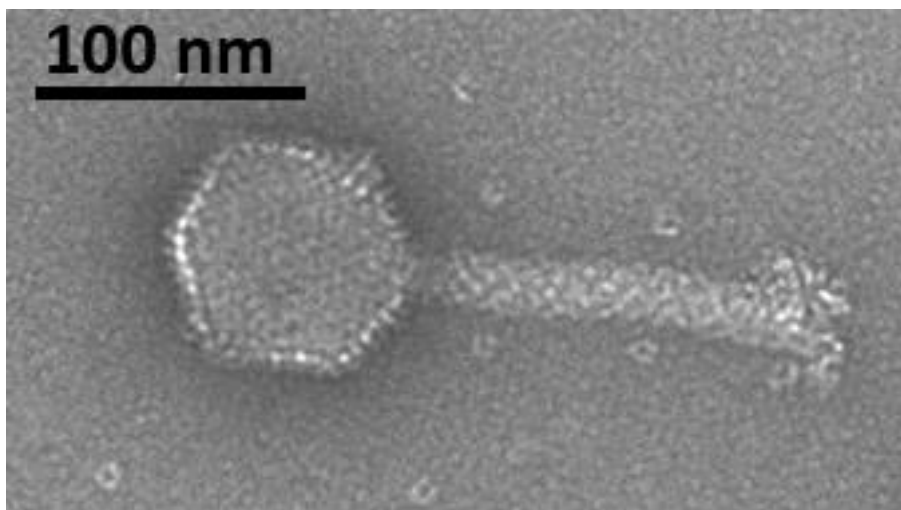


Figura 12: microscopía electrónica de transmisión tomada de una suspensión del nuevo bacteriófago aislado.

En la *Figura 12* se observa la cabeza icosaédrica del fago, una cola larga que muestra que no pertenece a la familia *Podoviridae* y una placa base compleja. En otras imágenes, que se reservan para su publicación, se observa la cola contraída dejando en claro que este fago pertenece a la familia *Myoviridae*.

Con la técnica validada, puesta a punto y su robustez demostrada, se procedió a intentar clonar los genes de *recombineering* del profago PLE3 de *L. casei* BL23 en un vector inducible para ser usado para la modificación genética de fagos regenerados en protoplastos.

Capítulo 2: clonado de los genes de *recombineering* en un vector inducible de *Lactobacillus casei*

En el año 2017, Xin et al. describieron la construcción de un vector inducible conteniendo los genes LCABL_13040-50-60, parte del genoma del profago PLE3, que presentan homología con las proteínas Exo, Beta y Gam del sistema lambda Red de *recombineering* en *E. Coli*, (Xin et al., 2017). En el mismo trabajo, demostraron la funcionalidad de este sistema para la construcción de mutantes en *L. casei* BL23. Tras repetidos intentos de solicitar este vector sin respuesta alguna, se decidió para poder avanzar en los objetivos de esta tesis realizar la construcción de este vector empleando como base el pMSP3535 que se obtuvo de un repositorio de plásmidos (Bryan, Bae, Kleerebezem, & Dunny, 2000) para poder contar con esa herramienta a la hora de manipular genéticamente al bacteriófago J-1.

Capítulo 2.1: análisis del vector a utilizar, diseño de primers y clonado virtual

Se comenzó realizando un análisis bioinformático de las secuencias de ADN de interés utilizando el programa libre *ApE (A Plasmid Editor)*. El plásmido utilizado a lo largo de este trabajo, el pMSP3535, se puede ver esquematizado en la *Figura 13*. Este plásmido utiliza una versión del sistema de expresión NiCE, del inglés **N**isin **C**ontrolled gene **E**xpression, que se encuentra ilustrado en la *Figura 14*. Este consiste en un promotor inducible por nisina, PnisA, y secuencias que codifican para dos proteínas, NisR y NisK, que constituyen el sistema de dos componentes y permiten sensar la presencia extracelular del inductor (la nisina) y regular la expresión desde PnisA (De Ruyter, Kuipers, & De Vos, 1996).

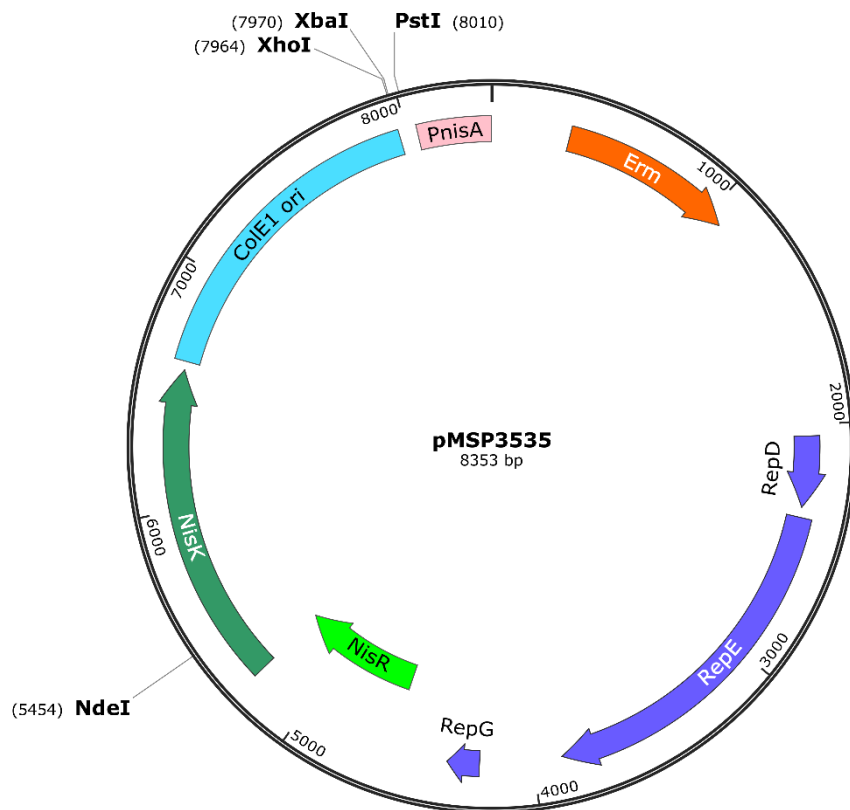


Figura 13: Mapa gráfico de PMSP3535. Leyendas relevantes: *Erm*: genes de resistencia a la eritromicina; *PnisA*, *NisR*, *NisK*: descritos en el texto; *ColE1*: origen de replicación en *E. coli*; *RepD*, *RepE* y *RepG*: Genes del operón de replicación para bacterias Gram (+) *pAMB1*.

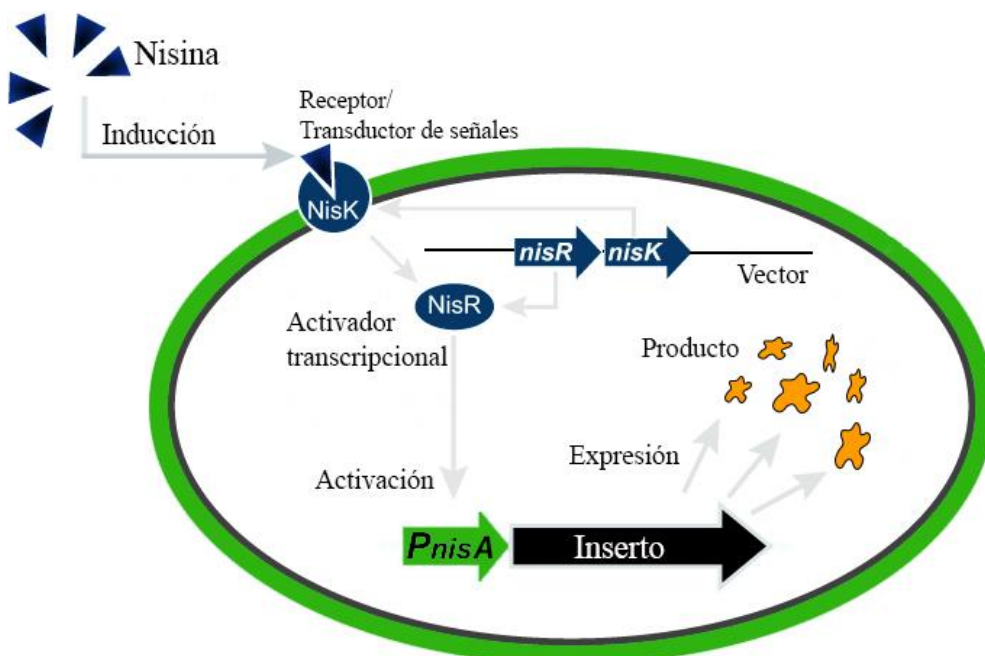


Figura 14: Modelo esquemático de la funcionalidad del sistema de expresión NiCE. Leyendas en la Figura.

Este vector posee un sitio de clonado múltiple río abajo de *PnisA*. A su vez, dentro de la secuencia reportada como *PnisA* se encuentra el codón de inicio de la nisina y la región amino

terminal de este péptido. En la conclusión del paper original (Bryan et al., 2000) sugieren añadir un codón STOP en el 5' terminal del primer a utilizar para evitar una posible fusión traduccional con este péptido.

En línea con lo concluido en el trabajo original de Dunny, desde Addgene sugieren añadir un codón STOP previo al gen de la proteína que se quiera expresar. En contraposición con esto, durante el análisis de la secuencia del pMSP3535 depositada en este repositorio, se observó que había una inserción de 4 nucleótidos (no descrita en el paper de Dunny et al) previa al sitio múltiple de clonado que generaba un codón STOP prematuro. Un análisis más preciso indicó que esto hacía que la adición de un STOP sólo fuera necesaria si se usaran ciertas enzimas de clonado que se encuentren al comienzo del sitio de clonado múltiple. Como se ve en la *Figura 15 (B)*, al realizar el clonado usando la enzima PstI, se mantiene el codón STOP y se evita la fusión traduccional del péptido con el inserto.

En la *Figura 15 (A)* se presenta un esquema del clonado virtual realizado. Dentro de la secuencia reportada como PnisA se encuentra el fragmento de la nisina reportado por Dunny, que finaliza en el sitio de clonado múltiple como se mencionó anteriormente. Se marcan las secuencias -35 y -10, las zonas de hibridación de los primers utilizados para el clonado y el operón que contiene a los genes LCABL_13040-50-60 del genoma de PLE3 anotados por Dieterle et al (2016). Cada gen del operón se encuentra rotulado individualmente según la función que cumple usando las proteínas del sistema Redλ como referencia.

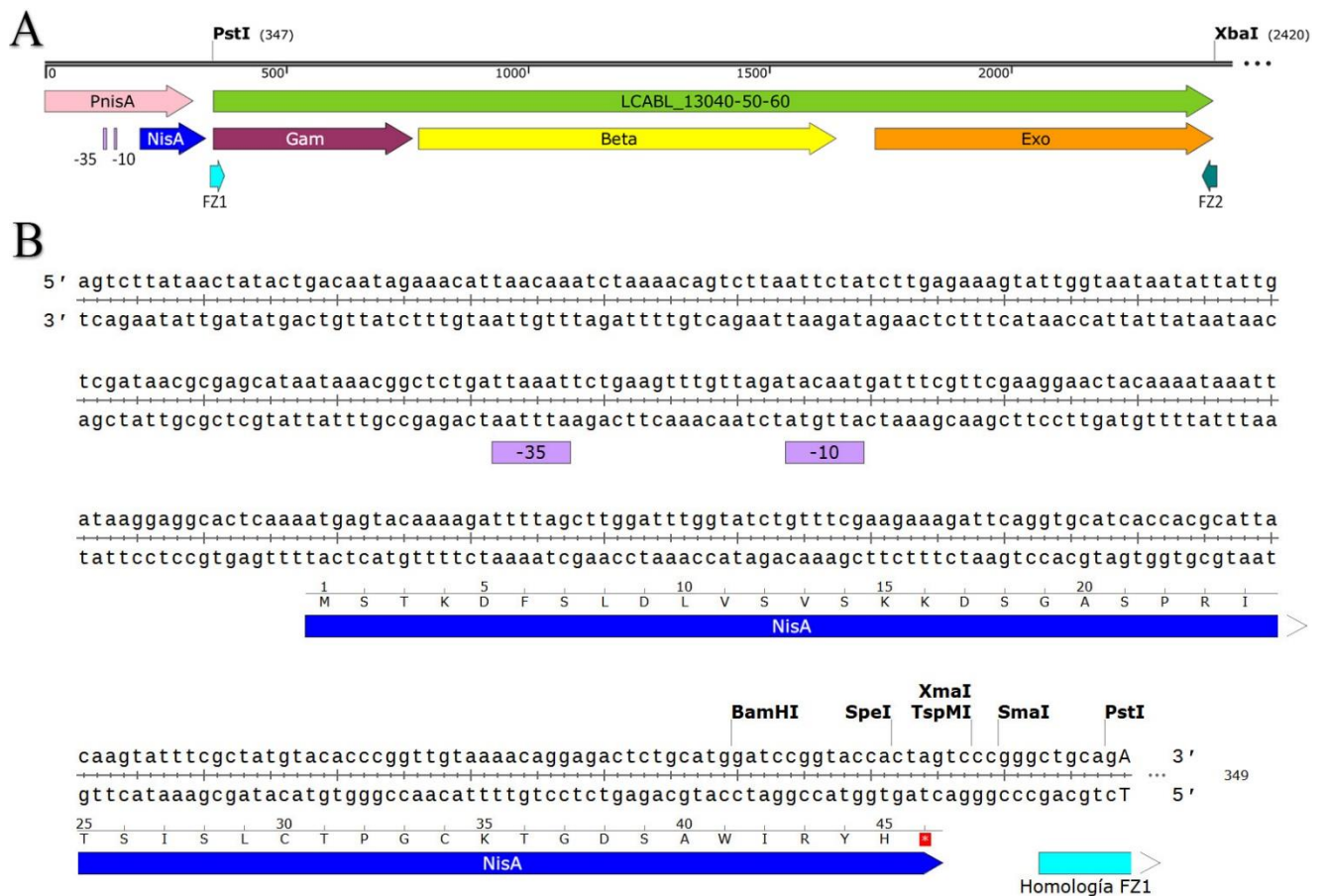


Figura 15: Promotor *PnisA* de *pMSP3535* con operón *LCABL_13040-50-60*. (A): Esquema del clonado virtual del operón *LCABL_13040-50-60* bajo la regulación del promotor *PnisA* en el plásmido *pMSP3535*. Leyendas en la Figura. (B): Detalle de la secuencia del promotor, desde su inicio hasta la región 5' de la zona de homología del primer fw FZ1. En azul se marca la región que codifica para el N-terminal de la nisina, con la traducción en código de aminoácidos de letra única.

Capítulo 2.2: Amplificación de los genes de *recombineering*

Utilizando el DNA genómico de *L. casei* BL23 como templado, se realizó una PCR con los primers FZ1 y FZ2 (ver Tabla 1, Materiales y métodos pág. 30) que amplifican los genes *LCABL_13040-50-60*. El producto de la PCR se corrió en un gel de agarosa 1% en el cual se observó una banda del tamaño esperado en la reacción con templado frente a la ausencia total de banda en el control sin templado (*Figura 16*).

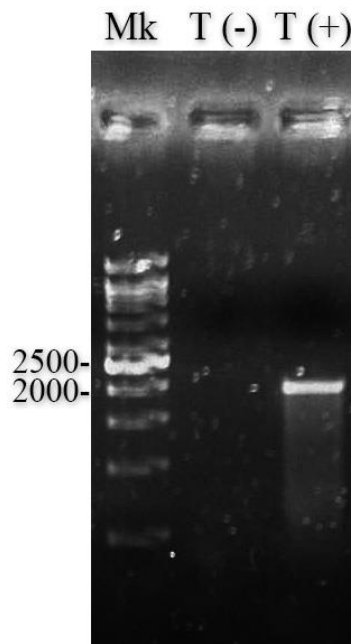


Figura 16: Amplificación por PCR de los genes de recombineering de PLE3. Mk: Ladder de peso molecular, bandas señaladas indican peso en pares de bases. T (-): Control negativo de la PCR sin templado. T (+): PCR con templado.

Capítulo 2.3: Procesamiento de pMSP3535 y del amplicón de genes de *recombineering*.

Con el fin de preparar tanto al vector como al inserto para la reacción de ligación, se realizó una restricción con las enzimas PstI y XbaI con el fin de poder insertar el fragmento en la orientación deseada. Previamente el corte de cada una de las enzimas por separado había sido evaluado (datos no mostrados).

Pasado el tiempo de reacción adecuado, el plásmido digerido se corrió en un gel de agarosa 0,7% con el fin de purificar el producto de la restricción y aislarlo de potenciales residuos del vector sin cortar. Se sembró la mayor parte del volumen de reacción en una calle y una pequeña porción en la calle contigua. De este modo, fue posible marcar en el gel la zona de escisión usando el transiluminador y mirando la calle de poca masa sin irradiar la de más masa, que es la que fue usada para seguir con el protocolo.

Con el fragmento del gel extraído y el producto de PCR cortado con las mismas enzimas de restricción, se procedió a purificarlos mediante el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up. Tras cuantificar los productos de la purificación, se ligó inserto y vector en relación 3:1. Como control de religado se utilizó una mezcla de reacción idéntica a la cual no se le agregó inserto.

Capítulo 2.4: Transformación de *E. coli* competentes y observación de los productos de ligado.

Los productos de ligado se utilizaron para electroporar bacterias *E. coli* Top10 electrocompetentes. Para cada ligada se utilizó la mayor masa de DNA posible sin que esta produjera un arco eléctrico durante la transformación. Luego de recuperar, las bacterias se plaquearon en medio de selección.

No observando colonias pasadas las 48hs, se volvió a repetir la transformación y plaqueo en medio de selección, seguida de la incubación a 37°C. Nuevamente no presentando crecimiento, se dejaron las placas en mesada a temperatura ambiente. 24 hs más tarde se comenzaron a observar colonias individuales de tamaño reducido en la placa de la ligada mas no así en la del control, indicando una potencial transformación exitosa.

Para verificar si las colonias poseían efectivamente el plásmido con el inserto, se tomaron anzadas de distintas colonias con las cuales se realizaron PCRs de colonia (*colony PCR*) usando como primers FZ1 y FZ2. Como control negativo se utilizó como templado al plásmido vacío y como control positivo se utilizó el genoma de *L. casei* BL23 a partir del cual se habían obtenido previamente los genes en cuestión. Los productos se corrieron en gel de agarosa 1% (Figura 17).

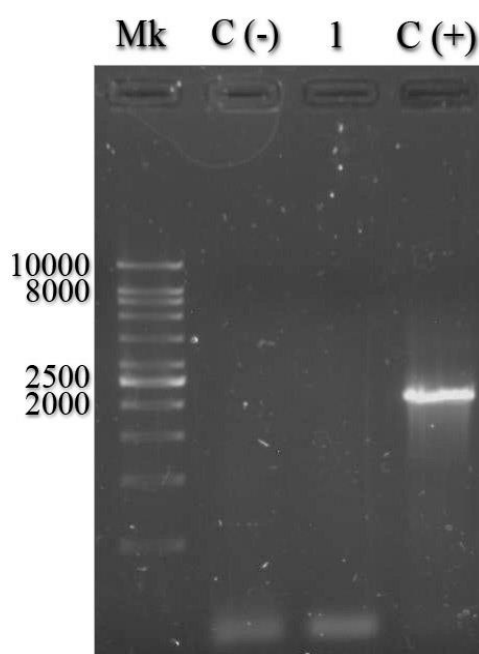


Figura 17: Amplificación por PCR de colonias de *E. coli* presuntamente transformadas con pMSP3535::LCABL_13040-50-60. Mk: marcador de peso molecular. C (-): control positivo de la PCR. 1: Producto de ColonyPCR de una colonia discreta tomada al azar. C (+): Control negativo de la PCR.

Al ser el resultado idéntico al control negativo, se concluyó que las colonias evaluadas no poseían el inserto. Se especuló con un posible religado del vector.

Teniendo en cuenta esta hipótesis, se repitió el protocolo descrito, con dos modificaciones: por un lado, se añadió un paso de tratamiento con fosfatasa alcalina sobre el vector vacío luego del corte con enzimas de restricción. Por otro, se cambió la cepa de clonado por *E. coli* HB101, una cepa que carece de resolvasa y es menos recombinogénica.

De la repetición del experimento con este paso adicional se observaron, al cabo de 48hs de incubación a 37°C y 2 días a temperatura ambiente, colonias discretas en las placas de la ligada y ninguna colonia en el control de religado. De la placa de ligada se repicaron 6 colonias al azar, las cuales fueron utilizadas para inocular medio líquido y para estriar nuevas placas en presencia de Eritromicina. Se tomaron 2 cultivos al azar y de estos se realizó una miniprep para extraer DNA plasmídico. Los plásmidos fueron sembrados en un gel de agarosa 1%, sometidos a electroforesis y observados al UV (Figura 18).

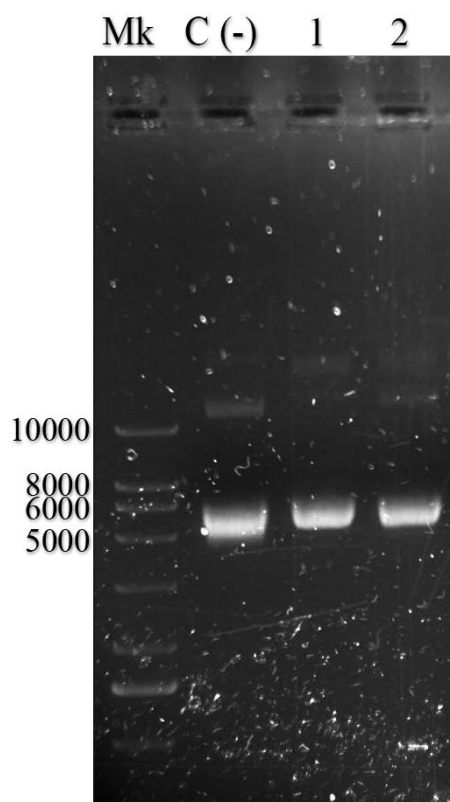


Figura 18: DNA plasmídico obtenido de la miniprep de dos clones de *E. coli* presuntamente transformadas con *Pmsp3535::LCABL_13040-50-60*. Mk: marcador de peso molecular. C(-): *pMSP3535* sin inserto como control negativo. 1: DNA plasmídico extraído del clon 1. 2: DNA plasmídico extraído del clon 2.

En la *Figura 18* se observa que ambos plásmidos extraídos de clones que potencialmente habían incorporado el inserto presentaban una movilidad retardada comparada con el plásmido vacío, indicando un mayor peso molecular.

Capítulo 2.5: Evaluación de la presencia de los genes de *recombineering*.

Con esta evidencia, se realizó una restricción de estos plásmidos usando las mismas enzimas utilizadas en el clonado para evaluar si se liberaba un fragmento del tamaño del inserto. Tras correr en agarosa 1% se observó la imagen de *Figura 19*.

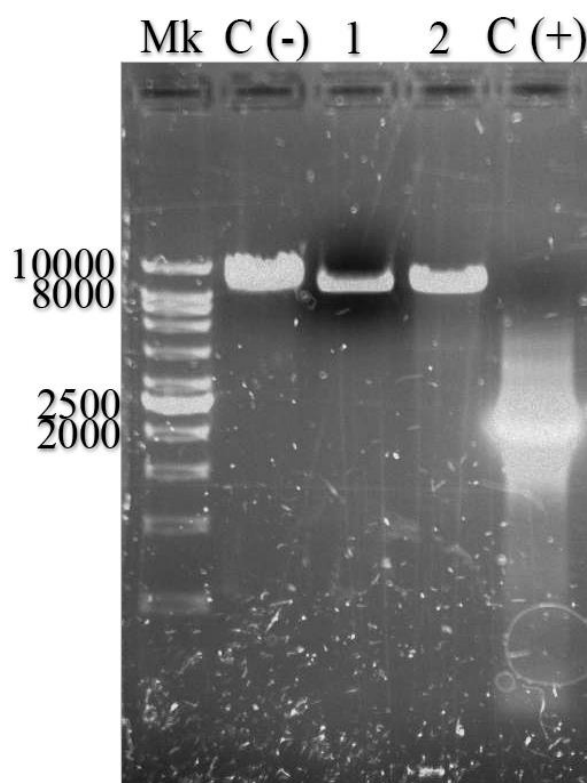


Figura 19: DNA plasmídico obtenido de la miniprep de dos clones de E. coli presuntamente transformadas con pMSP3535:: LCABL_13040-50-60 . Mk: marcador de peso molecular. C(-): pMSP3535 sin inserto cortado con PstI y XbaI como control negativo. 1: DNA plasmídico extraído del clon 1 cortado con PstI y XbaI. 2: DNA plasmídico extraído del clon 2 cortado con PstI y XbaI. C(+): Producto de PCR de los genes de recombineering del genoma de BL23 usado como control positivo del fragmento liberado esperado.

En la *Figura 19* se observa que los vectores que se pensaba poseían el inserto no lo liberaban tras ser digeridos con las enzimas utilizadas para el clonado. Esto sugiere fuertemente la ausencia del mismo, pero llamativamente se observa una movilidad levemente mayor que el control negativo.

Para determinar por otra vía la presencia del inserto, se realizó una PCR de los genes de *recombineering* usando plásmidos extraídos de un número mayor de clones como templado. En ninguno de los clones analizados se observó una banda del tamaño esperado (2kb).

A partir de resultados de los dos últimos experimentos, que indican que el DNA plasmídico extraído no posee el inserto de interés y su masa difiere ligeramente de la del plásmido vacío, se especula que pueden haberse producido rearrreglos indeseados del plásmido por una posible expresión “*leaky*” de los genes que codifican las funciones de *recombineering*.

Debido a los frustrados intentos de clonado de los genes que codifican para las funciones de *recombineering* provenientes del profago PLE3 en el vector pMSP3535 y para comprobar la funcionalidad del vector empleado se procedió al clonado de un gen diferente como control. Para ello se eligió una versión de mCherry con codones optimizados para su expresión en BAL (García-Cayuela et al., 2012).

Capítulo 3: clonado del gen *mrfp* en un vector de expresión inducible en *Lactobacillus casei*.

Para realizar distintos ensayos, nuestro laboratorio requería una cepa de *L. casei* BL23 capaz de expresar una proteína fluorescente. Con anterioridad se había intentado generar una cepa expresando mCherry bajo la regulación de un promotor fuerte y constitutivo pero lamentablemente, su expresión resultó tóxica para el organismo y no pudo ser utilizada. Es así que el clonado de mCherry cumple un doble propósito: por un lado, actuar como control positivo para la funcionalidad del pMSP3535 en este sistema. Por otro, la producción de una cepa de *L. casei* BL23 capaz de expresar una proteína fluorescente de manera inducible y controlada sin alterar la viabilidad de la bacteria.

Capítulo 3.1: Caracterización del gen *mrfp* de la proteína mCherry desde el pTLGR y clonado virtual en el vector pMSP3535.

Para realizar este clonado se partió del plásmido de expresión pAKmRFPGFP, también denominado pTLGR (*Figura 20*), que posee versiones tanto de GFP como de mCherry que están optimizadas en su uso de codones para BALs y en medios con pH ácidos. Este vector se utilizó como templado de PCR para amplificar el gen *mrfp*, que codifica para la proteína monomérica mCherry, que será clonado bajo control del promotor pNisA en el pMSP3535.

Como no era posible realizar un subclonado desde pTLGR a pMSP3535, se diseñaron cebadores que contuviesen las enzimas de restricción deseadas y unas pocas pares de bases extra río arriba de la zona de corte. En la *Figura 21* se observa el clonado virtual que se esperaba obtener. Este se realizó de manera muy similar al del capítulo anterior. Se repitió el uso de la enzima PstI para el primer *forward* (CD1), pero se cambió la enzima utilizada en el primer *reverse* (PD2) a XhoI.

.

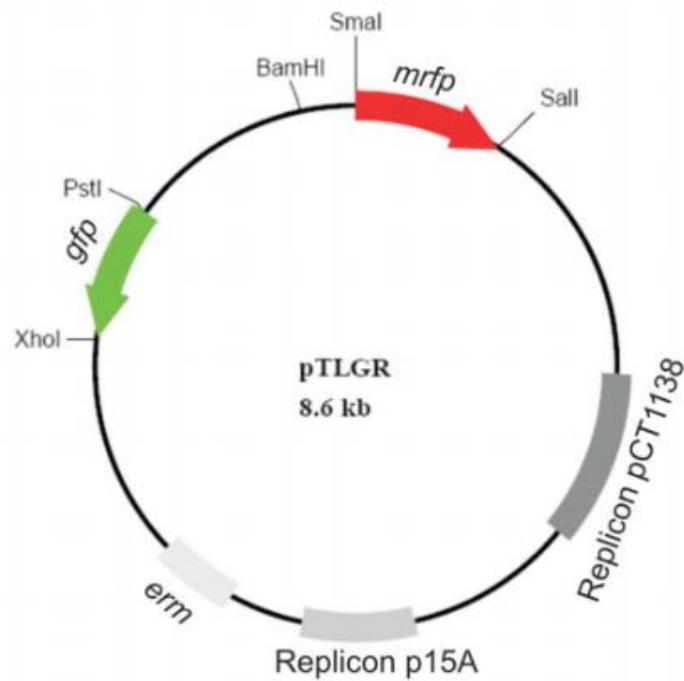
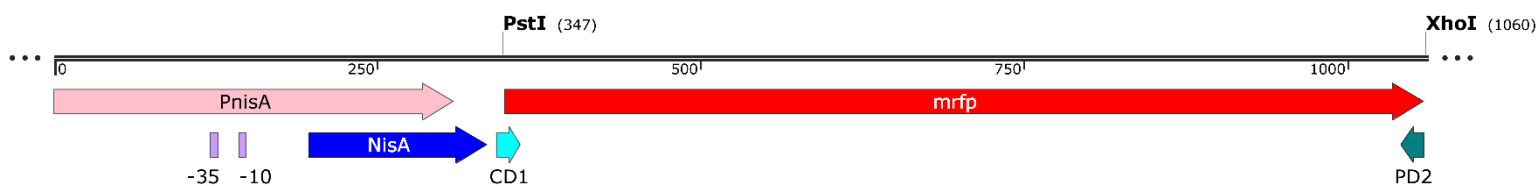


Figura 20: Mapa gráfico del plásmido pTLGr. Leyendas en la Figura.

El objetivo primario al realizar esta construcción fue evaluar la funcionalidad del pMSP3535 en *L. casei* BL23, asumiendo que la dificultad de clonado descrita anteriormente pudiera deberse a un rearrreglo en el plásmido presuntamente promovido por una expresión *leaky* de las funciones de *recombineering* en *E. coli*. De este modo se intentó evaluar el comportamiento del pMSP3535 con un inserto más simple: el gen *mrfp*, presente en pTLGR, que codifica para la proteína fluorescente monomérica mCherry y cuya expresión fue reportada exitosamente en



bacterias Gram + incluidas otras BALs (García-Cayuela et al., 2012).

Figura 21: Esquema del clonado virtual del gen *mrfp* bajo la regulación del promotor *PnisA* en el plásmido pMSP3535. Leyendas en la Figura.

Capítulo 3.2: Amplificación del gen *mrfp* mediante PCR.

Se utilizaron los primers CD1 y PD2 (ver Tabla 1, Materiales y Métodos, página 30) para amplificar el gen que codifica para mCherry desde el plásmido pTLGR. En primera instancia, se realizó una PCR con las dos ADN-polimerasas que posee el laboratorio para evaluar si se lograba amplificar el fragmento de interés utilizando pTLGR como templado.

En la *Figura 22* se observa que, si bien ambas enzimas amplificaron el fragmento de interés, la eficiencia de la enzima GoTaq es significativamente mayor a la de la enzima PFU. Considerando el tamaño del inserto, se decidió proseguir utilizando la enzima GoTaq.

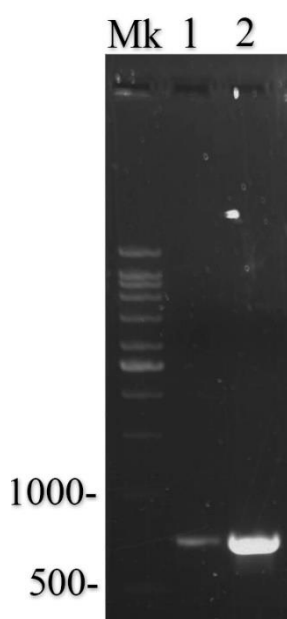


Figura 22: Producto de PCR del gen mrfp de pTLGR. Calle MK: Ladder de peso molecular. Calle 1: Producto de PCR obtenido con la enzima PFU. Calle 2: Producto de PCR obtenido con la enzima GoTaq.

Capítulo 3.3: Clonado del gen *mrfp* en pMSP3535.

El procedimiento de clonado fue idéntico al utilizado en el capítulo X.2, agregando el paso de fosfatasa descrito en el capítulo X.3. Las enzimas utilizadas en este caso fueron *PstI* y *XhoI*.

Tras ligar, amplificar en *E. coli* HB101, plaquear en medio de selección y extraer DNA plasmídico de los clones obtenidos, se realizaron dos ensayos para evaluar la presencia del inserto. Por un lado, se realizó una PCR que permite amplificar el inserto (*Figura 23*).

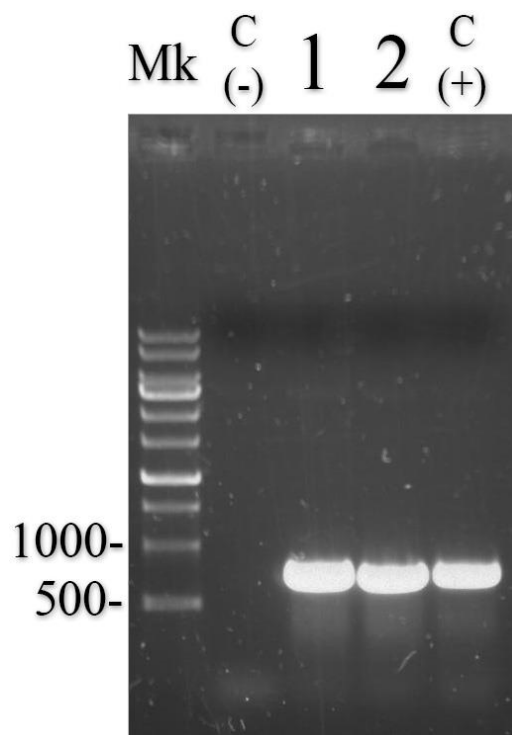


Figura 23: Producto de PCR de mrfp desde los plásmidos purificados a partir de las colonias transformadas. Calle MK: Ladder de peso molecular. Calle C (-): Control negativo de la PCR usando vector vacío como templado. Calle 1: Producto de PCR obtenido a partir del plásmido obtenido de una colonia al azar, colonia 1. Calle 2: Producto de PCR obtenido a partir del plásmido obtenido de una colonia al azar, colonia 2. Calle C (+): Control positivo de la PCR usando como templado al pTLGR.

Como se ve en la *Figura 23*, el control negativo solamente muestra apenas una amplificación inespecífica de muy bajo peso molecular. Por otro lado, en las calles 1 y 2 se observan bandas idénticas a las del control positivo, indicando la presencia del inserto en los plásmidos extraídos.

Por otro lado, para validar este resultado, se realizó un mapeo por restricción del plásmido usando tanto las enzimas del clonado (*PstI* y *XhoI*) como una enzima que tendría un solo sitio de corte en el plásmido vacío y dos sitios en el plásmido con el inserto (*NdeI*). Como producto de esta última reacción se esperaría ver un fragmento de 3159 pb y otro de 5869 pb. Se trató tanto al plásmido vacío como a los dos candidatos de clonados exitosos y se los corrió en un gel de agarosa 1%, obteniéndose los resultados que se muestran en la *Figura 24*.

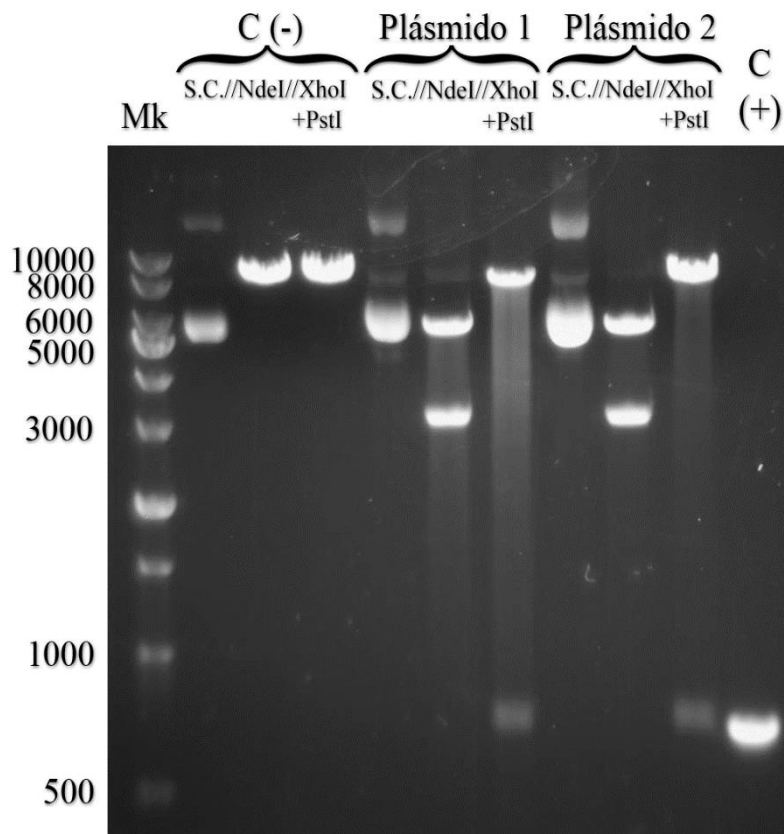


Figura 24: Mapeo por restricción de los plásmidos candidatos a un clonado exitoso. Calle Mk: marcador de peso molecular. C (-): Control negativo del clonado usando el plásmido pMSP3535 vacío. Calles Plásmido 1: Tratamientos realizados sobre el plásmido 1. Plásmido 2: Tratamientos realizados sobre el plásmido 2. C (+): Control positivo usando producto de PCR de *mrfp* desde pTLGR. Calles S.C.: Plásmido sin tratamiento. Calles NdeI: Plásmido tratado con NdeI. Calles XhoI+PstI: Plásmido tratado con XhoI y PstI. Números a la izquierda: Referencias de peso molecular en pb.

Como se puede observar en la Figura 24, ambos plásmidos presentan patrones de restricción idénticos con lo cual se analizan sin distinción. En la calle tratada con la enzima *NdeI* se observan dos fragmentos, uno de casi 6 kb y otro de poco más de 3kb, lo cual coincide con lo esperado. Esto difiere de lo observado en el control negativo que, al tener un solo sitio de corte para esta enzima, solamente se linealiza y no libera ningún fragmento.

En la calle tratada con las enzimas de clonado se ve de manera muy clara la liberación de un fragmento de entre 500 pb y 1000 pb, lo cual coincide con lo esperado para el fragmento y corre de manera casi idéntica al control positivo, el producto de PCR de ese gen. Se especula que la variación en las distancias de corrida observadas se deba a la diferencia de masas sembradas. A su vez este resultado es diferente a la calle correspondiente al control negativo que no presenta bandas porque fue cortada en la zona de clonado múltiple, liberando un fragmento de pocas pb.

Habiendo validado el éxito del clonado, se denominó a este nuevo plásmido pMSP3535R. Con este se procedió a transformar a la cepa de interés de este trabajo, *Lactobacillus casei* BL23.

Capítulo 3.4: Transformación de *L. casei* BL23 con el plásmido pMSP3535R.

Se transformaron *L. casei* BL23 electrocompetentes con el pMSP3535R, se plaquearon en medio de selección y se incubaron a 37°C. Si bien se esperaba observar colonias a las 48hs, pasado este tiempo las placas se hallaban límpidas. Se dejaron en la mesada (temperatura ambiente) y se repitió el ensayo, que produjo los mismos resultados. A los 5 días post-plaqueo para cada ensayo se observaron colonias en las placas. Se eligieron clones al azar y se repicaron en otra placa, presentando un comportamiento similar de crecimiento.

Capítulo 3.5: Expresión inducida de mCherry en *L. casei* BL23.

A partir de las cepas con una incorporación estable del plásmido, se realizaron ensayos de expresión en líquido con distintas concentraciones de nisina, el inductor. Se probaron concentraciones de nisina de 1 ng/ml, 2.5 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml y 25 ng/ml y un control sin inductor.

Se probó agregar el inductor en distintos momentos del crecimiento, encontrándose la condición óptima al inducir el cultivo a $DO_{600}=0,4$, incubando las células a 37°C y observándolas al día siguiente.

La concentración de 1 ng/ml mostró resultados idénticos al tratamiento control, presentando un bacilo fluorescente cada aproximadamente 10 campos explorados (*Figura 25 (A), (B) y (C)*). La *Figura 25 (A)* muestra un campo representativo de lo observado para estas concentraciones en una microscopía de campo claro y en fluorescencia, viéndose en la misma sólo un bacilo fluorescente de estructura conservada. Se especula con que esto se deba a la expresión de escape del promotor utilizado.

En los cultivos tratados con concentraciones de 10 ng/ml y 25 ng/ml de nisina se hallaron pocas células fluorescentes por campo, pero más que en el control, y se vieron en los cultivos bacilos formando filamentos y ciertas estructuras retorcidas, un comportamiento típico que presenta esta bacteria bajo estrés y podría deberse a un efecto tóxico de la nisina en las concentraciones empleadas.

Finalmente, para los cultivos tratados con concentraciones de 2,5 ng/ml y 5 ng/ml de nisina se observó la cantidad máxima de bacilos fluorescentes por campo, la mayoría de los cuales presentaban estructuras conservadas (*Figura 25 (D), (E) y (F)*). No se observaron grandes diferencias entre estos dos tratamientos.

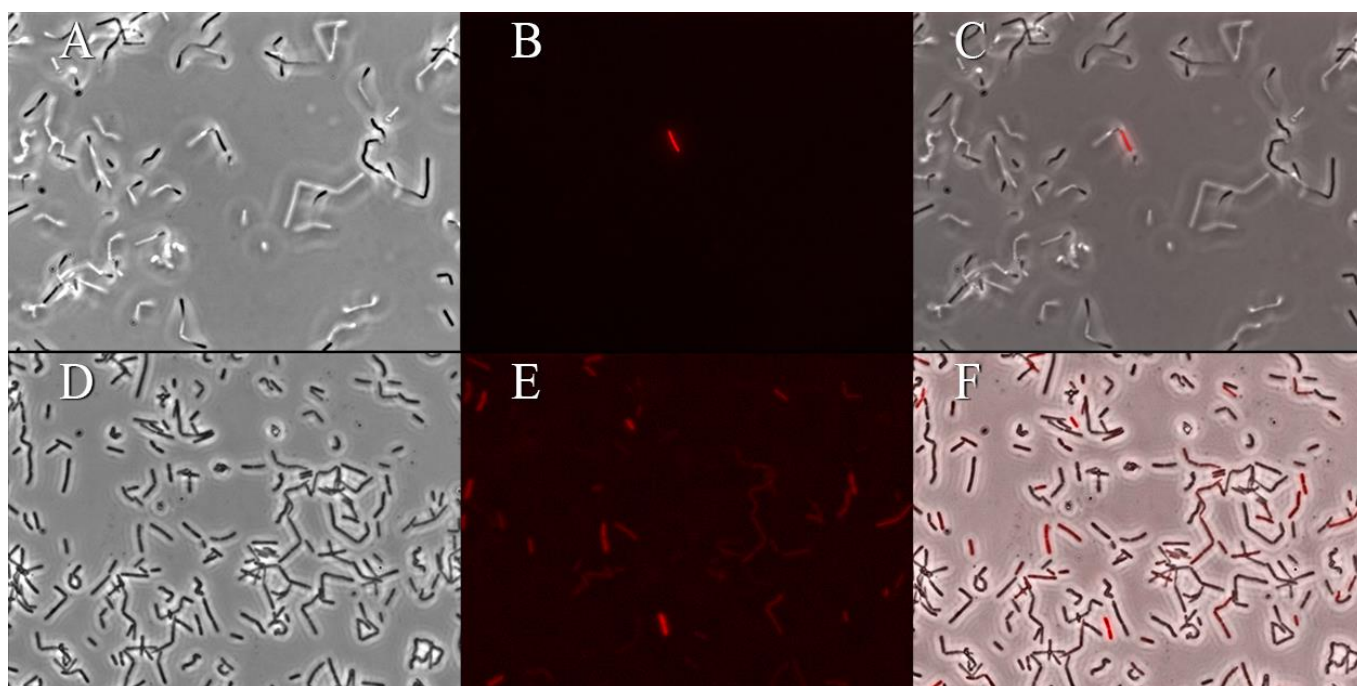


Figura 25: (A): Imagen de microscopía de campo claro de bacilos sin agregado de nisina. (B): Imagen de microscopía de fluorescencia de un bacilo sin agregado de nisina. (C): Merge de (A) y (B). (D): Imagen de microscopía de campo claro de bacilos tratados con 5 ng/ml de nisina. (E): Imagen de microscopía de fluorescencia de bacilos tratados con 5 ng/ml de nisina. (F): Merge de (D) y (E). Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 1000X y aceite de inmersión

En la *Figura 25 (D), (E) y (F)* se puede ver que una proporción significativa de los bacilos son fluorescentes, aunque la intensidad de la señal es variable. Si bien resta optimizar las condiciones para obtener una expresión más homogénea y elevada, con estos resultados queda a disposición del laboratorio una cepa de *L. casei BL23* que expresa la proteína fluorescente mCherry.

Discusión

Las bacterias ácido lácticas conforman un grupo heterogéneo de bacterias ampliamente estudiado y utilizado, entre las que se encuentran las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus spp.* Este género bacteriano despierta un gran interés tanto en la medicina como en la industria debido a su presencia natural en el organismo humano, las características probióticas de algunas cepas y su capacidad de influir en la diversidad de la microbiota intestinal (Series, 1999). En los últimos años ha cobrado relevancia la capacidad que tienen ciertas BALs de modular desde el sistema inmune hasta el estado emocional de las personas, este hecho, sumado a su condición de GRAS las ha convertido en excelentes candidatos para actuar como mecanismo de *delivery* de antígenos directamente en las mucosas de la cavidad bucal o intestinal. Hasta ahora, el mayor progreso se ha dado en *L. lactis* donde ha sido posible expresar abundantemente diferentes tipos de proteínas y dirigir su localización ya sea al citoplasma, a envolturas o al medio extracelular (Medina et al., 2008; Medina, Vintiñi, Villena, Raya, & Alvarez, 2010; Ribeiro et al., 2002; Rodríguez-Díaz et al., 2011). Sin embargo, *L. lactis* no es capaz de colonizar las cavidades orales e intestinales siendo esto una desventaja para su empleo en vacunación en particular a nivel de las mucosas donde es necesario un contacto efectivo entre el antígeno y el sistema inmune en orden de estimular una respuesta humoral y celular (Ryan, Daly, & Mills, 2001). Caso contrario, las BAL pertenecientes al género *Lactobacillus spp.* y en particular *Lactobacillus casei* son capaces de tolerar el pasaje por el tracto digestivo hasta el intestino e interactuar directamente con las mucosas del mismo. Sin embargo, hasta el día de hoy no se le ha dado la relevancia suficiente al desarrollo de herramientas para su manipulación genética y las existentes son escasas y/o dificultosas. En este contexto, el desarrollo de sistemas de expresión en cepas de *Lactobacillus spp.* es clave ya que varias cepas pertenecientes a este género presentan características probióticas que las convierten en excelentes candidatos para la expresión de proteínas de interés.

Por otro lado, la carencia de un sistema de expresión eficiente en *L. casei* BL23, empleada como modelo en el laboratorio, ha sido una limitante en la realización de estudios tanto genéticos como fisiológicos en este microorganismo. Sin esto no es posible el estudio de la expresión de genes heterólogos y sus potenciales aplicaciones que, considerando que esta especie posee la calificación GRAS, son amplias y diversas. También resulta crucial poseer esta herramienta a la hora de verificar el efecto de mutaciones deletéreas; sin la complementación de la mutación realizada no es posible afirmar que el fenotipo observado depende de esa variación genotípica.

Este trabajo de tesis surgió de la necesidad y la búsqueda de herramientas de ingeniería genética que permitiesen la manipulación de bacterias del género *Lactobacillus spp.* y los bacteriófagos que las infectan. Se basó en líneas propias del laboratorio y trabajos recientes tanto propios como externos. La utilización del vector pMSP3535 surgió a partir de un trabajo publicado por Xin et al en el 2017, este basado a su vez en un trabajo publicado por Dieterle et al. (2016). Frente a reiterados intentos de comunicación con el grupo de Xin sin recibir respuesta alguna, se procedió a intentar repetir sus resultados de manera interna para proseguir con los objetivos deseados: el uso de los genes que codifican para las funciones de *recombineering* del profago PLE3 de *L. casei* BL23 para modificar el genoma del bacteriófago J-1.

Para ello, el primer paso clave era reproducir la construcción del vector de expresión inducible que acarreara la funciones de *recombineering*. Al intentar llevar a cabo este objetivo se encontraron sucesivos obstáculos. En primer lugar, los resultados del clonado que se observan en las Figuras 18 y 19 del Capítulo 2 sugieren que, si bien las bacterias incorporaron alguna forma del plásmido y expresaron los genes de resistencia, el inserto no se encontraba presente en el mismo. Una interrogante que surgió fue si se habría logrado la correcta digestión del producto de PCR, ya que esto no puede ser corroborado con la técnica de clonado empleada. Se evalúa a futuro repetir el clonado de estos genes en un vector TOPO TA (que permite el clonado de productos de PCR), y de allí realizar un subclonado al pMSP3535, asegurándonos de este modo al menos la correcta digestión del producto de PCR. Por otro lado, en los clones analizados no sólo el inserto no se encontraba, sino que, al ser evaluados por restricción, el peso molecular de los mismos resultó menor que el del plásmido pMSP3535 empleado como control. Una de las hipótesis para explicar esto es que los genes de *recombineering* podrían haber sido efectivamente clonados y una expresión de escape de estos en *E. coli* podría haber producido un rearreglo en el plásmido. Para explorar esta hipótesis, verificar la funcionalidad del plásmido y por la necesidad de poseer en el laboratorio una cepa de *L. casei* BL23 capaz de expresar condicionalmente un fluoróforo, es que se decidió utilizar el clonado del gen *mrfp* que codifica para la proteína fluorescente mCherry (en su versión optimizada para BALs), como control del clonado.

Este control de clonado en pMSP3535 pudo realizarse exitosamente y sin inconvenientes empleando la misma metodología descrita para el clonado de los genes de *recombineering*. De esta manera se obtuvo el plásmido pMSP3535R.

Cabe destacar que durante la etapa de amplificación de pMSP3535R en *E. coli* HB101 se tomó una alícuota de las mismas para observar al microscopio; la aparición de fluorescencia podría ser indicativa de la expresión de escape de este promotor en esta bacteria. Si bien no se tomaron imágenes de lo observado y no se lo cuantificó, efectivamente se observó que una pequeña proporción de estos bacilos presentaba fluorescencia con los filtros para observar mCherry. Si bien habría que realizar ensayos más exhaustivos y precisos para evaluar la expresión de escape de este plásmido, este resultado podría avalar parcialmente la hipótesis de recombinación por expresión de escape de las funciones de *recombineering* previamente planteada. Sorprende también, entonces, que en el trabajo de Xin *et al.* no haya sido reportada ningún tipo de inestabilidad de este plásmido.

Si bien el control de clonado que dio origen a pMSP3535R resultó exitoso, presentó otro desafío: al momento de crecer *L. casei* transformadas, las bacterias presentaron un crecimiento retardado en el medio de selección a 37°C. Solo se observaron colonias luego de la transformación de *L. casei* BL23 cuando las placas se incubaron a temperatura ambiente y se observó un mejor crecimiento en medio líquido a 30°C. Se especula que esto se deba al origen de replicación para Gram+ presente en el plásmido, el pAMβ1 de *Enterococcus faecalis*, que presenta cierto grado termosensibilidad (Bruand, Le Chatelier, Ehrlich, & Janniere, 2006). Esta explicación debería ser evaluada experimentalmente en *L. casei* BL23 ya que esta respuesta termosensible sólo fue descripta para otras bacterias Gram+.

Respecto a la inducción de la fluorescencia, se probó un amplio rango de concentraciones de nisina. Para esta evaluación se partió de las concentraciones utilizadas por Bryan *et al.* (1999) en *Enterococcus faecalis* y las usadas por Xin *et al.* (2017). Como se describe en el capítulo 3 de resultados, las concentraciones mayores a los 10 ng/ml de inductor parecían resultar estresantes para las células. Recordemos que la nisina es una bacteriocina que genera poros en la membrana celular disipando el potencial de membrana y provocando la salida de diversos componentes celulares generando un consecuente daño celular. La MIC reportada para *L. casei* BL23 es de 10 µg/ml (M. Piuri, Sanchez-Rivas, & Ruzal, 2005b), por lo que en estos experimentos las concentraciones empleadas son subletales pero podrían ser optimizadas.. También, como se observa en la *Figura 25 (A, B y C)* del Capítulo 3, en lugar de presentarse una población de bacilos que expresen de manera homogénea la proteína fluorescente, se observa que sólo una proporción de estas lo hace. Se desconoce por el momento el motivo, considerando que se encuentran todas expuestas a la misma concentración de inductor. Se propone a futuro realizar una curva de crecimiento en un fluorímetro termostatzado para

distintas concentraciones del inductor, que permita encontrar la concentración óptima del mismo y caracterizar, a su vez, la cinética del proceso.

En cuanto a la formación de protoplastos, se logró efectivamente poner a punto un protocolo reducido, más económico y con una eficiencia prácticamente idéntica. En esta tesis se logró la transformación de protoplastos de *L. casei* BL23 con ADN de bacteriófago y posterior recuperación de partículas virales infectivas. Se logró demostrar la robustez del método al recuperar dos fagos completamente distintos: el fago J-1, ya ampliamente estudiado y uno novedoso, aislado en nuestro laboratorio y en proceso de caracterización

Si bien el objetivo original de nuestro trabajo era realizar ingeniería de fagos de *Lactobacillus* spp utilizando una adaptación de la metodología BRED, un trabajo publicado por Kilcher et al. durante la finalización de esta tesis logró reorientar parcialmente el futuro de este proyecto. En ese trabajo describen cómo logran recuperar distintos fagos a partir de la transformación de *L-forms* (bacterias deficientes de pared celular que son capaces de reproducirse indefinidamente sin regenerar su pared) de *Listeria monocytogenes* (Studer et al., 2016), empleando un protocolo muy similar al descrito en esta tesis, en un proceso que han denominado *rebooting* (Kilcher, Studer, Muessner, Klumpp, & Loessner, 2018). En ese mismo trabajo demostraron la capacidad de recuperar genomas de fagos que infectan otras bacterias Gram positivas en *L-forms* de *L. monocytogenes* aunque no emplearon fagos de *Lactobacillus*. Asimismo, demostraron la funcionalidad del *rebooting* al transformar con genomas sintéticos, ensamblados *in vitro* con el método de *Gibson assembly* y su aplicación para la ingeniería de genomas de bacteriófagos. A futuro, se intentará realizar el *rebooting* de fagos de BALs empleando protoplastos de *L. casei* y construyendo mediante *Gibson assembly* las mutantes de J-1 deseadas. Esta novedosa metodología tiene varias ventajas sobre el *recombineering*, a saber: es rápida, eficiente, puede introducir varios cambios en simultáneo y, principalmente, no requiere de *screening* para la identificación de los fagos mutantes ya que toda la progenie es modificada.

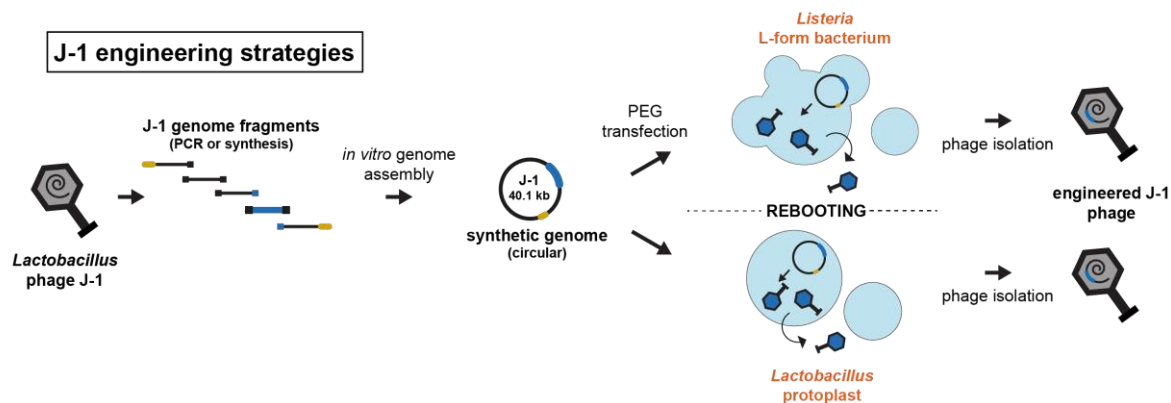


Figura 26: modelo de ensamblado *in vitro* del genoma del bacteriófago J-1 empleando *Gibson assembly* y posterior *rebooting* en *L-forms* de *L. monocytogenes* o protoplastos de *L. casei* BL23.

Nuestro laboratorio ya ha presentado un proyecto conjunto con el laboratorio del Dr. Loessner (ETH, Zurich), que permitirá complementar lo hallado en esta tesis con los amplios conocimientos en el tema que posee su laboratorio. En la Figura 26 se propone un modelo simplificado de la metodología propuesta para reemplazar la técnica de BRED para la modificación de genomas de fagos de *Lactobacillus* spp. En primer lugar, se evaluará la construcción de un genoma sintético de J-1 mediante la técnica de *Gibson assembly* y posterior *rebooting* para la regeneración de los viriones por transformación de protoplastos de *L. casei* BL23 o *L-forms* de *L. monocytogenes*. De resultar esta técnica, se realizará el ensamblado de manera tal de construir distintas mutantes de J-1 para estudiar diversas cualidades:

- Si bien se sabe que J-1 es un fago temperado, los intentos de aislar lisógenos estables en *L. casei* BL23 no han resultado fructíferos (resultados sin publicar). Se buscará construir mutantes de los genes incluidos en la región que codifica para el *switch* lisis-lisogenia para estudiar este mecanismo en detalle.
- Para profundizar nuestro conocimiento sobre las proteínas de reconocimiento del hospedador de J-1, se construirán mutantes puntuales del CBM2 (carbohydrate binding module) presente en la proteína Dit de la placa base del fago y se evaluará su efecto en la interacción fago-bacteria.
- Ya que en nuestro laboratorio contamos con amplia experiencia en la construcción y optimización de fagos reporteros de *Mycobacterium* spp. (Mariana Piuri & Hatfull, 2019; Mariana Piuri, Jacobs, & Hatfull, 2009; Urdániz, Rondón, Martí, Hatfull, & Piuri, 2016), se construirán mutantes de J-1 defectivas para la lisis y que acarrean genes

reporteros (como *mrfp*) y se evaluará su eficiencia luego de la infección de *Lactobacillus* spp por microscopía, fluorimetría o citometría de flujo.

- Los fagos defectivos para la lisis resultan muy útiles para el *delivery* de genes que codifican para proteínas de interés o antígenos que pueden ser expresados en sus hospedadores (Rosales Mendoza, Angulo, & Meza, 2016). Considerando que J-1 es capaz de infectar cepas probióticas y bacterias que son parte de la microbiota humana, la obtención de un fago mutante defectivo para la lisis y que pueda acarrear genes heterólogos resulta de gran interés biotecnológico.
- Se buscará evaluar, como se reportó en (Kilcher *et al.* 2018) para las *L-forms* de *L. monocytogenes*, si es posible regenerar fagos de otras especies utilizando protoplastos de *L. casei* BL23.

Bibliografía

- Ackermann, H. W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>
- Andreevskaya, M., Jääskeläinen, E., Johansson, P., Ylinen, A., Paulin, L., Björkroth, J., & Auvinen, P. (2018). Food Spoilage-Associated *Leuconostoc*, *Lactococcus*, and *Lactobacillus* Species Display Different Survival Strategies in R. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.00554-18>
- Barksdale, L., & Arden, S. B. (1974). Persisting Bacteriophage Infections, Lysogeny, and Phage Conversions. *Annual Review of Microbiology*, 28(1), 265–300. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.28.100174.001405>
- Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, 10(12), 2854–2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
- Breitbart, M., & Rohwer, F. (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.04.003>
- Bruand, C., Le Chatelier, E., Ehrlich, S. D., & Janniere, L. (2006). A fourth class of theta-replicating plasmids: the pAM beta 1 family from gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11668>
- Bryan, E. M., Bae, T., Kleerebezem, M., & Dunny, G. M. (2000). Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid*. <https://doi.org/10.1006/plas.2000.1484>
- Capra, M. L., Binetti, A. G., Mercanti, D. J., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. A. (2009). Diversity among *Lactobacillus paracasei* phages isolated from a probiotic dairy product plant. *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), 1350–1357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04313.x>
- Chapot-Chartier, M. P. (2014). Interactions of the cell-wall glycopolymers of lactic acid bacteria with their bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00236>
- Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - A genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>
- Court, D. L., Sawitzke, J. A., & Thomason, L. C. (2002). Genetic Engineering Using Homologous Recombination. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 361–388. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.36.061102.093104>
- CUMMINS, C. S., & HARRIS, H. (1956). The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *Journal of General Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-14-3-583>
- D'Hérelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. *Comptes*

- Rendus de l'Académie Des Sciences*, 165, 373–375.
<https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14941>
- de Melo, A. G., Levesque, S., & Moineau, S. (2018). Phages as friends and enemies in food processing. *Current Opinion in Biotechnology*.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.004>
- De Ruyter, P. G. G. A., Kuipers, O. P., & De Vos, W. M. (1996). Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food- grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Dedrick, R. M., Jacobs-Sera, D., Bustamante, C. A. G., Garlena, R. A., Mavrich, T. N., Pope, W. H., ... Hatfull, G. F. (2017). Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nature Microbiology*, 2(3), 16251.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.251>
- Deveau, H., Labrie, S. J., Chopin, M. C., & Moineau, S. (2006). Biodiversity and classification of lactococcal phages. *Applied and Environmental Microbiology*.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02517-05>
- Dieterle, M E, Jacobs-Sera, D., Russell, D., Hatfull, G., & Piuri, M. (2014). Complete Genome Sequences of *Lactobacillus* Phages J-1 and PL-1. *Genome Announcements*, 2(1), e00998-13-e00998-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00998-13>
- Dieterle, Maria Eugenia, Bowman, C., Batthyany, C., Lanzarotti, E., Turjanski, A., Hatfull, G., & Piuri, M. (2014). Exposing the secrets of two well-known *Lactobacillus casei* phages, J-1 and PL-1, by genomic and structural analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7107–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02771-14>
- Dieterle, María Eugenia, Fina Martin, J., Durán, R., Nemirovsky, S. I., Sanchez Rivas, C., Bowman, C., ... Piuri, M. (2016). Characterization of prophages containing “evolved” Dit/Tal modules in the genome of *Lactobacillus casei* BL23. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7727-x>
- Dieterle, Maria Eugenia, 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*, 104(4), 608–620. <https://doi.org/10.1111/mmi.13649>
- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., ... Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, 541(7638), 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., & Herskovits, A. A. (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 13(10), 641–650. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3527>
- García-Cayuela, T., De Cadiñanos, L. P. G., Mohedano, M. L., De Palencia, P. F., Boden, D., Wells, J., ... Requena, T. (2012). Fluorescent protein vectors for promoter analysis in lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(1), 171–181. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4087-z>
- Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
- Golding, I. (2016). Single-Cell Studies of Phage λ: Hidden Treasures Under Occam’s Rug. *Annual*

- Review of Virology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042127>
- Hargreaves, K. R., Kropinski, A. M., & Clokie, M. R. (2014). Bacteriophage behavioral ecology. *Bacteriophage*, 4(3), e29866. <https://doi.org/10.4161/bact.29866>
- Hatfull, G. F., Cresawn, S. G., & Hendrix, R. W. (2008). Comparative genomics of the mycobacteriophages: insights into bacteriophage evolution. *Research in Microbiology*, 159(5), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.008>
- Herskowitz, I., & Hagen, D. (1980). The Lysis-Lysogeny Decision of Phage lambda: Explicit Programming and Responsiveness. *Annual Review of Genetics*, 14(1), 399–445. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.14.120180.002151>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., ... Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hino, M., & Ikebe, N. (1965). Studies on the Lactic Acid Bacteria Employed for Beverage Production Part II. *J Agric Chem Soc Jap*, 39(12), 472–476. <https://doi.org/10.1271/nogeikagaku1924.39.212>
- Jacouton, E., Chain, F., Sokol, H., Langella, P., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2017). Probiotic Strain *Lactobacillus casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 8, 1553. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01553>
- Johnson, K. V.-A., & Foster, K. R. (2018). Why does the microbiome affect behaviour? *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 647–655. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0014-3>
- KAISER, A. D. (1957). Mutations in a temperate bacteriophage affecting its ability to lysogenize *Escherichia coli*. *Virology*, 3(1), 42–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13409759>
- Kakita, Y., Kashige, N., Watanabe, K., Murata, K., Kuroiwa, A., & Funatsu, M. (1995). Inactivation of *Lactobacillus* Bacteriophage PL-1 by Microwave Irradiation. *Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02244.x>
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209–224. <https://doi.org/10.1007/BF00399499>
- Kashige, N., Nakashima, Y., Miake, F., & Watanabe, K. (2000). Cloning, sequence analysis, and expression of *Lactobacillus casei* phage PL-1 lysis genes. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s007050070073>
- Kilcher, S., Studer, P., Muessner, C., Klumpp, J., & Loessner, M. J. (2018). Cross-genus rebooting of custom-made, synthetic bacteriophage genomes in L-form bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714658115>
- Kleerebezem, M., & Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(2), 232–237. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00033-8)
- Koskella, B., & Brockhurst, M. A. (2014). Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 916–931. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072>
- Krupovic, M., Dutilh, B. E., Adriaenssens, E. M., Wittmann, J., Vogensen, F. K., Sullivan, M. B., ...

- Kuhn, J. H. (2016). Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Archives of Virology*. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2728-0>
- Lavelle, K., Martinez, I., Neve, H., Lugli, G. A., Franz, C. M. A. P., Ventura, M., ... Mahony, J. (2018). Biodiversity of streptococcus thermophilus phages in global dairy fermentations. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v10100577>
- Le Marrec, C., Van Sinderen, D., Walsh, L., Stanley, E., Vlegels, E., Moineau, S., ... Fayard, B. (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. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Leenay, R. T., Vento, J. M., Shah, M., Martino, M. E., Leulier, F., & Beisel, C. L. (2019). Genome Editing with CRISPR-Cas9 in *Lactobacillus plantarum* Revealed That Editing Outcomes Can Vary Across Strains and Between Methods. *Biotechnology Journal*, 14(3), 1700583. <https://doi.org/10.1002/biot.201700583>
- Liu, W., Pang, H., Zhang, H., & Cai, Y. (2014). Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0>
- Loveleen Kaur, S., & Arora, M. (2015). Probiotics, Prebiotics and Microencapsulation - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 8398(April), 00–00. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Mahony, J., Ainsworth, S., Stockdale, S., & van Sinderen, D. (2012). Phages of lactic acid bacteria: The role of genetics in understanding phage-host interactions and their co-evolutionary processes. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.008>
- Maldonado Galdeano, C., Novotny Nuñez, I., Carmuega, E., de Moreno de LeBlanc, A., & Perdigón, G. (2015). Role of probiotics and functional foods in health: gut immune stimulation by two probiotic strains and a potential probiotic yoghurt. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 15(1), 37–45. <https://doi.org/10.2174/1871530314666141216121349>
- Maresca, M., Erler, A., Fu, J., Friedrich, A., Zhang, Y., & Stewart, A. F. (2010). Single-stranded heteroduplex intermediates in λ Red homologous recombination. *BMC Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-54>
- Marinelli, L. J., Piuri, M., Swigoňová, Z., Balachandran, A., Oldfield, L. M., van Kessel, J. C., & Hatfull, G. F. (2008). BRED: A simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes. *PLoS ONE*, 3(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003957>
- Medina, M., Villena, J., Vintiñi, E., Hebert, E. M., Raya, R., & Alvarez, S. (2008). Nasal immunization with *Lactococcus lactis* expressing the pneumococcal protective protein A induces protective immunity in mice. *Infection and Immunity*, 76(6), 2696–2705. <https://doi.org/10.1128/IAI.00119-08>
- Medina, M., Vintiñi, E., Villena, J., Raya, R., & Alvarez, S. (2010). *Lactococcus lactis* as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections. *Bioengineered Bugs*, 1(5), 313–325. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.5.12086>
- Mills, J. P., Rao, K., & Young, V. B. (2018). Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000410>

- Moineau, S., Borkaev, M., Holler, B. J., Walker, S. A., Kondo, J. K., Vedamuthu, E. R., & Vandenberg, P. A. (2010). Isolation and Characterization of Lactococcal Bacteriophages from Cultured Buttermilk Plants in the United States. *Journal of Dairy Science*. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(96\)76584-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(96)76584-0)
- Mosberg, J. A., Lajoie, M. J., & Church, G. M. (2010). Lambda red recombineering in *Escherichia coli* occurs through a fully single-stranded intermediate. *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120782>
- Moynihan, P. J., & Clarke, A. J. (2011). O-Acetylated peptidoglycan: Controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.08.007>
- Murphy, J., Royer, B., Mahony, J., Hoyles, L., Heller, K., Neve, H., ... van Sinderen, D. (2013). Biodiversity of lactococcal bacteriophages isolated from 3 Gouda-type cheese-producing plants. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6748>
- Ofir, G., & Sorek, R. (2018). Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell*, 172(6), 1260–1270. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045>
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Prado-Acosta, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2010). New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt. *Journal of Microbiological Methods*, 83(2), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.017>
- Palomino, M. M., Fina Martin, J., Allievi, M. C., Dieterle, M. E., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2019). DNA transfer in *Lactobacillus*: An overview. In *Lactobacillus genomes and metabolic engineering* (p. 160). <https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781910190890.08>
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2005a). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x>
- Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2005b). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 84–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x>
- Piuri, Mariana, & Hatfull, G. F. (2019). Fluoromycobacteriophages for Drug Susceptibility Testing (DST) of Mycobacteria. In *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8940-9_2
- Piuri, Mariana, Jacobs, W. R., & Hatfull, G. F. (2009). Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004870>
- Prevots, F., Mata, M., & Ritzenthaler, P. (1990). Taxonomic differentiation of 101 lactococcal bacteriophages and characterization of bacteriophages with unusually large genomes. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Rhee, S. J., Lee, J. E., & Lee, C. H. (2011). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S5>
- Ribeiro, L. a, Azevedo, V., Loir, Y. Le, Oliveira, S. C., Dieye, Y., Piard, J., ... Langella, P. (2002). Production and Targeting of the. *Society*, 68(2), 910–916. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.910>
- Rodríguez-Díaz, J., Montava, R., Viana, R., Buesa, J., Pérez-Martínez, G., & Monedero, V.

- (2011). Oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing the rotavirus VP8* protein. *Biotechnology Letters*, 33(6), 1169–1175. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0551-6>
- Rosales Mendoza, S., Angulo, C., & Meza, B. (2016). Food-grade organisms as vaccine biofactories and oral delivery vehicles. *Trends in Biotechnology*, 34(2), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.11.007>
- Ryan, E. J., Daly, L. M., & Mills, K. H. G. (2001). Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends in Biotechnology*, 19(8), 293–304. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01670-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01670-5)
- Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3564>
- Sambrook, J., Fritsch, E. ., & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Series, R. (1999). Safety Assessment of Viable Genetically Modified Micro-organisms Used in Food.
- Stackebrandt, E., & Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*.
- Stefanovic, E., Fitzgerald, G., & McAuliffe, O. (2017, February). Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.08.009>
- Studer, P., Staubli, T., Wieser, N., Wolf, P., Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2016). Proliferation of *Listeria monocytogenes* L-form cells by formation of internal and external vesicles. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13631>
- Surono, I. S., & Hosono, A. (2011). Fermented milks: Types and Standards of Identity. In *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition* (pp. 470–476). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00180-1>
- Sutula, J., Coulthwaite, L. A., Thomas, L. V., & Verran, J. (2013). The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 24. <https://doi.org/10.3402/mehd.v24i0.21003>
- Tolstoy, I., Kropinski, A. M., & Brister, J. R. (2018). Bacteriophage taxonomy: An evolving discipline. In *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_6
- Urdániz, E., Rondón, L., Martí, M. A., Hatfull, G. F., & Piuri, M. (2016). Rapid Whole-Cell Assay of Antitubercular Drugs Using Second-Generation Fluoromycobacteriophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.03016-15>
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, 60(2), 407–438. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0022-x>
- Villion, M., & Moineau, S. (2009). Bacteriophages of *Lactobacillus*. *Frontiers in Bioscience*. <https://doi.org/10.2741/3332>
- Wagner, P. L., & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. *Infection and Immunity*, 70(8), 3985–3993. <https://doi.org/10.1128/iai.70.8.3985-3993.2002>

- Watanabe, K, Takesue, S., Jin-Nai, K., & Yoshikawa, T. (1970). Bacteriophage active against the lactic acid beverage-producing bacterium *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology*, 20(3), 409–415.
- Watanabe, Kenji, Kakita, Y., Nakashima, Y., & Sasaki, T. (1990). Protoplast transfection of *Lactobacillus casei* by phage pl-1 dna. *Agricultural and Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870079>
- Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1861>
- Weigel, C., & Seitz, H. (2006). Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiology Reviews*.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00015.x>
- Welker, D. L., Hughes, J. E., Steele, J. L., & Broadbent, J. R. (2015). High efficiency electrotransformation of *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnu033>
- Wyszyńska, A., Kobińska, P., Bardowski, J., & Jagusztyn-Krynica, E. K. (2015). Lactic acid bacteria - 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2967–2977.
<https://doi.org/10.1007/s00253-015-6498-0>
- Xin, Y., Guo, T., Mu, Y., & Kong, J. (2017). Identification and functional analysis of potential prophage-derived recombinases for genome editing in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx243>
- Zeng, L., Skinner, S. O., Zong, C., Sippy, J., Feiss, M., & Golding, I. (2010). Decision Making at a Subcellular Level Determines the Outcome of Bacteriophage Infection. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.034>