



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Caracterización funcional de la proteína de capa S (S-layer) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

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

Lic. Joaquina Fina Martin

Directoras de tesis Dra. Sandra Ruzal
 Dra. Andrea Barquero
Consejera de Estudios Dra. Cybele García

Buenos Aires, 2019.

RESUMEN

Caracterización funcional de la proteína de capa S (S-layer) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

La envoltura bacteriana de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tiene las características de una bacteria Gram positiva, pero además posee proteínas de superficie o Surface layers (S-layers), las cuales se asocian con roles de protección contra enzimas hidrolíticas, cambios de pH y estrés, la captación de moléculas y iones, y ayudan a mantener la forma y rigidez de la célula. Además, varios reportes sugieren que en los lactobacilos la S-layer tendría un rol en las propiedades probióticas de las cepas que la poseen, sin embargo las funciones y los mecanismos involucrados están poco descritos. El objetivo general de esta Tesis doctoral fue caracterizar funcional y estructuralmente la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que la S-layer presenta un comportamiento homólogo a las lectinas, capaz de interactuar con eritrocitos de carnero, células bacterianas, levaduras, virus y células eucariotas. Respecto a los posibles carbohidratos con los cuales interactúa, se observó un comportamiento mixto asemejándose tanto a las lectinas que reconocen quitina/N-acetilglucosamina como a las de reconocimiento de ácido siálico/manosa. Mediante diferentes ensayos, como el clonado y expresión de proteínas o partes de la proteína conjugadas con la proteína verde fluorescente GFP, se logró identificar los dos dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) ubicados en la porción carboxilo-terminal y predichos del análisis *in silico* de la proteína. La actividad de lectina depende de la presencia de estos CRD. También quedó demostrado que el ácido lipoteicoico sirve como un ancla para la proteína SlpA. Además, fue posible determinar cómo se modifica la expresión de los tres genes que codifican para S-layer en esta cepa: *slpA*, *slpB* y *slpX*, en respuesta a cambios ambientales como la alta concentración salina. Se observaron cambios en la expresión génica de los ARNm *slpA* y la *slpX* pero no *slpB*. En consecuencia, la cantidad de las proteínas SlpA y SlpX se modifican no sólo por la condición de alta sal (NaCl 0,6 M) sino también por la fase de crecimiento. Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado o sugerido diversas aplicaciones biológicas para las proteínas S-layers de *Lactobacillus*, en este trabajo se pudo establecer que la proteína S-layer disminuye la adherencia y la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* en superficies bióticas y abióticas, respectivamente. Además fue capaz de modular la infección de diferentes virus, con una notable actividad pro-viral, facilitando las etapas tempranas del ciclo de infección de tres virus empleados como vectores oncolíticos: el herpes virus simplex tipo 1 (HSV-1), el virus de la estomatitis vesicular y el adenovirus 5. La proteína S-layer también fue capaz de proteger al virus HSV-1 de la inactivación térmica por calor. En conjunto estos resultados aportan a comprender las características estructurales y funcionales de la S-layer, y permiten proponer futuras aplicaciones biológicas.

Palabras claves: *Lactobacillus acidophilus*, S-layer, Actividad de lectina, Modulación de la infección viral

ABSTRACT

Functional characterization of S-layer protein (S-layer) from *Lactobacillus acidophilus*

ATCC 4356

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 cell wall has the characteristics of Gram-positive bacteria, and exhibits Surface layers proteins (S-layer), which protect the bacteria against hydrolytic enzymes; stress and pH changes interact to molecules and ions and maintain the shape and rigidity of the cell. Several reports suggest that *Lactobacillus* S-layer may be involved in the probiotic properties of the strain, though its function and mechanisms are not yet fully elucidated. The general objective of this thesis was to characterize functional and structurally *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356's S-layers. The results obtained confirmed that S-layer presents homologous behaviour to lectins, interacting with sheep erythrocytes, bacteria, yeasts, virus and eukaryotic cells. Regarding the interaction with carbohydrates, it showed a complex behaviour, similar to lectins that recognize either chitin/N-acetylglucosamine or the sialic acid/mannose. By different assays such as cloning and expression of proteins or chimeric fragments conjugated with green fluorescent protein GFP, it was possible to identify two carbohydrate recognition domains (CRD) localized at the C-terminus portion which had been predicted *in silico*. The lectin activity depends of these CRD. It was also shown that lipoteic acid serves as an anchor for the SlpA protein. Also, it was determined that the expression of the three genes that encodes for S-layer in this strain, *slpA*, *slpB* y *slpX*, is regulated by environmental factors such as high saline concentration. Changes in gene expression of *slpA* and *slpX* mRNA but not of *slpB* were observed. It was also noted that the amount of SlpA and SlpX proteins is modified not only by salt concentration (NaCl 0,6M) but also by growth phase. On the other hand, during the last years several biological applications have been developed for *Lactobacillus* S-layer protein and in this work it was established that S-layer diminishes the adherence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* on both biotic and abiotic surfaces, respectively. Besides, it was able to modulate the infection of different viruses, exhibiting a noticeable pro-viral activity, facilitating early stages of infection of three of the viruses that are useful as oncolytic vectors: herpes simplex type 1 virus (HSV-1), vesicular stomatitis and adenovirus 5. The S-layer protein was able to protect HSV-1 from heat inactivation. Altogether, these results contribute to comprehend the structural and functional characteristics of S-layer, and allow propose future biological applications.

Keyword: *Lactobacillus acidophilus*, S-layer, lectin activity, modulation of viral infection

AGRADECIMIENTOS

Con esta tesis finalizan cinco años de muchísimo aprendizaje y esfuerzo, y sin dudarlo un segundo, este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo de un montón de personas (que nombraré a continuación) que fueron pilares fundamentales durante mi camino por el doctorado, tanto a nivel experimental como emocional y con las cuales estoy eternamente agradecida.

En primer lugar quisiera agradecerle a mis directoras a la Dra. Sandra Ruzal y Dra. Andrea Barquero. Con San aprendí a ser científica, di mis primeros pasos en la investigación y aprendí también, que no hay nada que un destornillador o WD40 no puedan solucionar. Gracias San por ser una directora tan presente y comprensiva. Con Andre viajé al mundo de las células y de los virus, un terreno totalmente desconocido para mí pero gracias a la pasión con que ella lo vive y la dedicación que tuvo conmigo, aprendí un montón. Gracias Andre por transmitirme tantos conocimientos y tener la paciencia de explicar todo más de una vez. Gracias a ellas, su excelente dirección y orientación esta tesis tomó un hermoso rumbo.

A la Dra. Carmen Sánchez Rivas, por ser nuestro norte y estar presente siempre.

A todos los integrantes de los laboratorios QB 40-43, que es el grupo de investigación que todo doctorando quisiera tener. Gracias a ustedes por cada cultivo largado, sugerencia de experimentos, conocimientos compartidos, el apoyo de grupo, los viernes buena onda y demases. Gracias por aguantar mis ataques de limpieza, retos por la seguridad e higiene de los laboratorios y ni hablar del cajón de los falcons. Un agradecimiento aparte merecen Mer y Marianita, que son mis hermanas mayores del laboratorio, con ellas comparto día a día la mesada, me apoyan, escuchan y bancan en todas. ¿Qué sería de mí y de esta tesis si ustedes? Gracias Mer por tu paciencia infinita de siempre y en particular la que desarrollaste en cada foto del microscopio. Cómo no estar agradecida con los mates que me recibía Marianita cada mañana, gracias Marian por estar al pie del cañón siempre.

A Esme, Flor y Jordi mis doctorandas preferidas, con las que durante estos años cultivamos además de bacterias una hermosa amistad. Estoy infinitamente agradecida con ellas no sólo por la ayuda diaria en la mesada sino también por el apoyo y la

presencia incondicional. Gracias por cada cuenta chequeada, estadístico resuelto, mate, charlas de pasillo y por velar por mi integridad psicológica a toda hora.

A Colo, Indi, Ire, Javi y Nico mis amigos grietenses, con los que sé que puedo contar eternamente. Odiamos, amamos, reímos y lloramos juntos. Son todo lo que está bien en una amistad, gracias por escucharme, por los consejos y el apoyo de siempre.

A los López-Pettinari por los mates salvadores de la merienda, por cada reactivo compartido y por cada palabra de apoyo y aliento. Realmente es gratificante trabajar rodeada de buena onda y compañerismo.

A todos los de bedelía por cada reactivo salvador que me prestaron y en especial a Eva por aguantar mi quejas y estar tan bien predispuesta cada vez que la necesité.

Al grupo de doctorandos en apuros: Diego, Estefi, Indi e Ire. Por cada papel, carta modelo, trámite, juntadas a escribir la tesis, trucos del word y por sobre todo por el apoyo moral de estos últimos meses.

A Nati, mi amiga de toda la vida, que a pesar de la distancia mantenemos una hermosa amistad. Gracias por las charlas eternas por teléfono, por bajarme a la realidad y por esperarme con un mate calentito cada vez que vuelvo a Colón.

A mi familia que es mi cable a tierra. A mi mamá y papá por acompañarme en cada decisión y alentarme a seguir adelante siempre. A mis hermanos por ser incondicionales, por apoyarme en cada paso y por sus amadas contraseñas que me ayudaron mucho durante la escritura de la tesis. Por último quiero agradecer a mis abuelos la laia y el Tati, sin ellos no hubiese podido llegar tan lejos, gracias por mimarme, cuidarme y preocuparse por mí siempre. Gracias por brindarme tanto amor.
¡Los amo!

A todos millones de gracias de corazón y... ¡Vamos que nos Doctoramos!

Los resultados de esta Tesis Doctoral fueron publicados en:

Palomino, M. M., Waehner, P. M., Fina Martin, J., Ojeda, P., Malone, L., Sánchez Rivas, C., Ruzal, S. M. (2016). Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(19), 8475–8484.

Fina Martin J., Palomino M. M., Cutine A. M., Modenutti C., Fernández Do Porto DA., Allievi M. C., Zanini S. H., Mariño K. V., Barquero A., Ruzal S. M. (2019) Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied Microbiology and Biotechnology*. En prensa.

Índice

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	4
AGRADECIMIENTOS.....	6
Abreviaturas	14
INTRODUCCIÓN	17
1. <i>Lactobacillus</i> sp.....	18
1.1 Generalidades de <i>Lactobacillus</i> sp.	18
1.2 Hábitat: Tractos vaginal y gastrointestinal.....	19
1.3 <i>Lactobacillus</i> sp. y su relación con los alimentos	21
1.4 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
1.5 Envoltura Bacteriana	26
1.6 Respuesta al estrés osmótico y envoltura.....	31
2. Capa S (S-layer)	33
2.1 Estructura y ensamblado	33
2.2 Organización Genética y Biosíntesis.....	37
2.3 Funciones.....	39
2.4 Aplicaciones.....	40
3. Lectinas	43
Objetivos.....	47
Objetivo general	48
Objetivos específicos	48
Materiales y métodos.....	49
1. Cepas Microbianas	50
2. Líneas celulares.....	50

3. Virus.....	51
4. Titulación por el método de formación de placas en medio semisólido	51
5. Purificación de proteína la proteína S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	52
6. Determinación de la concentración proteica.....	53
7. Extracción de ADN de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	53
8. Geles de agarosa.....	54
9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	54
10. Síntesis de ADNc y PCR en tiempo real.....	55
11. Clonado y Expresión de S-layer recombinante.....	56
12. Purificación de proteínas quiméricas	57
13. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	58
14. Brilliant Blue R-250	58
15. Zimograma	59
16. Western Blot	59
17. Lectin blot	59
18. Extracción de pared celular, PG y CWPS y LTA	60
19. Ensayo de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación por carbohidratos.....	61
20. Ensayo de Aglutinación de microorganismos.....	62
21. Ensayo de Dot blot.....	62
22. <i>Quenching</i> de fluorescencia de las tirosinas.....	64
23. Unión de proteínas de fusión de SIpA a <i>Lactobacillus acidophilus</i>	64
24. Ensayos en fase sólida	66
25. Actividad virucida de S-layer.....	67
26. Ensayo de arrastre de las partículas virales.....	67

27.	Interacción de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 con líneas celulares	67
28.	Inhibición de la Interacción de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> con A549	68
29.	Ensayo de interacción de la proteína S-layer y proteínas quiméricas con células epiteliales.....	68
30.	Actividad moduladora de la infección viral	69
31.	Ensayo de plaqueo directo	70
32.	Protección de la inactivación viral por temperatura	70
33.	Ensayo de formación de biopelícula.....	71
34.	Análisis estadístico.....	71
RESULTADOS.....		73
Capítulo 1: Caracterización de la capacidad de lectina de la proteína S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....		74
1.1.	Capacidad de hemaglutinación de la proteína S-layer.....	75
1.2.	Capacidad de la proteína S-layer de aglutinar microorganismos	77
1.3.	Capacidad de interacción de la proteína S-layer con partículas virales	80
1.4.	Capacidad de interacción de la proteína S-layer con células eucariotas.....	89
1.5.	Capacidad de interacción de la proteína S-layer con macromoléculas eucariotas y procariontas	95
1.6.	Análisis funcional del dominio amino y carboxilo terminal de proteína S-layer en la interacción con carbohidratos.....	98
1.7.	Modelado estructural del carboxilo terminal	109
1.8.	Glicosilación de la proteína S-layer	112
1.9.	Conclusiones parciales	113
Capítulo 2: Influencia de la respuesta a estrés salino en la expresión génica y perfil proteico de las S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....		115
2.1.	Organización genómica	116

2.2. Perfil génico y proteico de la proteína S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 en condiciones de alta concentración salina	119
2.3. Análisis de expresión génica	126
2.4. Regulación post-transcripcional.....	133
2.5. Conclusiones parciales	135
Capítulo 3: Aplicaciones biológicas de la proteína S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	136
3.1. Efecto modulador de la infección viral	137
3.2. Protección de la inactivación viral por temperatura	143
3.3. Efecto Anti-adhesivo de la proteína S-layer	147
3.3. Conclusiones parciales	149
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	151
BIBLIOGRAFÍA	164

ABREVIATURAS

%m/v: porcentaje masa en volumen
µg: microgramos
AdV: adenovirus
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ARNr: ácido ribonucleico ribosomal
BSA: proteína seroalbúmina bovina
CI₅₀: concentración inhibitoria 50 %
CIM: concentración inhibitoria mínima
CRD: dominios de reconocimiento a carbohidratos
CV: control de virus
CWPS: polisacáridos de la pared celular
D-MEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
DO: densidad óptica
ELISA: inmunoensayo enzimático por su nombre en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FR: factor de reducción
GBP: glicosiltransferasa de *Streptococcus mutans*
GFP: proteína verde fluorescente
GFP-CT: dominio carboxilo-terminal de la proteína SlpA fusionado a GFP
h: hora
HSV: Virus Herpes
IFI: inmunofluorescencia indirecta
LiCl: cloruro de litio
LPS: lipopolisacárido
LTA: ácido lipoteicoico
m.i: multiplicidad de infección
M: molar
MBL: lectinas de unión a manosa
MEM: medio mínimo de Eagle
min: minutos
ml: mililitro
MRS: medio Man, Rogosa y Sharpe
NaCl: cloruro de sodio
NAG: N-acetil-D-glucosamina
nm: nanómetros
NT-GFP: dominio amino-terminal de la proteína SlpA fusionado a GFP
°C: grados Celsius
PBS: buffer fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PG: peptidoglicano
Pi: punto isoeléctrico
PVDF: Polyvinylidene difluoride
qPCR: PCR en tiempo real
SD: secuencia Shine-Dalgarno
SDS: dodecilsulfato de sodio
S-layer: proteína de capa S
SLH: motivos homólogos de capa S

slp: gen que codifica para las proteínas S-layers

TCA: tricloroacético

ToxA: toxina de *Clostridium difficile*

UFC: unidades formadoras de colonias

UFP: unidades formadoras de placas

VSV: virus de la estomatitis vesicular

WGA-Tritc: aglutinina de germen de trigo conjugada a rodamina

WTA: ácido teicoico asociado a pared

INTRODUCCIÓN

1. *Lactobacillus* sp.

1.1 Generalidades de *Lactobacillus* sp.

Los lactobacilos son bacterias Gram positivas, aerotolerantes y con un porcentaje de G+C bajo. Al microscopio se observan como bacilos inmóviles, que no forman esporas [1]. Tienen requerimientos nutricionales complejos en términos de aminoácidos, péptidos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos.

Desde un punto de vista taxonómico *Lactobacillus* pertenece al Phylum *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. Originalmente, el género *Lactobacillus* fue clasificado basado en la característica fenotípica del tipo de fermentación que realizan. Kandler y Weiss (1986) dividieron al género en tres grupos, con respecto a la presencia o ausencia de las enzimas fructosa 1-6 difosfato aldolasa y fosfoacetolasa, enzimas claves en el metabolismo homo o heterofermentativo de las hexosas y pentosas, respectivamente.

- Grupo I: Lactobacilos homofermentativos, fermentan las hexosas por la vía de Embden Meyerhof-Parnas, produciendo dos moles de ácido láctico por mol de glucosa. Los microorganismos poseen la enzima fructosa 1-6 difosfato aldolasa, pero carecen de fosfoacetolasa y, por lo tanto, no fermentan ni el gluconato ni a las pentosas. Ejemplos: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*.

- Grupo II: Lactobacilos facultativamente heterofermentativos, fermentan a las hexosas, usando gluconato y pentosas con producción de ácido láctico y ácido acético. Tanto la 1-6 difosfato aldolasa como la fosfoacetolasa están presentes, pero esta última es inducible por pentosas. Ejemplos: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*.

- Grupo III: Lactobacilos heterofermentativos, fermentan las hexosas con formación de ácido láctico, ácido acético (o etanol) y dióxido de carbono en cantidades equimolares. Utilizan las pentosas a través del ácido 6-fosfogluconico con producción de ácido láctico y ácido acético. Ejemplos: *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus fermentum* [2].

Sin embargo, se conocen excepciones a estas características que sugieren que esta clasificación y la identificación basadas en propiedades metabólicas requiere una reclasificación basada en el genoma [3]. El primer análisis filogenético del género lo realizaron Collins y colaboradores en base a la disponibilidad de las secuencias genómicas y secuencias del gen 16S del ácido ribonucleico ribosomal (ARNr) [4]. Luego,

en una nueva revisión taxonómica, Sun y colaboradores proponen agrupar a los seis géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Fructobacillus* dentro de lo que ellos denominaron como el "complejo del género *Lactobacillus*" [5].

Particularmente, en el género *Lactobacillus* se han descrito 237 especies (<http://www.bacterio.net/Lactobacillus.html>), presentes en una gran variedad de nichos ricos en carbohidratos.

1.2 Hábitat: Tractos vaginal y gastrointestinal

Lactobacillus sp. forma parte de la flora normal de la boca, el tracto gastrointestinal y los tractos genitales de los humanos y muchos animales. La comunidad microbiana que habita en el tracto gastrointestinal se caracteriza por su alta densidad de población, gran diversidad y complejidad de las interacciones. Las bacterias son predominantes, pero también se encuentran una variedad de protozoos, levaduras y bacteriófagos. Las bacterias no se distribuyen al azar en el tracto gastrointestinal, sino que se encuentran a niveles de población y distribución de especies que son características de regiones específicas del tracto.

Las distintas especies de *Lactobacillus* tienen diferentes grados y modos de persistencia en el intestino. Algunas de ellas son autóctonas, es decir, establecen una asociación duradera y forman poblaciones estables que caracterizan una región intestinal específica, dentro de un huésped particular. Sin embargo, la metagenómica y las evidencias experimentales indican que la mayoría de los *Lactobacillus* son alóctonos, es decir, colonizadores transitorios que se originan a partir de los alimentos o de la cavidad oral. Los *Lactobacillus* alcanzan la densidad máxima dentro del intestino delgado y grueso, donde generalmente representan menos del 1% del total de residentes bacterianos (Figura 1).

Si bien los lactobacilos no son organismos predominantes en la flora intestinal, se han aislados a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de humanos sanos por ejemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus plantarum* se encuentran comúnmente en las heces de los humanos; mientras que *Lactobacillus bulgaricus*, el organismo utilizado en combinación con *Streptococcus thermophilus* para realizar el yogur, no puede colonizar el intestino y no se aísla en las heces [6]. La

función principal de la microbiota intestinal es prevenir la colonización por microorganismos potencialmente patógenos.

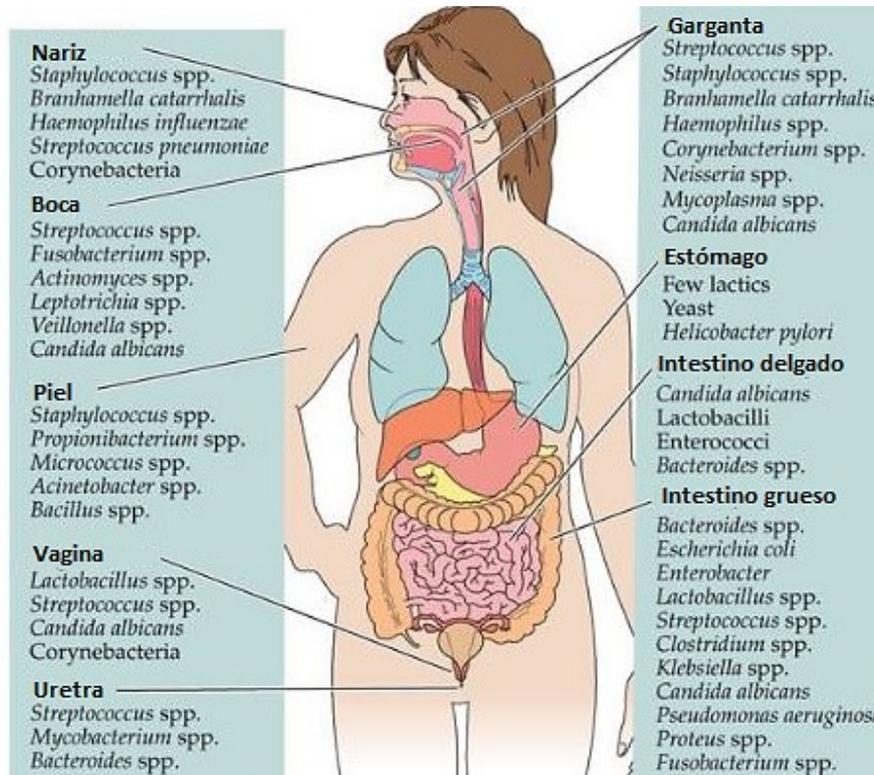


Figura 1 Distribución de los *Lactobacillus* en el cuerpo humano.

Por otra lado, la vagina humana es un entorno complejo colonizado por una diversa comunidad de microorganismos conocidos como la microbiota vaginal; entre ellos, *Lactobacillus sp.* representa a los microorganismos predominantes en tracto vaginal sano [7]. Se identificaron cuatro especies predominantes: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii* y *Lactobacillus gasseri* junto con, pero en menor medida, algunos otros lactobacilos, como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus vaginalis*. La abundancia de *Lactobacillus sp.* está asociada con una vagina sana, mientras que una baja abundancia de *Lactobacillus sp.*, y como consecuencia una alteración de la microbiota vaginal, está relacionada con vaginosis bacteriana y vaginitis aeróbica [8].

Las funciones beneficiosas de las *Lactobacillus sp.* en la preservación de una vagina sana incluyen el mantenimiento del pH vaginal ácido, la prevención de infecciones mediante la producción de bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos [9]–[11].

En particular, el virus herpes simplex (HSV), principal causa del herpes genital, es una de las infecciones de transmisión sexual más frecuente. Por ello, es importante prevenir la infección, de hecho, la falta de una flora vaginal predominante de *Lactobacillus sp.* fue identificada como un factor de riesgo para la infección por HSV-2 [12]. La protección ejercida *in vivo* por los lactobacilos contra la infección del HSV es probablemente multifactorial, debido a los mecanismos antimicrobianos bien conocidos de los *Lactobacillus* como son la competencia por los receptores celulares, producción de peróxido de hidrógeno y ácido láctico.

1.3 *Lactobacillus sp.* y su relación con los alimentos

Los lactobacilos se utilizan desde hace siglos para el procesamiento y la preservación de los alimentos y son considerados organismos seguros para el consumo humano (también denominados GRAS por sus siglas en inglés, *General Recognized As Safe*). Son microorganismos industrialmente importantes que contribuyen a la producción de queso, yogur, leches fermentadas y embutidos cárnicos. Por otra parte, se utilizan en alimentos funcionales que contienen cepas probióticas definidas como “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped, al ser administrados en cantidades adecuadas más allá de los efectos nutricionales habituales” (*Federal Drug Administration* - Organización Mundial de la Salud). Dentro de las especies de bacterias, las cepas más utilizadas como probióticos pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Para que una cepa sea considerada probiótica debe reunir las siguientes características:

- Debe tener una larga historia de no ser patógena, especialmente para personas inmunocomprometidas, no estar asociadas con enfermedades como endocarditis infecciosa y/o trastornos gastrointestinales.
- No ser sensible a las enzimas proteolíticas.
- Ser capaz de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Debe ser estable frente a ácidos y bilis, y no conjugarse con las sales biliares.
- Tener capacidad para adherirse a las superficies epiteliales.
- Sobrevivir en el ecosistema intestinal.
- Ser capaz de producir componentes antimicrobianos.

- Debe permanecer viva y estable durante su empleo.
- Debe tener un mecanismo específico de adhesión al intestino humano.
- Debe ser capaz de inmunoestimulación.

Numerosos estudios de alimentación en humanos han demostrado que el uso de probióticos modula a la microbiota intestinal y vaginal humana, y la respuesta inmune sistémica y a nivel de mucosas. Por lo tanto, constituyen una alternativa interesante para prevenir y tratar enfermedades infecciosas (como las diarreas gastrointestinales e infecciones vaginales) y diferentes inmunopatologías como las enfermedades inflamatorias del intestino (Ej.: enfermedad de Crohn). Sin embargo, los mecanismos moleculares o que molécula de la bacteria es responsable de estos efectos benéficos aún no han sido dilucidado completamente y probable sea multifactorial. No obstante, existen evidencias que los mecanismos de acción de las cepas probióticas pueden ser a través de un mecanismo directo con producción de sustancias antibacterianas, o indirecto mediante la estimulación de la respuesta inmune.

En relación a su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, por ejemplo, fue reportado que la administración en humanos de una bebida probiótica conteniendo *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* redujo la incidencia de diarrea asociada a antibióticos y diarrea asociada a *Clostridium difficile* [13]. También, trabajos realizados *in vitro* han demostrado que factores extracelulares de cepas de bifidobacterias son capaces de antagonizar eventos claves en la patogénesis de *Clostridium difficile* [14]. Asimismo, la combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*, habitantes normales del tracto vaginal, ejercen *in vitro* un efecto sinérgico contra el crecimiento de *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis* y otras bacterias causantes de infecciones urogenitales [7]. Por lo tanto, estos resultados demuestran que la asociación de cepas probióticas puede ser útil para tratar diversas infecciones bacterianas.

Respecto de su acción inmunomoduladora, por ejemplo, ha sido demostrado que las cepas de *Lactobacillus kefir* aisladas de gránulos de kéfir estimulan la producción *in vitro* de citoquinas pro y antiinflamatorias. Además, la administración de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 a ratones produce una disminución de la expresión de mediadores proinflamatorios y aumenta la expresión de moléculas antiinflamatorias en los sitios inductivos y efectores del sistema inmunológico intestinal [15].

En la industria alimenticia, los lactobacilos, además de ser utilizados como cepas probióticas se las emplea como cultivos iniciadores o *starters*. El fin de utilizar estos cultivos, conteniendo uno o más microorganismos, es mantener la calidad organoléptica de los productos y asegurar la reproducibilidad y estandarización de los procesos. Varias propiedades metabólicas de *Lactobacillus* tienen un impacto directo o indirecto en procesos como el desarrollo de sabor, aroma y maduración de productos lácteos (como quesos y yogur). La degradación de las caseínas presentes en la leche juega un rol crucial en el desarrollo de estos procesos, mientras que ciertos péptidos contribuyen a la formación del sabor.

El agregado de sal, con el objeto de preservar alimentos, es una técnica empleada desde la antigüedad, y en muchos alimentos las fermentaciones ocurren en un ambiente con una alta concentración de solutos. Así mismo, el proceso de maduración en quesos de pasta dura ocurre luego del salado, momento en el que la participación de las bacterias lácticas en la determinación del sabor y el aroma del producto es fundamental. En dicho proceso de maduración de quesos la concentración salina va desde 0,35 M (2% m/v) hasta 0,6 M (3,5% m/v) [16], [17]. En condiciones de alta salinidad las envolturas bacterianas están involucradas en el mantenimiento de la presión de turgencia, y en el intenso transporte de osmolitos y homeostasis iónica [18]. Se observa que existe una alteración en la composición de las envolturas celulares en respuesta a condiciones de estrés como el ácido o la alta salinidad como de describirá más abajo.

1.4 *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 es el microorganismo de estudio de esta tesis; presenta un metabolismo homofermentativo, es una bacteria anaeróbica aerotolerante y sus condiciones óptimas de crecimiento son a 30-45 °C y un pH 4-5.

En la Figura 2 se muestra un árbol filogenético del género *Lactobacillus*, basándose en el gen 16s ARNr, donde se observan las relaciones filogenéticas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con otras especies del género [19].

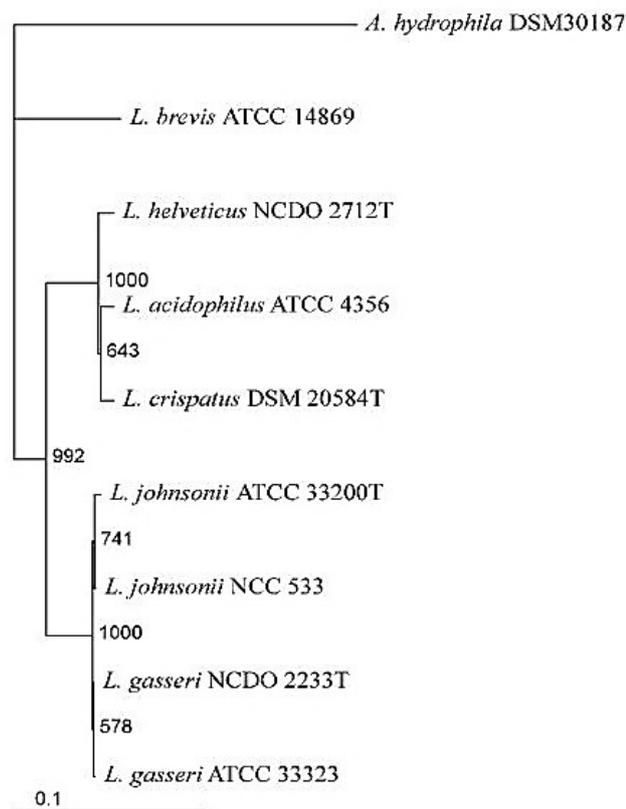


Figura 2 Árbol filogenético del grupo *Lactobacillus* realizado por el método de Neighbour-joining utilizando el gen 16S ARNr. Extraído de [19].

Lactobacillus acidophilus habita de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. Tanto a nivel experimental como industrial se utiliza a esta bacteria en la elaboración de quesos por ejemplo, cheddar (junto con otros probióticos como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* o *Bifidobacterium spp.*), queso brasileiro tipo mina fresco y queso blanco turco [20]–[22] En el tracto gastrointestinal, *Lactobacillus acidophilus* comparte con los microorganismos que lo acompañan el uso de los mismos nutrientes entrando así en

competencia con ellos; también controlando el desarrollo desmedido de estos por la disminución de nutrientes. Durante la digestión, asiste al intestino humano con la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina). Cuando se encuentran en suficiente proporción son considerados como probióticos, los cuales son capaces de modificar favorablemente el balance de la microflora intestinal, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y también potencian el funcionamiento del sistema inmunológico.

Existen a la fecha disponibles en bases de datos 37 secuencias de genomas de *Lactobacillus acidophilus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/1099>), de las cuales 6 se encuentran completas mientras que el resto se encuentran ensambladas en forma de *scaffold* o *contigs*. En la Tabla 1 se muestra algunas de las cepas de *Lactobacillus acidophilus* entre ellas la cepa ATCC 4356 que es la cepa de estudio de esta tesis.

Cepa	Tamaño (Mb)	GC%	Scaffolds	Grado de ensamblaje
NCFM	1,99	34,7	1	Completo
La-14	1,99	34,7	1	Completo
FSI4	1,99	34,7	1	Completo
ATCC 53544	1,99	34,7	1	Completo
LA1	1,99	34,7	1	Completo
DSM 20079	2	34,7	1	Completo
ATCC 4796	2,02	34,7	38	Scaffold
CIP 76.13	1,95	34,6	34	Scaffold
DSM 9126	1,99	34,6	27	Scaffold
CIRM-BIA 445	2	34,6	22	Scaffold
DSM 20242	2,04	34,7	21	Contig
CIRM-BIA 442	1,98	34,7	19	Contig
CFH	1,97	34,6	124	Contig
ATCC 4356	1,95	34,6	20	Contig
NBRC 13951	1,95	34,6	18	Contig

Tabla 1 Cepas de *Lactobacillus acidophilus* secuenciadas.

La cepa que se considera de referencia es NCFM, cuyo genoma posee 1.993.564 nucleótidos, no contiene plásmidos, y tiene un 99,9% de similitud con la cepa ATCC 4356. En la Figura 3 se muestra un atlas comparativo de la cepa de referencia NCFM y la de estudio ATCC 4356 utilizando la herramienta bioinformática SEED viewer (<http://rast.theseed.org>) donde puede observarse que son prácticamente idénticos.

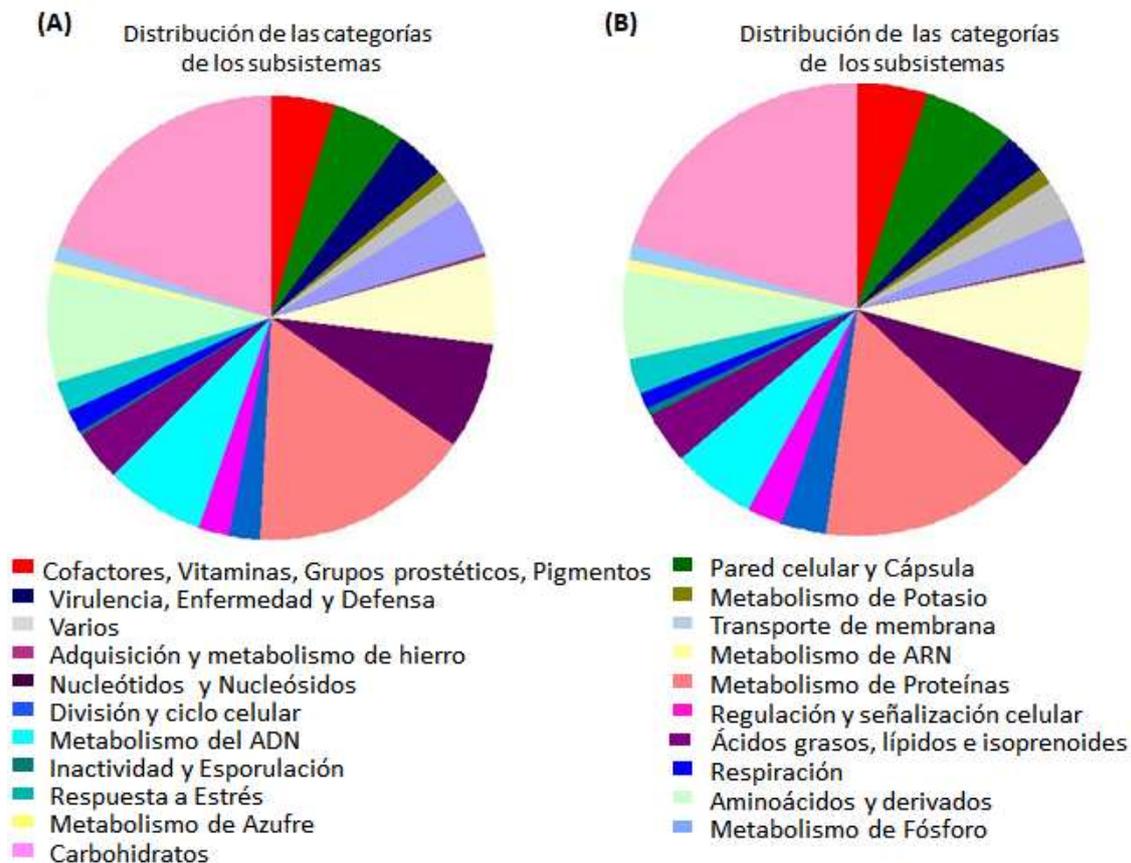


Figura 3 Atlas comparativo entre la cepa de estudio ATCC 4356 (A) y la cepa de referencia NCFM (B).

Cada subsistema representa un conjunto de funciones relacionadas que dan lugar a una vía metabólica. En *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus acidophilus* NCFM el 54 % y 52 %, respectivamente de los genes no están asignados aún a un subsistema.

1.5 Envoltura Bacteriana

La envoltura de las bacterias Gram positivas está conformada desde adentro hacia afuera por una membrana citoplasmática y una pared celular formada por una gruesa capa de peptidoglicano (PG) y cadenas de ácidos teicoicos: los asociados a pared (WTA) y los lipoteicoicos (LTA) anclados a la membrana. Algunas especies poseen además proteínas de superficie o Surface layer por sus siglas en inglés (S-layer). En la Figura 4 se muestra un esquema representativo de la envoltura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

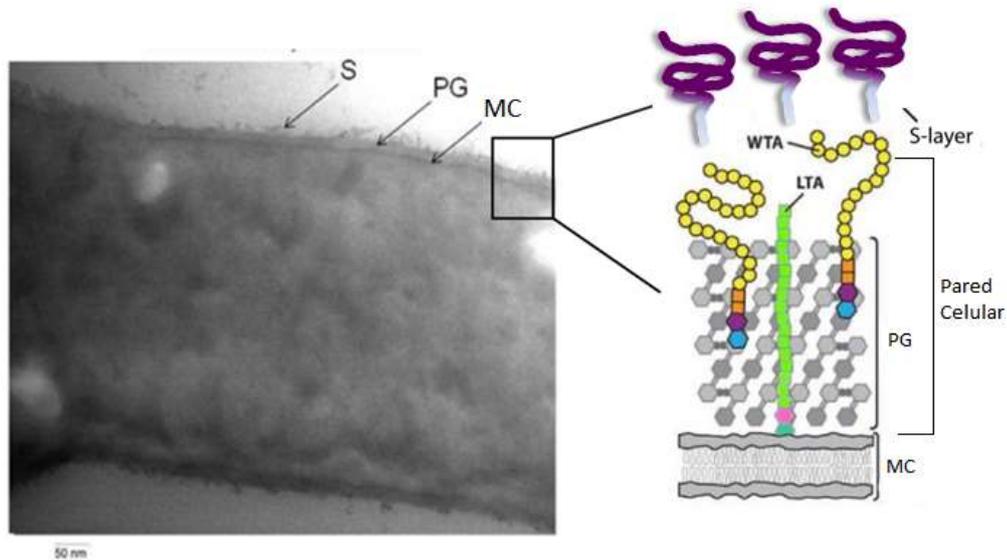


Figura 4 Envoltura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Microscopía electrónica de transmisión de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Aumento 20000X y esquema representativo de la envoltura. La envoltura está compuesta por una membrana citoplasmática (MC), peptidoglicano (PG), cadenas de ácidos teicoicos: los asociados a pared (WTA) y los lipoteicoicos (LTA) anclados a la membrana y proteínas de superficie (S-layers). La pared celular está conformada por el PG y ácidos teicoicos.

La envoltura celular es la primera línea de defensa contra los cambios ambientales, es una barrera física que separa la célula de su entorno y, como tal, actúa como el primer sensor para supervisar las modificaciones en el medio. Se ha demostrado que los cambios en la composición química de envoltura provocada por el estrés ayudan a la supervivencia celular [23], [24].

La pared celular tiene múltiples funciones durante el crecimiento bacteriano, incluido el mantenimiento de la integridad y la forma de las células bacterianas, así como la resistencia a la presión interna de la turgencia. Además, debe permanecer flexible para adaptarse a la remodelación que se requiere para la división y el crecimiento celular. Dado que sirve como interfaz entre la célula bacteriana y su entorno, la pared celular también media las interacciones con las superficies abióticas, con los bacteriófagos o con las células eucariotas.

1.5.1 Membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es la primera capa que rodea a la bacteria y está formada por una doble capa de fosfolípidos, entre los cuales hay proteínas asociadas que desempeñan funciones estructurales, sensoriales o funciones metabólicas. Varias actividades enzimáticas están asociadas con la membrana citoplasmática, incluidos los

sistemas de transporte y diversos sistemas de síntesis de polímeros [2]. Representa aproximadamente el 30% del peso celular, contiene entre 60 y 70% de proteínas; aproximadamente 40% de lípidos y pequeñas cantidades de carbohidratos. Dentro de los lípidos, se encuentran los lípidos polares y en menor proporción los fosfolípidos [25]. En los lactobacilos los lípidos polares son principalmente fosfatidilglicerol, con pequeñas cantidades de ácido fosfatídico, difosfatidilglicerol o cardiolipina, lisilfosfatidilglicerol, fosfoglicolípido y diglicosil glicérido [2]. También presentan diacilfosfatidilglicerol, triglicosildiglicéridos y lípidos neutros [26].

1.5.2 Peptidoglicano

El peptidoglicano (PG) es el componente principal de la pared celular de las bacterias Gram positivas. Está constituido por cadenas de glicanos de la unidad repetitiva disacáridica N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAMur) que se unen a través de enlaces β -1,4. Unido al grupo carboxilo del N-acetilmurámico se encuentra un péptido corto cuya secuencia es característica taxonómica de especie. Este péptido es responsable del entrecruzamiento entre las cadenas polisacáridicas. En *Lactobacillus*, la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica es L-alanina, ácido D-glutámico, di-aminoácido (que pueden ser lisina, asparragina o meso-diaminopimelico), D-alanina [27]. Los di-aminoácidos al contener dos grupos amino pueden formar enlaces peptídicos con aminoácidos di-carboxílicos de otra cadena (Figura 5). En la mayoría de los lactobacilos, D-Ala predomina en la posición cinco del PG recién sintetizado. Los residuos de D-lactato se encuentran en los lactobacilos que son naturalmente resistentes a la vancomicina, como *L. casei* y *L. plantarum*.

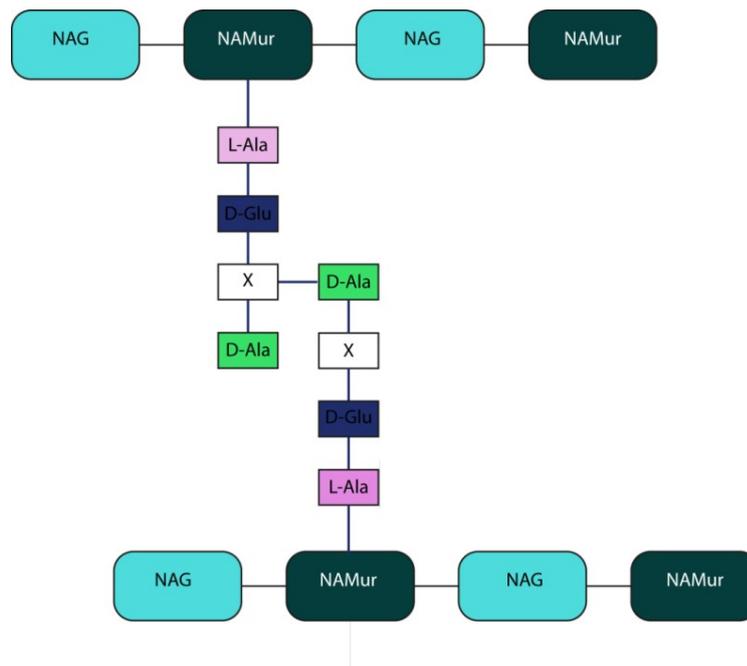


Figura 5 Esquema representativo de la estructura del peptidoglicano de *Lactobacillus*. X es el di-aminoácido que pueden ser Lisina, asparragina o diaminopimelico según la especie.

Debido a la combinación de las cadenas rígidas de los aminoazúcares, unidas con puentes peptídicos flexibles, la capa de PG resulta ser una la malla con una estructura fuerte pero también elástica.

1.5.3 Ácidos Teicoicos

Existen dos tipos de ácidos teicoicos, el ácido teicoico de pared (WTA) asociado covalentemente al PG por enlaces fosfo-diester entre el ácido N-acetilmurámico y unidad de unión compuesto por el disacárido N-acetilglucosamina-N-acetilmanosamina, y el ácido lipoteicoico (LTA) unido a membrana celular por un ancla glicolípídica de diglucosildiácilglicerol (Figura 6). La presencia de los ácidos teicoicos (WTA y LTA) está generalizada en bacterias Gram positivas y constituyen entre el 35-50% de la pared aunque ciertas especies bacterianas, incluyendo *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, parecen contener solo LTA [2], [27].

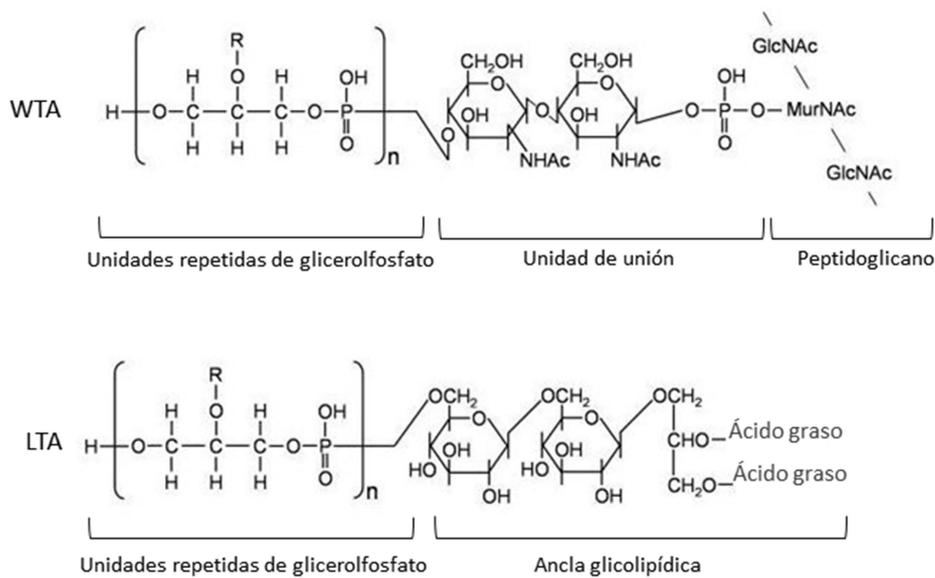


Figura 6 Estructura química de los ácidos teicoicos de pared (WTA) y ácidos lipoteicoicos (LTA). Imagen modificada de [28].

En lactobacilos, ambos polímeros conforman largas cadenas cargadas negativamente de poliglicerolfosfato que pueden ser sustituidos por esterificación con D-alanina o D-glucosa [28]–[30]. Pueden existir diferencias en el largo de las cadenas y el grado de sustitución con D-alanina entre especies. Se ha analizado por resonancia magnética nuclear la estructura de los LTA de cuatro cepas de *Lactobacillus*: *L. plantarum* WCFS1, *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* 100-23 y *L. delbrueckii ssp. lactis* ATCC 15808 [31], [32], hallándose una diferencia en el largo de las cadenas: 20-22 residuos de glicerolfosfatos en *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus reuteri*, 33 y 50 residuos en *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus rhamnosus* respectivamente.

La sustitución en D-alanina está directamente relacionada con las propiedades iónicas y función de estos polímeros. Su función es mantener el ambiente iónico en particular secuestrando cationes divalentes y el gradiente de pH para sostener el potencial de membrana. La afinidad de los antibióticos catiónicos, como Nisina, por las bacterias es consecuencia de su carga positiva que garantiza afinidad por la carga negativa de la envoltura bacteriana. La incorporación de la D-alanina, con cargas positivas en los ácidos teicoicos, proporciona a las células varias ventajas adaptativas como, la

formación de biopelículas o *biofilm*, una mejor adhesión a las células huésped y la resistencia a los péptidos antimicrobianos catiónicos [33].

Los ácidos teicoicos conforman la capa más externa (en especies que no poseen S-layer) y junto con el PG, los WTA y LTA componen una malla polianiónica que provee funciones, relacionadas con la división, porosidad y mantenimiento de un medio iónico apropiado. Mutantes deficientes en LTA de *Lactobacillus acidophilus* exhiben una morfología elongada [34] similar a la observada cuando se crece en alta sal, y resultaron sensibles a altas concentraciones de manganeso, sugiriendo un rol de los LTA en la homeostasis iónica como se había sugerido para *Lactobacillus casei* [35], [36].

1.6 Respuesta al estrés osmótico y envoltura

Lactobacillus sp. está expuesto frecuentemente a condiciones ambientales adversas tanto en su hábitat natural como en los procesos industriales. Cuando son utilizados como cepas probióticas, se enfrentan a un estrés ácido en su pasaje a través del estómago, y cuando se los emplea para la fermentación de alimentos, a un estrés térmico, ya que en el proceso de pasteurización de las materias primas se utilizan altas temperaturas. En sus variadas aplicaciones en la industria alimenticia, *Lactobacillus sp.* también puede ser expuesto a un estrés osmótico debido al agregado de sal y/o azúcar a los productos por ejemplo, durante la producción y maduración de quesos, fermentación de carne y en el proceso de elaboración del yogur.

El estrés osmótico es el aumento o la disminución en la fuerza osmótica del ambiente de un organismo; una respuesta a estrés osmótico es el conjunto de procesos adaptativos activos que suceden en una célula en oposición al cambio en la osmolaridad. Es una de las perturbaciones ambientales más adversas para un microorganismo, que puede causar una disminución en la tasa de crecimiento o la supervivencia y afectar las actividades metabólicas.

La membrana citoplasmática de las bacterias constituye una barrera eficaz contra el pasaje de la mayoría de los solutos del medio y los metabolitos presentes en el citoplasma. Para sobrevivir al estrés osmótico, las células necesitan adaptarse acumulando solutos compatibles específicos en condiciones hiperosmóticas y liberarlos bajo una condición hipoosmótica. Los principales solutos descritos son iones como el K^+ ; aminoácidos (glutamato, prolina), derivados de aminoácidos

(péptidos, aminoácidos N-acetilados), aminas cuaternarias (glicin-betaína, carnitina), hidratos de carbono (sacarosa, trehalosa) y tetra-hidro-pirimidinas (ectoínas) [2]. *Lactobacillus sp.* tiene una limitación en la síntesis de solutos compatibles, siendo la principal estrategia de osmotolerancia el ingreso activo de tales compuestos del medio de cultivo. En *Lactobacillus casei* se observó que la presencia de di- y tri-péptidos en un medio químicamente definido, aumentaron la osmotolerancia, mediante un estudio del sistema proteolítico se demostró que, en alta osmolaridad la proteasa asociada a pared PrtP y la peptidasa intracelular PepX aumentaron su actividad y fueron desreprimidas en presencia de péptidos. Estos resultados demostraron una nueva estrategia de osmorresistencia en *Lactobacillus casei* llevada a cabo por una función proteolítica para acumular un *pool* de aminoácidos y pequeños péptidos como moléculas osmoprotectoras [37].

La estabilidad de las membranas celulares desempeña un papel muy importante en la adaptación a diferentes tipos de estrés. En condiciones de un estrés hiperosmótico se produce un aumento en la hidrofobicidad de la pared de *Lactobacillus sp.*, en las bacterias Gram positivas las moléculas que confieren hidrofobicidad están relacionadas con polímeros externos como los ácidos lipoteicoicos y las proteínas de envoltura. Los cambios inducidos en los perfiles lipídicos en la membrana celular probablemente constituyen una de las principales respuestas fisiológicas de las células para la supervivencia en el tracto gastrointestinal, por ejemplo en *Lactobacillus reuteri* se observaron cambios en el perfil de lípidos cuando fue sometido a un estrés por sales biliares [2]. Por otro lado, en *Lactobacillus casei* se han descrito modificaciones de la pared y tamaño celular cuando se crece a la bacteria en un medio con alto contenido de sal. Este aumento significativo del tamaño celular se ha correlacionado con un crecimiento más lento cuando fue expuesto a un estrés salino respecto al crecimiento en condiciones control [23].

2. Capa S (S-layer)

2.1 Estructura y ensamblado

La S-layer, conforma arreglos monomoleculares cristalinos de una o varias proteínas o de glicoproteínas que se auto-ensamblan formando una matriz bidimensional regular. Las S-layers están presentes en especies de los dominios *Archaea* y *Bacteria* (Gram positivas y Gram negativas). Como se muestra en la Figura 7 la S-layer forma un enrejado ordenado regularmente que puede tener simetrías oblicuas (p1, p2), cuadradas (p4) o hexagonales (p3, p6). Dependiendo del tipo de entramado, la una unidad morfológica consiste en una, dos, cuatro, tres o seis subunidades proteicas o glicoproteicas, que tienen una separación centro-centro de 4-35 nanómetros. Esta estructura puede ser muy porosa, con poros que ocupan hasta un 70% de la superficie bacteriana. El tamaño de los poros puede ser idéntico, o formar una capa con dos o más clases de poros. [38], [39]

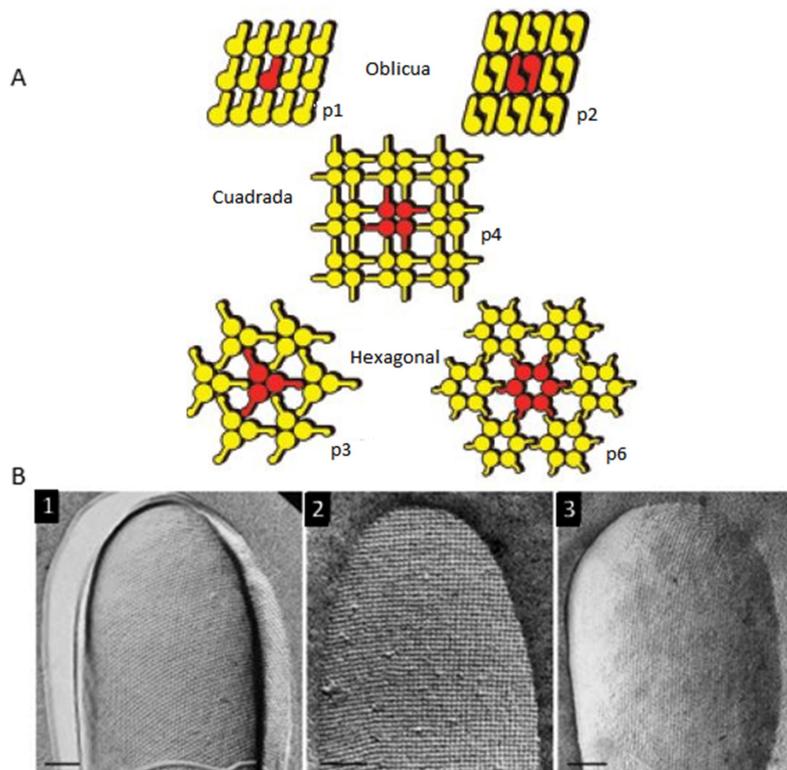


Figura 7 A Microscopía electrónica de transmisión de (1) *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 la cual presenta una simetría hexagonal p6 (2) *Desulfotomaculum nigrificans* B200-71 con simetría cuadrada p4 (3) *Geobacillus* con simetría oblicua p2. Barras = 100 nm. Imagen extraída de [40] **B** Esquema de los distintos tipos de entramados de la Capa S. Imagen extraída de [41].

En el género *Lactobacillus* la presencia de la capa de S-layer se ha descrito en varias especies, pero no en todas. Las especies de lactobacilos con S-layer incluyen *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. kisonensis*, *L. otakiensis*, *L. parafarraginis*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. kefiranofaciens*, *L. parakefiri* y *L. kefiri* [42].

Por otra parte, algunas cepas de *Lactobacillus* poseen múltiples genes (*slp*) que codifican para diferentes proteínas en la misma cepa, en el caso de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se habían reportado dos genes, *slpA* y *slpB*, [43]; a partir de la reciente secuenciación del genoma de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, en el laboratorio donde se realizó la presente Tesis [44], se confirmó la presencia de tres genes codificantes de las proteínas S-layers *slpA*, *slpB* y *slpX* siendo la proteína SlpA la predominante. Las estructuras primarias de las distintas S-layers de *Lactobacillus* presentan una gran variabilidad, en la Figura 8 se muestra un análisis filogenético basado en las secuencias de genes *slp* de distintos *Lactobacillus* [19].

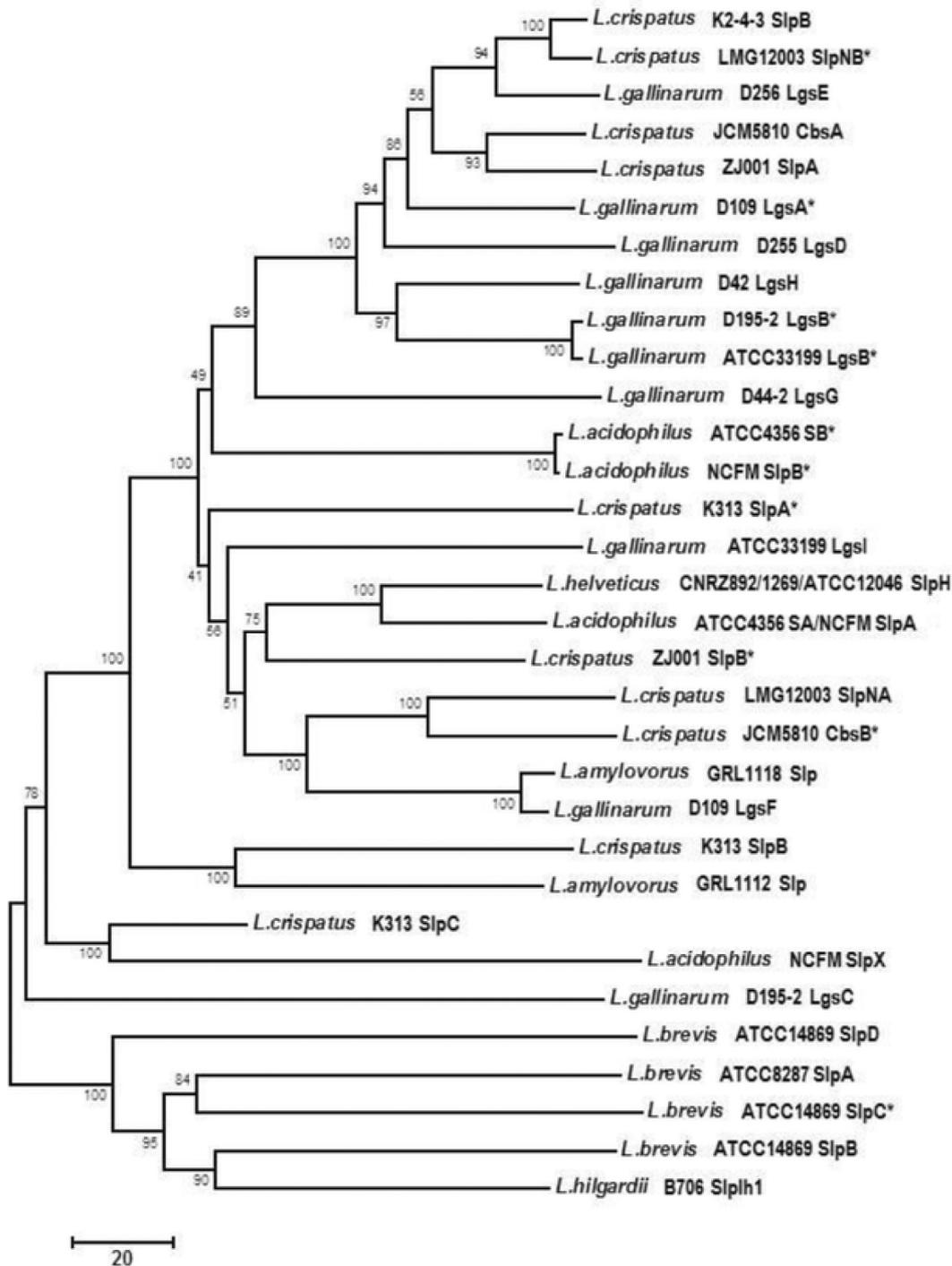


Figura 8 Árbol filogenético realizado por el método de Neighbour-joining utilizando la proteína S-layer. Imagen extraída de [42].

En el caso de la SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se observa un 100% de similitud con la SlpA de *Lactobacillus acidophilus* NCFM y ambas proteínas tienen una relación filogenética más cercana con *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus crispatus*. Las proteínas S-layers de *Lactobacillus* son bioquímicamente únicas: no poseen los motivos homólogos de la capa S (SLH) presentes en otras bacterias portadoras de S-layer, los tamaños varían entre 25 y 71 kDa y los valores de punto isoeléctrico

predichos son altos (9,4–10,4) en comparación con los puntos isoeléctricos de las proteínas S-layers de otras bacterias. Sólo se ha descrito la simetría del tipo oblicua o hexagonal para *Lactobacillus* y la glicosilación es una modificación post-transduccional que se ha encontrado y caracterizado en unas pocas especies. En particular, en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 la simetría descrita es oblicua p2 [45], posee un punto isoeléctrico de 9,4 y un peso molecular de 45 kDa. Las sub-unidades se mantienen juntas y se unen a la superficie celular subyacente mediante interacciones no covalentes [42], [46]. La capa de S-layer bacteriana generalmente tienen un espesor de 5 a 20 nm, mientras que la de arqueas tienen un espesor de hasta 70 nm [41].

Las S-layers en las *Bacterias* se unen a diferentes estructuras de la envoltura bacteriana. Mientras que en las Gram negativas la S-layer se adhiere al lipopolisacárido de la membrana externa mediante interacciones iónicas, carbohidrato-carbohidrato, proteína-carbohidrato y/o proteína-proteína, en las bacterias Gram positivas, la unión puede ocurrir con el peptidoglicano o con polímeros de pared celular como los ácidos teicoicos, los lipoglicanos o los ácidos teicurónicos [39].

En el género *Bacillus* los dominios SLH son los responsables del anclaje de la proteína principalmente a polímeros de la pared celular o directamente al peptidoglicano. Como se mencionó anteriormente, en las proteínas S-layers de *Lactobacillus sp.* no se han descrito dominios SLH. Sin embargo, Smit y colaboradores [45] describieron que la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee dos dominios estructurales con funciones diferentes: un dominio de interacción proteína-proteína (denominado de cristalización) correspondiente a los dos tercios de la porción amino-terminal de la proteína, y un dominio de unión a la pared celular formado por el tercio restante de la molécula en el carboxilo-terminal. Luego, Smit y Pouwels [47] demostraron que dentro del dominio de unión a la pared, la porción cercana al amino-terminal es la que interactúa con alguno de los ácidos teicoicos (WTA o LTA). Ya se ha demostrado en *Lactobacillus crispatus*, que tanto los WTA como los LTA son los ligandos a la pared celular de la proteína S-layer. Posteriormente, por un análisis *in silico* realizado en el grupo de investigación donde se desarrolló esta Tesis doctoral, se predijo la presencia de dos dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) en la porción carboxilo-terminal de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [48]. La característica glucosídica de los polímeros que interactúan con la S-layer

y la presencia de los CRD en la secuencia aminoacídica, sugieren que la S-layer tendría un comportamiento de tipo lectina. Al inicio de esta investigación no existían reportes de actividad del tipo lectina en *Lactobacillus acidophilus*, por esta razón uno de los objetivos de esta Tesis será caracterizar la capacidad de lectina de la S-layer.

2.2 Organización Genética y Biosíntesis

Algunas de las cepas de *Lactobacillus* que poseen múltiples genes *slp* son: *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus crispatus* ZJ001, *Lactobacillus crispatus* K313, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus brevis* ATCC 367 y *Lactobacillus buchneri* CD034. Sin embargo, se ha reportado la presencia de genes silenciosos, variación antigénica, expresión alternativa *in vivo* o *ex vivo*, expresión secuencial durante el crecimiento o S-layers compuestas por dos polipéptidos diferentes y sólo se ha demostrado para algunas cepas la expresión simultánea de más de un gen *slp* en condiciones experimentales [46].

Las S-layers representan aproximadamente entre el 10-15% del total de las proteínas celulares bacterianas, por lo que su síntesis representa un gran esfuerzo para el microorganismo. La síntesis eficiente de las proteínas S-layers en lactobacilos se logra gracias a varios factores:

1- Los tiempos de vida media de los ARN mensajeros (ARNm) del gen de la proteína S-layer son excepcionalmente largos (14 y 15 minutos para la S-layer de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, respectivamente). Para *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus crispatus* K313, esto se debe a que el transcripto posee una región 5' no traducida (UTR) larga que forma una estructura secundaria estable.

2- Un uso sesgado de codones, para los genes *slp* de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

3- Promotores eficientes, por ejemplo el promotor del gen *slpA* de *Lactobacillus acidophilus* es dos veces más efectivo que el gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa, que es uno de los promotores más fuertes en el género *Lactobacillus*.

4- Presencia de múltiples promotores, que pueden actuar para mejorar y/o regular la expresión génica. Por ejemplo, en la secuencia del gen *slpA* de *Lactobacillus brevis*

ATCC 8287, *slpB* de *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 y *slpA* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Además en *Lactobacillus brevis* ATCC 8287, se demostró que ambos promotores *slp* estaban activos, mientras que en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, sólo el promotor más distal de la región codificante es funcional [42].

Por otra parte, todas las S-layers, a excepción de *Caulobacter sp.* y *Campylobacter sp.*, son sintetizadas con un péptido señal en el extremo amino-terminal el cual es procesado luego de la translocación a través de la membrana plasmática (Sleytr et al., 2000). Las proteínas S-layers de *Lactobacillus* caracterizadas contienen un péptido señal de 25 a 32 aminoácidos, lo que indica que la secreción es a través del sistema Sec.

En relación a la estructura primaria, las proteínas S-layers de los lactobacilos se caracterizan por tener un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, que van del 31,9% al 38,7%; un bajo contenido de aminoácidos que contienen azufre, el máximo es el 2%; y un alto porcentaje de aminoácidos con grupos hidroxilo, cuya abundancia es del 23 al 33%. El número de aminoácidos cargados positivamente puede ser hasta 12,5% y siempre es mayor que el número de aminoácidos cargados negativamente, lo que lleva a los altos valores de punto isoeléctrico (Pi) calculados para estas proteínas [19], en la Tabla 2 se resumen algunas de estas características de las S-layers para cepas del género *Lactobacillus*.

Especie	Cepa	Masa Molecular (kDa)	Pi	% aminoácidos hidrofóbicos	% aminoácidos azufrados	Residuos cargados pos/neg
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4365	44	10,4	36,4	0,2	6,8/10,4
<i>L. helveticus</i>	CNZR 892	43,1	10,19	35,9	0,7	8,8/11,2
<i>L. crispatus</i>	JCM 5810	43,9	9,69	36,8	2	7,1/11,2
<i>L. gasearii</i>	VPI 1175	29,8	9,98	32,9	1,1	5,1/8,7
<i>L. johnsonii</i>	ATCC 332	26,8	9,45	37,7	0,9	6/6,9
<i>L. kefirii</i>	CIDCA 8321	57,03	9,6	38,4	-	9,6/5,7
<i>L. brevis</i>	ATCC 8287	46	9,88	32,4	0,9	6,6/10,9

Tabla 2 Características de la proteína S-layer en el género *Lactobacillus*.

La glicosilación es la única modificación post-traducciona que se ha descrito en las S-layers de *Lactobacillus*. Al presente se ha reportado que las S-layers de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Lactobacillus acidophilus* NCFM,

Lactobacillus plantarum 41021/252 y varias cepas de *Lactobacillus kefir* se encuentran glicosiladas [46].

2.3 Funciones

El hecho de que las proteínas S-layers sean las moléculas más abundantes en los microorganismos que las poseen, apunta a una importancia biológica significativa. Sin embargo, no se ha encontrado una única función que la describa en los microorganismos que expresan S-layer. Dentro de las funciones de las proteínas S-layers se las involucra con roles de protección contra enzimas hidrolíticas, cambios de pH y estrés, la captación de moléculas e iones y el mantenimiento de la forma y rigidez de la célula. Numerosos estudios han demostrado, en las cepas de *Lactobacillus sp.* que poseen S-layer, que esta tendría un rol en las propiedades probióticas de los lactobacilos involucrándola directamente en los fenómenos de exclusión de patógenos [19], [41], [49]–[52].

Por otro lado, la S-layer tendría un rol protectoro frente a condiciones ambientales adversas, la eliminación de la proteína S-layer por un tratamiento con LiCl provocó una menor viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* M92 cuando se lo expuso a condiciones del tracto gastrointestinal [53] poniendo en evidencia la posible función protectora de la S-layer.

Las bacterias han adoptado un repertorio de mecanismos que les permiten enfrentar los cambios en las condiciones osmóticas ambientales. La presencia del peptidoglicano compensa las diferencias de presión entre el medio interno y externo de la célula, esto no ocurre en arqueas donde el único componente de la pared celular es la S-layer y el espacio periplasmático es menos restrictivo que el de las bacterias debido a la porosidad de las S-layers. La turgencia actúa predominantemente sobre la membrana celular y en condiciones de estrés osmótico dependen de la S-layer que actúa como osmoprotector estructural [54]. La relación entre el estrés osmótico y las proteínas S-layers está ampliamente descrita para el dominio *Archaea*.

Si el interior de una vesícula es hipertónico se produce una afluencia de agua, lo que aumenta el volumen de la vesícula, su área de superficie y su diámetro. La entrada de agua continúa hasta que la tensión de la membrana evita una mayor expansión y compensa la presión intravesicular, o la membrana se vuelve permeable y se rompe.

En arqueas la S-layer está anclada a la membrana por un ancla lipídica y se dilata junto con la membrana celular hasta que se estira de tal manera que es imposible una expansión adicional o las conexiones de la S-layer se rompen. Si las interacciones entre las subunidades de S-layer son estables el anclaje de la proteína a la membrana aumenta la estabilidad de la envoltura lipídica, cuando se la compara con una estructura sin S-layer [54].

En *Lactobacillus casei* se han descrito modificaciones de la pared celular y tamaño cuando se crece a la bacteria en un medio con alto contenido de sal. Este aumento significativo del tamaño celular se ha correlacionado con un crecimiento más lento cuando fue expuesto a un estrés salino respecto al crecimiento en condiciones control [23]. Al analizar la envoltura celular mediante microscopía electrónica de transmisión se observó que las modificaciones en el tamaño celular fueron acompañadas por cambios en la estructura de la envoltura celular. Asimismo, ha sido reportado que cuando se crece a *Lactobacillus acidophilus* IBB801 en condiciones de estrés salino por sales biliares al 0,05 % m/v o NaCl al 2% m/v hay un incremento en la síntesis de la S-layer. El aumento de la expresión de la S-layer en condiciones de estrés ambiental probablemente ayude a la cepa a mantener la viabilidad celular cuando se enfrenta a condiciones de cultivo hostiles [55]. Se ha informado que el estrés osmótico inducido por una alta concentración de sal aumenta la actividad autolítica y la supervivencia después de la liofilización en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* [56].

2.4 Aplicaciones

En los últimos años se han desarrollado o sugerido diversas aplicaciones biológicas para las proteínas S-layers puras extraídas de distintos *Lactobacillus*, entre ellas utilizarlas como *carriers* en la inmunización oral de humanos o animales, y como agentes antiadhesivos o preventivos contra enfermedades infecciosas [42].

La S-layer se puede extraer de la pared bacteriana utilizando diferentes métodos, la mayoría se relacionan con la ruptura de uniones puente de hidrógeno (urea o cloruro de guanidina), detergentes a pH ácido o por sustitución de cationes (Li^+ o Na^+). Luego de la extracción de la superficie bacteriana, y al remover el agente disruptor utilizado para la extracción, las S-layers tienen la capacidad intrínseca de formar productos auto-ensamblados de flotación libre en suspensión (p. ej., láminas planas, tubos,

vesículas), re-ensamblarse en monocapas o bicapas en soportes sólidos, en interfase aire-agua, en películas lipídicas o cubrir liposomas y nanopartículas completamente [46] (Figura 9).

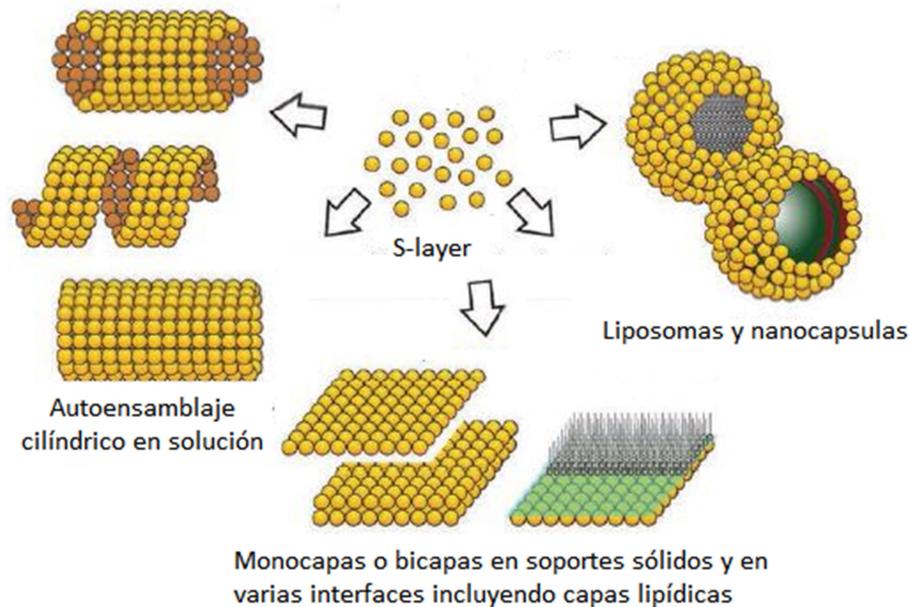


Figura 9 Esquema representando los posibles re-ensamblajes de proteínas de la capa S. Imagen modificada de [57]

Gracias a esta propiedad de las S-layers y, en combinación con la exposición repetitiva de grupos funcionales, se establecieron las bases para el desarrollo de *carriers* para biomoléculas, dispositivos de diagnóstico, biosensores, biocatalizadores, etc. [41], [57]. En relación a su uso como *carriers*, la expresión a nivel de superficie celular de enzimas o epítopes requiere asociarlos a un sistema de transporte hacia el exterior celular. Varias proteínas de anclaje fueron analizadas para determinar su eficiencia de unión de proteínas híbridas a la membrana celular o a la pared de *Lactobacillus*, tales como proteínas que contienen el motivo de anclaje LPXTG, proteínas transmembrana y proteínas S-layers. Las proteínas que contienen el motivo LPXTG son las más utilizadas en la mayoría de los sistemas de exposición de proteínas en la superficie celular. Sin embargo, dado que las proteínas fusionadas al motivo de anclaje a pared celular son expresadas en las células productoras esto hace que la cepa sea un organismo modificado genéticamente (OMG) [58] y no pueda ser utilizado en humanos.

La incorporación de péptidos o dominios funcionales bien conocidos en regiones hidrofílicas de las proteínas S-layer ha sido realizada con éxito, como ejemplo, utilizando el fragmento C de la toxina del tétanos (ToxC) de *Clostridium tetani* como antígeno en el modelo murino, se ha demostrado que después de la administración oral se obtiene una respuesta inmune de mucosas así como sistémica [59]. Asimismo, Hu y colaboradores [58] construyeron una proteína de fusión entre la región carboxilo terminal de la S-layer de *Lactobacillus crispatus* K2-4-3 y la proteína verde fluorescente (GFP), que fue capaz de unirse a las paredes celulares de varias cepas de *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* y *Lactococcus lactis in vitro*, lo que demuestra que la S-layer tiene la capacidad de unirse a la superficie celular en un sistema heterólogo.

Por lo tanto, utilizar a las proteínas S-layers fusionadas a antígenos de diferentes patógenos y unirlos a cepas probióticas como un vehículo de vacuna, constituye una estrategia atractiva ya que los lactobacilos persisten en el tracto gastrointestinal, se adhieren a las células epiteliales, modulan la respuesta inmune y tienen una ventaja significativa segura sobre los patógenos vivos atenuado.

En relación al potencial antimicrobiano de las S-layers, para *Lactobacillus kefir* se ha reportado que la S-layer ejerce una acción protectora, contra la invasión de *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*, a las células Caco-2, así como también antagoniza los efectos citopáticos de las toxinas de *Clostridium difficile in vitro* a través de una interacción directa S-layer-toxinas [60], [61]. Además estudios del laboratorio donde se realizó la presente Tesis han demostrado que la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tiene actividad de mureína hidrolasa (endopeptidasa) contra la pared celular de, por ejemplo, *Salmonella enterica*. Esta actividad de mureína hidrolasa proporciona a las cepas portadoras de S-layer un mecanismo adicional para inhibir la adhesión de bacterias Gram negativas y la exclusión competitiva de patógenos [62], [63].

En cuanto a las propiedades antivirales de la S-layer pura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4365, se ha reportado que impide la infección del virus Junín en células 3T3 que sobreexpresan el receptor DC-SIGN, y la infección del virus influenza cepa H9N2 en células dendríticas [48], [64]. En ambos casos, la inhibición estaría relacionada con la interacción entre la S-layer y el receptor DC-SIGN, previamente establecida por

Konstantinov [65] para la SlpA de *Lactobacillus acidophilus* NCFM, que en estas células estaría actuando como un receptor para la entrada viral.

3. Lectinas

Cómo se mencionó en el ítem 2.1 la SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 podría tendría un comportamiento de tipo lectina debido a la presencia de los CRD en su secuencia aminoacídica. Las lectinas son proteínas o glicoproteínas, distribuidas ampliamente en plantas, animales, virus y bacterias, que se unen de manera reversible a monosacáridos u oligosacáridos, libres o unidos a superficies celulares. La interacción de las lectinas con los carbohidratos puede ser tan específica como la interacción entre un antígeno y un anticuerpo o un sustrato y una enzima [66]. Sin embargo, las interacciones lectina monosacáridos libre son relativamente débiles con constantes de disociación en el orden de micromolar a milimolar [67], [68], en comparación a la interacción lectina con oligosacáridos unidos a superficies que presenta constantes de disociación del orden de los nanomolares. Se identifican fácilmente basándose en la secuencia de aminoácidos primaria, debido a la presencia de dominios de reconocimiento de carbohidratos. Además, las lectinas pueden diferenciarse de otras moléculas que interactúan con carbohidratos por su capacidad para aglutinar células [69]. La actividad aglutinante, es similar a la obtenida con anticuerpos, y también puede ser inhibida específicamente por compuestos de bajo peso molecular, que en el caso de las lectinas son carbohidratos o glicoconjugados. El método clásico, para detectar la presencia de una lectina en un material biológico, es examinando su capacidad para aglutinar eritrocitos. Si se obtiene un resultado positivo, es esencial mostrar que la aglutinación es inhibida por monosacáridos u oligosacáridos, para demostrar la especificidad de unión con carbohidratos [70].

Las lectinas pueden ser clasificadas según su origen taxonómico, localización en el organismo o célula, homología de secuencia o por la especificidad de unión a carbohidratos y glicoconjugados. Basándose en la especificidad de unión relativa a carbohidratos las lectinas se clasifican en seis grupos, lectinas de unión a: N-acetilgalactosamina; galactosa; manosa/glucosa; N-acetilglucosamina; fucosa y ácido siálico [71].

Las lectinas son capaces de interactuar con los glicanos presentes en las glicoproteínas, glicolípidos o polisacáridos. La glicosilación proteica es el resultado de adicionar carbohidratos o glicanos en el residuo asparragina (enlaces N-glicosídicos) cuando está presente la secuencia consenso (Asn-X-Ser / Thr) o en los residuos serina/treonina (enlaces O-glicosídicos). Tanto los enlaces N-glicosídicos como los enlaces O-glicosídicos implican una serie de reacciones enzimáticas que dan como resultado diversas estructuras de N-glicanos (glicanos de alta manosa, complejos e híbridos) y variantes de O-glicano que contienen hasta 8 estructuras de O-N-acetilgalactosamina [72](Figura 10).

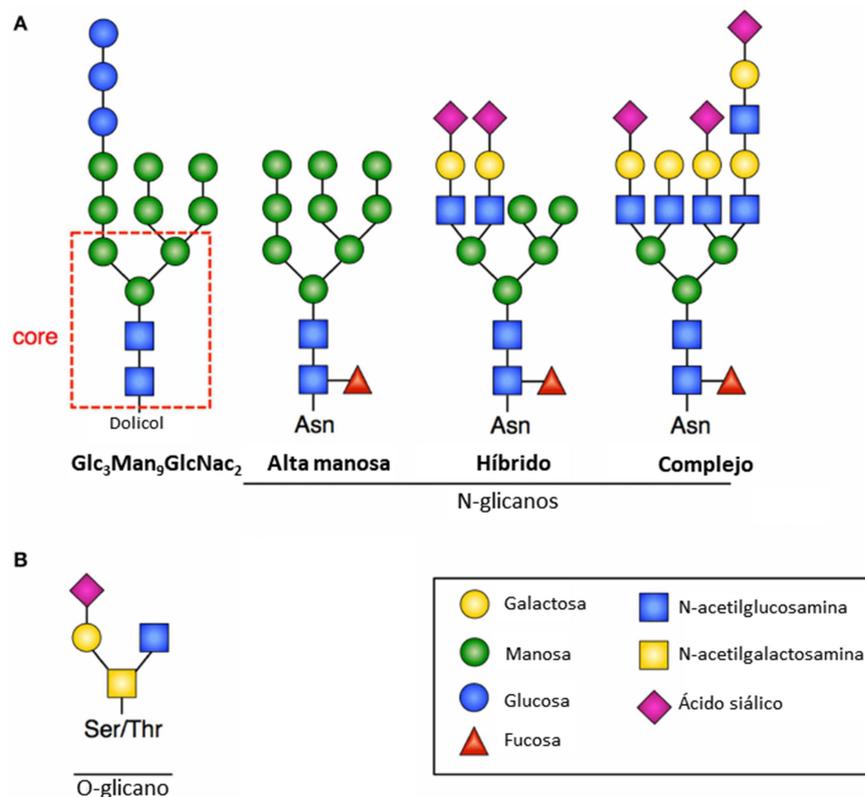


Figura 10 Tipos de glicosilaciones de las proteínas (A) Ejemplos de N-glicanos, en el extremo izquierdo está el precursor de 14 azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$) con núcleo conservado (indicado en el cuadro de puntos rojos) **(B)** Ejemplo representativo de una estructura O-glicano, no existe un núcleo conservado [73].

Las funciones de las lectinas en la naturaleza son extremadamente diversas y todas se basan en su capacidad para reconocer y unirse a carbohidratos de los glicoconjugados, ya sea en solución o presentes en las células.

Las lectinas de las plantas, actúan como defensa contra diferentes tipos de hongos e insectos fitopatógenos, así como contra los invertebrados y vertebrados depredadores. Peumans y colaboradores [74] demostraron que la ricina y las toxinas relacionadas a la ricina protegen las plantas contra animales herbívoros y/o invertebrados fitófagos.

Una gran variedad de funciones han sido descritas para las diferentes familias de lectinas animales. Las galectinas, las lectinas animales con más funciones asignadas, son esenciales para la diferenciación normal y el crecimiento de todos los animales multicelulares, pueden inducir la proliferación, arresto celular o apoptosis, y están implicadas en la morfogénesis de órganos, metástasis de células tumorales, tráfico de leucocitos, respuesta inmune e inflamación, así como reconocimiento de matriz extracelular [70], también modulan positiva o negativamente la infección viral de HSV-1, HIV, dengue, entre otros [75]. Además las lectinas animales desempeñan un papel importante en la defensa inmunológica contra los patógenos cuando están presentes en las células del sistema inmune innato, por ejemplo, el receptor lectina de tipo C (DC-SIGN), la lectina tipo C específica de células dendríticas (Dectina-1 y Dectina-2) y el receptor de manosa [76].

Las lectinas bacterianas, por su parte, son las responsables de la interacción entre las bacterias y las células eucariotas. En bacterias patógenas como *E. coli*, *H. pylori*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* median la adhesión de los microorganismos a las células huésped, un requisito para que se produzca la infección. Una de las lectinas bacterianas más estudiada es la adhesina FimH ubicada en la punta de los pili tipo 1 de *E. coli* uropatógena, donde desempeña un rol en la unión al tracto urinario mediante la interacción específica con manosa [77]. Golowczyc y colaboradores [78] demostraron que *Lactobacillus kefir* fue capaz de co-agregar con *Sacharomyces lipolytica* y aglutinar glóbulos rojos. Esta capacidad de co-agregación y hemoaglutinación fue inhibida por un tratamiento con LiCl, sugiriendo que la S-layer de *Lactobacillus kefir* tiene un comportamiento del tipo lectina.

En los últimos años surgió un gran interés en el rol que cumplen las lectinas en la interacción entre las células eucariotas y los patógenos en enfermedades infecciosas y su potencial rol antimicrobiano. Las funciones antimicrobianas descritas para las

lectinas incluyen el bloqueo de la invasión y la infección, la inhibición del crecimiento y la germinación, regulación de la adhesión y migración de las bacterias [79].

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar funcional y estructuralmente la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Objetivos específicos

1. Explorar y caracterizar el comportamiento tipo lectina de la proteína S-layer, y su capacidad de unión con otros componentes de la pared del lactobacilo, y con macromoléculas de la superficie de células eucariotas.
2. Confirmar la localización funcional de los CRD en la estructura primaria de la proteína y evaluar su participación en la capacidad de la S-layer de unir azúcares libres o en diferentes macromoléculas.
3. Determinar la influencia de la respuesta a estrés salino de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en la expresión de los genes que codifican para las diferentes proteínas S-layers.
4. Investigar el efecto que tiene la S-layer pura sobre la infección viral y en la capacidad de adhesión de bacterias patógenas a superficies bióticas o abióticas, y su relación con el reconocimiento de azúcares.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas Microbianas

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Lactobacillus kefir* JCM 5818, *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 y *Lactobacillus casei* BL23 se cultivaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C, en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) (Biokar, Beauvais, Francia). Para evaluar las condiciones de estrés osmótico se creció a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en MRS agregando NaCl a concentraciones finales de 0,4; 0,45; 0,6 y 0,8 M.

Como cepa de clonado se utilizó *Escherichia coli* Top10 (ThermoFisher Scientific) y HMS 174 (DE₃) (Novagen Merck Millipore, USA) como cepa de expresión. Ambas cepas se propagan en medio Luria Bertani (LB) a 37°C en condiciones aeróbicas. Los antibióticos utilizados fueron kanamicina, 30 µg ml⁻¹ (Sigma, USA) y ampicilina, 100 µg ml⁻¹ (Sigma, USA). *Bacillus cereus* BGSC 6A1, *Salmonella enterica* serovar *Newport* NCTC 129 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 se propagaron en medio LB en condiciones aeróbicas a 37°C y *Saccharomyces cerevisiae* 1115 se propagó en medio para levaduras YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) en condiciones aérobicas a 30°C.

2. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron: HT-29 (Gentilmente proporcionada por la Dra. Ferrero, IDEHU CONICET-UBA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires) proveniente de un adenocarcinoma colorrectal humano la cual adquiere un crecimiento indiferenciado y no polarizado. Caco-2 (Gentilmente proporcionada por la Dra. Karina Mariño, IByME-CONICET) y Caco-2/TC-7 (Gentilmente proporcionada por la Dra. Minnaard, CIDCA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata) derivadas de un adenocarcinoma de colon humano, esta línea celular se diferencia espontáneamente a enterocitos a los 14 días de cultivo. La línea celular Caco-2/ TC7 es un clon aislado de Caco-2 que se diferencia a enterocitos en tiempos más cortos y forma una población más homogénea que la línea Caco-2. Además se utilizó la línea celular A549, células humanas de epitelio alveolar basal derivadas de un adenocarcinoma de pulmón y la línea celular Vero, células epiteliales del riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*.

Las líneas celulares Vero y A549 fueron crecidas en medio mínimo de Eagle (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (MEM 5% SFB). Las líneas celulares restantes fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM, Gibco), suplementado con 10% de SFB (D-MEM 10%). En todos los casos se utilizó 50 µg/ml de gentamicina y las monocapas fueron subcultivadas semanalmente y mantenidas a 37°C en estufa gaseada (5% CO₂).

3. Virus

Las cepas de herpes virus utilizadas en esta tesis fueron HSV-1 cepa KOS y la recombinante YK608 que fue gentilmente proporcionadas por el Dr. Yasushi Kawaguchi, Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio, Japón, ambas se propagaron en células Vero. La cepa Indiana de VSV también se propagó en células Vero y AdV-5 en células A549.

Para preparar los stocks virales, células Vero o A549 crecidas a confluencia en botella T25 se infectaron con 1 ml de cada cepa de HSV-1, VSV o AdV-5 y luego de 1 h a 37°C, se retiró el inóculo viral y las células se cubrieron con 6 ml de MEM suplementado con 1,5% de SFB (MEM 1,5%) y se incubaron a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ hasta observar 100% de muerte. Luego las células se sometieron a tres ciclos de congelado y descongelado y se centrifugaron a baja fuerza G. El sobrenadante se fraccionó en alícuotas que se conservaron a -70°C y el título viral (UFP/ml) de todos los stocks se cuantificó por el método de formación de placas de lisis.

4. Titulación por el método de formación de placas en medio semisólido

Monocapas confluentes de células A549 o células Vero crecidas en placas de 24 pocillos se inocularon con 100 µl de diluciones seriadas al décimo de la muestra a titular por duplicado y se incubaron durante 1 h a 37°C. Luego de la hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas se cubrieron con 0,5 ml de medio de plaqueo. El medio de plaqueo semisólido se preparó con volúmenes iguales de MEM 1,5% en doble concentración (MEM 2X) y metil-celulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ hasta observar la formación de las placas de lisis, entre 48 y 72hs. Luego del tiempo de incubación, se fijaron las células con formol 10% (0,5 ml por pocillo) y se tiñeron con una solución 1% de cristal violeta en 10% de etanol. Las placas de lisis formadas se contaron en aquellos pocillos donde se

observaron entre 30 y 150 placas y se calculó el título viral (UFP/ml) con la siguiente ecuación:

$$\text{Título viral} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas promedio}}{\text{volúmen inóculo(ml)}} \times \text{Factor de dilución}$$

5. Purificación de proteína la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Un cultivo de 300 ml de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecido en MRS a 37°C por 16 h, se cosechó por centrifugación a 2000 x g por 20 minutos y se realizó un lavado con PBS. Luego con el fin de separar las proteínas asociadas a la S-layer (SLAPS), el pellet se re-suspendió en LiCl 1 M, se agitó vigorosamente utilizando un agitador tipo vortex y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. A continuación se centrifugaron las células a 2000 x g por 20 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en LiCl 5 M, agitaron vigorosamente utilizando un agitador tipo vortex e incubaron 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 12000 x g por 20 minutos y el sobrenadante se dializó contra agua destilada a 4°C por 24-48 h con un mínimo de 3 recambios de agua. Luego de la diálisis se centrifugó a 12000 x g y el pellet se re-suspendió en PBS y almacenó a 4°C.

En los casos en los que se requirió obtener la proteína estéril el sobrenadante fue filtrado y la diálisis se realizó en condiciones de esterilidad.

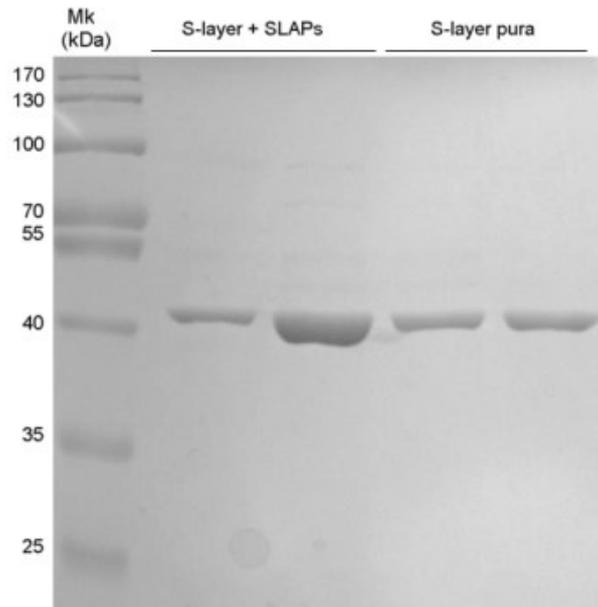


Figura 11 Purificación de la proteína S-layer. En un SDS-PAGE 12,5 % se separaron las proteínas extraídas solamente con un tratamiento con LiCl 5M, **líneas 2 y 3** (observándose una banda predominante correspondiente a la S-layer y bandas más tenues correspondientes a las SLAPs) o con un tratamiento secuencial 1 M seguido de 5 M de LiCl **líneas 4 y 5**.

6. Determinación de la concentración proteica

La concentración de la proteína S-layer se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm. Utilizando el programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) se obtuvo el coeficiente de extinción molar (ϵ) en base a la secuencia primaria que determina que una suspensión de 1 mg/ml de proteína tiene una absorbancia a 280 nm de 0,785. La concentración de las proteínas quiméricas se determinó utilizando un espectrofotómetro UV/visible NanoDrop 2000 (ThermoFisher). Los coeficientes de extinción molar de las proteínas (ϵ) y los pesos moleculares se calcularon con el programa ProtParam.

7. Extracción de ADN de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Un cultivo de 10 ml de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecido en MRS a 37°C por 16 h se cosechó por centrifugación a 2000 x g por 5 minutos. A continuación se realizó un lavado de las células en PBS. Debido a la presencia de la proteína S-layer en la capa externa, las células recibieron un tratamiento previo con LiCl 5M para ello se re-suspendió el pellet en 1.5 ml de LiCl 5 M y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se centrifugó a 2000 x g y se lavó con 10 ml de EDTA 50 mM pH 8. El pellet fue re-suspendido en 500 μ l de Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM, 1 mg/ml de lisozima y 25 U/ml de mutanolisina y se incubó 2 h a 37°C para fragilizar la pared

celular. Luego se agregó ARNsa A 0,05mg/ml y proteinasa K 0,2 mg/ml y se incubó 15 minutos a 50°C.

Las células se lisaron añadiendo SDS o Sarkosyl hasta una concentración final del 1% v/v y se incubaron durante 2 h a 50° C o 16 h a 42° C. Posteriormente se agregó 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó vigorosamente con vortex y se centrifugó a temperatura ambiente a 14000 x g durante 20 minutos y se extrajo la fase acuosa. Se realizaron 2 extracciones consecutivas con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).

Los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M (mezcla por inversión) y 2 volúmenes de etanol. Inmediatamente luego del agregado de etanol se extrajo el ADN con una varilla de vidrio estéril. Se dejó secar 2 h a temperatura ambiente y se sumergió en agua para que se disuelva en heladera o a temperatura ambiente.

8. Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook *et al.*, 1989. La concentración de los geles de agarosa varió entre 1% y 1.5 %, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando buffer Tris Acetato EDTA (TAE) a 100 V en cubas de Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se utilizó el 1 kb de Promega. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 15 minutos. Los geles fueron examinados y fotografiados utilizando el Transiluminador Benchtop 3UV.

9. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la PCR se utilizó la Taq ADN Polimerasa (Promega) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

Las temperaturas utilizadas para la reacción fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95° C seguido de 30 ciclos de 15 segundos a 95° C, 20 segundos a 60° C y 20 segundos a 72° C, y un paso final de extensión de 10 minutos a 72° C. Cuando fue necesario, la temperatura del paso de apareamiento del cebador (temperatura de apareamiento o *annealing*) fue modificada a la temperatura indicada por el fabricante para cada oligonucleótido.

10. Síntesis de ADNc y PCR en tiempo real

Para la transcripción reversa se emplearon 7 mg de ARN de cada muestra extraídos utilizando el método de fenol caliente previamente descrito [35]. El ADNc fue sintetizado empleando 25 pmoles de los cebadores reversos específicos (Tabla 1). El ARN y los cebadores se calentaron a 95°C durante 5 min, para eliminar las posibles estructuras secundarias del ARN, se colocaron inmediatamente en hielo 5 min y se incubaron con 100 U de M-MLV transcriptasa reversa (Ambion) durante 1 hora a 42°C y por último 15 min a 90°C. Luego se realizó una PCR del ADNc para verificar si la síntesis fue exitosa.

A continuación se cuantificó el ARN mediante una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el termociclador MyiQ™ Real-time (Bio-Rad).

Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de ARNm, se realizó la reacción de PCR desde el ADNc con un volumen de 25 µl, en presencia de Syber Green (Stratagene) como fluoróforo intercalante y se emplearon cebadores (Tabla 1) diseñados especialmente para utilizar en el termociclador MyiQ™ Real-time (Bio-Rad). Las características en el diseño de los primers es tal que el producto amplificado sea de entre 100 a 200 nt desde la secuencia génica y cercano al inicio de transcripción del gen y se realizó con el software Primer Blast.

El programa utilizado para la PCR en tiempo real fue el siguiente: 5 min a 95°C y 40 ciclos de 20 seg. 94°C, 20 seg. 52°C y 20 seg. 72°C. Se utilizó el programa de curva de *melting* para verificar que se tratara de un producto único.

Los resultados se analizaron en base al método CT (“cycle threshold”, o ciclo umbral). El CT es el número de ciclos mínimos de PCR (amplificaciones) necesarias para que el producto de la amplificación sea detectado por el equipo. Los valores de CT fueron normalizados empleando la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S como control interno (denominado gen *housekeeping* o mantenimiento). Cada muestra se analizó por triplicado, y se analizaron muestras de dos experimentos independientes para cada condición.

Cebador directo	Cebador reverse
<i>slpA1</i> 5'-CGGGATCCATGAAGAAAAATTTAAG-3'	<i>slpA2</i> 5'-GTTGGTATTGATTGCTGATG-3'
MKKNLR	SAINT
<i>slpB1</i> 5'-AGGCCATACTGAACTT-3'	<i>slpB2</i> 5'-AGTAGCTGAAACCTTG-3'
PGHTEL	NKVSAT
<i>slpX1</i> 5'-ATCAAAGTCAACCATTC-3'	<i>slpX2</i> 5'-ACTTGAATACTTGTC-3'
NQTATI	NGQVF
<i>ARNr 16 s</i> 5'- GCGAAGGCGGCTGTCTGG - 3'	<i>ARNr 16 s</i> 5'- GGCCTGAAGGGCGGAAACC -3'

Tabla 3 Cebadores diseñados para cada proteína y secuencias de aminoácidos correspondientes.

11. Clonado y Expresión de S-layer recombinante

Para realizar la construcción quimérica se construyó un vector de expresión de fusión de proteína fluorescente verde Carboxilo-terminal (GFP), amplificando *gfp* desde el plásmido pM14 [80] con los siguientes cebadores:

GFP1-5`TGCGTCGACATGGTGAGCAAGG-3`

GFP2-5`TGGGCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCC-3`

(Las letras subrayadas corresponden a sitios de restricción).

El producto de la PCR se digirió con las enzimas de restricción Sall y XhoI y se clonó en el plásmido pET21b (Novagen, Merck Millipore, EE. UU.) para generar el vector pET21-GFP.

Luego se sub-clonó *slpA* CT en el pET28-GFP [81] río debajo y en fase de la secuencia de *gfp*.

El pET28-GFP se usó como vector de expresión de fusión GFP amino-terminal.

Todas las secuencias de ADN se amplificaron mediante PCR utilizando la ADN polimerasa Go Taq (Promega, EE. UU.) Siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las diferentes regiones *slpA* se amplificaron usando ADN cromosómico de *Lactobacillus acidophilus* como molde, se amplificaron usando los cebadores descritos en la Tabla 2 y se clonaron en pET21-GFP.

Construcción quimérica	Cebador directo ¹	Cebador reverso ¹
NT-GFP clonado en pET21-GFP	TGG <u>CATATG</u> GCTACTACTATTAACGCA (Sitio de restricción NdeI)	CGT <u>GTCGAC</u> AGTGAAAGTATGAGG (Sitio de restricción Sall)
GFP-CT1 clonado en pET28-GFP	AGT <u>GGATCCA</u> ACGTTAAAGCAAC (Sitio de restricción BamHI)	TAGGAGCTCTAATCTAAAGTTTGC (Sitio de restricción SacI)
GFP-CT2 clonado en pET28-GFP	AGT <u>GGATCCA</u> TGCACAACGCATAC (Sitio de restricción BamHI)	TAGGAGCTCTAATCTAAAGTTTGC (Sitio de restricción SacI)
GFP-CT3 clonado en pET28-GFP	AGT <u>GGATCCA</u> TGCACAACGCATAC (Sitio de restricción BamHI),	TAGGAGCTCTTAGTTTGCAGCGTTGAT G (Sitio de restricción SacI)
GFP-CT4 clonado en pET28-GFP	AGTGAATTCTTTGCAGCACAATACGC (Sitio de restricción EcoRI)	TAGGAGCTCTTATCTAAAGTTTGC (Sitio de restricción SacI)
GFP-CT5 clonado en pET28-GFP	AGTGAATTCTTTGCAGCACAATACGC (Sitio de restricción EcoRI)	TAGGAGCTCTTAGTTTGCAGCGTTGAT G (Sitio de restricción SacI)

Tabla 4 Cebadores utilizados para construir las proteínas quiméricas ¹ Sitio de restricción subrayado

12. Purificación de proteínas quiméricas

Los plásmidos descritos arriba se transformaron por electroporación en células *E. coli* HMS 174 (DE3) (Novagen, Merck Millipore, EE. UU.). Las células transformadas se cultivaron en medio LB con el antibiótico correspondiente a 37°C con aireación hasta una DO₆₀₀ de 0,6. La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de 0,1 mM isopropil-β-d-tiogalactopiranosido (IPTG) y los cultivos se incubaron 16 h a 19° C. Transcurrido el tiempo de incubación las células se centrifugaron a 2000 x g, los pellets celulares se re-suspendieron en buffer de lisis y sonicaron (6 ciclos de 15 s).

Los lisados se centrifugaron a 12000 x g durante 20 min, y los sobrenadantes fueron filtraron (0,22 μm de Millipore) para eliminar los residuos celulares.

Posteriormente, los lisados se cargaron en columnas HisTrap™ HP (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibradas con buffer A. La elución proteica se realizó mediante un gradiente creciente de imidazol resultante de la mezcla de buffer A y buffer B (50, 100, 150, 200 y 250 mM). Las muestras eluidas se dializaron dos veces utilizando el buffer de diálisis y luego se almacenaron a -20 °C.

La concentración de proteína se determinó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para analizar la expresión de proteínas se realizaron SDS-PAGE y Western blot.

Buffer de lisis

20 mM buffer fosfato de sodio pH 7,4
500 mM NaCl
10 mM imidazol
1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo [PMSF]
2 % v/v tritón X-100

Buffer A

20 mM buffer fosfato de sodio pH 7,4
500 mM NaCl
10 mM imidazol

Buffer B

20 mM buffer fosfato de sodio pH 7,4
500 mM NaCl
500 mM imidazol

Buffer diálisis

50 mM buffer TrisHCl pH 8
150 mM NaCl
30 % v/v glicerol

13. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Con el objeto de separar las proteínas según su peso molecular se realizó una electroforesis a temperatura ambiente en un gel SDS-PAGE 10 % o 12,5 %, y un gel concentrador 4,5% en una cuba Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts constantes.

14. Brilliant Blue R-250

Los geles se tiñeron en una solución de 0,1 % de Coomassie Brilliant Blue R-250 en agua destilada: metanol: ácido acético (5: 5: 2) durante una hora. Para decolorarlo se hicieron 3 lavados en agua destilada a baño maría. Los geles fueron examinados y fotografiados utilizando el Transiluminador Benchtop 3UV.

15. Zimograma

Una suspensión de *Salmonella newport* (2% m/v) se incorporó en un gel de poliacrilamida 12,5 % conteniendo 0.01% SDS. Luego de una corrida electroforética de 2 h a 100 V, el gel se incubó 30 minutos en agua miliQ a temperatura ambiente y a continuación se incubó a 37°C durante toda la noche en buffer de re-naturalización (10 mM fosfato de sodio pH 6; Tritón X100 1 % v/v). Luego, se realizaron sucesivos lavados con agua miliQ y se tiñó durante 2 h con azul de metileno en agitación a temperatura ambiente. El gel se destiñó con agua miliQ por 3-4 días en agitación a temperatura ambiente. La actividad enzimática se observó por la presencia de una zona clara en el gel donde se produjo la degradación.

16. Western Blot

Las proteínas se transfirieron a una membrana de Polivinildifluoruro (PVDF), que previamente fue activada con metanol, en buffer de transferencia (Buffer Tris-glicina, 20% metanol) empleando un transfer ECL-Semi-dry Bloters (Amersham Biosciences). La electrotransferencia se realizó a 45 mA durante una hora. Luego de transferir, se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS. A continuación se bloqueó con 20 ml de buffer de bloqueo (3% m/v BSA en PBS tween 20 0,05% v/v) durante 16 h a 4° C. Luego se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v, para eliminar el remanente del buffer de bloqueo, y se incubó con 10 ml del anticuerpo policlonal anti S-layer (dilución 1:5000 en PBS) durante 90 minutos. Posteriormente se lavó la membrana 5 veces durante 5 minutos cada vez, con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v y se incubó con 10 ml de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanito (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/10000 en PBS) durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos cada vez con 20 ml de PBS tween 20 al 0,05% v/v. Posteriormente se detectó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Sigma) utilizando el equipo digitalizador de imágenes Amersham Imager 600.

17. Lectin blot

Las proteínas se separaron mediante un SDS-PAGE 10%, luego se transfirieron a una membrana de PVDF y bloquearon con BSA 3% m/v como se explicó anteriormente para Western blot. Luego del bloqueo la membrana se lavó 3 veces por 10 min con PBS

tween 20 al 0,05% v/v e incubó 30 min a temperatura ambiente con 1 µg/ml de Concanavalina A biotinilada. A continuación se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS tween 20 al 0,05% v/v e incubó 1 h a temperatura ambiente con estreptoavidina conjugado a la peroxidasa de rabanito (dilución 1/2000 en PBS). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces durante 10 min cada vez con PBS tween 20 al 0,05% v/v. Posteriormente se detectó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL utilizando el equipo digitalizador de imágenes Amersham Imager 600. La glicosilación de la proteína S-layer también se evaluó utilizando el kit de tinción con glicoproteína Thermo Scientific Pierce (Rockford IL, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

18. Extracción de pared celular, PG y CWPS y LTA

Cultivos crecidos hasta una fase estacionaria de *Lactobacillus acidophilus* se recogieron por centrifugación y las células se lavaron con Tris HCl 50 mM, pH 7,5.

El LTA se purificó empleando un método de extracción que utiliza 1-butanol [82], [83]. Brevemente, se cultivó *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a 37°C a una DO₆₀₀ de 3,5. Las bacterias se sedimentaron por centrifugación a 6000 x g durante 10 minutos y se lavaron con buffer citrato de sodio 0,1 M pH 4,7. Después del lavado, las bacterias se re-suspendieron en 20 ml de citrato de sodio 0,1 M pH 4,7 y se sonicaron con perlas de vidrio de 0,1 mm. Las perlas de vidrio se sedimentaron por centrifugación durante 3 minutos a 200 x g. Los restos celulares se recogieron por centrifugación y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con un volumen igual de 1-butanol. Los extractos se transfirieron a un nuevo tubo y las fases se separaron por centrifugación a 13.000 x g durante 20 min. La fase acuosa (inferior) que contiene LTA se recuperó. Finalmente, la fracción enriquecida en LTA se liofilizó y la concentración de fósforo se midió siguiendo el protocolo de Chen, 1956.

Para purificar las paredes celulares, las células bacterianas se rompieron por sonication con perlas de vidrio en Tris HCl 50 mM, pH 7,5, seguido de incubación con DNasa (30 µg ml⁻¹) y RNasa (5 µg ml⁻¹) durante 2 h a 37°C. Las células no lisadas se eliminaron mediante una centrifugación 1500 x g, 5 min, y las paredes celulares se recuperaron por centrifugación a 20.000 x g durante 20 min. Esta fracción se llamó fracción de la pared celular total (CW)[23], [24].

El peptidoglicano (PG) purificado se preparó a partir de células hervidas en SDS al 4% (m/v) durante 30 min y luego se centrifugó para eliminar los restos celulares y las células no lisadas (1500 x g, 5 min). Las paredes crudas se trataron con DNasa 5 µg/ml y RNasa 30 µg/ml en 0,1 M de buffer fosfato pH 6,7. Después de 2 h de incubación a 37 ° C, las paredes celulares se purificaron por tratamiento con tripsina (0,5 mg/ml) a 37 ° C durante 16 h en 0,1 M TrisCl pH 7,5 que contenía 0,01 M MgCl₂. También se añadió SDS (2% m/v) y las muestras se calentaron a 100 ° C durante 15 minutos. Después de enfriar, las muestras se recogieron por centrifugación (20.000 x g, 20 min), se lavaron con agua destilada para eliminar el SDS y los PG purificados se liofilizaron. Los polisacáridos de la pared celular (CWPS) de *Lactobacillus casei* se obtuvieron por tratamiento con ácido tricloroacético (TCA). Las paredes extraídas con TCA se prepararon a partir de paredes sin tratar mediante tratamiento con TCA al 10% (p / v) durante 48 horas a 48 °C, seguido de lavado extensivo con agua bidestilada fría, los CWPS fueron recolectados en la fracción insoluble.

19. Ensayo de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación por carbohidratos

Para realizar el ensayo de hemoaglutinación los eritrocitos de canero fueron lavados con PBS frío centrifugándolos a 500 x g por 5 minutos con el fin de retirar el plasma y se re-suspendieron en PBS estéril.

En una placa de 96 pocillos, con fondo en U, se adicionaron 50 µl de diluciones seriadas al medio (a partir de 1 mg/ml) de la proteína S-layer. Luego a cada pocillo se le agregó 50 µl de 4% v/v de eritrocitos preparados como se describió arriba y se incubó la placa a temperatura ambiente por un lapso de 30 a 60 minutos. Como control negativo se utilizó BSA. Si una proteína aglutina a los eritrocitos reconociendo estructuras oligosacáridicas sobre la superficie celular se va a formar una trama reticulada en suspensión, en caso contrario se visualiza como un botón en el fondo del pocillo.

Para realizar los ensayos de competencia de la hemoaglutinación en una placa de 96 pocillos con fondo en U, se pre-incubó 1mg/ml de la proteína S-layer 30 minutos a temperatura ambiente con diluciones seriadas al medio de los siguientes carbohidratos: D-manosa, L-ramnosa, D-galactosa, L-fucosa, D-glucosa, D-maltosa, D-lactosa, D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, y luego se realizó el ensayo de

hemoaglutinación como se explicó antes. PBS y una solución de S-layer sin inhibidor se utilizaron como control negativo y positivo de hemoaglutinación, respectivamente.

20. Ensayo de Aglutinación de microorganismos

Cultivos exponenciales de *Salmonella enterica*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Saccharomyces cerevisiae* fueron incubados 1 h a 37°C con 1 mg/ml de S-layer o seroalbumina bovina como control negativo. Luego de la hora de incubación las células se centrifugaron a 4000 rpm y se realizó un lavado con buffer fosfato salino (PBS). Con el fin de observar la aglutinación y muerte celular en simultáneo, por microscopía, se utilizó el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen) para ello se re-suspendieron en 100 µl de agua miliQ y se le adicionó 0,2 µl de reactivo A y 0,5 µl de reactivo B LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen). Una suspensión de S-layer sola también se visualizó como control. Las células se observaron al microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus; Carl Zeiss) con un objetivo 40X y 100X con inmersión y contraste de fase. Las imágenes de fluorescencia se tomaron con una cámara Cannon EOS Rebel T3. En todos los experimentos se mantuvo el mismo tiempo de exposición. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el software ImageJ.

21. Ensayo de Dot blot

Los ensayos de *dot blot* se realizaron como describió previamente [84] con algunas modificaciones. Las macromoléculas se inmovilizaron en una membrana de PVDF (Thermo Scientific, Rockford IL, EE. UU.):

Componentes de la pared celular procarionta:

Ácidos lipoteicoicos, (LTA), 20 mg/ml; (preparado como se describió antes)

Peptidoglicano, (PG), 20 mg/ml; (preparado como se describió antes)

Polisacáridos de la pared celular, (CWPS), 20 mg/ml; (preparado como se describió antes)

Lipopolisacárido, (LPS), 6 mg/ml (Sigma, St Louis MO, EE. UU.);

Proteínas eucariotas glicosiladas:

Mucina porcina de tipo III (PSM, 10 µg / ml) (Sigma, St. Louis, EE. UU.),

Mucina porcina de tipo III desialilada(10 µg / ml)

Fibronectina (1 mg/ml) (Advanced Biomatrix, San Diego CA, EE. UU.),

Colágeno (100 µg/ml) (Helena Laboratory Beaumont TX, EE. UU.)

Glucosa oxidasa (GOX, 2 µg/ml) (Sigma, St Louis MO, EE. UU.)

Fetuina (0.5 µg/ml) (Sigma, St Louis MO, EE. UU.)

Asialofetuin (0.5 µg/ml)

RNAse B (5 µg/ml) (Sigma, St Louis MO, EE. UU.)

Polisacáridos eucariotas:

Quitina (30 mg/ml) (ICN Biomedicals Inc, Aurora OH, EE. UU.),

Quitosano (30 mg/ml) (Sigma, St Louis MO, EE. UU.),

Ácido hialurónico (2,5 mg/ml) (Sigma, St Louis MO, EE. UU.),

Heparina (250 mg/ml) (Northia, Bs As, Argentina).

Se utilizó BSA (BSA, 10 mg/ml) como control negativo (Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX, EE. UU.).

La desialilación de la fetuina y de la mucina se realizó incubando 2 hs a 80 °C en ácido acético 2N seguido de neutralización con hidróxido de amonio 5 M, finalmente las muestras se dializaron contra agua.

Partículas virales

En una membrana de PDVF se inmovilizó 1×10^5 UFP/10 µl de Adv-5, 5×10^4 UFP/10 µl de HSV-1 y 1×10^6 UFP/10 µl de VSV o el doble de cada virus en una gota de 20 µl. Como control negativo de interacción se utilizó la mezcla de marcadores de peso molecular (Mk), BSA y MEM 1,5 %, medio donde se encontraban suspendidas las particulares virales y S-layer pura como control positivo del revelado.

Después de la siembra, las membranas de PVDF se lavaron una vez con PBS y luego se bloquearon durante 16 hs a 4°C en PBS conteniendo 3% m/v BSA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EE. UU.). Las membranas bloqueadas se lavaron con PBS tween 20 al 0,05 % v/v y luego incubaron a 37 °C durante 1 h con una suspensión de proteínas de fusión (NT-GFP o GFP-CT) o GFP como control negativo o con S-layer purificada con LiCl (50 µg/ml) según corresponda.

Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con PBS tween 20 al 0,05% v/v y los puntos positivos se visualizaron directamente mediante fluorescencia en el caso de las fusiones de GFP o se incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo policlonales de ratón anti-S-layer (1: 5000)[85] luego de 5 lavados con PBS tween 20 al 0,05% v/v se incubó con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con HRP (1: 10000) por 30 min. y la interacción fue detectada por quimioluminiscencia

mediante el sustrato ECL (Amersham, GE Healthcare, Chicago, EE. UU.). Las imágenes se obtuvieron con Amersham Imager 600 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suecia).

22. Quenching de fluorescencia de las tirosinas

La interacción de la proteína S-layer con carbohidratos y partículas virales se evaluó mediante cambios en la intensidad de fluorescencia.

Una suspensión de HSV-1 (4×10^6 UFP/ml), Adv-5 (4×10^6 UFP/ml) o VSV (6×10^8 UFP/ml) se puso en contacto con de 400 μ g/ml S-layer durante 1 h a 37°C, luego se registraron los espectros de emisión de fluorescencia a temperatura ambiente, de 290 a 380 nm, con una longitud de onda de excitación de 275 nm y una de emisión a 305 nm en cubeta de cuarzo con una trayectoria óptica de 10 nm. Utilizando espectrómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Thermo Spectronic AMINCO-Bowman, serie 2, EE. UU.).

Lo mismo se realizó para evaluar la interacción con carbohidratos, pero las titulaciones se llevaron a cabo mediante la adición de 1 μ l de alícuotas de los carbohidratos (0,5 M) o del hidrolizado de quitina (Vector Labs, Burlingame, EE. UU.) disueltos en PBS a 0,2 ml de proteína S-layer (0,5 mg/ml) en PBS. La fluorescencia de cada muestra se midió variando la concentración de azúcar de 0 a 20 mM. Cada espectro fue un promedio de tres exploraciones sucesivas, no se necesitó corrección para el efecto de dilución debido a la adición de soluciones de carbohidratos ya que el volumen agregado no excedió el 10% del volumen total. La espectroscopia de fluorescencia permite describir el *quenching* mediante la ecuación de Stern-Volmer $F_0/F = 1 + K_a [AF]$. Donde F_0 y F son las intensidades de emisión de fluorescencia en ausencia y presencia de azúcar respectivamente; $[AF]$ es la concentración de azúcar y K_a es una constante igual a la recíproca de la concentración de azúcar cuando la intensidad de fluorescencia disminuye a la mitad. El valor final de K_d se calculó a partir de tres lecturas independientes y se representó como un promedio de los valores finales de K_d junto con la media de error estándar, calculada a partir de la desviación estándar [86], [87].

23. Unión de proteínas de fusión de SlpA a *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus se cultivó por 16 h en MRS y la S-layer se removió por tratamiento con LiCl 5 M como se mencionó anteriormente. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se re-suspendieron en PBS ajustando a una DO_{600} de 1,0.

En un típico experimento de unión, se incubaron alícuotas de 300 µl de cultivo durante 1 h a 37 °C con 10 µg de las proteínas de fusión quiméricas NT GFP, GFP-CT1. La proteína purificada GFP y PBS se usaron como controles negativos y de autofluorescencia, respectivamente. Luego de la hora de interacción las células se colectaron mediante centrifugación a 10.000 x g durante 5 minutos y se lavaron dos veces con PBS. A continuación las bacterias se re-suspendieron en 100 µl de PBS y se analizaron por un lado por microscopía de fluorescencia (Axiostar Plus; Carl Zeiss) con un objetivo 100X y por otro lado por citometría laminar de flujo.

Para el análisis por citometría laminar de flujo, luego de la hora de interacción las bacterias se lavaron dos veces con PBS y se re-suspendió en 300 µl de PBS con aproximadamente 1×10^6 células. Las células fluorescentes y no fluorescentes dentro de la población fueron discriminadas en base a la intensidad de fluorescencia (GFP-H). Se utilizó el software BD FACSAria (BD FACSDiva, versión de firmware 6.1.3) para la adquisición de datos, para el análisis posterior de los datos se utilizó el software FlowJo 10.0.7. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Como inhibidores competitivos de la unión de GFP-CT1 a *Lactobacillus acidophilus* se probaron concentraciones crecientes de carbohidratos como D-manosa, D-fructosa, ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico), D-glucosa, D-galactosa, D-fructosa 6-fosfato, D-fructosa 1,6-bifosfato y polímeros como la quitina y LTA. Para el hidrolizado de quitina dada su condición de mezcla compleja de distintas longitudes de oligómeros de N-acetil-D-glucosamina (NAG) se consideró que el polímero está formado por 900 monómeros de NAG y tiene un peso molecular de 182.700 g/mol y para LTA se estimó una longitud de cadena promedio de 27,5 (172 g/mol de monómeros de glicerol fosfato)[88] considerando los datos de *Lactobacillus helveticus* DSM 20075T y *Lactobacillus buchneri* CD034, ambas cepas que poseen S-layer [28], [89].

Además las células de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se incubaron con 100 U/ml mutanolisina o con 10 % de tricloroacético (TCA) 2 h a 37°C con el fin de desprender sólo los WTA de la pared y con 10 % de SDS para extraer los LTA de la pared.

La fluorescencia media relativa fue cuantificada por citometría de flujo y se calculó la concentración inhibitoria 50 % (CI_{50}) ajustando los datos experimentales a una curva de dosis-respuesta para cada carbohidrato usando el software GraphPad Prism® 5

(Versión 5.01, Software GraphPad, Inc., EE. UU.). La CI_{50} es la concentración de un inhibidor donde la respuesta (o unión) se reduce a la mitad.

24. Ensayos en fase sólida

El recubrimiento de placas de poliestireno se realizó como fue previamente descrito por [90], con algunas modificaciones. Brevemente, placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp Nunc, Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 50 μ l con una concentración de 10 mg/ml de mucina tipo III de estómago porcino (Sigma-Aldrich) disuelta en PBS. El recubrimiento se realizó mediante una incubación secuencial a 37°C durante 2 h seguido de una incubación durante 16 h a 4°C, luego se descartaron los 50 μ l y se realizó una última incubación a 37°C por 2 h adicionando 75 μ l de mucina 10 mg/ml para minimizar los sitios de unión inespecíficos. Finalmente, la placa se lavó dos veces con 100 μ l PBS para eliminar el exceso de mucina.

Luego la placa recubierta de mucina se incubó a 37°C durante 2 h con 50 μ l de S-layer con las siguientes concentraciones 10, 25, 50 y 100 μ g/ml. Cada pocillo se lavó 3 veces con PBS tween al 0,05% v/v (buffer de lavado), y se incubó 1 h a temperatura ambiente con 50 μ l anticuerpo policlonal de ratón anti-S-layer (dilución 1:5.000 en PBS) (Prado-Acosta et al., 2008). Posteriormente se realizaron 3 lavados durante 10 min con 200 μ l de buffer de lavado. La interacción se detectó utilizando 50 μ l de anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (dilución 1:10.000 en PBS) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 5 lavados con buffer de lavado y se reveló utilizando 25 μ l del sustrato 1-Step™ Turbo Tetramethylbenzide (TMB) -ELISA (ThermoFisher). La reacción se detuvo con 25 μ l de ácido sulfúrico 2N y se registró la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA.

Para los ensayos de inhibición la proteína S-layer se pre-incubó con diluciones al medio de rafinosa, D-glucosa, D-galactosa y D-manosa a partir de un stock de 1 M y 0,5 M para el caso de la lactosa. Los valores de CI_{50} , concentración de azúcar que causa el 50% de inhibición de la unión de S-layer a la mucina, se calcularon ajustando los datos experimentales transformados logarítmicamente a una curva de dosis-respuesta usando GraphPad Prism® 5 para el software de Windows (Versión 5.01, Software GraphPad, Inc., EE. UU.).

25. Actividad virucida de S-layer

Una suspensión viral de Adv-5 (4×10^6 UFP/ml), HSV-1 (4×10^6 UFP/ml), VSV (6×10^8 UFP/ml) o bacteriófago J1 (4×10^{10} UFP/ml) se dividió en dos tubos, uno se diluyó con PBS y el otro con una solución de 400 μ g/ml de S-layer, ambos se incubaron por 1 h a 37°C. Luego, se cuantificó el título viral remanente tanto en los controles de virus (CV) como en las muestras tratadas con S-layer (S-layer) por el método de formación de placas (UFP/ml) se graficó el logaritmo de los títulos obtenidos para los cuatro virus ensayados.

26. Ensayo de arrastre de las partículas virales

Una suspensión viral de Adv-5 (4×10^6 UFP/ml), HSV-1 (4×10^6 UFP/ml), VSV (6×10^8 UFP/ml) o bacteriófago J1 (4×10^{10} UFP/ml) se dividió en dos tubos, uno se diluyó con PBS (CV) y el otro con una solución de 400 μ g/ml de S-layer, ambos se incubaron por 1 h a 37°C, luego de la hora de incubación, una alícuota se sometió a 3.800 x g durante 20 min, lo mismo se realizó con los CV. El título viral remanente en el sobrenadante antes y después de la centrifugación se cuantificó tanto en los CV como en las muestras tratadas con S-layer por el método de formación de placas. Con estos datos se calculó el factor de reducción (FR) como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de la centrifugación en los tubos de CV y en los tratados S-layer.

En este ensayo también se evaluó el efecto de agregar manosa junto con la S-layer sólo en el caso de HSV-1. Para ello, 400 μ g/ml de S-layer fueron pre-incubados 1 h a 37°C con 400 mM de D-manosa antes de la incubación con el virus. Como control se utilizó una suspensión de D-manosa. Luego de la hora de incubación a 37°C se continuó como se explicó antes.

$$\text{Factor de reducción} = \log\left(\frac{\text{título viral antes de centrifugar}}{\text{título viral después de centrifugar}}\right)$$

27. Interacción de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con líneas celulares

Las células epiteliales (Caco-2, Caco-2/TC7 y HT29) crecidas en placas de 24 pocillos, se pusieron a interactuar con 0,5 ml por pocillo de concentraciones iniciales crecientes (10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 UFC/ml) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y se incubaron 1 h

a 37° C en estufa gaseada (5% CO₂). Transcurrido el tiempo de incubación, cada pocillo de lavó 3 veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y luego se agregó 0,5 ml de agua destilada estéril a fin de despegar las células de los pocillos para luego cuantificar las bacterias adheridas mediante un recuento en placa de MRS. El recuento se realizó en aquellas placas en las que hubo de 50 a 300 colonias.

28. Inhibición de la Interacción de *Pseudomonas aeruginosa* con A549

Células A549 crecidas en microplaca de 24 pocillos se pre-incubaron con 400 µg/ml de la proteína S-layer y luego se añadió una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (1x10⁷ UFC por pocillo en PBS) y se dejó en contacto por un lapso de 1 h a 37°C. Por un lado, se determinó el número de *Pseudomonas* viables adheridas por pocillo mediante el recuento de UFC sobre placas de agar LB y por otro lado las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentajes de adhesión relativos a las UFC de *Pseudomonas* adheridas en el control sin ningún tratamiento previo y que corresponden al 100% de adhesión.

Los vidrios se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos, después de un lavado con agua corriente el vidrio fue montado sobre un porta objetos y observado al microscopio (Axiostar Plus; Carl Zeiss) con un aumento de 1000X.

29. Ensayo de interacción de la proteína S-layer y proteínas quiméricas con células epiteliales

Células HT29 o Caco-2/TC7 crecidas sobre cubreobjetos se pusieron en contacto con 10 o 100 µg/ml de S-layer por 1 h a 37° C en estufa gaseada (5% CO₂). Transcurrido el tiempo de incubación se reveló la interacción de la proteína mediante una inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para ello, las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 min cada vez y fijaron con metanol. Luego de 3 lavados con PBS, se incubaron con un anticuerpo policlonal anti S-layer (dilución 1:1000 en PBS) por 30 min en cámara húmeda a 37° C. Finalizada la primera incubación, se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min cada vez y se incubó 30 min en cámara húmeda a 37° C con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a FITC (dilución 1:200 en PBS). Luego de 3 lavados con PBS se incubó con WGA-Tritc tal como se explica a continuación. Finalizada la incubación se realizaron 2 lavados con PBS por 10 min cada vez seguido de 2 lavados con agua bidestilada, y los cubreobjetos se montaron con glicerina tamponada con

2,5% DABCO y las células se observaron por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX51 con los filtros adecuados.

Células HT29 o Caco-2/TC7 crecidas sobre cubreobjetos se pusieron en contacto con 100 µg/ml de las construcciones quiméricas NT-GFP, GFP-CT1 y GFP 1 h a 37° C en estufa gaseada (5% CO₂). Transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron 3 veces con PBS por 5 min cada vez y fijaron con metanol. Luego de 3 lavados con PBS, se incubaron con una dilución 1/200 de WGA-TRITC (aglutinina del germen de trigo asociada a tetrametilrodamina) en PBS por 1 h a 37°C en cámara húmeda. Finalizada la incubación se realizaron 2 lavados con PBS por 10 min cada vez seguido de 2 lavados con agua bidestilada, y los cubreobjetos se montaron con glicerina tamponada con 2,5% DABCO y las células se observaron por microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio Olympus BX51 con los filtros adecuados.

Para los ensayos de inhibición de la interacción del CT1-GFP monocapas de células Caco-2/TC7 crecidas sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos fueron fijadas y luego se incubaron con 100 µg/ml GFP-CT1 en presencia o ausencia de 100 o 500 mM de D-manosa y luego se continuó como se explicó antes.

30. Actividad moduladora de la infección viral

Monocapas de células HT29 se incubaron con 400 µg/ml de S-layer una hora antes de la adsorción del virus recombinante YK608 de HSV-1 (pretrat), durante la hora de adsorción del virus a 37°C (ads) o luego de la adsorción viral (post). Las células se infectaron con una multiplicidad de infección (m.i) de 0,1. A las 48 hs post infección por un lado se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el método de formación de placas y por otro lado se evaluó de forma cualitativa el efecto antiviral mediante la observación al microscopio de las células fluorescentes infectadas utilizando un microscopio Olympus BX51 con los filtros adecuados.

Luego, se repitió el mismo esquema de tratamiento pero fijando las células a las 12 h post infección. El porcentaje de células fluorescentes se calculó respecto del total de núcleos teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) contados mediante el software ImageJ, se contaron un mínimo de 100 núcleos y al menos 3 campos en cada pocillo.

31. Ensayo de plaqueo directo

Células A549 se incubaron con 400 µg/ml de S-layer una hora antes (pretrat), durante la hora de adsorción (ads) o luego (post) de la adsorción viral de HSV-1 KOS, VSV y Adv-5 (de cada virus se utilizó una dilución tal que se obtuvieran entre 50 a 100 UFP en los respectivos controles de virus). Luego de la hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y las monocapas se cubrieron con 0,5 ml de medio de plaqueo. El medio de plaqueo semisólido se preparó con volúmenes iguales de MEM 1,5% en doble concentración (MEM 2X) y metil-celulosa 1,4 % (Sigma-Aldrich). La placa se incubó a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ hasta observar la formación de las placas de lisis, 48 hs para HSV-1, 24 hs para VSV y 6 días para el caso de Adv-5. Luego del tiempo de incubación, se fijaron las células con formol 10% (0,5 ml por pocillo) y se tiñeron con una solución 1% m/v de cristal violeta en 10% de etanol. Las placas de lisis se contaron y se calculó el % de UFP respecto al control de virus sin S-layer.

Cuando se evaluó el efecto de agregar D-manosa junto con la S-layer durante la adsorción del VSV, se siguieron dos esquemas de tratamiento, por un lado 400 µg/ml de S-layer fueron pre-incubados 2 hs a 37°C con 400 mM de D-manosa y por otro 400 µg/ml de la proteína se adicionaron junto con 400 mM D-manosa durante la hora de adsorción viral. Como control se utilizó una suspensión de D-manosa. Luego de la adsorción se continuó como se explicó antes.

32. Protección de la inactivación viral por temperatura

Una suspensión viral de HSV-1 (4x10⁶ UFP/ml) o VSV (6x10⁸ UFP/ml) se puso en contacto con 400 µg/ml de S-layer 2 h a 42°C, como control se utilizó 400 µg/ml de BSA. Las muestras junto con el control de virus se titularon por el método de formación de placas de lisis al tiempo cero (T0) y al tiempo 2 h (T2). Con los valores de títulos obtenidos se calculó el factor de reducción del título viral.

$$\text{Factor de reducción} = \log\left(\frac{\text{título viral } T0}{\text{título viral } T 2h}\right)$$

Una suspensión viral de Adv-5 (4x10⁶ UFP/ml) se puso en contacto con 400 µg/ml de S-layer 1 h a 45°C, como control se utilizó 400 µg/ml de BSA. Las muestras junto con el control de virus se titularon por la técnica del punto final en células A549, los títulos

fueron expresados en dosis infectiva en cultivo de células 50 % por mililitro ($\text{DICT}_{50}/\text{ml}$).

Cuando se evaluó el efecto de agregar D-manosa a una suspensión HSV-1 (4×10^6 UFP/ml) se puso en contacto con de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S-layer o 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S-layer y 400 mM de D-manosa durante 2 h a 42°C. El título se cuantificó por el método de unidades formadoras de placas de lisis. Con estos datos se calculó el factor de reducción (FR) como se explicó antes.

Una suspensión viral de HSV-1 (7×10^8 UFP/ml) se puso en contacto con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S-layer o 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA y se incubó a 4°C. A los 0, 9, 30 y 60 días se tomaron alícuotas y el título viral se cuantificó por el método de unidades formadoras de placas de lisis.

33. Ensayo de formación de biopelícula

En una placa de poliestireno de 96 pocillos, fondo en U, se inoculó *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a una DO_{600} inicial de 0,025 con concentraciones crecientes de S-layer. (50, 100, 200, 400 y 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las placas se incubaron a 37 ° C durante 24 horas luego de lo cual se procedió a evaluar la adherencia utilizando la técnica de tinción con cristal violeta. Brevemente, se tomó el sobrenadante de cada pocillo para determinar la DO_{600} de las células planctónicas (Apl), luego se agregaron 200 μl de Cristal violeta (0,1% en etanol 70%) a cada pocillo (8 por cada dilución). Luego de 20 minutos se lavaron los pocillos suavemente con agua destilada para retirar el cristal violeta remanente, a continuación se agregaron 200 μl de etanol absoluto y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente para que se solubilice el colorante. Luego se traspasó a una placa fondo plano y se midió la absorbancia en el lector de Elisa Tasoh Corp MPR Ai4 utilizando un filtro I 550/700 (A_{CV}). Se determinó el índice de adherencia como la relación Acv/Apl .

34. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6. La importancia significativa de cada tratamiento se evaluó mediante la prueba del t de Student con un $p < 0,05$ fue considerada como significativa o mediante la prueba ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple de Bonferroni ($p < 0,05$)

Los ensayos se realizaron por triplicado y los datos se normalizaron a las medias para las tres repeticiones. Los resultados se presentan como las medias \pm desvíos estándares (indicadas por barras de error) para experimentos repetidos.

RESULTADOS

Capítulo 1: Caracterización de la capacidad de lectina de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Como se mencionó en la Introducción la envoltura de las bacterias Gram positivas está constituida por una membrana celular, una gruesa pared formada por cadenas de peptidoglicano entrecruzadas y adornada por cadenas de ácidos teicoicos. En algunas especies éstas se envuelven de S-layer.

En el género *Lactobacillus* la presencia de S-layer no es universal, se ha descrito en varias especies, entre ellas *Lactobacillus acidophilus* siendo la cepa de estudio de esta tesis ATCC 4356.

La proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* forma una matriz cristalina de subunidades proteicas auto-ensambladas y unidas de forma no covalente a la envoltura de la pared celular bacteriana más externa.

Desde la secuencia proteica se predice en la proteína de superficie predominante, SlpA, la presencia de dos CRD [48] sugiriendo que la S-layer podría tener un comportamiento del tipo lectina. El objetivo de este capítulo es la caracterización de la capacidad de lectina de la proteína S-layer purificada de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

1.1. Capacidad de hemaglutinación de la proteína S-layer

El ensayo de hemaglutinación es un primer paso de rastreo de lectinas o componentes de tipo lectina siendo un método simple y fácil para obtener datos semi-cuantitativos sobre la interacción con azúcares y su especificidad. Si una proteína aglutina a los eritrocitos reconociendo por ejemplo estructuras oligosacáridicas sobre la superficie celular se va a formar una trama reticulada en suspensión, en caso contrario se visualiza como un botón en el fondo del pocillo.

La capacidad de hemaglutinación de la S-layer purificada como se describió en materiales y métodos, se evaluó utilizando eritrocitos de carnero (Figura 12).

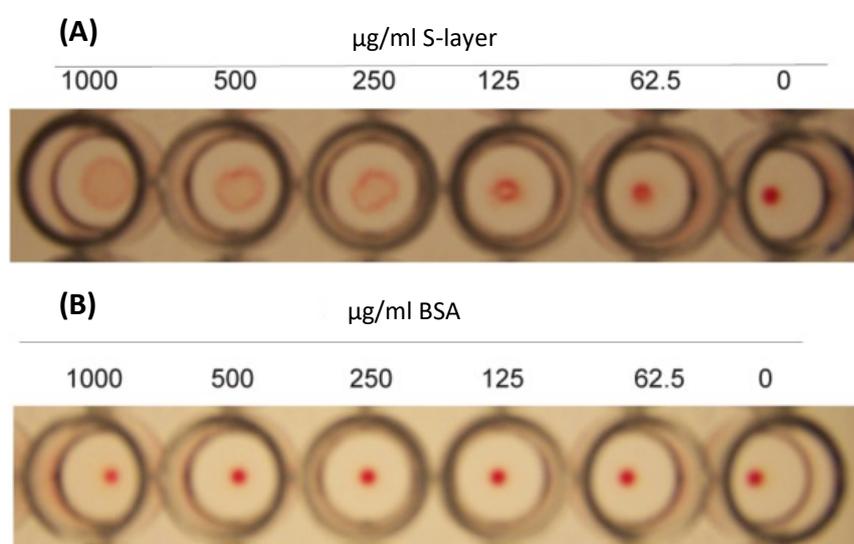


Figura 12 Aglutinación de eritrocitos de carnero. En una placa de 96 pocillos se sembraron diluciones seriadas al medio de la proteína S-layer (A) ó BSA (B) como control negativo y luego se añadió una cantidad constante de eritrocitos (concentración 4%).

Como puede observarse en la Figura 12 la S-layer posee la capacidad de aglutinar eritrocitos de carnero. La concentración mínima necesaria para una aglutinación positiva fue de 250 µg/ml. Como control negativo se utilizó la proteína seroalbúmina bovina (BSA) la cual no aglutinó a los eritrocitos. Este resultado sugiere la interacción directa de la proteína S-layer con los componentes extracelulares de los eritrocitos de carnero.

Los glicoeptopes presentes en los eritrocitos pueden ser reconocidos de manera específica o inespecífica por las lectinas causando aglutinación. Para demostrar la especificidad de unión con carbohidratos, la aglutinación tiene que ser inhibida por

carbohidratos que presenten mayor afinidad por la lectina. Para caracterizar los glicoeptopes que median la hemaglutinación se emplearon distintos carbohidratos como potenciales inhibidores. La proteína S-layer se pre-incubó con los carbohidratos que se detallan a continuación y posteriormente se realizó el ensayo de hemoaglutinación.

Los carbohidratos evaluados fueron los monosacáridos: D-manosa, L-ramnosa, D-galactosa, L-fucosa, D-glucosa; los disacáridos: D-maltosa (formado por la unión de dos glucosas), D-lactosa (formado por la unión de glucosa y galactosa) y los amino-azúcares: D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina. Luego se calculó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada carbohidrato como la concentración del carbohidrato del último pocillo que inhibió en forma positiva la hemoaglutinación (Tabla 5).

Hidrato de carbono	CIM (Molar)
D-manosa	0,015
L-ramnosa	0,125
D-galactosa	0,250
L-fucosa	0,500
D-glucosa	1,000
D-lactosa	0,015
D-maltosa	>1
D-Glucosamina	0,500
N-acetil-D-glucosamina	>1

Tabla 5 Concentraciones mínimas inhibitorias. Las CIM se calcularon considerando la mínima concentración capaz de inhibir la hemoaglutinación.

Un valor de CIM más bajo implica una mayor afinidad del carbohidrato por la S-layer. El monosacárido que mejor inhibió la aglutinación fue la D-manosa con una CIM de 0,015 M mientras que para los demás monosacáridos se requirió utilizar una concentración de cinco a diez veces más que la de D-manosa. También fue evidente la inhibición de la aglutinación por el disacárido D-lactosa obteniéndose una CIM de 0,015 M mientras que la D-maltosa no inhibió la aglutinación en la máxima concentración ensayada. Respecto a los amino-azúcares se obtuvo una CIM de 0,5 M para la D-glucosamina mientras que la N-acetil-D-glucosamina no inhibió la aglutinación en la máxima

concentración ensayada. Los resultados obtenidos de la hemaglutinación sugieren que la S-layer se comporta como una lectina.

1.2. Capacidad de la proteína S-layer de aglutinar microorganismos

Cómo se mencionó en la introducción las lectinas pueden interactuar con carbohidratos presentes en la superficie bacteriana. La interacción lectina-bacteria puede ser fácilmente reconocida por una aglutinación bacteriana que ocurre cuando se agrega la lectina a una suspensión de bacterias [91].

Para este ensayo de aglutinación de microorganismos se evaluaron a los patógenos entéricos *Bacillus cereus* y *Salmonella enterica* serovar newport, teniendo en cuenta que Prado Acosta (2010) demostró la capacidad de la S-layer, en combinación con la nisina, de inhibir el crecimiento de dichos patógenos. Además se evaluó otra bacteria Gram negativa, *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno respiratorio modelo y formador de biopelículas.

Bacillus cereus es una bacteria anaerobia o anaerobia facultativa, Gram positiva y formadora de esporas que tiene la capacidad de crecer en diferentes ambientes y en un amplio rango de temperaturas (4–50°C), además de ser resistente al calor, tratamientos químicos y radiación. Esta bacteria es capaz de sobrevivir al proceso de pasteurización debido a la producción de endosporas. Es un microorganismo oportunista ampliamente reconocido como agente etiológico de brotes transmitidos por los alimentos (síndromes eméticos y diarreicos), así como patologías no intestinales. Algunas cepas de *Bacillus cereus* pueden producir enterotoxinas diarreicas, las cuales causan diarrea y dolor abdominal (NheA: enterotoxina no hemolítica, CytK: citotoxina K, HblC: hemolisina BL, EntFM: peptidasa de la pared celular), mientras que otras cepas producen una toxina emética (cereulida: toxina termoestable), que causa vómitos. Esta especie bacteriana se encuentra comúnmente en las fábricas de productos lácteos y en las fábricas de alimentos y bebidas [92].

Mientras que *Salmonella entérica* otro patógeno gastrointestinal, se transmite por vía fecal-oral, ya sea directamente, o bien indirectamente, a través de los alimentos causando gastroenteritis o septicemia. *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* es el serotipo más frecuente que genera náuseas, vómitos, fiebre, diarrea y dolor abdominal como síntomas principales. La carne de aves es un reservorio común para estas

bacterias en los alimentos procesados. *Salmonella enterica* es capaz de adherirse fácilmente a la carne y otros alimentos, lo que eventualmente conduce a una contaminación cruzada entre lotes de alimentos en la fábrica productora o en un supermercado [92]. Uno de los factores que favorecen la persistencia de *Salmonella* en ambientes variados es su capacidad de formar biopelículas sobre diferentes tipos de superficies, bióticas y abióticas.

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa*, es una bacteria Gram negativa altamente versátil, presente en variados ambientes entre ellos en suelo, ríos y océanos, así como sistemas de aguas residuales domésticos y clínicos. Es capaz de causar infecciones oportunistas en el humano, aunque rara vez infecta individuos sanos es una causa importante de infecciones graves en pacientes con neoplasias malignas, inmunosupresión, quemaduras y en ventilación mecánica. En las personas con fibrosis quística, es el patógeno respiratorio comúnmente aislado y, por lo tanto, clínicamente importante, y se asocia con una progresión acelerada de la enfermedad [93].

A fin de evaluar la capacidad de aglutinar microorganismos de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se puso en contacto la S-layer, purificada con LiCl, con *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* serovar *newport* y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Figura 13). Para obtener una mejor visualización por microscopía se utilizaron dos fluoróforos del kit LIVE/DEAD BacLight, el SYTO 9 que tiñe al ácido nucleico de color verde y el ioduro de propidio que tiñe al ácido nucleico de rojo. Estos fluoróforos difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en las células sanas. Cuando se usa solo, el SYTO 9 generalmente marca a todas las células en una población, aquellas con membranas intactas y aquellas con membranas dañadas. Por el contrario, el ioduro de propidio penetra solo en las células con envolturas dañadas, lo que provoca una reducción en la fluorescencia de la tinción de SYTO 9 cuando ambos tintes están presentes.

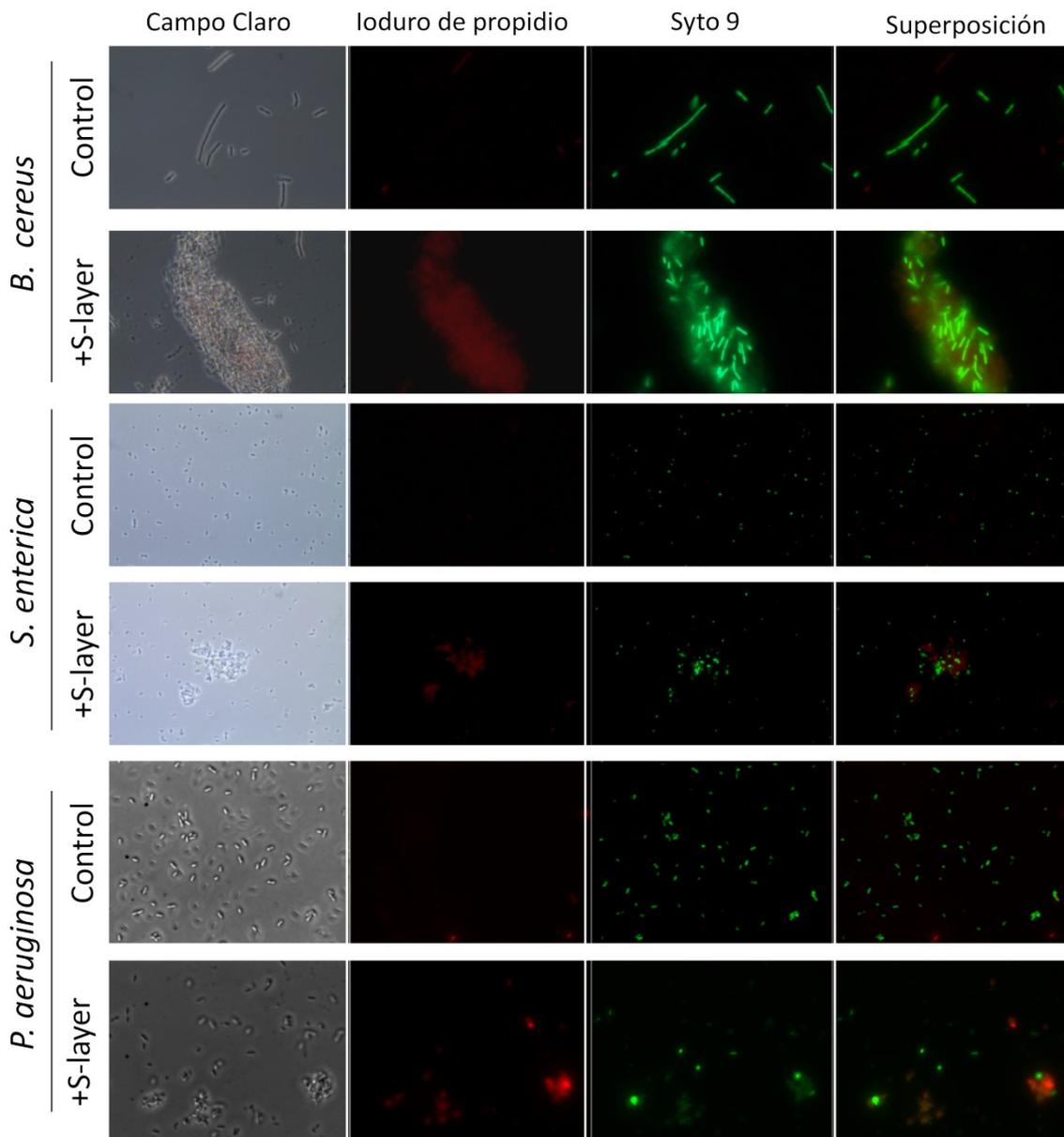


Figura 13 Aglutinación de bacterias. Células de *S. enterica*, *B. cereus* y *P. aeruginosa* en fase exponencial de crecimiento se incubaron 1 h a 37°C con S-layer o BSA como control negativo. Luego las bacterias se cosecharon y re-suspendieron en agua miliQ. Se utilizó el kit LIVE / DEAD BacLight para visualizar la aglutinación y la muerte celular al mismo tiempo mediante microscopía de contraste de fase y fluorescencia. Aumento 1000X.

Como puede observarse en la Figura 13 la proteína fue capaz de aglutinar los tres microorganismos evaluados, observándose cúmulos bacterianos en presencia de S-layer. Además, fue evidente que en los cúmulos de bacterias aglutinadas una gran proporción de células se tiñeron de rojo evidenciando daño en las envolturas. El análisis por recuento de viables realizado en paralelo sólo muestra una disminución de

un orden de magnitud, de modo que debe tratarse de un daño de características subletal.

La proteína S-layer de *Lactobacillus kefiri* posee una actividad del tipo lectina que es capaz de aglutinar microorganismos eucariotas como son las levaduras [78]. Es por esto que se evaluó si la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 poseía la capacidad de aglutinar a *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 14).

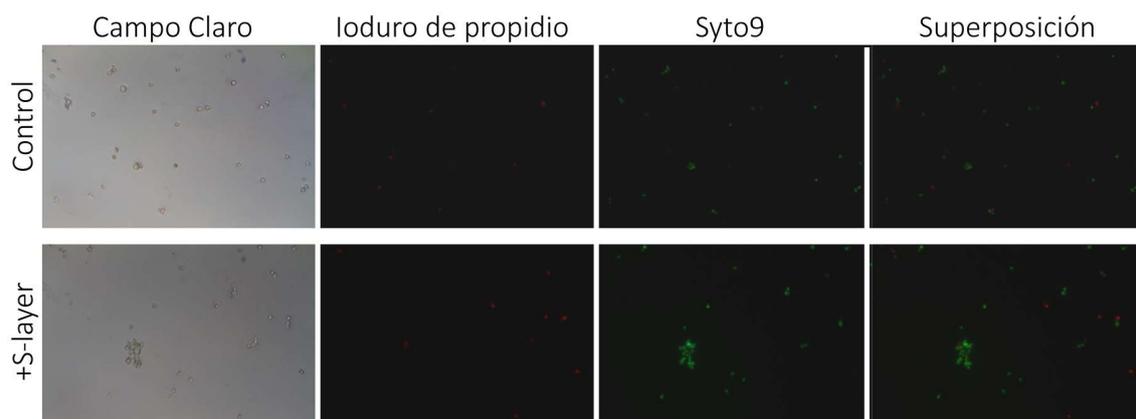


Figura 14 Aglutinación de levaduras. Células de *S. cerevisiae* en fase exponencial de crecimiento se incubó 1 h a 37°C con S-layer o BSA como control negativo. Luego se cosecharon y re-suspendieron en agua miliQ. Se utilizó el kit LIVE / DEAD BacLight para visualizar la aglutinación y la muerte celular al mismo tiempo mediante microscopía de contraste de fase y fluorescencia. Aumento 400X.

Fue evidente la aglutinación de *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo no se evidencia daño en envolturas como consecuencia de la interacción con la proteína S-layer.

1.3. Capacidad de interacción de la proteína S-layer con partículas virales

A diferencia de las bacterias y las levaduras, con los virus no se puede observar una aglutinación directa y los métodos experimentales que se utilizan para detectar la interacción lectina-virus generalmente son complejos y caros como por ejemplo *microarrays* [94], ELISA con las proteínas virales purificadas [95] o resonancia de plasmones superficiales [96] entre otros. Por esta razón, se utilizaron tres abordajes experimentales diferentes disponibles en el laboratorio: *dot blot*, *quenching* de fluorescencia y arrastre de las partículas virales por S-layer para poder determinar la interacción.

Para estudiar la interacción directa de la S-layer con partículas virales se emplearon tres virus animales, dos envueltos y uno desnudo respectivamente: el virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa KOS; el virus de la estomatitis vesicular (VSV); y el adenovirus humano tipo 5 (AdV5).

Las partículas virales elegidas para realizar los ensayos fueron seleccionados por sus características estructurales diferenciales y por la presencia de glicosilaciones en sus envolturas o cápside. A continuación se detallan algunas características relevantes de los tres virus utilizados.

El virus herpes simplex es un virus humano que pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alfaherpesvirinae*. Los viriones son partículas esféricas de 186 nm de diámetro con espículas que sobresalen, generando un diámetro total de 225 nm. La estructura de la partícula viral de HSV-1 es compleja ya que posee 40 proteínas de origen viral y celular, tiene una morfología única que consta de cuatro componentes básicos: núcleo, cápside, tegumento y envoltura. El núcleo está formado por el genoma del virus, que es una molécula de ADN, lineal y de doble cadena, rodeando al núcleo se encuentra la cápside icosaédrica con un diámetro de 125-130 nm. Las proteínas principales que forman la cápside son: VP5 (proteína mayoritaria que forma los hexones y pentones), VP26, VP23 y VP19C. Alrededor de la cápside se encuentra el tegumento compuesto por 26 proteínas virales. Y por último, rodeando al tegumento se encuentra la envoltura de virión compuesta por una doble capa lipídica, 12 glicoproteínas virales, así como algunas proteínas celulares. Las glicoproteínas median la adsorción y la entrada del virus a la célula, entre otras funciones [97]

Dentro de este género se pueden distinguir dos tipos: HSV-1 y HSV-2, que se asociaban con las infecciones herpéticas "del ombligo" hacia arriba o hacia abajo, respectivamente. La transmisión de HSV puede resultar del contacto directo con las secreciones infectadas de un hospedador sintomático o asintomático. El HSV-1 se transmite principalmente por contacto de boca a boca y causa infecciones en la boca o a su alrededor (herpes labial). El HSV-2 se transmite casi exclusivamente por vía sexual y provoca infecciones en la zona genital o anal (herpes genital). Sin embargo, el HSV-1 también puede transmitirse a la zona genital por contacto buco genital y provocar herpes genital. La infección por HSV no puede prevenirse mediante una vacuna y el virus establece una infección latente que le permite evadir el sistema inmune

generando una infección para toda la vida que se considera incurable. La reactivación del estado latente del virus es un evento frecuente e intermitente, que puede desencadenarse por diferentes estímulos. Según la Organización Mundial de la Salud se estima que en todo el mundo hay 3.700 millones de personas menores de 50 años (67%) infectadas por HSV-1 y 417 millones de personas de 15 a 49 años de edad (11%) infectadas por HSV-2 [98].

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) pertenece a la familia *Rhabdoviridae*, género *Vesiculovirus*, existen dos serotipos New Jersey e Indiana. Las partículas virales maduras tienen forma de bala, con un extremo redondeado y el otro recto, con un tamaño de aproximadamente 180 nm de largo y 75 nm de ancho. El material genético es ARN lineal de cadena simple de polaridad negativa y codifica para cinco proteínas: N, P, M, G y L. El genoma se encuentra rodeado por la nucleoproteína (N) formando un complejo N-ARN helicoidal resistente a nucleasas que sirve como templado para la síntesis de ARNm y para la replicación del genoma ARN. La ARN polimerasa dependiente de ARN compuesta por la proteína L, como subunidad catalítica, y la proteína P, como cofactor, se encuentra asociada a este complejo formando la ribonucleocápside. La ribonucleocápside está rodeada por la proteína de matriz (M) y todo está envuelto por una doble capa lipídica que contiene la glicoproteína (G) anclada [99].

El VSV es el agente viral que causa la estomatitis vesicular en ganado, caballos y cerdos, puede transmitirse por contacto directo entre los animales que presentan las lesiones o por vectores. Los vectores, hasta ahora identificados, son el mosquito (*Aedes spp.*), la mosca negra (*Simulium spp.*) y el tábano (*Lutzomyia spp.*). Las manifestaciones clínicas incluyen vesículas, úlceras y erosión en la mucosa oral y nasal, y en la superficie epitelial de la lengua, bandas coronarias y pezones, junto con lesiones en el hocico y abdomen. El VSV es zoonótico y puede causar en humanos síntomas parecidos a los de la gripe, que se resuelven completamente entre 3 y 5 días sin necesidad de tratamientos [99].

Los adenovirus (Adv) humanos pertenecen a la familia *Adenoviridae*, género *Mastadenovirus*. Los viriones maduros son icosadeltaedros regulares no envueltos, que tienen de 70 a 100 nm de diámetro. Los 252 capsómeros que constituyen la cápside se dividen en 240 hexones, que forman las caras triangulares equiláteras, y 12

pentones ubicados en los vértices. De cada pentón se proyecta una fibra, la cual está O-glicosilada, responsable de la unión al receptor y aumenta el diámetro total del virus aproximadamente a 167 nm. La cápside está compuesta además por otras cinco proteínas (IIIa, IVa2, VI, VIII, and IX) que tienen la función de estabilizarla o conectar la cápside externa con el núcleo. El núcleo está formado por un ADN bicatenario lineal, unido covalentemente a las proteínas terminales, y asociado a cuatro proteínas virales adicionales (V, VII, mu y proteasa) [100].

Dependiendo del serotipo de AdV, la infección puede causar diferentes enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, enfermedad del tracto respiratorio y cistitis hemorrágica.

El primer abordaje experimental realizado fue un ensayo cualitativo de *dot blot*. En una membrana de PDVF se inmovilizaron las partículas virales y se pusieron a interactuar 1 h a 37°C con 50 µg/ml de S-layer previo bloqueo de la membrana con BSA. Luego de sucesivos lavados la interacción entre las partículas virales y la proteína se reveló con un anticuerpo anti S-layer (Figura 15).

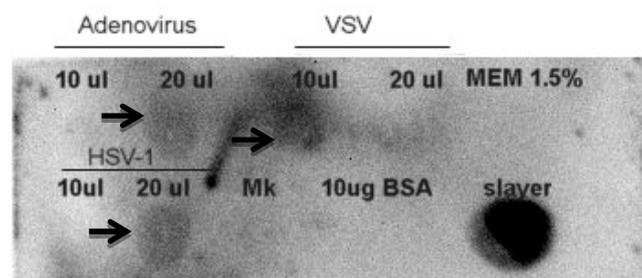


Figura 15 Interacción de la proteína S-layer con partículas de Adv-5, VSV y HSV-1. En una membrana de PDVF se inmovilizaron las partículas virales y luego se puso a interactuar 1 h a 37°C con 50µg/ml de S-layer previo bloqueo de la membrana con BSA. La interacción se reveló con un anticuerpo policlonal anti S-layer específico. Como control negativo de interacción se utilizó la mezcla de marcadores de peso molecular (Mk), BSA y MEM 1,5 % (medio donde se encontraban suspendidas las particulares virales) y S-layer pura como control positivo del revelado. Las flechas indican los dot positivos.

En la Figura 15 se observa que en el caso de Adv-5 y HSV-1 sólo hay interacción cuando se utilizaron 20 µl de stock de virus tal cual, aproximadamente 2×10^5 UFP/20 µl y 1×10^5 UFP/20 µl respectivamente. En cambio 10 µl de stock de virus de VSV que contenían aproximadamente 1×10^6 UFP/10 µl fueron suficientes para obtener interacción. En los controles utilizados, MEM 1,5 % (medio donde se encontraban suspendidas las particulares virales) y BSA, no se observa interacción. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la S-layer interacciona con las tres partículas virales ensayadas.

Luego, la interacción de la S-layer y las partículas virales se evaluó mediante el *quenching* o modificación de la fluorescencia de las tirosinas. La composición de aminoácidos de una proteína y su disposición espacial en la estructura secundaria resulta en un espectro de emisión de fluorescencia característico producto de la presencia de aminoácidos aromáticos. Hay sólo tres aminoácidos aromáticos que absorben luz en la región del ultravioleta cercano, estos son fenilalanina, tirosina y triptófano. La secuencia primaria de SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 presenta 23 tirosinas, 9 fenilalaninas y ningún triptófano cuyas longitudes de onda (λ) de emisión son: fenilalanina 282 nm, tirosina 303 nm y triptófano 350 nm.

La fenilalanina, con sólo un anillo bencénico y un grupo metileno es débilmente fluorescente y se observa sólo en ausencia de tirosina y triptófano, por ende, al analizar los espectros de emisión de la S-layer el único aminoácido que influirá fuertemente en emitir fluorescencia será la tirosina.

Para evaluar la interacción de la S-layer y las partículas virales mediante el *quenching* o modificación de fluorescencia, se verificó si hubo un cambio en la intensidad de fluorescencia de un determinado aminoácido sin cambiar el espectro de emisión, que ocurre por las interacciones del estado excitado con otras moléculas. En la Figura 16 se muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la proteína S-layer sola, de las partículas virales y de la interacción con la S-layer obtenidos para las tres partículas virales.

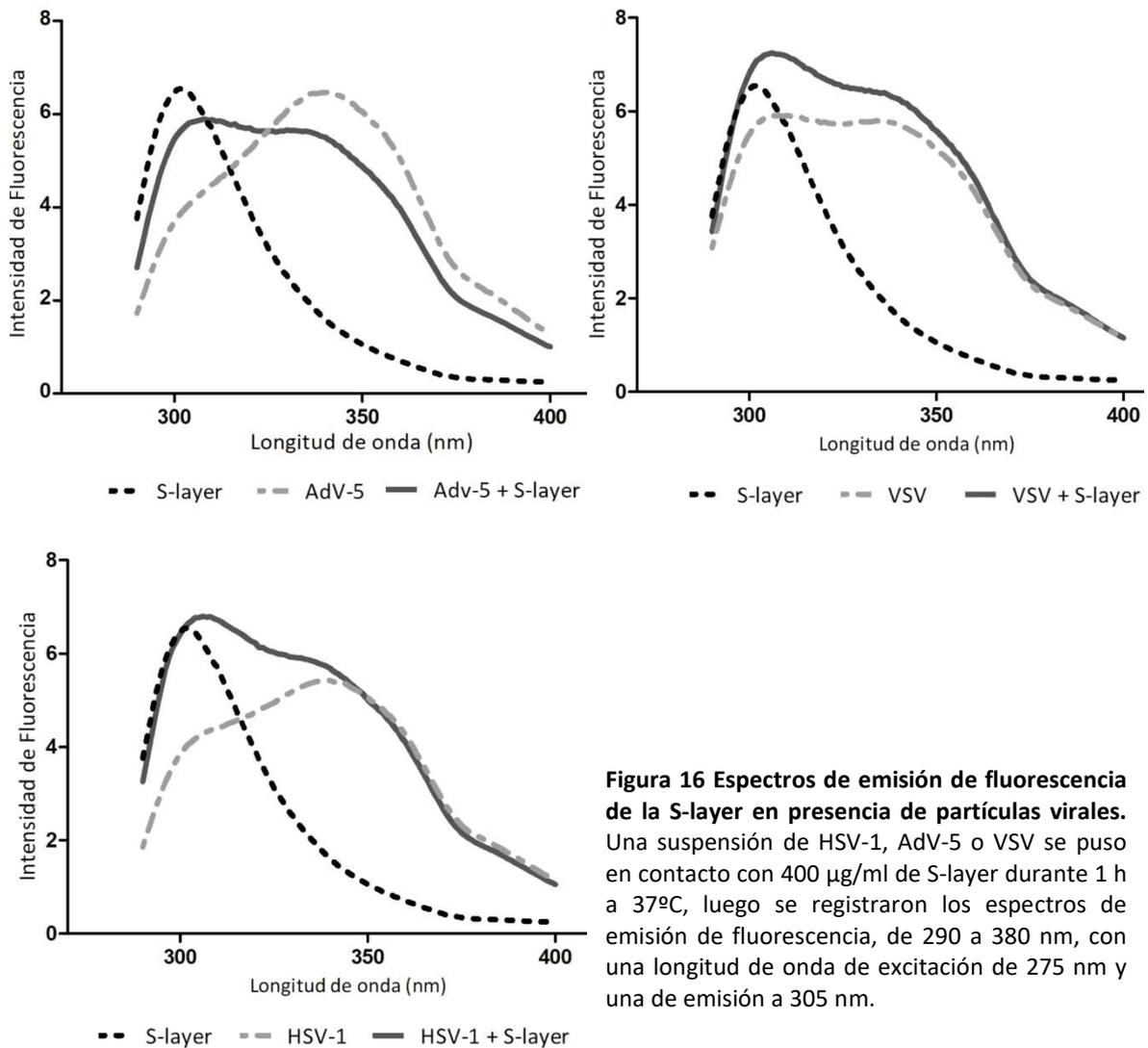


Figura 16 Espectros de emisión de fluorescencia de la S-layer en presencia de partículas virales. Una suspensión de HSV-1, AdV-5 o VSV se puso en contacto con 400 µg/ml de S-layer durante 1 h a 37°C, luego se registraron los espectros de emisión de fluorescencia, de 290 a 380 nm, con una longitud de onda de excitación de 275 nm y una de emisión a 305 nm.

El espectro de emisión de la S-layer muestra un pico de emisión a los 305 nm, longitud de onda correspondiente a la emisión de las tirosinas, que se muestra en la Figura 16 como una línea punteada negra. Al evaluar el espectro de emisión de las partículas virales (línea punteada gris en cada gráfico) se observa mayoritariamente un pico de emisión a los 350 nm, longitud de onda correspondiente a la emisión de los triptófanos. Cuando la proteína se puso en contacto con las partículas virales (línea continua gris en cada gráfico) se observó un cambio en la intensidad de la emisión de fluorescencia tanto de las partículas virales como de la S-layer. En el caso de AdV-5 se observó una disminución en la emisión de las tirosinas y del triptófano, al contrario de lo que se observó en VSV dónde la emisión de la fluorescencia de las tirosinas y triptófano es mayor y en HSV-1 sólo se ve un leve aumento de la emisión de las

tirosinas. Un aumento en el espectro de emisión de los aminoácidos indica una mayor exposición de los residuos, mientras que una disminución en espectro indica que los residuos se encuentran menos expuestos. En los dos casos, ya sea un aumento o una disminución en el espectro de emisión de la fluorescencia, es indicativo de una interacción directa entre la proteína S-layer y las partículas virales.

Del ensayo de *dot blot* y del análisis del espectro de emisión de la fluorescencia se evidencia que existiría una interacción directa entre las particulares virales y la S-layer. Si la proteína está interactuando con las partículas virales, reconociendo los carbohidratos presentes en la superficie de los viriones, esto podría resultar en una inactivación viral, dado que las glicoproteínas virales desempeñan un papel clave en la entrada de los virus a la célula huésped. El bloqueo de la interacción glicoproteína viral con el receptor celular es una de las estrategias en estudio para la prevención e inhibición de las infecciones virales [101]. Por lo tanto, a continuación se verificó si existía o no un efecto virucida de la S-layer sobre los virus HSV-1, Adv-5 y VSV. Para realizar este ensayo las partículas virales se pusieron en contacto 1 h a 37°C con 400 µg/ml de S-layer y se cuantificó el título viral por el método de formación de placas.

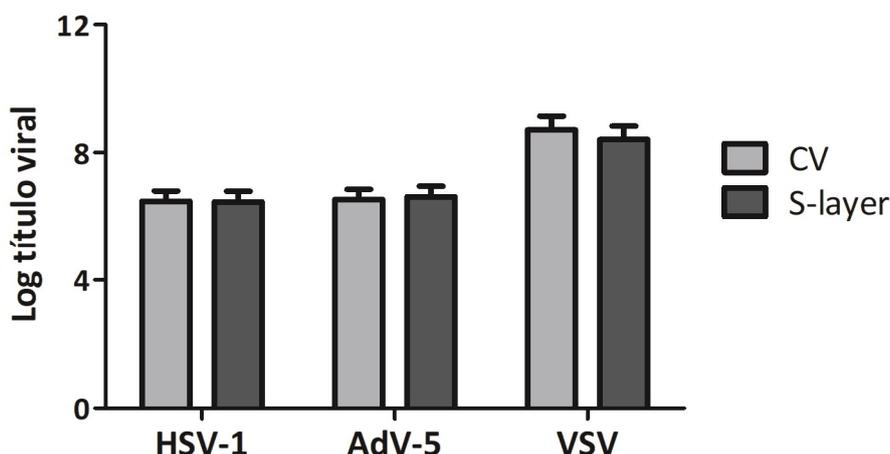


Figura 17 Evaluación de la actividad virucida de la S-layer contra HSV-1, Adv-5 y VSV. Una suspensión de cada virus fue incubada 1 h a 37°C con PBS (CV) o con la proteína S-layer. El título viral remanente se cuantificó tanto en los CV como en las muestras tratadas con S-layer. No se obtuvieron diferencias significativas respecto al CV usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p > 0,05$).

En la Figura 17 se graficó el logaritmo de los títulos virales obtenidos para los tres virus ensayados observándose que en ningún caso hay diferencias significativas entre los controles de virus y las muestras tratadas con S-layer. Por lo tanto, la proteína S-layer no presenta actividad virucida.

A continuación para confirmar la interacción, desarrollamos un ensayo de arrastre de las partículas virales por la S-layer, en analogía a los ensayos de *pull-down*. Este abordaje experimental es posible porque la proteína, luego de ser extraída de la bacteria con LiCl, interactúa entre sí formando una matriz paracristalina. Al eliminar las sales de litio, mediante una extensa diálisis, se forma un agregado blanco que permanece en suspensión pero puede recuperarse por centrifugación a baja velocidad. Esta característica intrínseca fue observada a concentraciones mayores o iguales a 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Por otra parte, para que una suspensión viral forme un pellet se requiere alta fuerza centrífuga (mayor a 30.000 x g) empleando una ultracentrífuga [102].

Las partículas virales en suspensión se incubaron con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la S-layer durante 1 h a 37°C y luego se centrifugaron a 3800 x g. El título viral en el sobrenadante antes y después de centrifugar a baja velocidad se cuantificó por el método de placas de lisis. Con los datos obtenidos se calculó el factor de reducción (FR) como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de la centrifugación en el control de virus y en las muestras tratadas con S-layer.

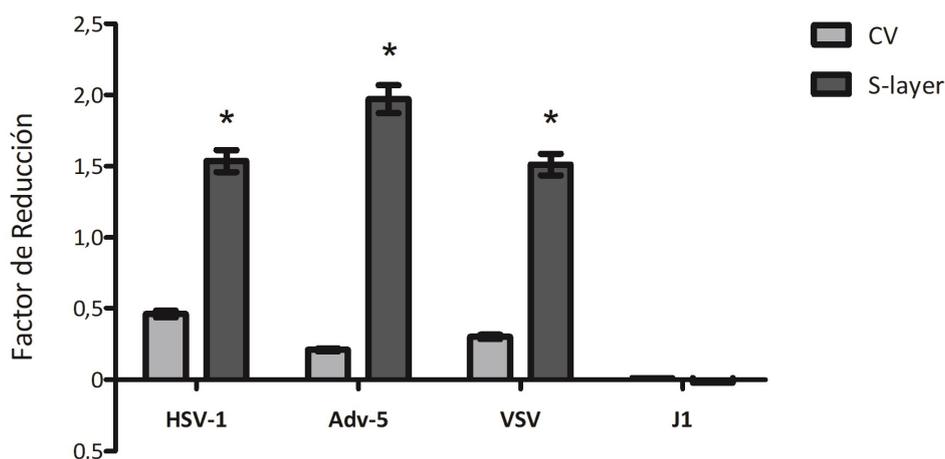


Figura 18 Interacción de S-layer con partículas virales mediante ensayo de arrastre. Una suspensión de cada virus se dividió en dos tubos, uno se diluyó con PBS (CV) y el otro con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S-layer, ambos se incubaron por 1 h a 37°C. Luego, se centrifugó a baja G y el título viral remanente en el sobrenadante antes y después de la centrifugación se cuantificó tanto en los CV como en las muestras tratadas con S-layer. Con estos datos se calculó el factor de reducción (FR) como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de la centrifugación. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al (CV) usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 18 cuando a las partículas virales (CV) se las somete a una baja fuerza centrífuga el título viral no se ve afectado. Los factores de reducción varían entre 0,2 y 0,5 indicando que no hubo una reducción significativa del título viral en los sobrenadantes de los controles de virus. Sin embargo, cuando las partículas virales fueron puestas en contacto con la proteína hay una notable reducción del título viral en los sobrenadantes de los tres virus evaluados luego de la centrifugación, indicando que la S-layer fue capaz de interactuar con los virus y arrastrarlos hacia el *pellet*.

A fin de descartar que el efecto de arrastre sea consecuencia de un atrapamiento inespecífico, en lugar de producto de la interacción de la S-layer con las partículas virales glicosiladas, se realizó el mismo ensayo pero con el bacteriófago J1. Además de no presentar glicosilaciones, el tamaño de J1 (150-200 nm) es comparable al de los virus animales HSV-1 (180 nm), VSV (90 nm) y AdV-5 (290 nm).

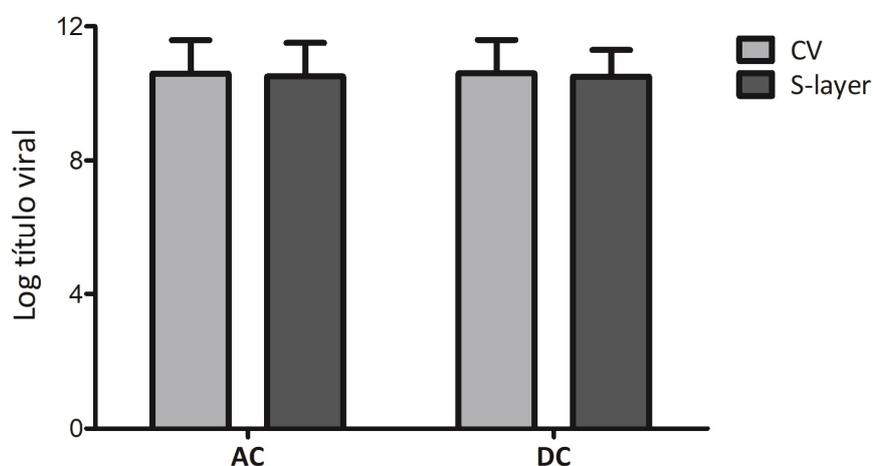


Figura 19 Evaluación de la interacción de S-layer con el bacteriófago J1. Una suspensión de J1 se dividió en dos tubos, uno se diluyó con PBS (CV) y el otro con 400 µg/ml de S-layer, ambos se incubaron por 1 h a 37°C. Luego, se centrifugó a baja G y el título viral remanente en el sobrenadante antes (AC) y después de la centrifugación (DC) se cuantificó tanto en los CV como en las muestras tratadas con S-layer. No se obtuvo diferencia significativa respecto al CV usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

En la Figura 19 se graficó el logaritmo del título viral de los sobrenadantes, obtenido en el control de virus y en las muestras tratadas con S-layer, antes y después de

centrifugar. En este caso no se obtuvieron diferencias significativas en las muestras tratadas con S-layer respecto al CV ni antes de centrifugar (no hay efecto virucida) ni después de centrifugar (no hay efecto de arrastre).

Estos resultados refuerzan la hipótesis que hay algún tipo de interacción específica entre las partículas virales de HSV-1, AdV-5 y VSV y la proteína, ya que al estar en contacto con la S-layer pueden ser precipitadas junto a ella luego de la centrifugación, mientras que si fuese una acción mecánica inespecífica, el bacteriófago también debería ser arrastrado. Además, sugieren que la interacción sería específica de glicosilaciones en concordancia con la ausencia de arrastre del bacteriófago J1 que no posee glicosilaciones en su estructura.

A fin de dilucidar si en esta interacción estaban involucrados los CRD, se evaluó si el arrastre era inhibido por la pre-incubación de la proteína con D-manosa, que antagoniza la unión de la S-layer a los carbohidratos como se observó en la Tabla 4. Para ello, se realizó el mismo ensayo descrito en la Figura 18 utilizando el virus HSV-1, y preincubando la S-layer con 400 mM de D-manosa durante 1 h a 37°C antes de la interacción con el virus. En estas condiciones, el factor de reducción que se obtuvo cuando la S-layer se pre-incubó con D-manosa fue un 67% menor que el obtenido con la S-layer. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la interacción de la S-layer con las partículas virales está mediada por su actividad de tipo lectina.

1.4. Capacidad de interacción de la proteína S-layer con células eucariotas

Como se mencionó en la introducción el género *Lactobacillus* se encuentra presente en el intestino y es ampliamente reconocido como microorganismo promotor de la salud en los seres humanos. La adhesión al epitelio intestinal permite la colonización de los microorganismos probióticos en el tracto intestinal humano, y generalmente está mediada por proteínas de adhesión a la superficie celular y esto resulta en la persistencia de las bacterias en el intestino con la exclusión competitiva de patógenos. Los lactobacilos tienen numerosas proteínas en su superficie celular que pueden unirse específicamente a los componentes de la matriz extracelular y a la capa de mucus de las células epiteliales. Diversos trabajos reportaron que *Lactobacillus acidophilus* interactúa con la matriz extracelular, mediante adhesinas, a través de un reconocimiento del tipo lectina [103], [104].

La mucosa intestinal está compuesta, en parte, por mucinas que son una familia de glicoproteínas de alto peso molecular secretadas por las células epiteliales. Siendo las proteínas S-layer las primeras en tener contacto con las células del epitelio, éstas podrían ser de gran importancia en la interacción bacteria-hospedador. La interacción de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con células del epitelio intestinal fue descrita en células Caco-2 y HT-29, ambas líneas celulares derivan de un adenocarcinoma de colon humano [105], [106]. Mientras que las Caco-2 en cultivo se diferencian espontáneamente una vez que alcanzan la confluencia, formando una monocapa de células que expresa un fenotipo característico de los enterocitos maduros, las HT29 crecen como una multicapa no polarizada y no diferenciada. A continuación se evaluó la capacidad de interacción de la S-layer con células eucariotas, pero primero se corroboró si las células enteras de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tienen la capacidad de interactuar con dichas células epiteliales.

Para el ensayo de adhesión del lactobacilo, monocapas de células crecidas en microplaca de 24 pocillos se incubaron con distintas cantidades de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y se determinó el número de bacterias viables adheridas por pocillo mediante el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) sobre placas de agar MRS.

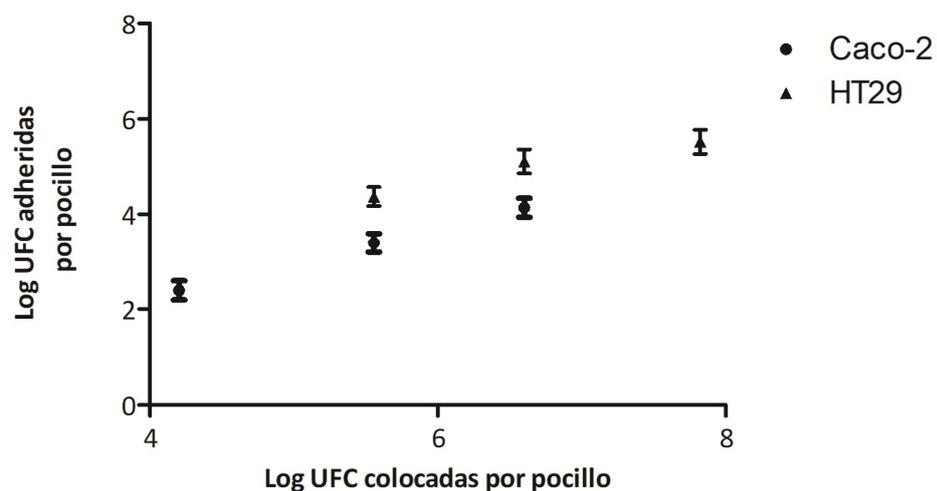


Figura 20 Adhesión de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a células epiteliales intestinales. Monocapas de células HT29 y Caco-2 crecidas en microplaca de 24 pocillos (HT29 durante 48 hs y Caco-2 durante 13 días) se incubaron con distintas cantidades de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 durante 1 h a 37°C. Luego, se realizaron varios lavados y las monocapas se lisaron con 0,5 ml de H₂O durante 30 min a 37°C. El número de bacterias viables adheridas por pocillo se determinó mediante el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) sobre agar MRS.

En la Figura 20 se puede observar la adhesión del lactobacilo a las dos líneas celulares, con preferencia por las células HT29.

La diferenciación de las células Caco-2 ocurre alrededor de los 13 a 14 días de cultivo. Debido al largo tiempo requerido para la diferenciación de las Caco-2, se empleó para el ensayo de adhesión un clon de la línea Caco-2, la línea celular Caco-2/TC7, que es capaz de exhibir espontáneamente un fenotipo diferenciado y polarizado luego de 7 días de cultivo.

A continuación se realizó un ensayo de adhesión de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a células Caco-2/TC7, en este caso se aumentó el inóculo inicial respecto al experimento anterior con el fin de obtener un mayor porcentaje de células adheridas (Figura 21).

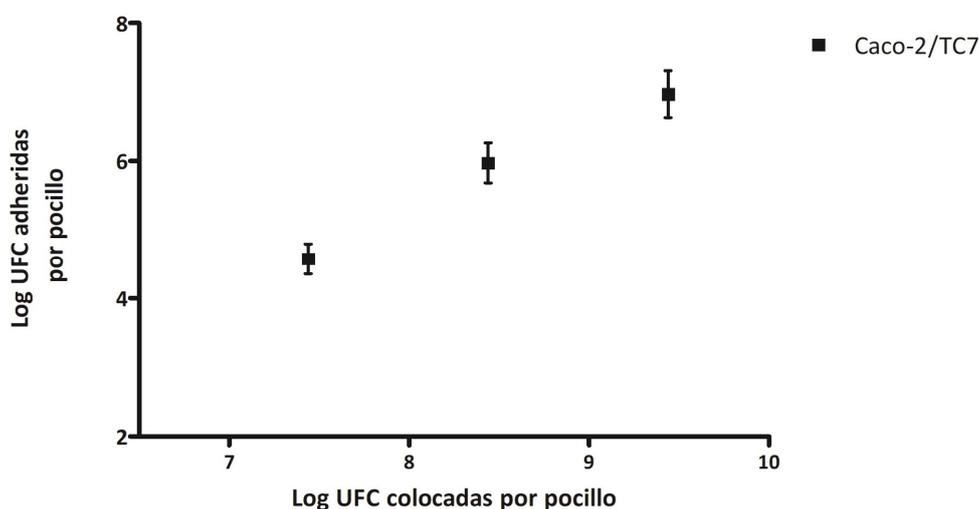


Figura 21 Adhesión de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a células Caco-2/TC7. Monocapas de Caco-2/TC7 crecidas en microplaca de 24 pocillos por 7 días se incubaron con distintas cantidades de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 durante 1 h a 37°C. Luego de varios lavados, las monocapas se lisaron con 0,5 ml de H₂O durante 30 min a 37°C y el número de bacterias viables adheridas por pocillo se determinó mediante el recuento de las unidades formadoras de colonia (UFC) sobre agar MRS.

Por otra parte, la adhesión también fue evaluada mediante microscopía a células Caco-2/TC7 y HT-29. Para este ensayo células crecidas en microplaca de 24 pocillos sobre vidrios, se incubaron con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 durante 1 hora a 37°C y luego de lavados con PBS, para remover las bacterias no adheridas, se las tiñó con cristal violeta.

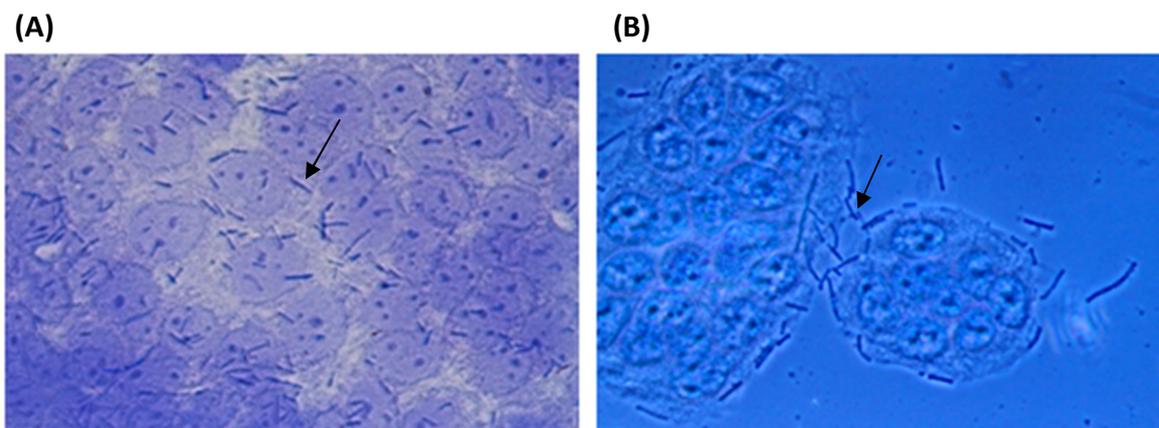


Figura 22 Adhesión de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 a células epiteliales intestinales. Monocapas de células HT29 y Caco-2 crecidas sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos (HT29 durante 48 hs y Caco-2 durante 7 días) se incubaron con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 durante 1 h a 37°C. Luego de realizar lavados con PBS para remover las bacterias no adheridas, las monocapas fueron teñidas con cristal violeta y se observaron al microscopio. (A) Caco-2/TC7 y (B) HT29. Aumento 1000X. La flecha negra muestra a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Los resultados muestran que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es capaz de adherirse a las tres líneas epiteliales del intestino evaluadas, obteniéndose un porcentaje de adhesión que varía entre 0,4 y 0,8 %.

La proteína S-layer conforma la capa más externa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, por lo que resulta lógico especular que esta proteína es una de las principales responsables de la interacción con las células en el epitelio intestinal. De hecho, ha sido reportado que eliminar la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* M92, por un tratamiento de la bacteria con 5 M LiCl, ocasiona una disminución en la adhesión a células epiteliales íleales de ratón [53] así como también una cepa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM mutante para *slpA* perdió su capacidad de adherirse a células Caco-2 [107].

A continuación, la interacción directa de la S-layer con la membrana plasmática de las células Caco-2/TC7 y HT29 se analizó por un ensayo de inmuno-marcaación mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y se observó por microscopía de fluorescencia. Monocapas de células HT29 o Caco-2/TC7 crecidas en microplaca de 24 pocillos sobre vidrios se incubaron con 10 o 100 µg/ml de S-layer durante 1 h a 37°C. Luego de varios lavados, las células se fijaron con metanol y se realizó la inmunomarcaación como se detalla en materiales y métodos, y la tinción con aglutinina de germen de trigo (WGA) conjugada a rodamina (roja), para marcar las células y así definir la ubicación de la S-layer.

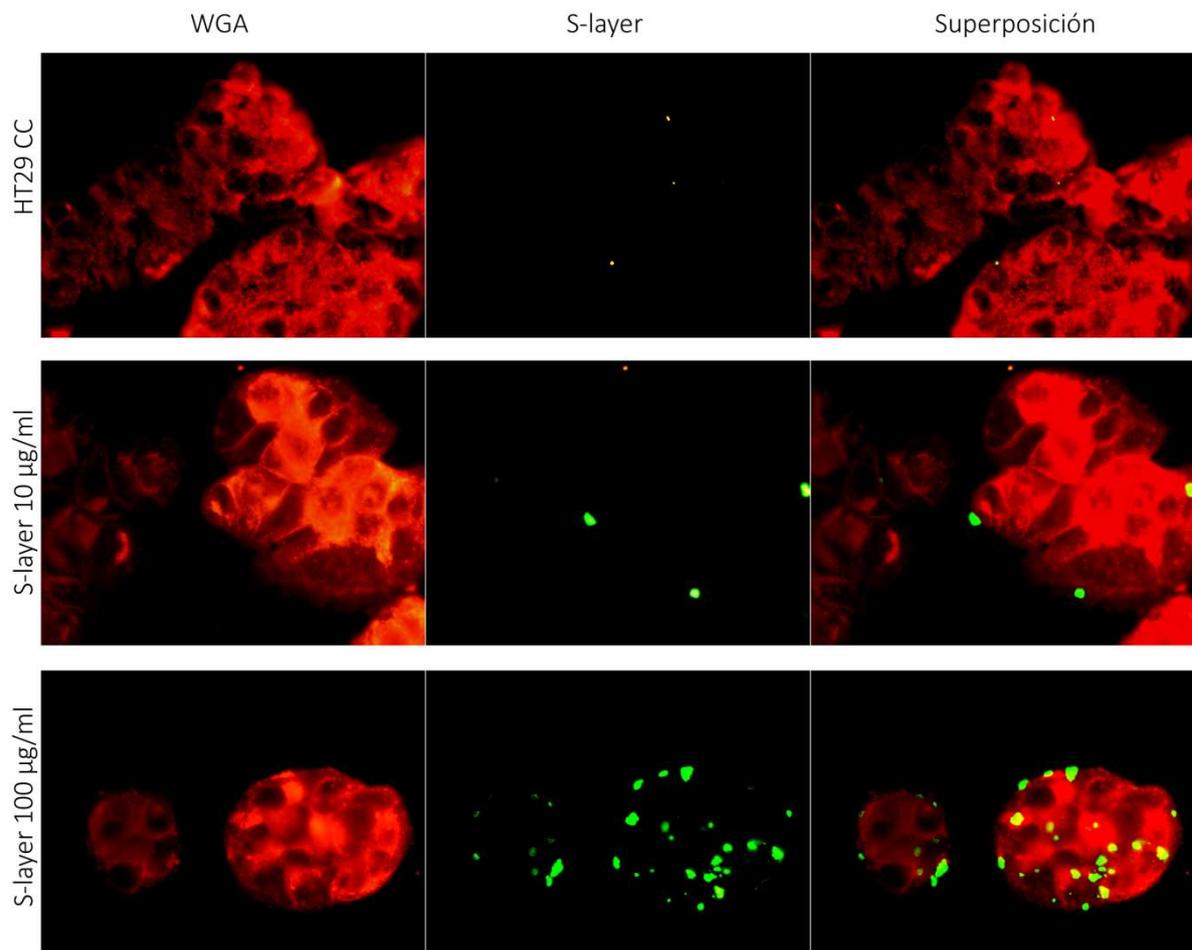


Figura 23 Interacción de la proteína S-layer con células HT29. Monocapas de células HT29 crecidas 24 hs sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos se incubaron con 10 o 100 µg/ml de S-layer. Luego las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo para detectar S-layer (verde) y con WGA (roja). Aumento 400X.

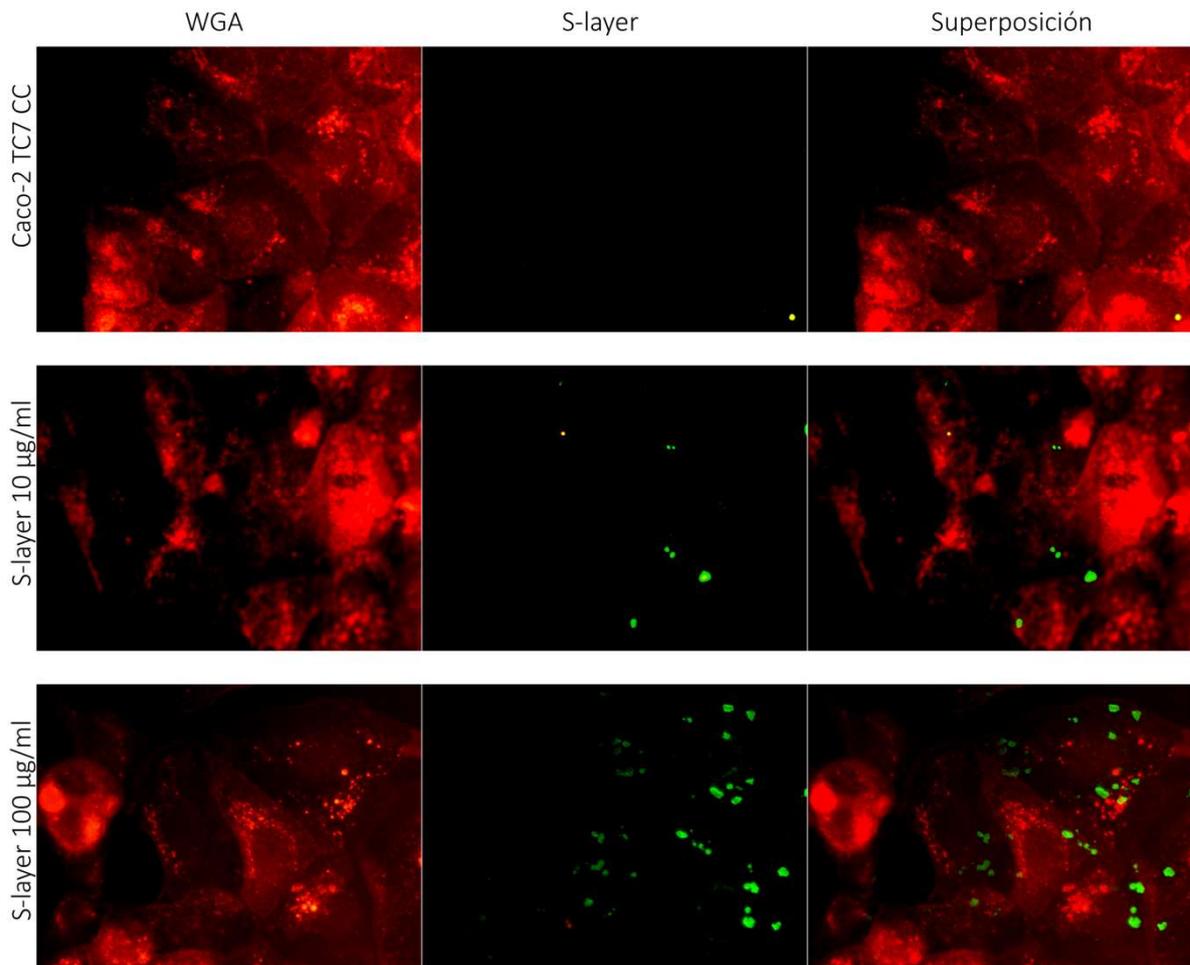


Figura 24 Interacción de la proteína S-layer con células Caco-2/TC7. Monocapas de células Caco-2/TC7 crecidas 7 días sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos se incubaron con 10 o 100 µg/ml de S-layer. Luego las células fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo para detectar S-layer (verde) y con WGA (roja). Aumento 400X.

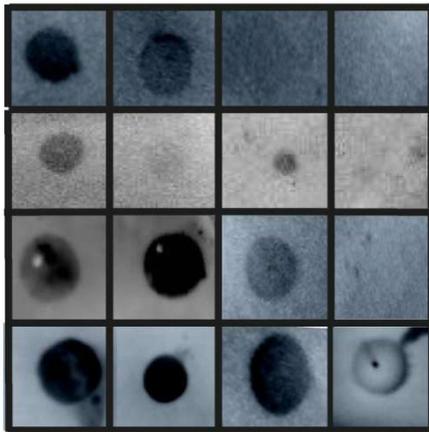
Las imágenes obtenidas en las Figuras 23 y 24 muestran la presencia de puntos verdes en las células tratadas con S-layer, probablemente sean agregados de SlpA que se forman como resultado de su propiedad de autoensamblaje, sugiriendo que la proteína se adhiere a la superficie de ambas líneas celulares. Esta interacción resultó ser dependiente de la concentración, ya que a una concentración de 100 µg/ml se observó una mayor interacción respecto a 10 µg/ml.

1.5. Capacidad de interacción de la proteína S-layer con macromoléculas eucariotas y procariotas

Continuando con la caracterización de la S-layer y su comportamiento de tipo lectina se realizaron ensayos de *dot-blot* con macromoléculas de origen tanto eucariota como procariota, como primera aproximación cualitativa para identificar posibles interactores y tipo de glicosilación involucrada. En la Tabla 6 se detallan las características glicosídicas de las distintas macromoléculas que se emplearon.

Macromolécula	Características relevantes	Función	Origen	Tipo de glicosilaciones	Referencia
Colágeno	Glicoproteína secretada por células del tejido	Estructural	Animal	O-glicosilaciones	(Haltiwanger <i>et al.</i> , 2015)
Fibronectina	Glicoproteína presente en la matriz extracelular	Estructural	Animal	N-glicosilaciones	(Hsiao <i>et al.</i> , 2017)
ARNasa B	Glicoproteína secretada por el páncreas	Enzima	Animal	N-glicosilaciones de alta manosa	(Geiger <i>et al.</i> , 2011)
Glucosa Oxidasa	Glicoproteína	Enzima	Hongo <i>Aspergillus niger</i>	N-glicosilaciones	(Bankar <i>et al.</i> , 2009)
Mucina	Glicoproteína secretada en la superficie de las mucosas del tracto	Lubricante y protectora	Animal	Altamente glicosilada, presenta O- y N-glicosilaciones.	(Perez-Vilar and Hill, 2004)
Mucina sin siálico	Mucina a la cual se le removió el ácido siálico por un tratamiento				
Fetuína	Glicoproteína secretada por el hígado	Transporte	Animal	N- y O-glicosilaciones, sialico terminal	(Stefan <i>et al.</i> , 2008)
AsialoFetuína	Fetuína a la cual se le removió el ácido siálico por un tratamiento				
Seroalbumina bovina (BSA)	Proteína no glicosilada proveniente del suero fetal bovino	Transporte	Animal		(Majorek <i>et al.</i> , 2012)
Ácido Hialurónico	Polisacárido presente en los tejidos conectivos de todos los vertebrados	Estructural	Animal	Formado por unidades repetidas de ácido glucurónico y NAG	(Sudha <i>et al.</i> ,2014)
Quitina	Polisacárido	Estructural	Hongos y crustáceos	N-acetilglucosamina (900 monómeros)	(Rinaudo , 2006)
Quitosano	Polisacárido	Estructural	Hongos y crustáceos	N-acetilglucosamina y D-glucosamina	(Rinaudo , 2006)
Polisacárido de pared (CWPS)	Polisacárido	Estructural	Bacteria	En la pared celular de bacterias lácticas xej <i>Lactobacillus casei</i> contiene ramosas	(Vinogradov <i>et al.</i> , 2016)
Péptidoglicano (PG)	Polímero	Estructural	Bacteria	Muropéptido de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico crosslinkeados por cadenas de pentapeptidos	(Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014)
Ácido lipoteicoico (LTA)	Polímero	Estructural	Bacteria	En Lactobacilos glicerolfosfato y azúcares	(Baddiley, 1989)

Tabla 6 Macromoléculas ensayadas y sus características relevantes.



Colágeno	Fibronectina	ARNasa B	Glucosa Oxidasa
Mucina	Mucina sin siálico	Fetuína	Fetuína sin siálico
Quitina	Quitosano	Ácido hialurónico	BSA
PG <i>L. acidophilus</i>	PG <i>L. casei</i>	LTA <i>L. acidophilus</i>	CWPS <i>L. casei</i>

Figura 25 Interacción de la proteína S-layer con macromoléculas procariotas y eucariotas. (A) En una membrana de PDVF las macromoléculas fueron inmovilizadas y luego se puso a interactuar 1 h a 37°C con 50µg/ml de S-layer previo bloqueo de la membrana con BSA. La interacción se reveló con un anticuerpo policlonal anti S-layer específico. (B) Diagrama representativo de los componentes inmovilizados en la membrana de PDVF.

En la Figura 25 se observa que la S-layer interactuó con las glicoproteínas eucariotas mucina, fibronectina y colágeno, presentes en el epitelio intestinal, pero no lo hizo con la ARNasa B y la glucosa oxidasa. Por otro lado, también se observa la presencia de manchas oscuras o señal con los polisacáridos eucariotas como la quitina, el quitosano y el ácido hialurónico. Respecto de los componentes bacterianos, la S-layer pura interactuó con las fracciones PG y LTA de la envoltura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, microorganismo del cual se extrae. Pero también se observa una interacción positiva con el PG de *Lactobacillus casei* y en menor grado con el CWPS de dicha especie.

En cuanto a las glicosilaciones que estarían siendo reconocidas, el ácido siálico sería importante para la interacción de la S-layer con la mucina y la fetuína, ya que se obtuvo una disminución considerable de la señal al remover el ácido siálico de ambas proteínas; mientras que los glicanos de alta D-manosa presentes en la ARNasa B y la glucosa oxidasa, no fueron reconocidos por la S-layer. Pero no parece ser el único tipo de glicosilación reconocido, ya que se observó una amplia gama de afinidad a diversos polímeros incluyendo la quitina, quitosano, ácido hialurónico, PG y LTA.

Dado que se observó que la S-layer interactuó con la mucina y que éstas son proteínas altamente glicosiladas, a fin de evaluar la especificidad del reconocimiento de los carbohidratos presentes en las glicosilaciones, se puso a punto un ensayo de fase sólida utilizando mucinas inmovilizada en el soporte. Para ello se adhirió la mucina a una placa de poliestireno y luego se llevaron a cabo los ensayos de unión de S-layer. Lo primero que se realizó fue una curva de calibración para determinar la concentración óptima de uso de la proteína S-layer (Figura 26).

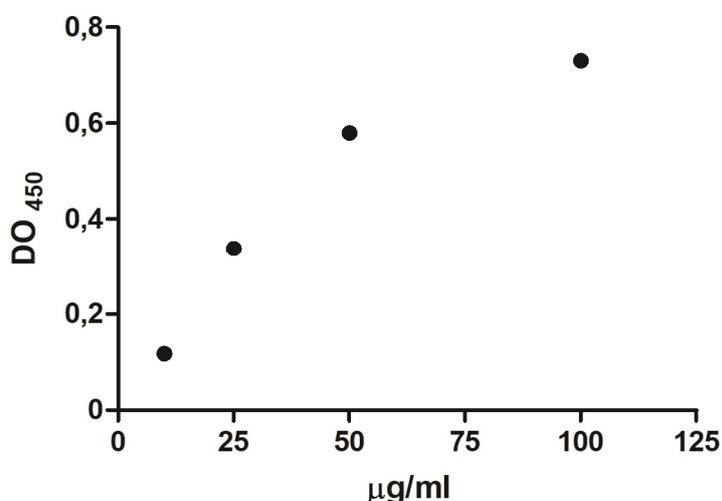


Figura 26 Interacción de la proteína S-layer con mucina. En una microplaca de 96 pocillos se adhirió la mucina y luego se incubó por 1 h a 37°C con concentraciones crecientes de S-layer la interacción se reveló mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA).

Teniendo en cuenta este resultado para los siguientes experimentos se utilizó una concentración de 50 µg/ml de proteína.

Utilizando esta técnica de fase sólida se evaluaron diferentes carbohidratos como inhibidores competitivos de la interacción de S-layer con mucina. La S-layer se pre-incubó con concentraciones creciente de los distintos carbohidratos y luego se pusieron a interactuar con la mucina previamente adherida a una placa de poliestireno. La interacción se reveló con un anticuerpo policlonal anti S-layer específico y se calculó la concentración inhibitoria (CI_{50}) para cada carbohidrato (Figura 27). La CI_{50} es la concentración de un inhibidor donde la respuesta (o unión) se reduce a la mitad.

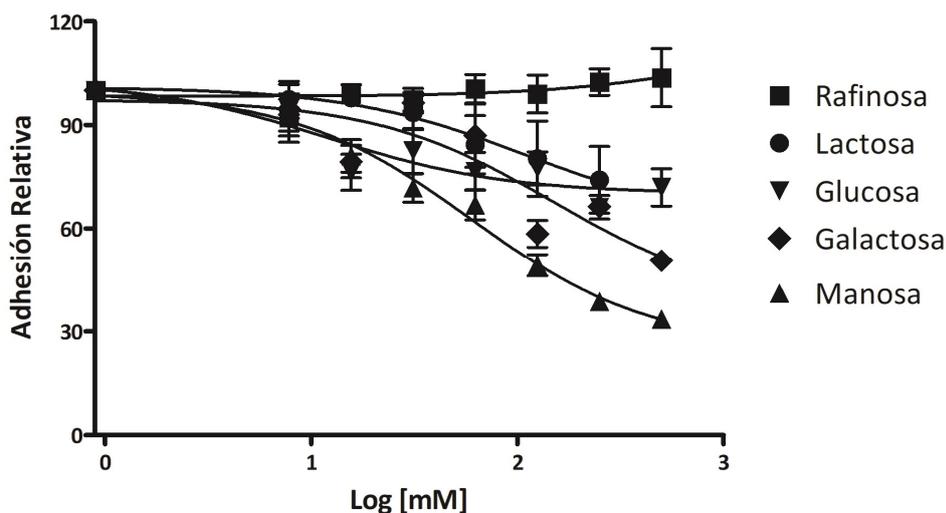


Figura 27 Inhibición de la interacción de la proteína S-layer con mucina por carbohidratos. En una microplaca de 96 pocillos se adhirió la mucina y luego se incubó por 1 h a 37°C con S-layer previamente incubada con los distintos carbohidratos. La interacción se reveló mediante un inmunoensayo enzimático (ELISA). Los valores de CI_{50} se calcularon ajustando los datos experimentales transformados logarítmicamente a una curva de dosis-respuesta usando GraphPad Prism® 5 (Versión 5.01, Software GraphPad, Inc., EE. UU.).

Las CI_{50} s obtenidas para los carbohidratos evaluados fueron $59 \pm 0,03$ mM, $210 \pm 0,1$ mM, $240 \pm 0,1$ mM para los monosacáridos D-manosa, D-galactosa y D-glucosa, respectivamente; $107 \pm 0,05$ mM para el disacárido lactosa; mientras que el trisacárido rafinosa (compuesto por glucosa, fructosa y galactosa) no inhibió la interacción de la S-layer con la mucina. A pesar de inhibir con baja afinidad la interacción de la S-layer con la mucina, el mejor inhibidor de los evaluados resultó ser la D-manosa.

1.6. Análisis funcional del dominio amino y carboxilo terminal de proteína S-layer en la interacción con carbohidratos

La proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee dos dominios estructurales con diferentes funciones, un dominio de cristalización correspondiente a dos tercios de la porción amino-terminal de la proteína y un dominio carboxilo-terminal de unión a la pared celular formado por el tercio restante de la molécula [45]. Los CRD se predicen en la región carboxilo-terminal de la SlpA y posee dos repeticiones internas (RI) de 57 y 58 aminoácidos con una similitud del 60% y una identidad del 26% que están compuestas en su mayoría por aminoácidos básicos y

aromáticos. Las secuencias consenso propuestas por Von Eichel-Streiber para la toxina (ToxA) de *Clostridium difficile* [108] y para la glicosiltransferasa (GBP) de *Streptococcus mutans* [109] se encuentran dentro de estas repeticiones. Además al comienzo de cada repetición interna se encuentra una secuencia de cinco aminoácidos que posee similitud con las de las lectinas de unión a manosa (MBL) [110] (Figura 28).

RI1	322	MHNA <u>Y</u> YYDKDAKRVGTDSVKRYNSVSVLPNTTTI-NGKTY <u>Y</u> QVVENGKAVDK-YINAAN
	 : : : : : .
RI2	387	KHNA <u>V</u> <u>Y</u> ASSKKRANKVVLKKGEVVTY <u>G</u> ASYTFKNG <u>Q</u> <u>K</u> <u>Y</u> YKIGDNT---DKT <u>Y</u> VKVANFR
Consenso CT		HNA <u>Y</u> <u>Y</u> KR K V T NG <u>Y</u> <u>Y</u> N DK <u>Y</u> NF
GBP		TI-DGKK <u>Y</u> YF N
Von Eichel		KR K VTGW QTI-DGKW <u>Y</u> YF DNG
MBL/PCL		QDN <u>V</u> <u>Y</u>
Consenso		..N.Y.....T. .G..YY...N.....

Figura 28 Alineamiento de las repeticiones internas del CT Alineamiento de secuencias, utilizando la herramienta bioinformática Multalin versión 5.4.1 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), de las repeticiones internas de SlpA RI1 (residuos 322-378) y RI2 (residuos 387- 444). El símbolo “|” indica aminoácido idénticos, los dos puntos “:” indica similitud de grupo y el punto “.” indica baja similitud de grupo. Debajo del alineamiento se encuentran las secuencias descritas para GBP y ToxA [109] y PLC o MBL [110].

Entonces, con el fin de establecer que dominio de la proteína es responsable de las interacciones con carbohidratos y cuál es la secuencia mínima de aminoácidos de la SlpA necesaria para la interacción, se construyeron por clonado fusiones quiméricas de porciones del gen *slpA* con la proteína verde fluorescente (GFP) conteniendo diferentes péptidos de la proteína SlpA. La GFP fue localizada río arriba de la porción carboxilo-terminal de la SlpA (GFP-CT) o río abajo de la porción amino-terminal (NT-GFP) para conservar la configuración de la S-layer nativa.

Al igual que con la S-layer nativa la capacidad de unión de las proteínas quiméricas a distintas macromoléculas fue evaluada mediante *dot blot*. En la Figura 29 se muestra el resultado obtenido, se señala con “+” la interacción, con “-” no interacción y ND no determinado.

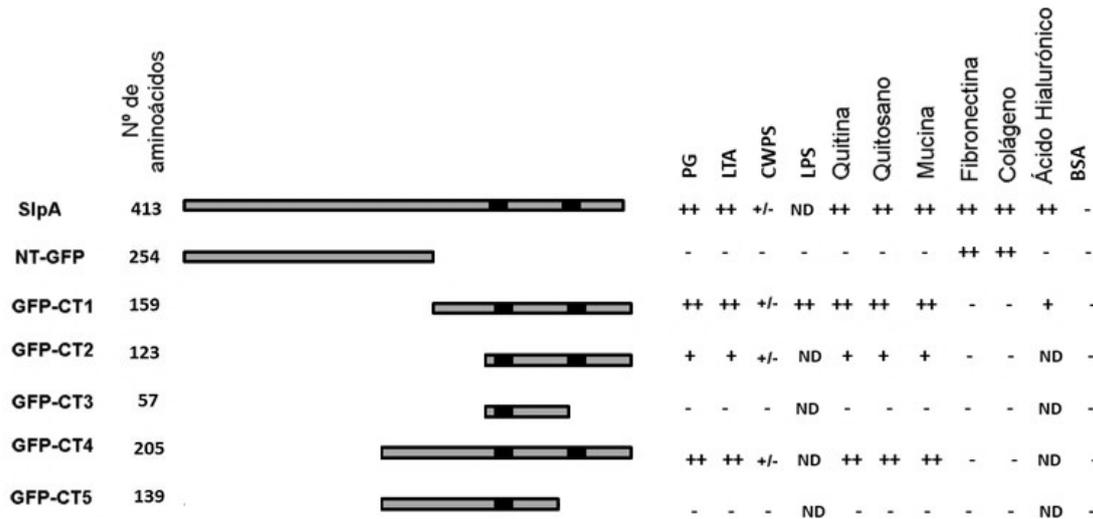


Figura 29 Interacción de las proteínas quiméricas S-layer con macromoléculas procariontas y eucariotas. En una membrana de PDVF las macromoléculas fueron inmovilizadas y luego se puso a interactuar 1 h a 37°C con 50µg/ml de las proteínas previo bloqueo de la membrana con BSA. La interacción se visualizó por fluorescencia directa. Los dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) están representados en cajas negras. Los símbolos “+” y “-” indican el nivel de interacción y ND indica no determinado.

Los resultados obtenidos indican que el NT interactuó sólo con fibronectina y colágeno, mientras que ninguna de las construcciones del CT mostró interacción con dichas proteínas. En cambio, los dominios CT1, CT2 y CT4 de la proteína S-layer interactuaron con los componentes de la pared celular de bacterias Gram positivas (PG, LTA y CWPS), con macromoléculas eucariotas (como la glicoproteína mucina y los polisacáridos quitina y quitosano), e incluso el CT1 también lo hizo con el LPS de bacteria Gram negativa y el ácido hialurónico. Con las proteínas quiméricas CT3 y CT5, en las cuales sólo hay una de las dos repeticiones internas de los CRD, no se observó interacción con ninguna macromolécula. Por lo tanto, esto indicaría que ambas repeticiones son necesarias para la interacción de la S-layer con la pared celular de *Lactobacillus* y con las macromoléculas eucariotas.

A continuación, corroboró si el dominio CT1 y no el dominio NT, era capaz de interactuar con los componentes de la pared de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en células desprovistas de S-layer, tal como lo sugieren los resultados de la Figura 29. Para ello, las proteínas quiméricas GFP-CT1 y NT-GFP se incubaron con bacterias carentes de S-layer por un tratamiento con LiCl. Luego, la interacción se evaluó por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo valiéndose de la fluorescencia de GFP. Los resultados de la Figura 30 muestran que las células aparecen fluorescentemente marcadas cuando son incubadas con el GFP-CT1, a diferencia de la

incubación con el NT-GFP que no fue capaz de interactuar con los componentes de la pared del lactobacilo. Una vez obtenido este resultado, se caracterizó qué carbohidratos, presentes en la pared de la bacteria, estaban participando en la interacción con el CT. Para ello, diferentes monómeros, disacáridos y polímeros se incubaron con el GFP-CT1 antes de ponerlo a interactuar con células de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 desprovistas de S-layer. La inhibición de la interacción se observó por microscopía de fluorescencia y se cuantificó midiendo la fluorescencia media relativa por citometría de flujo. Los datos obtenidos empleando concentraciones crecientes de los distintos carbohidratos se ajustaron a una curva de dosis-respuesta y se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para cada uno de ellos.

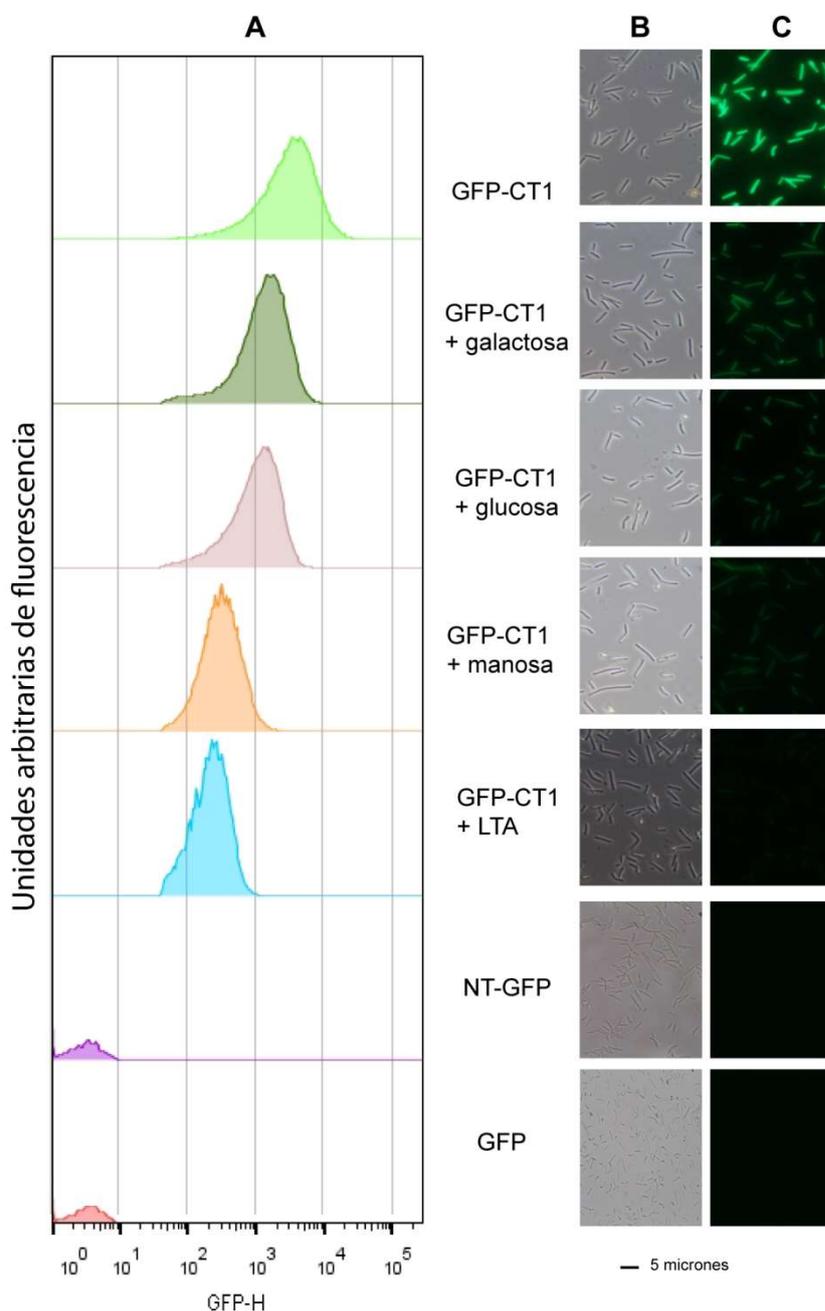


Figura 30 Interacción de GFP-CT1 y NT-GFP con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Las células fueron desprovistas de la S-layer por un tratamiento con LiCl y lavadas, luego se incubaron con 10 µg de GFP-CT1 o NT-GFP. La incubación del CT1 con los carbohidratos fue previa a la interacción con las células; la proteína GFP pura fue utilizada como control negativo. La inhibición de la interacción se evaluó mediante citometría de flujo (A) microscopía campo claro (B) y microscopía de fluorescencia (C). Aumento 1000X.

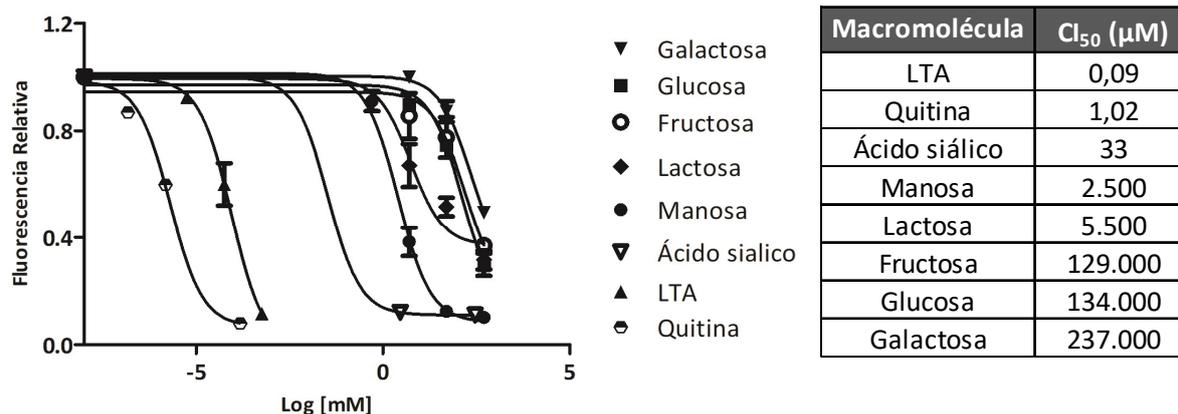


Figura 31 Inhibición de la interacción de GFP-CT1 con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 por carbohidratos. La fluorescencia media relativa fue cuantificada por citometría de flujo y se calculó la concentración inhibitoria (CI₅₀) ajustando los datos experimentales a una curva de dosis-respuesta para cada carbohidrato usando GraphPad Prism® 5 (Versión 5.01, Software GraphPad, Inc., EE. UU.).

En la Figura 30 se observa claramente que las células tratadas, con el GFP-CT1 previamente incubado con los distintos monosacáridos (galactosa, glucosa y D-manosa) y con el LTA, poseen una marcada disminución en la intensidad de fluorescencia de GFP, indicando que la interacción CT-células fue inhibida por los carbohidratos. En la Figura 31 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada molécula y las CI₅₀s que se calcularon a partir de las mismas. Para los compuestos poliméricos (LTA y quitina) se obtuvieron CI₅₀s del orden micromolar mientras que para los monómeros o carbohidratos diméricos fueron del orden milimolar.

Teniendo en cuenta la mayor afinidad por los polímeros con carga negativa como el LTA, también se evaluaron monosacáridos fosforilados (Figura 32), obteniéndose una CI₅₀ de 160 mM para la fructosa, 138 mM para la fructosa 6-fosfato y 214 mM para la fructosa 1,6-Bifosfato. Por lo que no se observaron diferencias que sugieran que al aumentar las cargas negativas en las moléculas de carbohidratos se aumente la interacción.

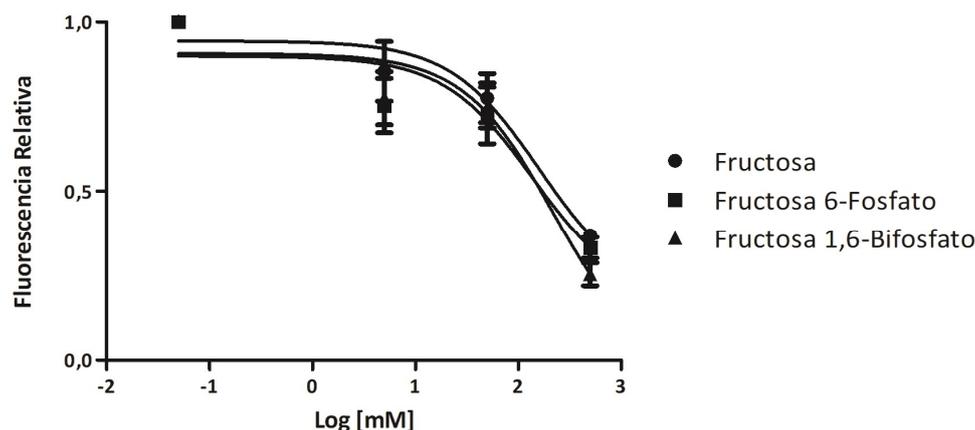


Figura 32 Inhibición de la interacción de GFP-CT1 con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 por carbohidratos fosfato. La fluorescencia media relativa fue cuantificada por citometría de flujo y se calculó la concentración inhibitoria (CI_{50}) ajustando los datos experimentales a una curva de dosis-respuesta para cada carbohidrato usando GraphPad Prism® 5 (Versión 5.01, Software GraphPad, Inc., EE. UU).

A continuación, se evaluó la capacidad de interacción del GFP-CT1 con otras bacterias lácticas que poseen S-layer como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefir* y *Lactobacillus brevis* al ser desprovistas de la S-layer por un tratamiento con LiCl, y con bacterias lácticas que no poseen S-layer como *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum*. En la Figura 33 se muestra la intensidad de fluorescencia relativa respecto a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (control) para cada microorganismo, obteniéndose una fluorescencia significativamente menor en todos los casos. Por otra parte, también se observó que el crecimiento previo de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en un medio con alto contenido de sal (0,6 M NaCl) disminuye la unión de la proteína GFP-CT1 al lactobacilo. Este resultado estaría indicando que, habría modificaciones en la pared celular en condiciones de alto contenido de sal que afectan la interacción de la S-layer a la célula, de manera similar a lo observado para *Lactobacillus casei* BL23 [23], [24]. Este tema será abordado con más detalle en el siguiente capítulo.

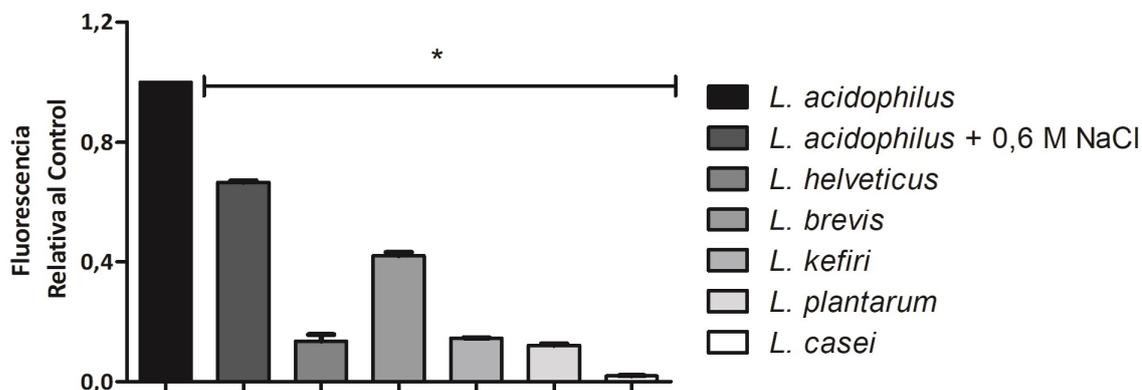


Figura 33 Interacción de GFP-CT1 con diferentes especies de *Lactobacillus*. Los lactobacilos S-layer fueron desprovistos de la S-layer por un tratamiento con LiCl 5 M y luego se incubaron con 10 µg de GFP-CT1. La unión fue analizada por citometría de flujo y la fluorescencia media relativa fue cuantificada. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Para identificar los componentes de la pared celular de *Lactobacillus acidophilus* a los cuales se une la S-layer, las bacterias se trataron de forma diferencial para verificar qué componente estaba involucrado en la interacción. Las bacterias fueron tratadas con tricloroacético (TCA) para eliminar los ácidos teicoicos unidos a la pared celular (WTA), con mutanolisina con el fin de eliminar el PG y WTA dejando el LTA, y por último se realizó un tratamiento con detergente (SDS) que permite eliminar el LTA.

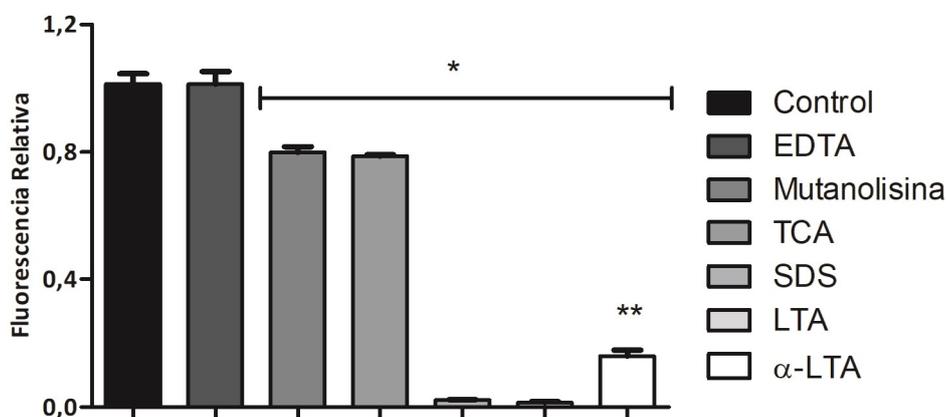


Figura 34 Interacción de GFP-CT1 con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 expuesto a distintos tratamientos. Los lactobacilos fueron desprovistos de la S-layer por un tratamiento con LiCl 5 M y tratados con mutanolisina, TCA o SDS. Luego por un lado se incubaron con 10 µg de GFP-CT1 y por otro lado células sin S-layer se incubaron 10 µg de GFP-CT1 en presencia de LTA o anticuerpos anti-LTA. La unión fue analizada por citometría de flujo y la fluorescencia media relativa fue cuantificada. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control sin tratar y el doble asterisco (**) denota diferencias significativas entre el tratamiento con α-LTA y LTA, usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

En la Figura 34 se presenta la fluorescencia relativa para cada tratamiento respecto de la obtenida en las células sin tratar. Si bien se obtuvieron diferencias significativas al tratar al lactobacilo con TCA o mutanolisina, se obtuvo una disminución mucho más drástica al tratar las células con SDS, lo que sugiere que el LTA es el componente principal con el cual interactúa la S-layer. Además, cuando se realizó el ensayo de inhibición con LTA purificados, la interacción del GFP-CT1 con la pared del lactobacilo fue casi nula. Por otro lado, cuando los LTA purificados fueron pre-incubados con un anticuerpo anti-LTA antes del ensayo de inhibición, aumentó la interacción entre la proteína y el lactobacilo, lo que indica una interacción específica entre el polímero LTA y la proteína GFP-CT1 en la superficie celular.

Cómo se demostró en las Figuras 23 y 24, la S-layer pura es capaz de interactuar con las células epiteliales HT-29 y Caco-2/TC7. Considerando que la superficie de las células eucariotas presenta polisacáridos y oligosacáridos unidos a proteínas y lípidos, es posible que la interacción de la S-layer con las células esté mediada por los dominios de reconocimiento a carbohidratos presentes en la porción carboxilo-terminal. Para demostrar esta hipótesis, células Caco-2/TC7 y HT29 se pusieron en contacto con 100 µg/ml de las construcciones quiméricas GFP-CT1 y NT-GFP durante 1h a 37°C, y luego se analizaron por microscopía de fluorescencia.

En las Figuras 35 y 36 se observa que las células que estuvieron en contacto con el GFP-CT1 presentan una fluorescencia verde intensa distribuida en la superficie celular. La diferencia en el patrón de fluorescencia, homogéneo respecto de puntillado, observado con el CT o la S-layer entera (Figuras 33 y 34), respectivamente, debe estar relacionado con la pérdida de la capacidad de autoensamblarse del CT, que permanece en solución. Por el contrario, en las células que estuvieron en contacto con el NT-GFP o la GFP sola no se observa fluorescencia positiva. Por lo tanto, para ambas líneas celulares se observó interacción con el dominio carboxilo terminal sugiriendo que los CRD estarían involucrados.

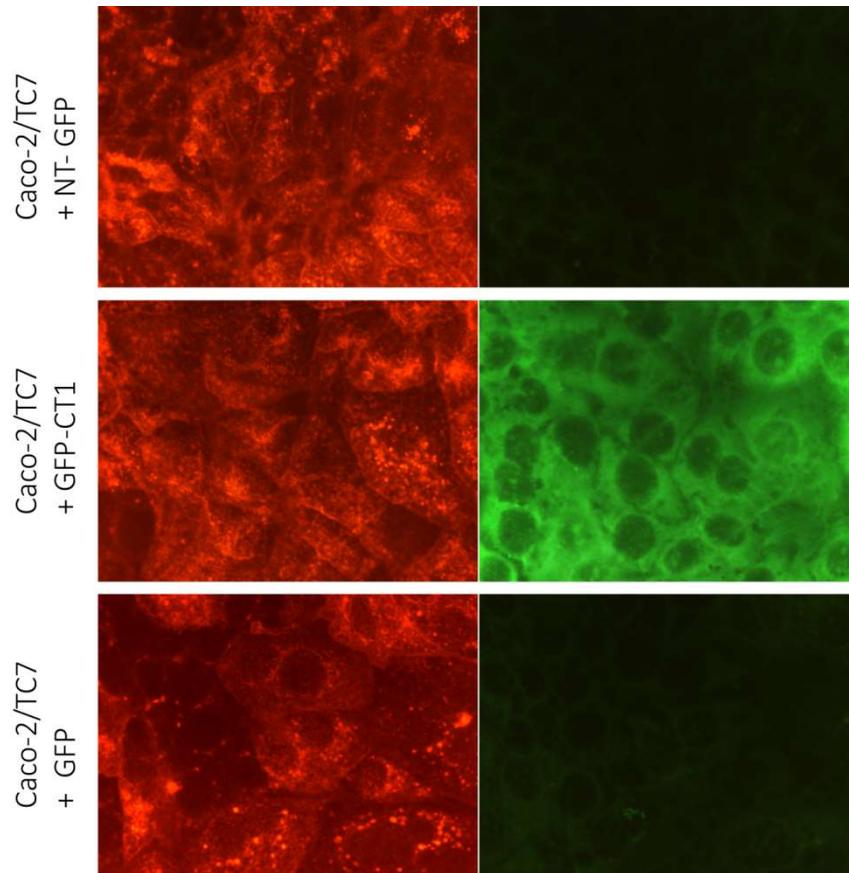


Figura 35 Interacción de las proteínas quimérica con células Caco-2/TC7. Monocapas de células Caco-2/TC7 crecidas 7 días sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NT-GFP o GFP-CT1. La GFP se utilizó como control negativo. Luego las células fueron fijadas con metanol y analizadas por microscopía de fluorescencia. La WGA (roja) se utilizó para delimitar los bordes celulares. Aumento 400X.

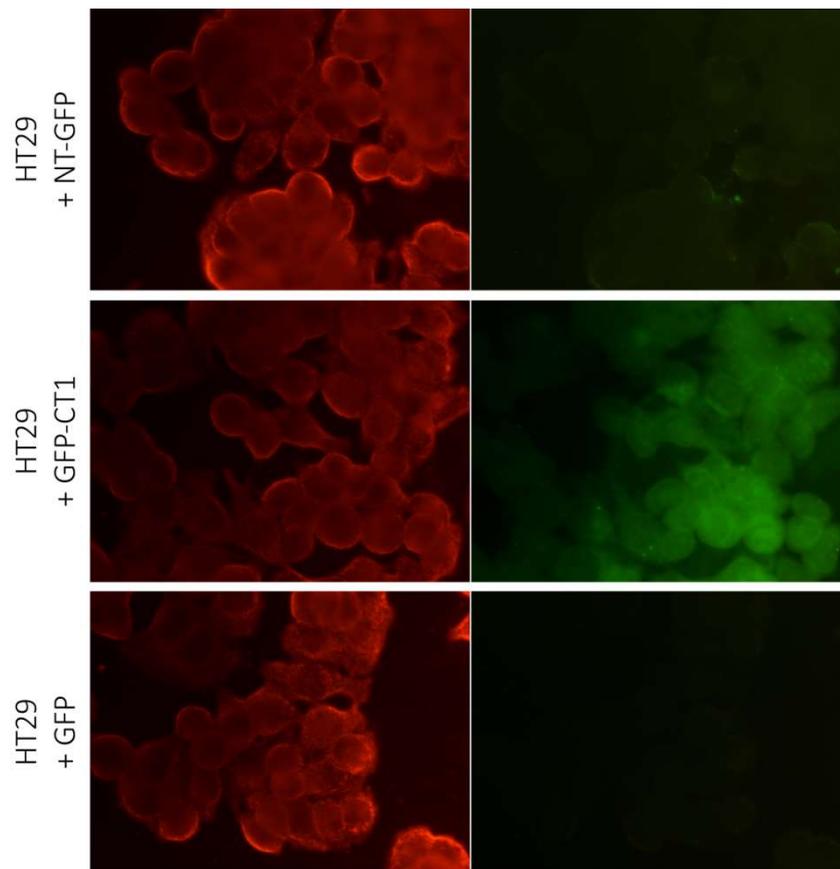


Figura 36 Interacción de las proteínas quimérica con células HT29. Monocapas de células HT29 crecidas 48 hs sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NT-GFP o GFP-CT1. La GFP se utilizó como control negativo. Luego las células fueron fijadas con metanol y analizadas por microscopía de fluorescencia. La WGA (roja) se utilizó para delimitar los bordes celulares. Aumento 400X.

En base a estos resultados, se pensó en otra forma de evaluar la participación de los CRD en la interacción con las células epiteliales, aprovechando el efecto de la D-manosa de antagonizar el comportamiento tipo lectina de la S-layer. En este caso, monocapas de células Caco-2/TC7 crecidas sobre cubreobjetos se fijaron con metanol y luego se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GFP-CT1 durante 1 h a 37°C en presencia o ausencia de 100 mM o 500 mM de D-manosa. Luego de varios lavados, las células se tiñeron con cristal violeta y se observaron al microscopio de fluorescencia. En la Figura 37 se observa que las células Caco-2/TC7 fijadas y luego incubadas con el GFP-CT1 tienen una intensa fluorescencia verde que se localiza mayoritariamente en el núcleo y los nucléolos. Esta distribución del GFP-CT1 diferente en las células fijadas en comparación con las vivas, muy probablemente se debe a que las células fijadas con metanol se permeabilizan. De esta forma, se permite el ingreso de la proteína

quimérica a la célula, dando lugar a una interacción en zonas con mayor densidad de estructuras glicosídicas. Los resultados obtenidos también muestran que la D-manosa fue capaz de inhibir la interacción del GFP-CT1, lo que indicaría que los CRD estarían involucrados en la interacción de la proteína con las células eucariotas fijadas. En el control con GFP sola no se observa interacción alguna.

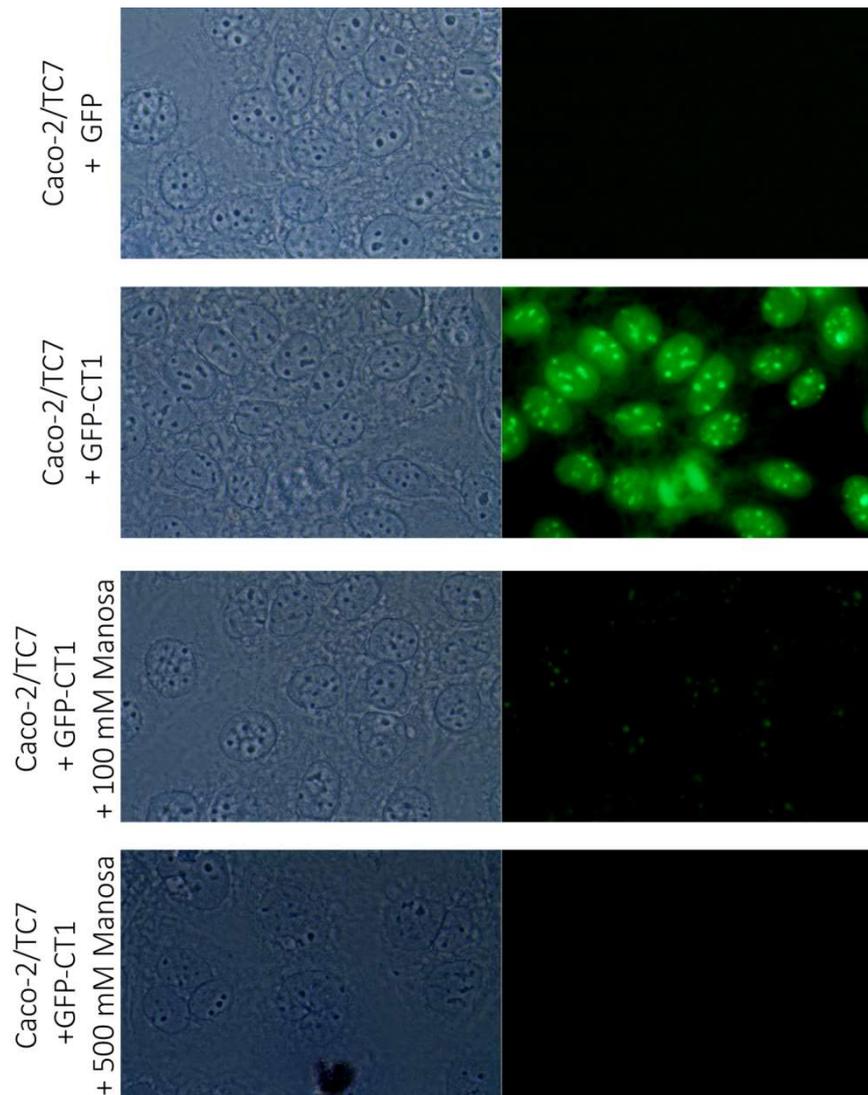


Figura 37 Inhibición de la interacción de GFP-CT1 con células epiteliales por D-manosa. Monocapas de células Caco-2/TC7 crecidas durante 7 días sobre vidrios en microplaca de 24 pocillos fueron fijadas y luego se incubaron con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GFP-CT1 en presencia o ausencia de D-manosa. La GFP se utilizó como control negativo. Luego las células fueron teñidas con cristal violeta y la interacción se analizó por microscopía de fluorescencia. Aumento 400X.

1.7. Modelado estructural del carboxilo terminal

El modelado bioinformático es un método alternativo para poder predecir la estructura del dominio carboxilo terminal e intentar identificar posibles sitios de unión a carbohidratos, aunque aún no haya sido resuelta una estructura 3D para la proteína S-layer de *Lactobacillus*. En colaboración con el grupo de bioinformática del IQIBICEN se construyó un modelo basado en homología utilizando como templado a la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, Atl (PDB id 4EPC), la cual es la principal mureína hidrolasa involucrada en la separación de celular y cuyas repeticiones son capaces de unirse al LTA como un ancla para el Atl [111].

El modelo estructural del carboxilo terminal se representa en la Figura 38 e incluye los residuos que son componentes del sitio de unión más probable a carbohidratos (FPocket Druggability Score de 0.768) [112].

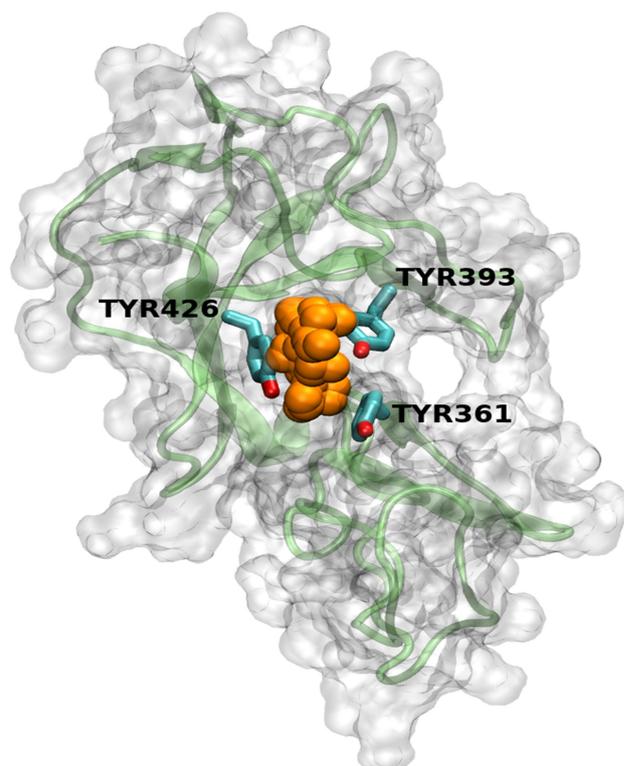


Figura 38 Modelo por homología del carboxilotermino de la proteína S-layer. Las tirosinas predichas para interactuar con el ligando están coloreadas por tipo de átomo (rojo, azul, cian y blanco para oxígeno, nitrógeno, carbono e hidrógeno, respectivamente). Los residuos que componen el bolsillo son: ASN351, **TYR361**, GLN362, VAL364, ALA390, TYR391, **TYR393**, GLN424, **TYR426**, TYR437, VAL438, LYS439 (en negrita se muestran tirosinas representadas en la Figura).

En la Figura 38 se representa el modelo obtenido para el carboxilo-terminal, en amarillo se muestra el *backbone* de la proteína, en rojo una representación de superficie, y en blanco el bolsillo que posee alta probabilidad de albergar al ligando. El volumen del bolsillo predicho es de aproximadamente 564 Å³, suficiente para albergar dos hexosas con volúmenes individuales de 216 Å³. Los residuos que componen el bolsillo son: ASN351, TYR361, GLN362, VAL364, ALA390, TYR391, TYR393, GLN424, TYR426, TYR437, VAL438, LYS439.

Del modelo estructural se predice que las tirosinas (TYR361, TYR391, TYR393, TYR426, TYR437) son las responsables de la interacción con los carbohidratos. Esto es concordante con el alineamiento del CRD propuesto descrito para GBP, ToxA, PCL y MBL (Figura 28). Con el fin de corroborar experimentalmente el modelo predicho, se realizó un ensayo de *quenching de fluorescencia* de las tirosinas de la proteína S-layer utilizando el mismo concepto descrito anteriormente. La secuencia primaria de la SlpA presenta 23 residuos tirosina de los cuales 14 están presentes en los 123 aminoácidos del dominio carboxilterminal. Para realizar este ensayo la proteína S-layer se puso en contacto con concentraciones crecientes de los siguientes carbohidratos: D-lactosa, ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico, D-manosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, D-glucosamina, D-glucosa, D-galactosa. En la Figura 39 se muestran espectros representativos las moléculas evaluadas. Con los espectros de emisión obtenidos se calculó una constante de disociación (Kd), lo que permitió realizar un análisis comparativo y determinar las afinidades para cada carbohidrato. Según las Kd estimadas el orden de afinidad de mayor a menor obtenido fue: D-lactosa (44 ± 5 mM), ácido siálico (51 ± 5 mM), D-manosa (58 ± 6 mM), L-fucosa (61 ± 6 mM), N-acetil-D-glucosamina (71 ± 7 mM), D-glucosamina (98 ± 10 mM), D-glucosa (106 ± 10 mM), D-galactosa (138 ± 11 mM).

El análisis empleando un hidrolizado de quitina muestra una drástica disminución de la fluorescencia (Figura 39 C), si bien, dada su condición de mezcla compleja de distintas longitudes de oligómeros de N-acetil-glucosamina (NAG) no fue posible calcular una concentración exacta, fue posible estimar un KD considerando los equivalentes de NAG obteniéndose un valor de $3,65 \pm 0,4$ μM para la quitina hidrolizada y $153,85 \pm 15$ μM para la quitina, considerando que el polímero está formado por 900 monómeros de NAG y tiene un peso molecular de 182.700 g/mol. Cuando se realizó el ensayo con

polímeros ramificados como el manano y dextrano, no se observaron diferencias en los espectros de fluorescencia.

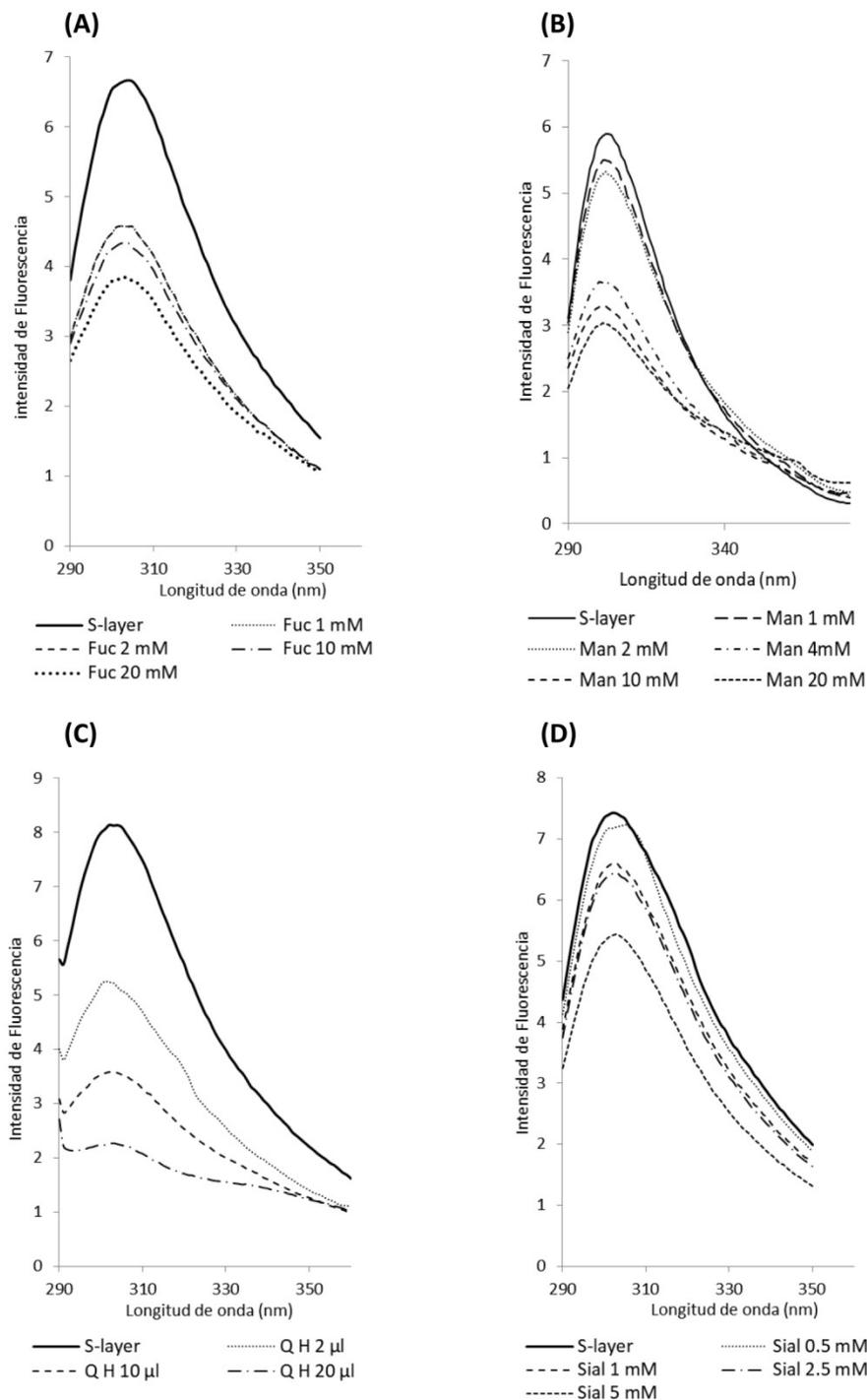


Figura 39 Espectros de emisión de fluorescencia de la S-layer. Una suspensión de S-layer se puso en contacto con concentraciones crecientes de (A) L-fucosa, (B) D-manosa (C) quitina hidrolizada, (D) ácido siálico, (E) D-glucosa, luego se registraron los espectros de emisión de fluorescencia, de 290 a 380 nm, con una longitud de onda de excitación de 275 nm y una de emisión a 305 nm.

1.8. Glicosilación de la proteína S-layer

Las proteínas S-layer de *Lactobacillus* generalmente se consideraron no glicosiladas sin embargo, se ha informado sobre la naturaleza glicoproteica de la S-layer de *Lactobacillus buchneri* 41021/251, CD034 y NRRL B-30929, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus plantarum* 41021/252 y varias cepas de *Lactobacillus kefir* [113].

La controversia surge para *Lactobacillus acidophilus* ya que Konstantinov y colaboradores [114] mediante experimentos tipo ELISA con lectinas específicas sugirieron que la proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus* NCFM presenta glicosilaciones. Sin embargo la tinción de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 utilizando reactivos que revelan glicosilaciones no fue completamente concluyente [48].

Para dilucidar esta diferencia, se realizó un lectin-Blot que es un método para obtener información básica sobre las estructuras de glicano, basándose en la especificidad de unión de las lectinas y se pueden analizar directamente sin liberarlo de las glicoproteínas. En la Figura 40 A se muestra el lectin-blot realizado para la SlpA revelando con concanavalina A (ConA), que es una lectina que reconoce glicosilaciones (glucosa y manosa) y en particular residuos de alta manosa. Se realizó el mismo ensayo pero adicionando dos inhibidores, metil α -D-manosido y metil α -D-glucósido Figura 40 B. Por otro lado la glicosilación de la SlpA fue evaluada mediante tinción de glicoproteínas (Figura 40 C).

Como puede observarse en la Figura 40 la SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es reconocida por ConA y esta interacción es inhibida parcialmente por metil α -D-manósido y metil α -D-glucósido, siendo también positiva la tinción lo que sugiere que la S-layer está glicosilada. Analizando la secuencia aminoacídica de la S-layer (Figura 41) se verifica que presenta nueve secuencias consenso (Asn-X-Ser/ Thr) características para N-glicosilaciones, 8 en el dominio amino-terminal y una en dominio carboxilo-terminal de la SlpA madura. Esto nos sugiere que la N-glicosilación no estaría involucrada en las interacciones con carbohidratos de la porción C-terminal.

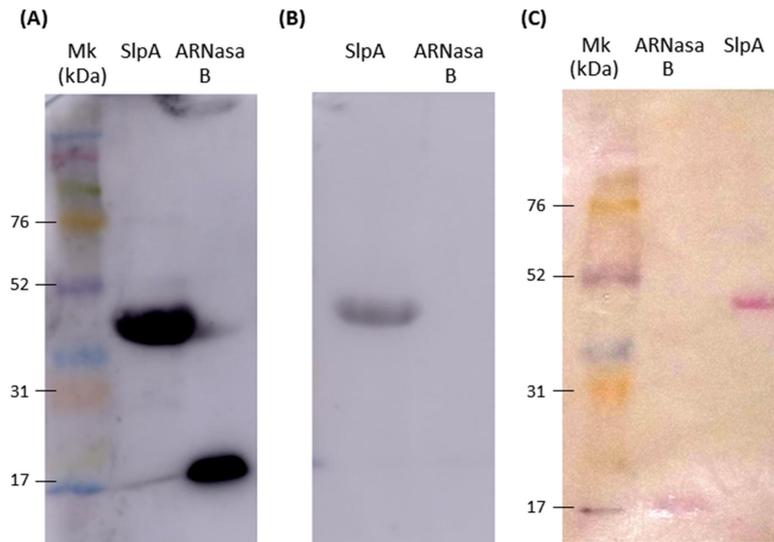


Figura 40 Glicosilación de la S-layer. La proteína S-layer pura fue corrida en un SDS-PAGE 12,5% seguido de una electrotransferencia a una membrana de PDVF y reveladas mediante diferentes métodos **(A)** ConA conjugada con biotina, **(B)** ConA conjugada a biotina e incubada junto con metil α -D-manosido y metil α -D-glucósido **(C)** tinción de glicoproteína. La ARNasa B fue utilizada como control positivo de glicosilación.

```

ATTINASSSAINTNTNAKYDVDVTPSVSAVAANTANNTPAIAGNLTGTI SASYNGKTYTANLKADTENATI
TAAGSTTAVKPAELAAGVAYTVTVNDVSNFNGSENAKGTVTLGSANSNVKFTGTNSDDNQTETNVSTLKVKL
DQNGVASLTTNVSIANVYAINTTDNSNVNFYDVTSGATVTNGAVSVNADNQGVNVANVVAAINSKYFAAQY
ADKKLNTRTANTEDAIKAALKDQKIDVNSVGYFKAPHTFTVAAGITLGMDELYKNVKATSNTNGKSATLPV
VVTVPNVAEPTVASVSKRIMHNAYYDKDAKRVGTDSVKRYNSVSVLPNTTTINGKTYQVVENGKAVDKY
INAANIDGTRKRTLKHNAVYVYASSKKRANKVVLKKGEEVTTYGASYTFKNGQKYYKIGDNTDKTYVKVANFR
    
```

Figura 41 Sitios posibles de glicosilaciones presentes en la secuencia aminoacídica. La SlpA presenta nueve secuencias consenso (Asn-X-Ser/Thr) señaladas en negrita y subrayadas para N-glicosilaciones. De las cuales ocho están en el extremo amino terminal (gris) y una en extremo carboxilo terminal (blanco)

1.9. Conclusiones parciales

En este capítulo se exploró el comportamiento tipo lectina de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* 4356. La proteína fue capaz de aglutinar eritrocitos de carnero, células de bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras, e interactuar con virus y células eucariotas.

Al analizar los posibles interactores se observó un comportamiento mixto respecto a su actividad del tipo lectina. Reconociendo polímeros como quitina con alta afinidad

pero también la unión probablemente es a través de los carbohidratos ácido siálico/manosa, presentes en oligómeros, polímeros y proteínas glicosiladas tanto de células eucarióticas como de procariotas. En tanto que el interactor natural de la SIpA en la pared celular del lactobacilo sería el LTA. Además, fue establecida la secuencia mínima de aminoácidos requerida para la interacción con carbohidratos y polímeros y se determinó que son necesarios los dos motivos repetidos, CRD, para que la interacción ocurra.

Por otro lado, fue confirmado que la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 está glicosilada como había sido demostrado para *Lactobacillus acidophilus* NCFM [114].

Capítulo 2: Influencia de la respuesta a estrés salino en la expresión génica y perfil proteico de las S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Los lactobacilos se enfrentan frecuentemente a distintas condiciones adversas o de estrés, en su hábitat natural, en los procesos industriales durante la producción de alimentos cuando son utilizadas como cultivos iniciadores o cepas probióticas y también a lo largo del pasaje por el tracto gastrointestinal.

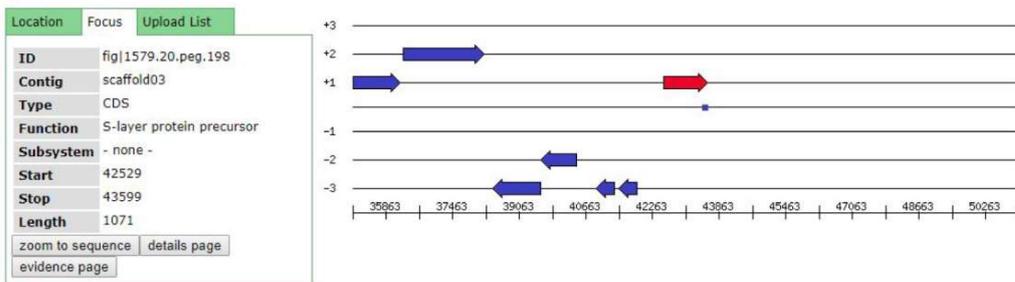
En sus variadas aplicaciones en la industria alimenticia, los lactobacilos pueden ser expuestos a estrés osmótico debido al agregado de sal y/o azúcar a los productos. Por ejemplo, durante la producción y maduración de quesos, fermentación de carne y en el proceso de elaboración del yogur. El estrés osmótico es una de las perturbaciones ambientales más adversas que puede causar una disminución en la tasa de crecimiento o la supervivencia y afectar las actividades metabólicas. Como se mencionó en la introducción existen diversos mecanismos descritos de adaptación al estrés osmótico en los lactobacilos.

En condiciones de estrés salino ha sido reportado en *Lactobacillus* un aumento en la síntesis de la S-layer, aumento en la actividad autolítica y mayor supervivencia luego de la liofilización [55], [56]. Visto las características de lectina descritas en el capítulo anterior que presenta implicancias en la actividad antimicrobina reportada para la proteína S-layer, nos propusimos investigar una condición de cultivo que favorezca su producción en las células. El objetivo de este capítulo es evaluar la influencia del estrés osmótico y de la fase de crecimiento, en el perfil génico y proteico de las proteínas S-layer.

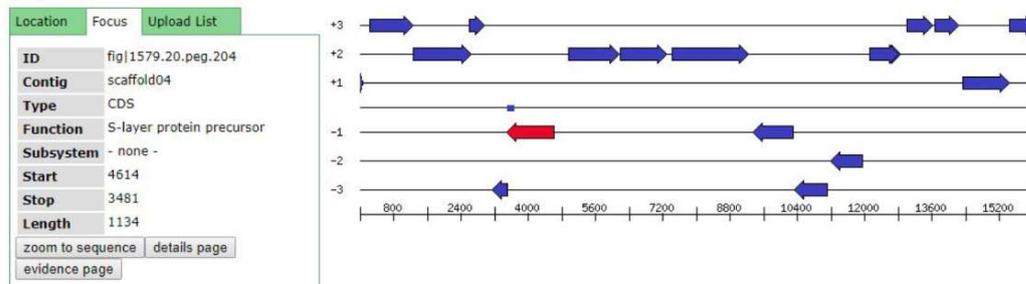
2.1. Organización genómica

A partir de la reciente secuenciación del genoma de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [44] se confirmó la presencia de tres genes codificantes de las proteínas S-layer en la cepa de estudio: *slpA*, *slpB* y *slpX*. Mientras que *slpA* y *slpB* se localizan en regiones cercanas del cromosoma, *slpX* se encuentra a unas 300 kpb, como se observa en la Figura 42.

(A)



(B)



(C)

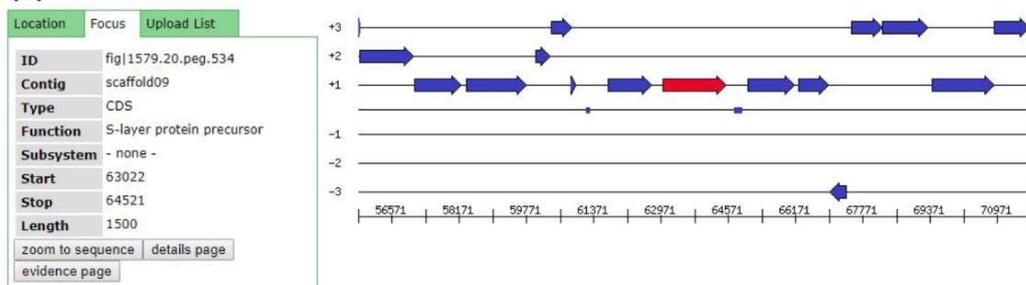


Figura 42 Organización genómica de los genes *slp* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Utilizando la base de datos RAST se analizó la disposición de los genes *slp*. Los genes *slpA* y *slpB* se encuentran en regiones cercanas en el cromosoma (A y B) mientras que *slpX* (C) se encuentra a 300 kpb de distancia.

Por otro lado se analizó la filogenia (Figura 43) y la sintenia (Figura 44) de los genes *slp* utilizando la herramienta informática Microbes.

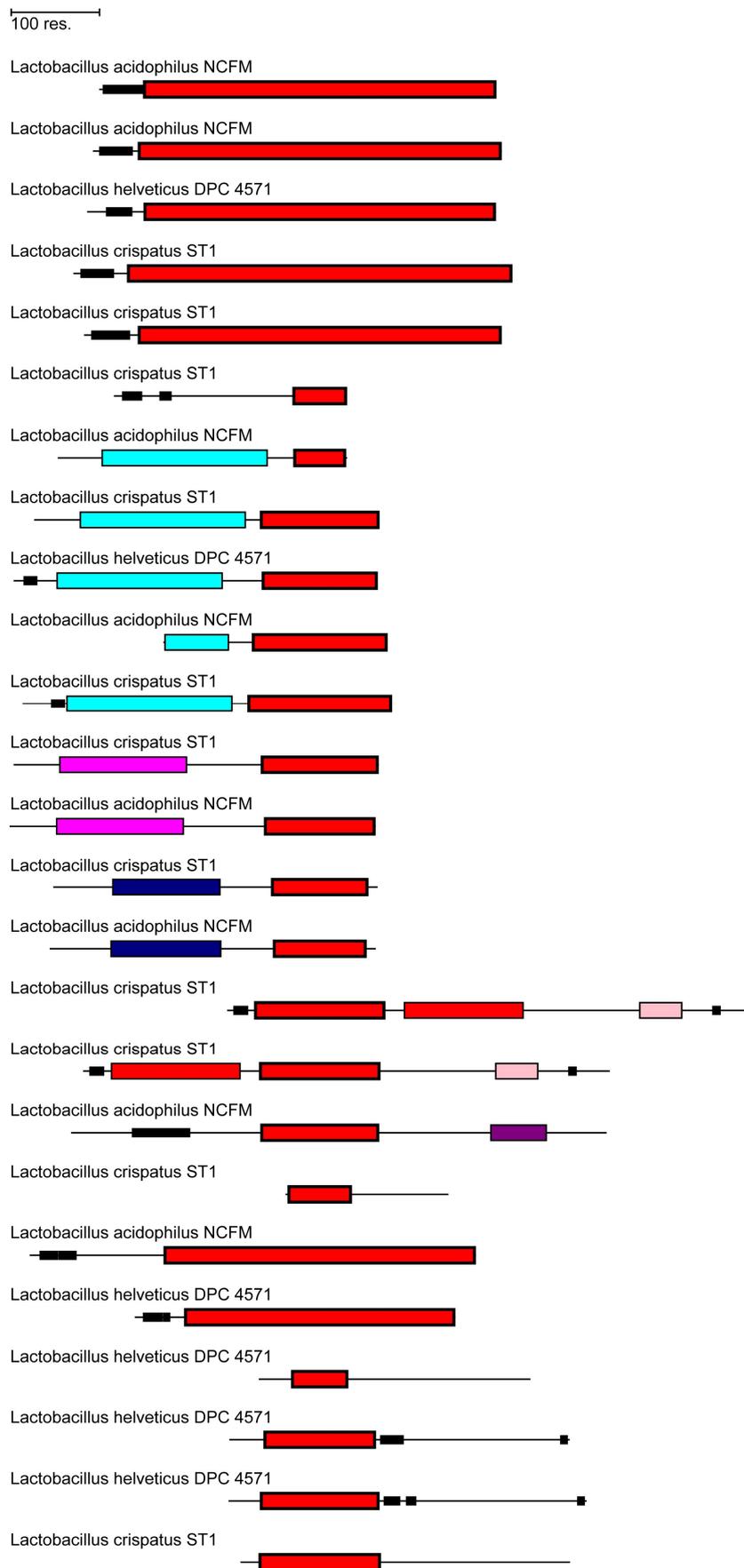


Figura 43 Filogenia de los genes *slp*. Utilizando la herramienta informática Microbes se analizó la filogenia. En rojo se muestran los genes que codifican para proteínas Slp en distintos *Lactobacillus*.



Figura 44 Sintenia de los genes *slp* en *Lactobacillus*. Utilizando la herramienta informática Microbes se analizó el contexto genético de los genes *slp* en *Lactobacillus*.

La sintenia se refiere a la conservación del orden de los genes a lo largo del genoma entre distintas especies mientras que la filogenia muestra las relaciones evolutivas entre las distintas especies. Como puede observarse en la Figura 43 y 44 los genes *slp* se encuentran conservados en varias especies de *Lactobacillus*.

2.2. Perfil génico y proteico de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*

ATCC 4356 en condiciones de alta concentración salina

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado la importancia de la composición de las envolturas celulares en la adaptación al estrés salino de varias especies y cepas de bacterias Gram positivas carentes de S-layer [23], [24], [37], [115], se decidió investigar la composición de la envoltura en condiciones de estrés salino en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Como antecedente ha sido reportado para *Lactobacillus acidophilus* NCFM que una mutante de *slpA* resultó osmosensible, siendo resistente a sales biliares, mientras que fue sensible al aumento de concentraciones de NaCl y etanol [116]; en *Lactobacillus acidophilus* IBB801 se observó que en condiciones de estrés salino por sales biliares al 0,05 % m/v o NaCl al 2% m/v se produjo un incremento en la síntesis de la S-layer [55]. Por ello, se decidió evaluar el perfil de expresión génica y proteica de las proteínas S-layer en condiciones de estrés salino en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. El estrés elegido fue el de alta concentración salina ya que, por ejemplo, en el proceso de maduración de quesos la concentración salina va desde 0,35 M (2% m/v) hasta 0,6 M (3,5% m/v) y es el momento en el que la participación de las bacterias lácticas en la determinación del sabor y el aroma del producto es fundamental [16], [17]. Además cuando los lactobacilos son utilizados como probióticos también son sometidos a un estrés osmótico, siendo la concentración equivalente de NaCl en el intestino de aproximadamente 0,03 M [117]. En condiciones alta salinidad las envolturas están involucradas en el mantenimiento de la presión de turgencia, y en el transporte intenso de osmolitos y homeostasis iónica [18], [118].

Para verificar la influencia de las proteínas S-layer en la capacidad de crecimiento en condiciones de alta sal, se comparó el crecimiento en un medio control (MRS) con la cepa sometida o no a un tratamiento con LiCl, utilizado para remover la S-layer. Esta estrategia ha sido utilizada para otras cepas de *Lactobacillus acidophilus* para verificar la influencia de las propiedades de superficie en la capacidad de adhesión y la supervivencia a las condiciones del jugo gástrico [53]. Al tratar las células con LiCl no se redujo la viabilidad, dado que los recuentos de viables no se modifican. Sin embargo, en las células tratadas con LiCl se observan defectos de crecimiento al aumentar la concentración de sal (Figura 45). La eliminación de la S-layer provoca un retraso en el crecimiento, incluso en ausencia del estrés salino. El retraso del crecimiento se

correlaciona con el período de recuperación de la síntesis para reponer la S-layer extraída [Tesis doctoral Prado Acosta, 2010, [119]].

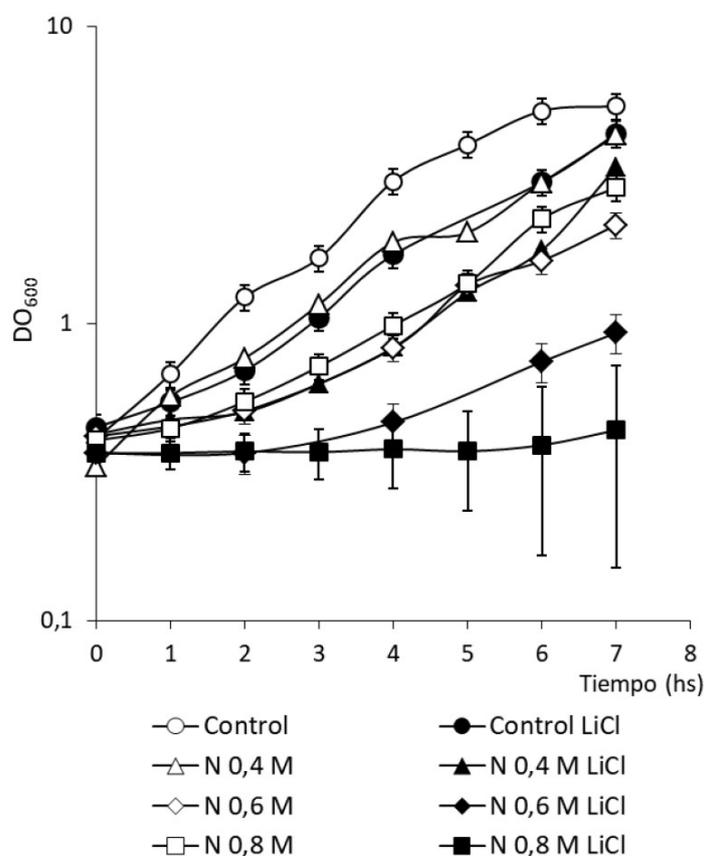


Figura 45 Curvas de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con (símbolos vacíos) y sin (símbolos rellenos) S-layer fue crecido en un medio sin agregado de sal (control) y en un medio conteniendo alta concentración salina (N 0,4; 0,6 o 0,8 M de NaCl). Las barras de error representan errores estándar de tres experimentos independientes.

La presencia de múltiples genes que codifican proteínas S-layer en una misma cepa es una característica común en los lactobacilos. El requisito estricto de la S-layer para el crecimiento en condiciones normales ha sido investigado por Goh y colaboradores [120], que si bien obtuvieron mutantes *slp* en la cepa NCFM de *Lactobacillus acidophilus*, la ausencia de un gen *slp* se compensó con la sobreexpresión de otro gen *slp* que no suele expresarse. Estos resultados sustentan la afirmación de Hynönen y Palva (2013), basada en sus resultados no publicados, sobre la dificultad o la imposibilidad de crear mutantes de *Lactobacillus* completamente negativos para las proteínas S-layer, lo que indica que al menos la presencia de un gen funcional de las proteínas S-layer es esencial para el crecimiento de los lactobacilos portadores de

genes *slp*. Por lo tanto, dado que las mutantes dobles probablemente no son viables [42], los resultados de la Figura 45 sugieren que las S-layer serían esenciales para la osmoadaptación de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

A continuación, para continuar con el análisis de la expresión proteica se evaluaron extractos totales de células enteras en condiciones de crecimiento control y de alta sal, en dos estadios de crecimiento, fase exponencial y fase estacionaria, mediante una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) (Figura 46).

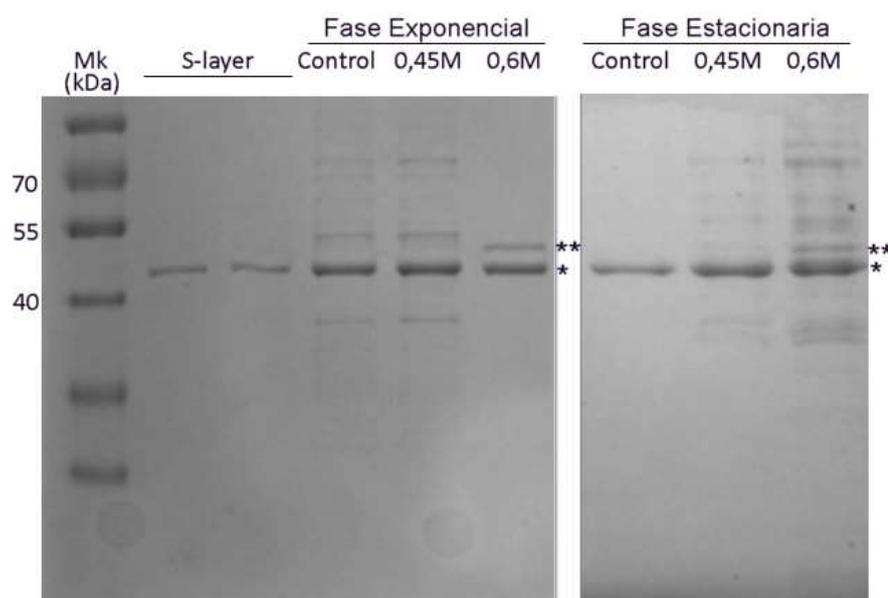


Figura 46 Perfil proteico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Extractos proteicos totales de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecido en condiciones de estrés salino (0,45 y 0,6 M de NaCl) o control evaluados en dos estadios de crecimiento, exponencial y estacionaria, se separaron en un gel 12,5 % SDS-PAGE y luego se tiñeron con coomassie blue. El asterisco (*) muestra la proteína predominante de 45 kDa y el doble asterisco (**) muestra una proteína de 49 kDa.

En la Figura 46 puede observarse que en condiciones de crecimiento control (crecimiento en MRS sin agregado de sal), tanto en la fase de crecimiento exponencial como estacionaria, la proteína predominante se corresponde con un peso molecular de movilidad electroforética estimado de 45 kDa. No obstante, cuando se evaluaron las mismas fases de crecimiento pero en condiciones de alta concentración salina (MRS con 0,45 M o 0,6 M de NaCl) se observó un incremento en una banda con un peso molecular estimado de 49 kDa, la identidad inmunológica de ambas bandas de proteínas se verificó mediante detección con anticuerpos contra SlpA por Western blot

(Figura 47 A). Asimismo, en concordancia con el trabajo reportado por Prado Acosta (2008), ambas proteínas demostraron una actividad mureína hidrolasa (Figura 47 B).

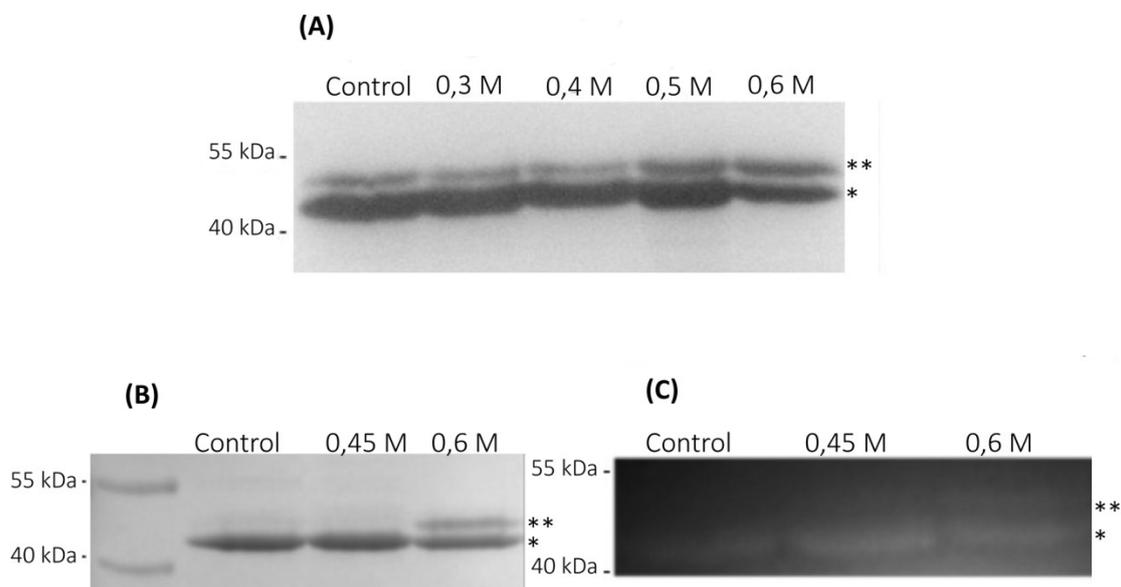


Figura 47 Perfil proteico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Extractos proteicos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecidos hasta una fase estacionaria en condiciones de estrés salino 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M y 0,6 M de NaCl, se separaron analizaron por western blot (A) con anticuerpo policlonal anti S-layer. Además se analizó la actividad mureína hidrolasa por zimograma, tinción con coomassie blue (B) y zimograma (C). El doble asterisco (**) y el asterisco (*) señalan a la proteína de 49 y 45 kDa, respectivamente.

Por lo tanto, se verificó que ocurre un cambio en el patrón proteico de las S-layers cuando la bacteria es expuesta a una condición de estrés salino por NaCl, observándose que a una concentración de 0,6 M de NaCl la proporción de la proteína de 45 kDa fue aproximadamente de un 60%, mientras que la de 49 kDa aumentó al 40% (Figura 47).

En estudios previos, Ramiah y colaboradores [121] observaron que cuando se cultiva a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 en condiciones que simulan el tracto gastrointestinal (TGI) se produce un aumento en la expresión del gen *slpA*. Sin embargo, esos experimentos se realizaron analizando la fase de crecimiento exponencial, donde las células están en un crecimiento activo, una condición que no se encontraría en el TGI, donde se espera que la división celular sea baja y se asemeja más a un estado de fase estacionaria de crecimiento. Por lo tanto, cuando se analiza la biosíntesis de componentes de la envoltura, que se produce principalmente durante la división celular,

se deben evaluar tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria de crecimiento para poder extrapolar lo que ocurre en el entorno del TGI.

Por otra parte, una posible explicación a la diferencia de tamaño entre las proteínas observadas en las Figuras 39 y 40 podría ser por un procesamiento diferencial del péptido señal en condiciones de alta sal. La proteína S-layer se transloca a través de la membrana al medio extracelular mediante un péptido señal de 31 aminoácidos, que se escinde, dando como resultado una diferencia de aproximadamente 3 kDa [38] en la proteína S-layer madura; entonces en una condición de estrés salino podría ocurrir una reducción en el procesamiento del péptido señal presente en el amino terminal de la proteína SlpA .

Para evaluar esta hipótesis, se decidió secuenciar el extremo amino terminal de las dos proteínas a través del servicio del LANAIS-PRO, por el método de degradación de Edman. Obteniéndose que el amino-terminal de la proteína de movilidad 45 kDa se precesa resultando en una proteína madura de 413 aminoácidos y que comienza con la secuencia ATTINA, posee una carga positiva (pI 9,49) y es insoluble en solución acuosa por interacción entre monómeros tal como se ha descrito para otras S-layer [49]. Al realizar un análisis de la proteína utilizando la herramienta informática Protparam (web.expasy.org/protparam/) se obtuvo que la proteína madura posee un peso molecular de 43,63 kDa. No fue posible la secuenciación del amino terminal de la proteína de movilidad 49 kDa dado que no se encontraba accesible a la reacción el primer aminoácido, por alguna modificación no caracterizada.

Por lo tanto, se decidió analizar ambas proteínas por espectrometría de masas a través del servicio del CEQUIBIEM-FCEN (MALDI TOF/ TOF). Para poder realizar este análisis es necesario primero hidrolizar con tripsina las bandas proteicas, extraídas de un gel de SDS-PAGE, para luego ser analizadas por espectrometría de masa y poder así determinar la relación carga/masa de los péptidos obtenidos. Luego, por una búsqueda en la base de datos Mascot (Matrix Science, Boston, MA, USA; <http://www.matrixscience.com/search-form-select.html>) y comparación con los péptidos obtenidos por una digestión con tripsina *in silico*, se identifican las proteínas analizadas. En este caso, pudo identificarse a la proteína predominante de movilidad 45 kDa como SlpA y a la proteína auxiliar de 49 kDa como SlpX. En las Tablas 7 y 8 se muestran los péptidos analizados de cada banda extraída de un gel SDS-PAGE 12,5%.

51 KDa	gi 523548846 SlpX (precursor 499 aa) ; SlpX [<i>Lactobacillus acidophilus</i> CIRM-BIA 442]						
N	m/z	m/z	Modificaci ones	Inicio	Fin	Missed	Secuencia
	(mi)	(av)				Cleavages	
1	809,404	809,8996		140	146	0	(K) AYEAIK(V)
1	986,5306	987,1505		409	416	1	(K) TYYKVANK(D)
1	1002,5327	1003,1095		422	430	0	(R) VTNITGNQR(T)
1	1010,5088	1011,195		446	454	1	(R) TPGTGKMYR(G)
1	1017,5404	1018,2079		486	493	1	(R) YIKAVNFY(-)
1	1026,5037	1027,1943	Oxidación	446	454	1	(R)TPGTGKMYR(G)
1	1062,6041	1063,2437		86	95	0	(K) VSDLISTISK(A)
1	1067,519	1068,2442		369	377	0	(K) TYPVMVDSR(A)
1	1083,5139	1084,2436	Oxidación	369	377	0	(K)TYPVMVDSR(A)
1	1093,5636	1094,2197		413	421	1	(K) VANKDEYVR(V)
1	1104,5215	1105,2248		476	484	1	(R)(Carbamidomethyl)RNNNK(R)
1	1116,5255	1117,2793		473	480	1	(K) YYRIEGC(Carbamidomethyl)R(N)
1	1141,5735	1142,2585		76	85	1	(R) TTISFKSDDK(V)
1	1144,5957	1145,2651		130	139	1	(K) TVQPSNKNEK(A)
1	1180,5844	1181,2954		137	146	1	(K) NEKAYEAIK(V)
1	1247,6015	1248,3458		344	354	0	(K) NDANSSNIWVK(T)
1	1308,6794	1309,4706		329	341	0	(K) TVGGVSYQVSPK(S)
1	1310,6409	1311,5086		455	466	0	(R) GQTVTTYGPQMK(F)
1	1326,6358	1327,5079	Oxidación	455	466	0	(R)GQTVTTYGPQMK(F)
1	1344,7594	1345,5508		422	433	1	(R) VTNITGNQRTLK(H)
1	1354,6121	1355,4091		317	328	0	(K) DGDQVYVSDQTK(T)
1	1400,7744	1401,6125		355	368	0	(K) TSALVKPAGDTNVK(T)
1	1442,7962	1443,653		123	136	1	(K) ANGVTVKTVQPSNK(N)
1	1459,6753	1460,6014		434	444	0	(K) HNAYIWSSYR(R)
1	1462,7285	1463,5996		342	354	1	(K) SKNDANSSNIWVK(T)
1	1502,7485	1503,6619		259	272	0	(R) YYNVTLTATGNTGK(K)
1	1507,785	1508,6758		82	95	1	(K) SDDKVSDDLITISK(A)
1	1513,8108	1514,7263		274	287	0	(K) TTATYTVLITSSQK(Q)
1	1523,8064	1524,7245		329	343	1	(K) TVGGVSYQVSPKSK(N)
1	1544,7414	1545,7651		369	381	1	(K) TYPVMVDSRAYDK(N)
1	1560,7363	1561,7645	1Oxidation	369	381	1	(K)TYPVMVDSRAYDK(N)
1	1585,8043	1586,8616		455	468	1	(R) GQTVTTYGPQMKFK(N)
1	1601,7992	1602,861	1Oxidation	455	468	1	(R)GQTVTTYGPQMKFK(N)
1	1615,7764	1616,79		434	445	1	(K) HNAYIWSSYRR(T)
1	1630,8435	1631,8371		259	273	1	(R) YYNVTLTATGNTGKK(T)
1	1641,9058	1642,9015		273	287	1	(K) KTTATYTVLITSSQK(Q)
1	1664,8351	1665,8141		417	430	1	(K) DEYVRVTNITGNQR(T)
1	1760,8458	1762,0722		452	466	1	(K) MYRGQTVTTYGPQMK(F)
1	1772,9905	1774,083		86	101	1	(K) VSDLISTISKAVQFHK(N)
1	1776,8408	1778,0716	1Oxidación	452	466	1	(K)MYRGQTVTTYGPQMK(F)
1	1792,8357	1794,071	2 Oxidación	452	466	1	(K)MYRGQTVTTYGPQMK(F)
1	1801,902	1803,0428		431	444	1	(R) TLKHNAIYWSSYR(R)
1	2281,0691	2282,4		237	258	0	(K) NNTTFASIEATSNPVTSEAGR(Y)
1	2321,1004	2322,4652		102	122	0	(K) NNSASGENVTINENDFINQLK(A)
1	2449,2755	2450,834		355	377	1	(K) TSALVKPAGDTNVKTYPVMVDSR(A)
1	2465,2705	2466,8333	1 Oxidación	355	377	1	(K)TSALVKPAGDTNVKTYPVMVDSR(A)
1	2629,358	2630,9355		344	368	1	(K) NDANSSNIWVKTSALVKPAGDTNVK(T)

1	2644,2737	2645,857		317	341	1	(K) DGDQVYVSDQTKTVGGVSYSQVSPK(S)
1	2990,4814	2992,2489		102	129	1	(K) NNSASGENVTINENDFINQLKANGVTVK(T)
1	3031,4868	3033,3045		96	122	1	(K) AVQFHKNNSASGENVTINENDFINQLK(A)
1	3044,4822	3046,4499		382	408	0	(K) NGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGK(T)
1	3060,4771	3062,4493	1 Oxidación	382	408	0	(K)NGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGK(T)
1	3142,4851	3144,3964	1Gln- >pyro-Glu	288	316	0	(K)QTLYNGGESTISTYSIYGNNVLSNSTTFK(D)
1	3159,5117	3161,4271		288	316	0	(K) QTLYNGGESTISTYSIYGNNVLSNSTTFK(D)
1	3521,7046	3523,9708		378	408	1	(R) AYDKNGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGK(T)
1	3537,6995	3539,9701	1 Oxidación	378	408	1	(R)AYDKNGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGK(T)
1	3599,7515	3602,0853		382	412	1	(K) NGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGKTYK(V)
1	3615,7464	3618,0846	1 Oxidación	382	412	1	(K)NGNYLGHMYAYDNIDIVPTVVTINGKTYK(V)
1	3764,7998	3767,0391		237	272	1	(K) NNTTFASIEATSNPVNTSEAGRYYNVTLTATGNTGK(K)

Tabla 7 Identificación de los péptidos por espectrometría de masas.

46 KDa P35829 SlpA (precursor 444 aa) SlpA [<i>Lactobacillus acidophilus</i> (strain ATCC 700396 / NCK56 / N2 / NCFM)]							
Número	m/z	m/z	Modificaciones	Inicio	Fin	Missed	Secuencia
	(mi)	(av)				Cleavages	
1	799,3832	799,8608		46	53	0	(L) TGTISASY(N)
1	963,4742	964,0259		103	112	0	(F) GSENAKTVT(-)
1	981,4888	982,0846		92	100	0	(Y) TVTVNDVSF(N)
1	981,5	982,0876		54	62	1	(Y) NGKTYTANL(K)
1	1224,5855	1225,3083		101	112	1	(F) NFGSENAKTVT(-)
1	1242,6001	1243,3669		92	102	1	(Y) TVTVNDVSFNF(G)
1	1362,6536	1363,4756		46	58	1	(L) TGTISASYNGKTY(T)
	1513,7533	1514,6854		86	100	1	(L) AAGVAYTVTVNDVSF(N)
1	1941,9512	1943,0901		1	19	0	(-) ATTINASSAINTNTNAKY(D)
1	1983,9618	1985,1277	1Acetyl	1	19	0	(-)ATTINASSAINTNTNAKY(D)
1	2260,1667	2261,5063		63	85	0	(L) KADTENATITAAGSTTAVKPAEL(A)
1	3262,6074	3264,5491		20	53	1	(Y) DVDVTPSVSAVAANTANNTPAIAGNLTGTISASY(N)

Tabla 8 Identificación de los péptidos por espectrometría de masas.

A continuación en la Figura 48 se muestra el alineamiento de las secuencias proteicas de SlpX y SlpA, utilizando la herramienta bioinformática Clustal-O, resaltado en verde y amarillo respectivamente los péptidos obtenidos del análisis por MALDI TOF/TOF que coinciden con los obtenidos por un análisis *in silico*.

SlpX	MKKNRKMGLAAATLLAVAPVATSVVPVQADTAVNVGSAAGTGANTTTNTTQAPQNKPYF	60
SlpA	MKKNLRIVSAAAAALLAVAPVAASAVSTVSAATTINASSAINTNTNAKYD--VDVTPSV	58
	**** : : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SlpX	TYNNEIIGEATQSNPLGNVVRTTISFKSDDKVS DLI STISKAVQFHK NNSASGENVTINE	120
SlpA	----SAVAANTANNT-----PA-IAGNLTGTI SASYNGKTYTANLKADTENATITA	104
	. * . : : : * : : . : * :	
SlpX	NDFINQLK ANGVIVKTVQPSNKNKA YEAIKVPST SFNITLSATGDNNQTATIQIPMVP	180
SlpA	AGSTTA--V--KPAELAAG-----VAYTVT-VNDVSV FNFGSENAG --- KIVTLLGSANSN	150
	: . : : : * : : : * : : * : *	
SlpX	---QGA-----STPTDTTQNPQINWTKGGQAQSSSLNGQVFQVA--VGSNFMPLN	225
SlpA	VKFTGTNSD-----NQTEINVTSLKVKLDQNGVASLTN--VSIANVYAINTTDNSNVN	201
	* . : : : : * : . . : : * : : : *	
SlpX	FTN-----SNGENIIVSAQQSK NNTFASIEATSNPVNTSEAGRY YNVTLTATGNTGK	278
SlpA	FYDVTSGATVINGAVSVNADNQGQVNV--ANV---VAA----INSKYFAAQYADK-----	247
	* : * : * : : : * : . : : * : : *	
SlpX	KITATYIVLITSSQK QTLYNGESTI STYSIYGNMVLNSNSTIFK DGDQVYVSDQTI IVGG	338
SlpA	KLNT-----R---TANTEDAI-----KAAL KDQKIDVNS	273
	: : : . * : : : . : * . * .	
SlpX	VSYSQVS-----PKSKNDANSSNIWVK---TSALVKPAGDTNVK IYPVMVDSRAYD	386
SlpA	VGYFKAPHT FTVNVKATSNITNGKSATLPVVVTVPNV---AEP-TVASVSKRIMHNAYYYD	329
	. * . * . : : : : * . . : : * : : * *	
SlpX	KNGNYLGH - MYAYDNIDIVPTVVTINGK IYYK VAN ---- KDEYVRV TNITGNQRTLKHN	441
SlpA	KDAKRVTGDSVKRY NSVSVLPNTTTINGKTY YQVVENGKAVDKYINAANIDGT KRILKHN	389
	* : : : * * : : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
SlpX	AYIYWSSY RRTPGTGKMYRGQVTITYGPQMKFRKNGKYYRIEGCRNNNKRYIKAVNFI	499
SlpA	AYVYASSK KRAN- KVVLKKG EVVTIYGASYTF KNGQKYYKI GD-- NTDKTYVKVANER	444
	** : * * * : * : . : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura 48 Alineamiento de secuencias. Utilizando la herramienta bioinformática Clustal-O se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas de SlpX y SlpA. Resaltado en verde y amarillo se muestran los péptidos obtenidos del análisis por MALDI TOF/TOF que coinciden con los obtenidos por un análisis *in silico* para SlpX y SlpA respectivamente.

En conjunto todos estos resultados permiten concluir que se produce un cambio en el perfil proteico de las proteínas de superficie por crecimiento en alta sal y se descarta la hipótesis original de reducción del procesamiento del péptido señal.

2.3. Análisis de expresión génica

Para verificar si el cambio del perfil proteico se correlaciona con un cambio en la expresión génica se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), pero primero fue necesario el diseño de cebadores específicos que permitieran distinguir entre los 3 genes que tienen alta similitud. Para ello, utilizando la herramienta informática Clustal O (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), se realizó un alineamiento de las secuencias proteicas de SlpA, SlpB y SlpX, observándose que existe una diferencia en el número de aminoácidos (aa) total de cada proteína; SlpA posee 444 aa, SlpB 456 aa

y 499 aa SlpX (Figura 49). Del análisis se definieron secuencias diferenciales para las tres proteínas y se diseñaron pares de cebadores para qPCR que identifican a cada uno de los tres genes cómo se detalla en la Tabla 3 de materiales y métodos.

SlpX	MKKNRKMGLAAATLLAVAPVATSVVPVQADTAVNVGSAAGTGANTTNTTTQAPQNKPYF	60
SlpA	MKKNLRF IVSAAAAALLAVAPVAASAVSTVSAATTINASS SAINT INTNAKYD--VDVTPSV	58
SlpB	MKKNLRIVSAA-AALLAVAPVAASAVSTVNAAAVNAIIVGGSATPLPNNSD--VQISSSV	57
	**** : : . * * :*****:.* . : : . : . : . : . .	
SlpX	TYNNEIIGEATQSNPLGNVVRTTISFKSDDKVS DLISTISKAVQFHKNNSASGENVTINE	120
SlpA	----SAVAANTANNT-----PA-IAGNLGTI SASYNGKTYTANLKADTENATITA	104
SlpB	-----AGVTTKNGS-----SY-TNGRISGSINASYNGTSY SANFSSSNAGVVVST	101
	. * . . : : * : . : : *	
SlpX	NDFINQLKANGVTVKTQVPSNKNKAYEAIKVPSTSFNITLSATGDN NOTATT QIPMVP	180
SlpA	AGSTTA---V--KPAELAAG-----VAYTVT-VNDVSFNFGSENAG---KTVTLGSANSN	150
SlpB	PGHTEI ---SGEQINGLEPG-----SAVTVTLRDGVSFNFGSTNAN---KTITLAFPKNV	150
	: . : : .***: : : * * :	
SlpX	---QGA-----STPTDITQNPQINWTKGGQAQSSSL NGQVE QVA--VGSNFNPLN	225
SlpA	VKFTGTNSD-----NQTE TNVSTLKVKLDQNGVASLTN--VSIANVYAINTTDNSNVN	201
SlpB	-SAAGLADA NKVSAT SETSVDAGKTIQVKTDKNGVVVSGS--AQVLNVKVVETS DVRAVS	207
	* . . . : : : * . . . : : * : : : . .	
SlpX	FTN-----SNGENIIVSAQQSKNNTTFASIEATSNPVNTSEAGRYNVTLTATGNTGK	278
SlpA	FYDVTSGATVTNGAVSVNADNQQVNV--ANV---VAA----INSKYFAAQYADK-----	247
SlpB	FYDIQTGKTVENGTLSIVAGSNARANV--QEI---VNA----FNAKYQASQLNNA-----	253
	* : * * : : : : * . . : : * :	
SlpX	KTATYTVLITSSQKQTLYNGGESTISTYSIYGNVLSNSTTFKDGQVYVSDQTKTVGG	338
SlpA	KLNT-----R--TANTEDAI-----KAALKDQKIDVNS	273
SlpB	NSNA-----NVRLTDNNAQAV-----ATMLRAQNIDVDA	282
	: : . : * : : : . : : * . * .	
SlpX	VSYSQVS-----PKSKNDANSSNIWVK----TSALVKPAGDTNVKTYPVMVDSRAYD	386
SlpA	VGYFKAPHTFTVNVKATSNTNGKSATLPVVVTVPNV---AEP-TVASVSKRIMHNAYYYD	329
SlpB	QGYFTAPASLSLTFHAESTQNNETAQLPVTVSVTNGKEVTPS-TVDSVSKSFMHNAYYYD	341
	. * . * . : : : : * . . : : * : : *	
SlpX	KNGNYLGH-MYYAYDNIDIVPTVVTINGKTYKVAN----KDEYVRVTNITGNQRTLKHN	441
SlpA	KDAKRVTDSVKRYNSVSVLPNTTTINGKTYQVVENGKAVDKYINAANIDGKRTLKHN	389
SlpB	KDAKRVTDSVKRYNSVSVLPNTTTINGKAYYQVVENGKAVDKYINAANIDGKRTLKHN	401
	* : : : * * : : : : * . * * * : : * : : * * : : * * * * *	
SlpX	AYIYWSSYRRTPGTGKMYRGQTVTTYGPQMKFKNGKYYRIEGCRNNNKRYIKAVNFY	499
SlpA	AYVYASSKKRAN-KVVLKKGEVVTTYGASYTFKNGQKYYKIGD--NTDKTYVKVANFR	444
SlpB	AYVYASSKKRAN-KVVLKKGEVVTTYGASYTFKNGQKYYKIGD--NTDKTYVKVANFR	456
	** : * * * : * : : : * : * * * * . * * * : * * * * * * * * *	

Figura 49 Alineamiento SlpA, SlpX and SlpB. Utilizando la herramienta informática Clustal O, se realizó un alineamiento de las tres proteínas Slp. Los bloques muestran las secuencias de aminoácidos seleccionadas para el diseño de cebadores específicos. Los cebadores reversos (rojo) se usaron para la síntesis de ADNc a partir del ARN extraído y junto con los cebadores directos correspondientes (verde) para el ensayo de qPCR utilizando ADNc como molde.

A continuación se evaluó mediante una qPCR la expresión de los genes *slpA*, *slpB* y *slpX* para determinar si existía una variación a nivel de la expresión génica dependiente de las fases de crecimiento (exponencial y estacionaria) o por someter a la bacteria a un estrés salino.

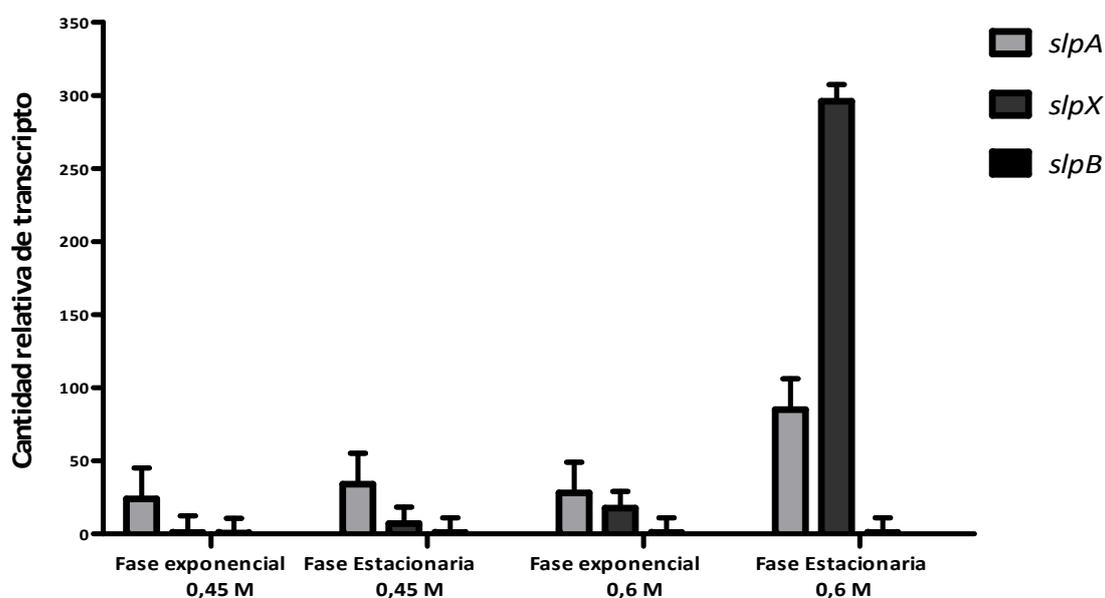


Figura 50 Expresión de *slpA*, *slpB* y *slpX* en condiciones de estrés salino y en dos etapas de crecimiento respecto al control evaluada por Real time PCR cuantitativa. Las barras de error representan errores estándar de tres experimentos independientes.

Cómo puede observarse en la Figura 50, la expresión de los genes *slpA* y *slpX* tuvo un aumento directamente proporcional al aumento de la concentración salina en el medio de cultivo, mientras que la expresión del gen *slpB* se mantuvo silente. Dado que se ha verificado que la inversión del segmento *slp* entre *slpA* y *slpB* tiene lugar solo en muy pocas células [122] no fue sorprendente que no se detectara expresión *slpB*, un gen considerado silente. Asimismo, hubo un mayor aumento de la expresión de los genes *slpA* y *slpX* para la fase de crecimiento estacionaria y en condiciones de alto contenido de sal (0,6 M de NaCl). De manera similar, en *Lactobacillus brevis* ATCC 14869, fue comprobado que la expresión diferencial de los genes *slpB* y *slpD* está relacionada con el contenido de oxígeno del medio de crecimiento y la etapa de crecimiento [123].

Por otro lado, en las bacterias existe una correlación transcripcional-traducciona consecuencia de la coordinación de ambos procesos en el citoplasma bacteriano. Sin embargo al comparar el nivel de expresión proteico y génico para *slpX*, se observa un mayor nivel en la expresión del ARNm en relación a la cantidad de proteína. La ausencia de correlación estricta para *slpX*/*SlpX* puede ser consecuencia de varios factores, una posible explicación es que la proteína se libera más al medio extracelular en condiciones de estrés salino, con lo cual se obtiene una menor cantidad al extraerla de la bacteria por un tratamiento con LiCl. Para verificar estas hipótesis se evaluó la presencia de S-layer en el sobrenadante de cultivos en condición control comparada con alta sal, luego de su concentración en Centriscart I con poro de corte de 20 kDa, se realizó un análisis por Western blot y *dot blot* (Figura 51).

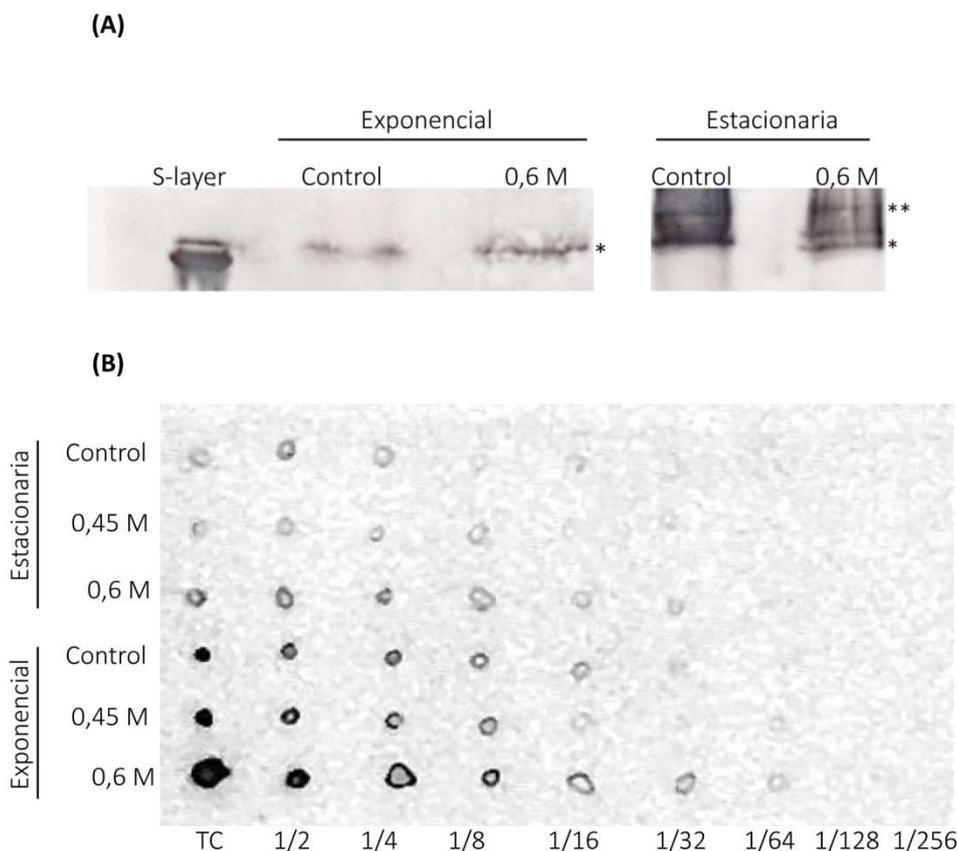


Figura 51 Perfil proteico de los sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los sobrenadantes provenientes de cultivos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecidos hasta una fase exponencial o estacionaria de crecimiento en condiciones de estrés (0,45 o 0,6 M de NaCl) fueron concentrados por Centriscart y luego analizados por western blot (A) o por dot blot (B) y revelado con un anticuerpo policlonal anti S-layer. El doble asterisco (**) y el asterisco (*) señalan a la proteína de 49 y 45 kDa, respectivamente.

Como se observa en la Figura 51, existe un aumento de las proteínas Slp en el sobrenadante a medida que aumenta la concentración salina del medio de cultivo. Esta liberación de las proteínas de la envoltura celular posiblemente este asociada a la modificación del PG y los LTA que se describen en los lactobacilos [23], [35].

Como ha sido descrito en el Capítulo 1, la proteína S-layer interactúa principalmente con los LTA y también PG y ambos se modifican en durante el crecimiento en alta sal [2], [35]. En la Figura 33 se verificó la disminución de la interacción del GFP-CT1 a células pre-crecidas en alta sal posiblemente debido a una mayor liberación de la proteína, despegándola de las paredes, sugiriendo que el anclaje de la S-layer a la pared se encuentra modificado en condiciones de estrés salino. Estos resultados podrían explicar en parte la falta de correlación transcripcional-traducciona observada. El estrés osmótico causado por altas concentraciones de sal, puede resultar en lesiones estructurales y fisiológicas de las células bacterianas, para sobrevivir al estrés osmótico las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para adaptarse. Los cambios en la pared celular pueden proteger a la célula del daño ambiental al modificar las propiedades fisicoquímicas de la membrana.

Para lograr una rápida adaptación a los cambios ambientales, los niveles de ARNm y de las proteínas están finamente regulados, mediante la activación o inhibición de la expresión de los genes; la regulación puede ocurrir tanto a nivel transcripcional como a nivel traducciona. Existen distintos mecanismos descritos de regulación génica, entre ellos, la presencia de secuencias regulatorias en el ADN, utilización de factores sigmas alternativos de la ARN polimerasa, la formación de una estructura secundaria en forma de horquilla o bucle en el ARN que ocasiona, en consecuencia, finalizar la transcripción prematuramente o secuestrar la secuencia de unión al ribosoma o Shine-Dalgarno (SD) inhibiendo el inicio de la traducción.

A fin de evaluar si existe una regulación génica involucrada en el aumento de la síntesis proteica de las S-layers, cuando las células son sometidas a un estrés salino, y buscar alguna posible explicación a la diferencia observada entre la cantidad de transcripto y proteína SlpX se realizó un abordaje bioinformático, utilizando a la cepa de referencia *Lactobacillus acidophilus* NCFM cuyo genoma está completo, disponible en la base de datos (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_006814), y su secuencia genómica

posee un 99,96 % de similitud con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, además las proteínas S-layers tienen un 100 % de identidad.

Utilizando la herramienta bioinformática Softberry (<http://www.softberry.com>) se predijo la región promotora de *slpA* y *slpX* (región -35 y -10) y los posibles factores de transcripción que puedan regular la expresión génica de las proteínas SlpA y SlpX y a continuación se realizó un alineamiento de las regiones promotoras de *slpA* y *slpX* utilizando la herramienta bioinformática ClustalO.



Figura 52 Alineamiento de la región promotora. Utilizando la herramienta bioinformática ClustalO (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), se realizó un alineamiento de la región promotora de los genes *slpA* y *slpX*. El asterisco (*) muestra bases idénticas. Subrayadas se encuentran las regiones -35 y -10 de cada gen.

Como puede observarse en la Figura 52, del alineamiento de las regiones promotoras, no existe homología entre las regiones -35 y -10 de los genes *slpA* y *slpX*.

Por otra parte, los factores de transcripción que interactúan con las regiones promotoras son esenciales para la regulación positiva o negativa de la expresión génica. En la Tabla 9 se muestra la predicción de posibles sitios de unión de los factores de transcripción, que postula la herramienta informática Softberry, en base a las secuencias rio arriba de los genes para *slpA* y *slpX*.

<i>slpA</i>	FT	Modo de regulación
	Fur	Represor, homeostasis de hierro
	Lrp	Regulador dual, metabolismo de los aminoácidos
	LexA	Represor, genes de respuesta SOS
	ArgR	Regulador dual, metabolismo de arginina
	GcvA	Regulador dual, metabolismo de glicina
	PurR	Represor, metabolismo de purinas
<i>slpX</i>	FT	Modo de regulación
	DnaA	Activador transcripcional constitutivo de inicio de replicación en OriC

Tabla 9 Factores de transcripción predichos. Utilizando la herramienta bioinformática Softberry se predijeron los factores de transcripción que podrían regular la expresión génica.

Para la región promotora del gen *slpA* se predicen varios factores de transcripción que podrían regular su expresión. Respecto a los factores de transcripción Fur y LexA, el primero está implicado en la homeostasis del hierro y el segundo implicado en la regulación de la respuesta SOS. Bajo condiciones de estrés las células pueden entrar en un estado hipermutable, lo que aumenta la diversidad de una población clonal, y conduce a nuevos genotipos que permiten la supervivencia en condiciones adversas, que de otro modo serían perjudiciales para el tipo salvaje [124], esto podría deberse a una represión del sistema SOS y/o a la utilización de polimerasa propensa a cometer errores. Un mecanismo descrito en *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* para afrontar el estrés osmótico es la regulación de las concentraciones intracelulares de ciertos aminoácidos, las concentraciones intracelulares de prolina y glutamato, aumentaron cuando se creció a las bacterias en condiciones de estrés osmótico [125] también ha sido descrito para *Lactobacillus casei* [37]; lo mismo podría estar sucediendo en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y estar regulado por los factores transcripcionales como Lrp, ArgR y GcvA. Estos factores transcripcionales podrían también influir en la expresión de *slpA* y formar parte de una respuesta conjunta al estrés osmótico (Tabla 9). Con la herramienta informática Softberry no se predicen factores de transcripción que puedan regular la expresión de *slpX*, salvo el DnaA que no parecería tener relación directa. Sin embargo, resulta llamativo, como puede observarse en la Figura 53, que río arriba de la secuencia *slpX*, se encuentra codificada una proteína anotada como regulatoria, si bien no se encontrarían formando un operón, evaluado utilizando la herramienta bioinformática Microbesonline (<http://www.microbesonline.org/>)



Figura 53 Organización genómica de *slpX*. Utilizando la herramienta informática Microbesonline se analizó si *slpX* se encontraba organizado formando un operón.

Continuando con el análisis de datos de expresión, provisto en Microbesonline se observa que hay un aumento de la expresión de ambos genes, *pfor* y *slpX*, en condiciones de estrés salino por sales biliares, aunque no parece haber un patrón conservado de regulación por este gen en otras especies de *Lactobacillus* (Figura 54). Resta evaluar experimentalmente si este marco de lectura es funcional y si existe alguna relación de su expresión con el crecimiento en alta sal.

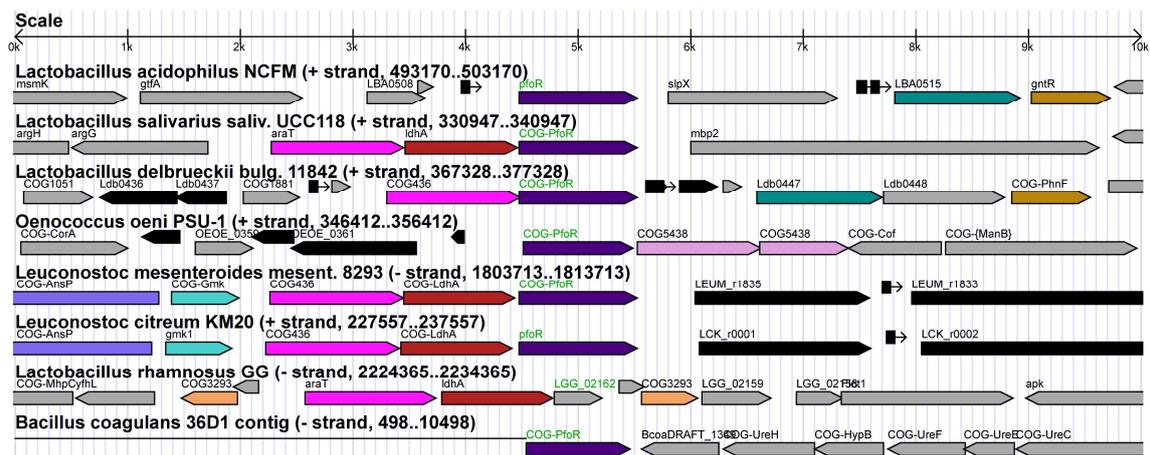


Figura 54 Análisis de la sintenia de *pfor*. Utilizando la herramienta informática Microbesonline se analizó la sintenia del gen *pfor*.

2.4. Regulación post-transcripcional

Como se describió en la Introducción, la estabilidad de los ARNm de las proteínas S-layer puede justificar su alto nivel de traducción logrando que hasta un 20% de las proteínas totales de la célula sea S-layer. Esta estabilidad puede estar asociada a la estructura secundaria que adopten los ARNm simple cadena, evitando su reciclado y permaneciendo accesible al sistema de traducción celular.

A continuación, se analizó si era posible una regulación a nivel post-transcripcional de los ARNm de las proteínas S-layers. Existen varios factores que pueden influir a este nivel, entre ellos, el reconocimiento de bases entre el ARN ribosomal y la secuencia Shine-Dalgarno (SD); este apareamiento específico es lo que facilita el reconocimiento del codón de inicio de la traducción (AUG) y distinguirlo de secuencias AUG internas. Ha sido reportado en *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus buchneri* que la secuencia Shine-Dalgarno AAGGAGG, presente en la secuencia genómica de *slpA*, es más eficiente que la secuencia AAGGAGA presente en *slpX* [126]. Por otra parte, la formación de una estructura secundaria en forma de horquilla o bucle en el ARNm puede dejar

inaccesible la secuencia Shine-Dalgarno y/o el inicio de la traducción provocando la inhibición de la traducción. A continuación se realizó un análisis de la estructura del ARNm utilizando la herramienta bioinformática RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>).

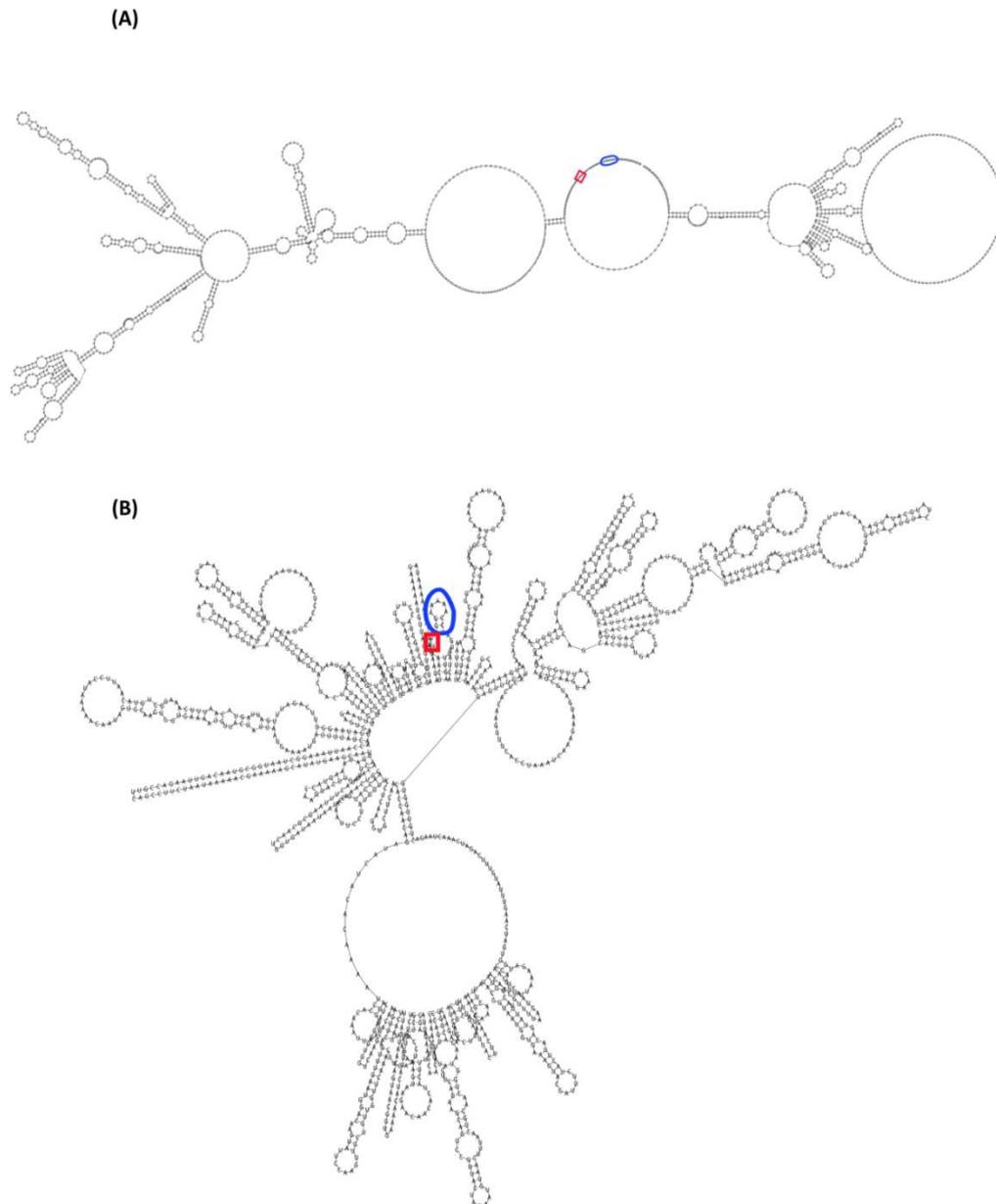


Figura 55 Plegamiento de los ARNm de *slpA* y *slpX*. Utilizando la herramienta bioinformática RNAfold, se predijeron las estructuras con menor energía libre mínima. El círculo indica la secuencia Shine-Dalgarno y el cuadrado indica el inicio de la traducción (AUG).

Como se observa en la Figura 55 el plegamiento de los ARNm *slpA* y *slpX* son ampliamente distintos. En el caso del ARNm *slpA* la secuencia SD y el inicio de la traducción quedan accesibles para el ribosoma, mientras que para el caso del ARNm

slpX se predice una estructura secundaria más compleja y la secuencia SD y el inicio de la traducción se encuentran en una horquilla y en doble cadena, respectivamente y como consecuencia no son accesibles a los ribosomas.

En una condición de estrés salino, las células necesitan adaptarse acumulando solutos compatibles específicos en condiciones hiperosmóticas y liberarlos bajo una condición iso-osmótica. Si bien existen mecanismos para mantener la homeostasis iónica, el aumento de la fuerza iónica extracelular podría trasladarse al citoplasma logrando desestabilizar las uniones puentes de hidrogeno, desarmando los loops y dobles cadenas del ARNm permitiendo así un aumento de la traducción. Otro factor que puede afectar la eficiencia de la traducción es la distancia entre la secuencia SD y el codón de inicio de la traducción. Ha sido descrito por Osterman y colaboradores [127] que la distancia óptima entre la secuencia SD y el inicio de la traducción es de 8 nucleótidos, en este caso la distancia en ambas secuencias génicas resultó ser de 10 nucleótidos, con lo cual este no sería un factor que influya en la expresión.

2.5. Conclusiones parciales

Existe un aumento en la expresión génica y la síntesis de las proteínas S-layer en condición de crecimiento con alta sal, tanto la proteína predominante SlpA y como la minoritaria SlpX, aumentan en alta sal. Una mayor proporción de S-layer en la superficie celular podría participar en el mantenimiento de la estabilidad de la pared a fin de contrarrestar la fragilidad causada por el estrés osmótico. El aumento transcripcional de *slpX* no tiene una correlación directa con la cantidad de proteína SlpX, esta diferencia puede ser explicada en parte por la estructura secundaria que adoptaría el ARNm que lo haría inaccesible a la maquinaria de traducción.

Por otro lado, la modificación en la envoltura celular por crecimiento en alta sal favorece la liberación al sobrenadante de proteínas S-layer, ésta condición de crecimiento sería favorable para la producción de S-layer purificada con fines de aplicación biotecnológica.

Capítulo 3: Aplicaciones biológicas de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

Como se mencionó en la Introducción, se han descrito varias aplicaciones biológicas para las proteínas S-layers puras extraídas de distintos *Lactobacillus*, en particular en la exclusión de patógenos bacterianos y partículas virales. Trabajos previos del grupo de investigación donde se desarrolló esta Tesis, han demostrado que la proteína S-layer pura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee propiedades antimicrobianas y antivirales [48], [128]. Avanzar en la caracterización de dichas propiedades es fundamental para evaluar su verdadero potencial como agente terapéutico o preventivo.

Tal como se mencionó anteriormente, las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos que interaccionan con los glicanos de glicoproteínas, glicolípidos o polisacáridos con alta afinidad. Por otra parte, diversas investigaciones han establecido que el reconocimiento de los oligosacáridos presentes en las partículas virales por lectinas es importante para las interacciones entre la célula y el virus, pudiendo activar la inmunidad del huésped, lo que resulta en la eliminación viral o en contraste, algunas lectinas actúan como factores que facilitan la entrada, replicación o el ensamblaje viral [129]. En el capítulo 1 se describió el comportamiento de tipo lectina que posee la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, y se estableció que es capaz de interactuar con partículas virales, posiblemente reconociendo las glicosilaciones presentes en las envolturas o cápside.

En este capítulo se estudiará la capacidad de la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 de modular la infección viral en relación con su comportamiento de lectina y el efecto anti-adhesivo de bacterias patógenas, como *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1. Efecto modulador de la infección viral

Para evaluar si la proteína S-layer pura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es capaz de interferir negativa o positivamente en la multiplicación viral, se eligió el sistema *in vitro* virus HSV-1/células HT29 (donde el virus multiplica) porque la proteína pura mostró interactuar tanto con el virus (Figura 18) como con las células (Figura 23 y 24). Además, considerando que ambos microorganismos pueden co-existir en la microbiota vaginal, porque *Lactobacillus acidophilus* es residente y el virus causa una de las enfermedades de transmisión sexual más frecuente (herpes genital), resulta relevante establecer qué tipo de modulación ejerce la proteína S-layer en esta infección viral. A fin de determinar el rol de la S-layer, se utilizó la cepa recombinante YK608 de HSV-1 que tiene la particularidad de expresar la proteína de tegumento VP22 fusionada a mRFP1 (proteína fluorescente roja) y la proteína de cápside VP26 fusionada a VenusA206K (proteína fluorescente verde) [130].

En cuanto a la cantidad de proteína a utilizar en estos experimentos, se decidió seguir trabajando con 400 µg/ml porque las investigaciones previas realizadas con cultivos celulares indican que la S-layer obtenida de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 no presenta efectos citotóxicos a dicha concentración [48]. Por otro lado, como ya se mencionó, luego de ser extraída de la bacteria con LiCl, la proteína interactúa entre sí formando una matriz paracristalina que permanece en suspensión o forma un precipitado blanco si se somete a centrifugación. Esta característica intrínseca se observa a concentraciones mayores o iguales a 400 µg/ml.

Inicialmente, la capacidad de la proteína S-layer para modular la replicación de HSV-1 se ensayó agregando 400 µg/ml de S-layer luego de la adsorción del virus (post), y el efecto se evaluó de forma cualitativa, mediante la observación al microscopio de las células infectadas fluorescentes, y de forma cuantitativa, titulando el rendimiento viral (virus extracelular) por el ensayo de placas a las 48 hs post infección.

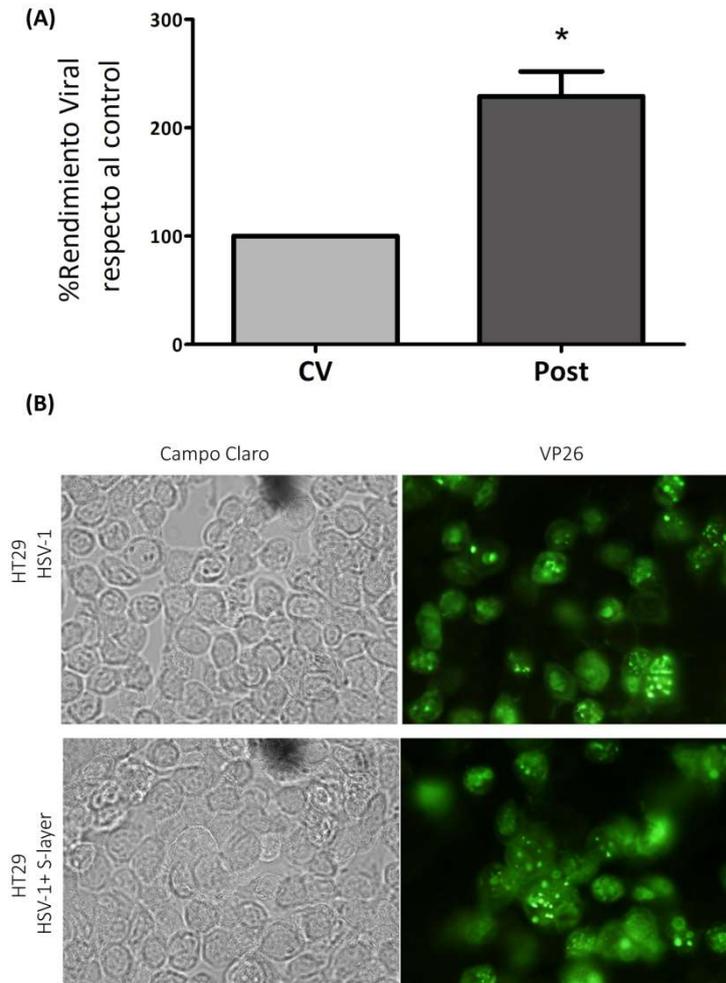


Figura 56 Actividad moduladora de la infección de HSV-1. Monocapas de células HT29 fueron infectadas con HSV-1 YK608 (m.i.=0,1) y luego de la adsorción se incubaron con 400 µg/ml de S-layer (post). A las 48 h post infección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el ensayo de placas **(A)** y las células se fijaron para observar la expresión de antígenos virales al microscopio. Aumento 400X **(B)**. CV: control de virus sin tratar. El asterístico (*) denota diferencias significativas utilizando el t de student ($p < 0,05$).

Como se muestra en la Figura 56 A, en las condiciones ensayadas la proteína no tendría una actividad antiviral que module negativamente la replicación de HSV. Por el contrario, llamativamente se observó un aumento significativo del rendimiento viral cuando la proteína estuvo presente luego de la adsorción del virus. Sin embargo, el número de células infectadas fluorescentes parece similar en ambos casos (Figura 56 B). Las células también se observaron en campo claro para corroborar que el tratamiento con la proteína no afecta el número total de células (infectadas o no), de esta forma se confirmó la ausencia de un efecto citotóxico luego de 48 hs de incubación con la S-layer.

Teniendo en cuenta que Martínez y colaboradores [48] demostraron el efecto antiviral de la S-layer durante las etapas tempranas de la infección con el virus Junín, a continuación se investigó si la proteína era capaz de modular dichas etapas en el modelo de HSV-1. Para ello, se realizaron dos esquemas de tratamiento diferentes: el agregado de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S-layer una hora antes de la adsorción del virus (pretrat) o durante la hora de adsorción del virus a 37°C (ads). Nuevamente, a las 48 hs post infección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el ensayo de placas de lisis, y se fijaron las células observándose la expresión de antígenos virales al microscopio.

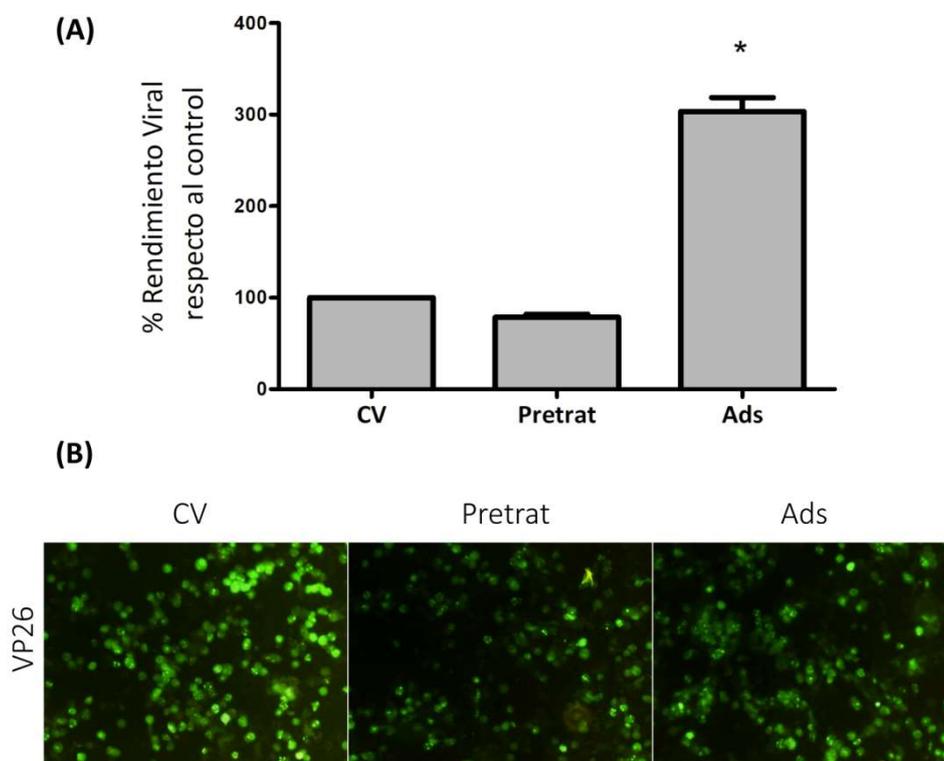


Figura 57 Actividad moduladora de la infección de HSV-1. Monocapas de células HT29 infectadas con HSV-1 YK608 (m.i.= 0,1) se incubaron con 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S-layer una hora antes de la adsorción (pretrat) o durante la hora de adsorción del virus a 37°C (ads). A las 48 h post infección se cosecharon los sobrenadantes y se titularon por el ensayo de placas **(A)** y las células se fijaron para observar la expresión de antígenos virales al microscopio. Aumento 100X **(B)**. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control de virus (CV) usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

En este caso, en la Figura 57 A también se observa un marcado aumento del rendimiento viral pero sólo cuando la S-layer está presente durante la adsorción del virus. En cambio, en las células infectadas pero previamente tratadas con la S-layer se observa una leve disminución en el rendimiento viral respecto del control de virus sin

tratar. Al observar las células infectadas de las cuales provienen dichos rendimientos virales, no es tan evidente este efecto "pro" o "anti" viral de la S-layer según se agregue durante o antes de la adsorción, respectivamente (Figura 57 B). Por esta razón, a continuación se repitió el mismo esquema de tratamiento pero fijando las células a las 12 h post infección para evitar la posibilidad de que haya más de un ciclo de replicación (el ciclo lítico de HSV-1 se completa entre las 12 a 14 hs post infección) y de este modo evaluar lo que ocurre con las células que inicialmente se infectan.

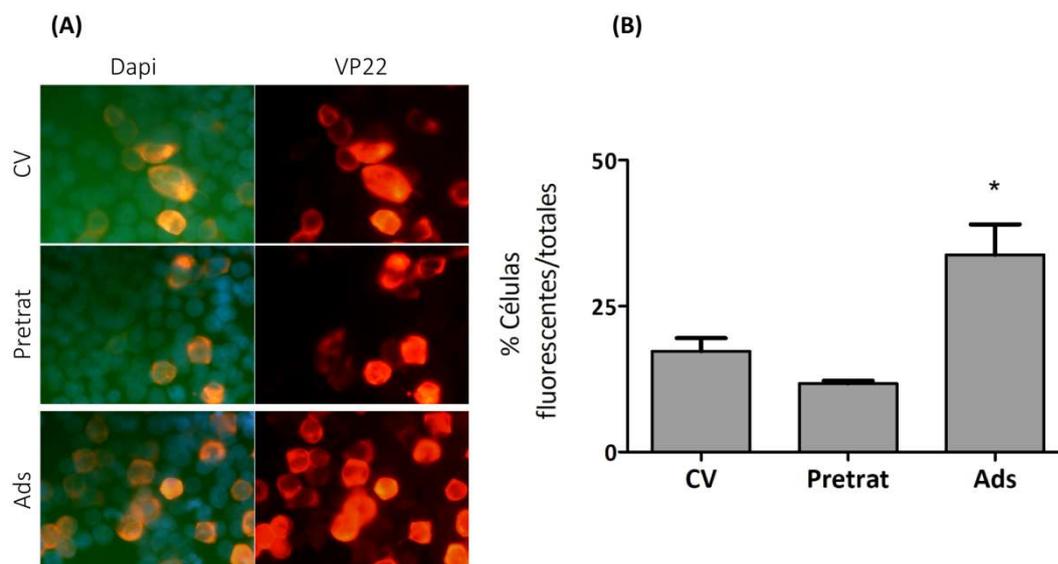


Figura 58 Actividad moduladora de la infección de HSV-1 de S-layer. (A) Monocapas de células HT29 infectadas con HSV-1 YK608 (m.i.= 0,1) se incubaron con 400 µg/ml de S-layer una hora antes de la adsorción (pretrat) o durante la hora de adsorción del virus a 37°C (ads). A las 12 h post infección se fijaron las células y se observó la expresión de antígenos virales al microscopio. Aumento 400X **(B)** Recuento de células fluorescentes. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control de virus (CV) usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

En la Figura 58 B se presentan los porcentajes de células fluorescentes que expresan el antígeno viral VP22. Los resultados obtenidos muestran que en el CV se infectan el 18% de las células en comparación con el 12% y el 34% que se observa en las células tratadas con la S-layer antes o durante la adsorción viral, respectivamente. Entonces, al evaluar el efecto de la proteína S-layer sobre HSV-1 en condiciones de un solo ciclo de infección se obtuvieron los mismos resultados que a las 48 hs post infección. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la S-layer modula diferencialmente la infección de HSV-1 dependiendo del momento en el que esté presente. Si la S-layer

se encuentra interactuando con las células HT29 durante la hora de adsorción (ads), aumenta el número de células que se infectan y esto se correlaciona con un incremento en el rendimiento viral, comportándose como una proteína pro-viral. En cambio, si la S-layer está presente antes de la adsorción viral (pretrat) se produce una disminución poco significativa en el número de células que se infectan y de partículas infectivas que se producen, por lo tanto no se puede concluir que resulta actuar como una proteína anti-viral propiamente dicha. Finalmente, si la S-layer se agrega luego de la adsorción (post) también se observa un efecto pro-viral sobre el rendimiento viral pero que no se condice con un aumento en el número de células infectadas.

A continuación, frente a estos resultados, se evaluó la modulación de la infección viral de otros virus además del HSV-1. En este caso, se realizó un ensayo de plaqueo directo con los virus VSV y Adv-5, que también interactúan con la S-layer como HSV-1 (Figura 18), empleando el modelo de células A549 ya que ambos virus multiplican en esta línea celular. Las monocapas de A549 se infectaron con aproximadamente 50 UFP de virus, y la S-layer estuvo presente antes (pretrat), durante (ads) o después (post) de la adsorción viral. Las UFPs obtenidas con cada tratamiento se expresaron como porcentaje de UFP respecto del control de virus sin tratar (CV).

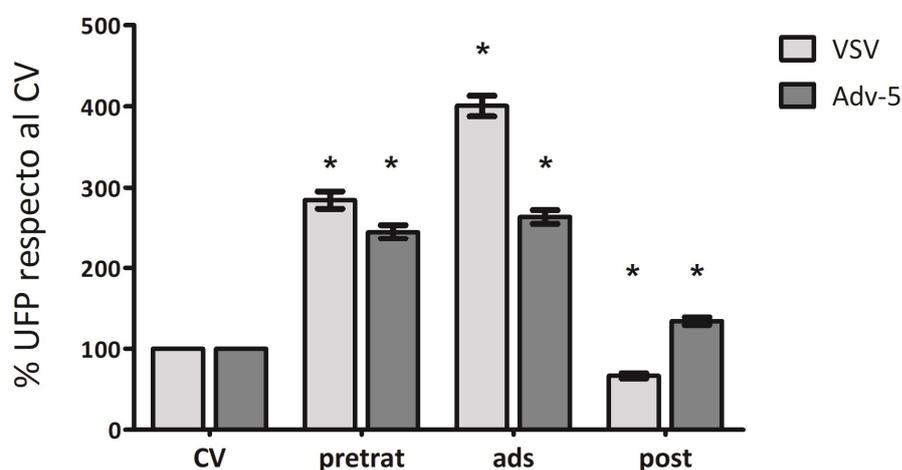


Figura 59 Efecto de distintos tratamientos con S-layer sobre la multiplicación de VSV y Adv-5. Monocapas de células A549 infectadas con aproximadamente 50 UFP de VSV o Adv-5 se incubaron con 400 μ g/ml de S-layer una hora antes de la adsorción (pretrat), durante la hora de adsorción del virus a 37°C (ads) ó post adsorción (post). Luego de la hora de adsorción, se descartó el inóculo y se agregó el medio semisólido para permitir la aparición de las placas de lisis. A las 24h (para VSV) o a los 6 días (para Adv-5) de incubación a 37°C, las células se fijaron y las placas se revelaron con cristal violeta. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control de virus (CV) usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos (Figura 59) muestran que el tratamiento de las células con S-layer antes o durante la adsorción viral, aumenta significativamente el número de UFPs respecto de los CV de VSV y Adv-5, llegando a duplicar o cuatriplicar sus valores. En cambio, cuando la proteína estuvo presente luego de la adsorción viral (post) inhibió la infección de VSV y facilitó la infección de Adv-5.

Posteriormente se evaluó si los dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD) de la S-layer estaban involucrados en el marcado aumento de la infección viral, por presencia de la proteína durante la adsorción. Para ello se realizó el ensayo de plaqueo directo utilizando VSV, ya que el efecto obtenido fue más notable y el tiempo de multiplicación es menor, en presencia de D-manosa que antagoniza la unión de la S-layer a los carbohidratos (como se observa en la Figura 27 del capítulo 1). Las células A549 se infectaron con VSV en presencia de la S-layer durante la hora de adsorción (S), en presencia de S-layer y D-manosa (S/M) o en presencia de la proteína pre incubada 2 h a 37°C con D-manosa (S+M) para favorecer la interacción proteína-carbohidrato, como control se incubó al virus en presencia de D-manosa sola (M).

Como se observa en la Figura 60 A, pre incubar la S-layer con D-manosa (S+M) antes de ponerla en contacto con el virus revierte totalmente el efecto de beneficiar la infección viral que produce la proteína sola (S). En cambio, si se agregan simultáneamente (S/M) la inhibición es parcial. Esto indicaría que los CRDs estarían involucrados en favorecer la infección viral de VSV cuando la proteína está presente durante la adsorción viral.

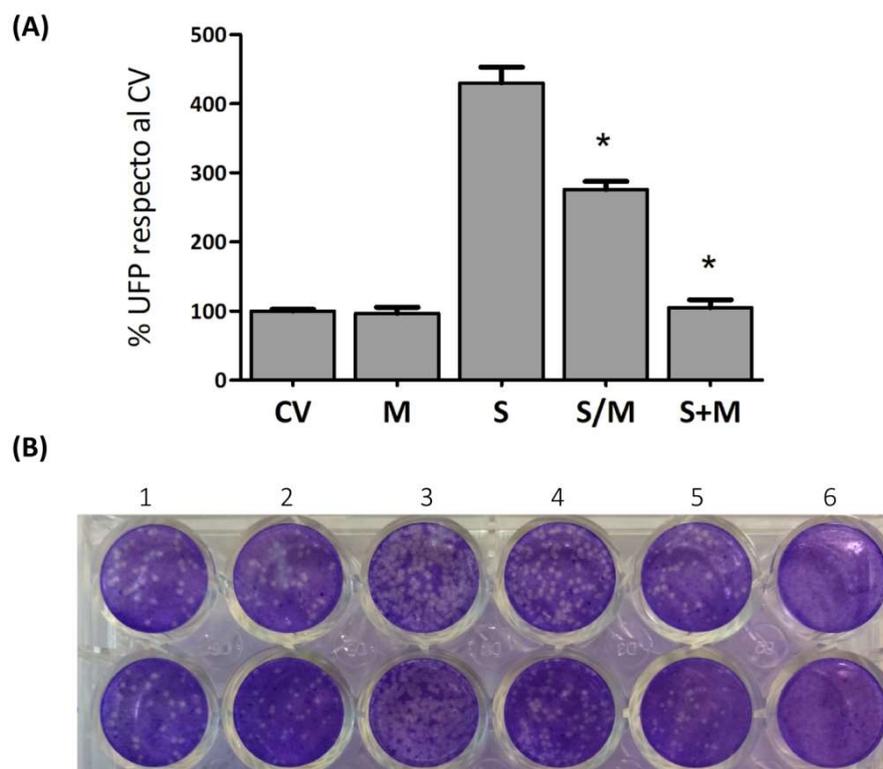


Figura 60 Inhibición del efecto de S-layer sobre la multiplicación de VSV por D-manosa. **(A)** Monocapas de células A549 infectadas con VSV se incubaron durante la hora de adsorción con: 400 mM de D-manosa (M), 400 μ g/ml de S-layer (S), 400 μ g/ml de S-layer y 400 mM de D-manosa (S/M) o 400 μ g/ml de S-layer pre incubada 2 h a 37°C con 400 mM de D-manosa (S+M). Luego, se descartó el inóculo y se agregó medio semisólido hasta la aparición de placas de lisis. A las 24 h se reveló con cristal violeta y se realizó el recuento de UFPs. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al tratamiento con S-layer usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$). **(B)** Placa representativa mostrando 1- VSV, 2- VSV + D-manosa, 3- VSV + S-layer, 4- VSV + S-layer y D-manosa, 5- VSV + S-layer pre-incubada con D-manosa 6- Control de células.

3.2. Protección de la inactivación viral por temperatura

Teniendo en cuenta que el post-tratamiento con S-layer aumentó el número de partículas de HSV-1 infectivas presentes en el sobrenadante (rendimiento viral) sin mostrar un incremento en el número de células infectadas (Figura 56), se decidió explorar si la proteína S-layer estaba protegiendo al virus de la inactivación por calor. Luego de 48 hs de incubación a 37°C, el rendimiento viral es el resultado de las nuevas partículas que se liberan al medio extracelular menos las que se inactivan por la temperatura, se sabe que a 37°C la mayoría de los virus animales son relativamente estables por tiempos cortos. Además, la sensibilidad al calor está influenciada por el medio, con frecuencia las preparaciones purificadas son mucho más sensibles al calor que las crudas porque la desnaturalización térmica puede estar sujeta a efectos

ambientales como la concentración de cationes o presencia de otras proteínas en el medio.

Para corroborar esta hipótesis, una suspensión viral de HSV-1 (cepa KOS) se sometió durante 2 h a 42°C, se eligió dicha temperatura para obtener una inactivación viral más marcada que a 37°C, y se cuantificó el título viral a tiempo cero (T0) y a tiempo dos horas (T2). La incubación se realizó en PBS solo (CV), en presencia de 400 µg/ml de S-layer o en presencia de 400 µg/ml de la proteína BSA, como control de especificidad. Con los títulos virales obtenidos se calculó el factor de reducción tal como se detalla en Materiales y Métodos.

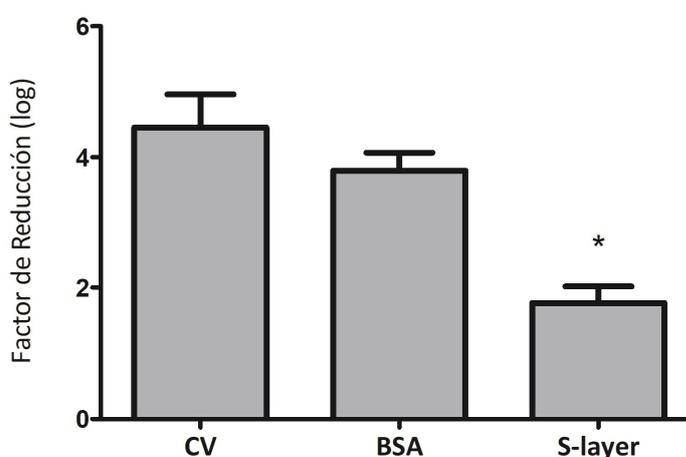


Figura 61 Protección de la S-layer frente a la inactivación de HSV-1 por calor. Una suspensión de HSV-1 se puso en contacto o no (CV) con 400 µg/ml de S-layer o BSA durante 2 h a 42°C. En cada muestra, se cuantificó el título viral remanente y a tiempo cero. Con estos datos se calculó el factor de reducción como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de estar a alta temperatura. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al CV usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Como puede observarse en la Figura 61 el título viral se redujo aproximadamente 4 logaritmos como efecto de la inactivación térmica en el CV. En cambio, en presencia de la proteína S-layer se observa una evidente protección a la inactivación por calor del HSV-1, ya que el título viral se redujo 2,5 veces menos que en el CV. Por el contrario, cuando se agregó la proteína BSA a la suspensión viral, la infectividad disminuyó igual que en el CV.

A continuación se investigó si esta protección de la S-layer era exclusiva para HSV-1 o también se observaba con otro virus envuelto, como VSV, y con un virus desnudo, como AdV-5.

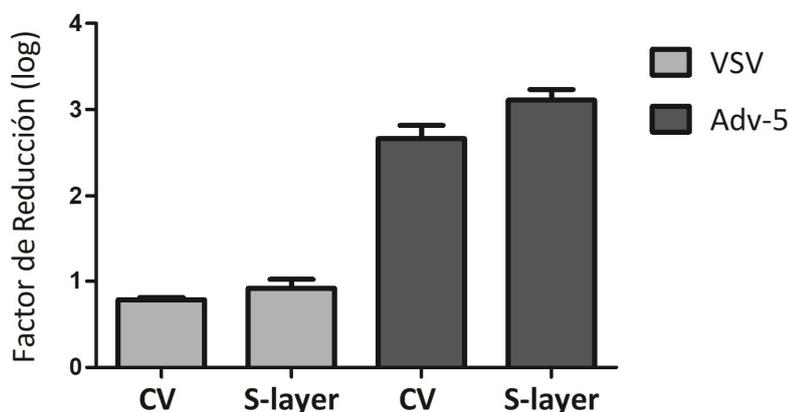


Figura 62 Efecto de la S-layer frente a la inactivación térmica de VSV y Adv-5. Una suspensión de VSV se puso en contacto con de 400 $\mu\text{g/ml}$ S-layer durante 2 h a 42°C mientras que Adv-5 se puso en contacto con la misma concentración de proteína pero a 45° C durante 1 h. El título se cuantificó tanto en los controles (CV) como en las muestras tratadas con S-layer antes y después del tratamiento con calor. Con estos datos se calculó el factor de reducción (FR) como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de estar a alta temperatura. No se obtuvieron diferencias significativa respecto a control usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p > 0,05$).

Como se observa en la Figura 62 el título viral de VSV y Adv-5 disminuyó alrededor de 1 a 3 logaritmos por exposición a altas temperaturas, respectivamente. Al comparar la carga viral en los CVs con la de las suspensiones que fueron incubadas con la proteína S-layer durante el tratamiento de inactivación de VSV y Adv-5 no se observaron diferencias significativas. Por lo tanto, la protección frente a la inactivación por calor que produce la S-layer sería específica para herpes, en las condiciones ensayadas.

Luego, para determinar si en dicha protección estaban involucrados los dominios de reconocimiento a carbohidratos de la S-layer se realizó el mismo ensayo que en la Figura 62 pero pre-incubando la S-layer con D-manosa durante 1h a 37°C. En la Figura 63 se observa que la D-manosa no inhibe el efecto de protección que produce la S-layer sobre la inactivación térmica de HSV-1. Estos resultados indicarían que la proteína S-layer puede proteger a HSV-1 del daño inducido por la temperatura alta pero que los CRD no estarían involucrados.

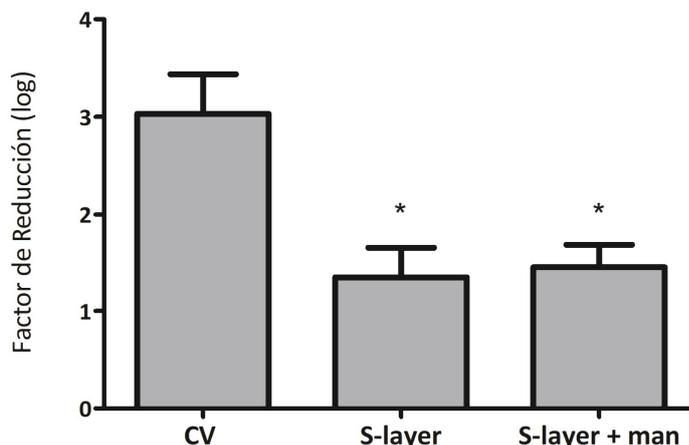


Figura 63 Efecto de la D-manosa sobre la protección de la S-layer ante la inactivación viral. Una suspensión HSV-1 se puso en contacto con 400 $\mu\text{g/ml}$ S-layer (S-layer) o 400 $\mu\text{g/ml}$ S-layer previamente incubada con 400 mM de D-manosa (S-layer + man), durante 2 h a 42°C. En cada muestra, se cuantificó el título viral remanente y a tiempo cero. Con estos datos se calculó el factor de reducción (FR) como el logaritmo del cociente del título viral antes y después de estar a 42°C. El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al CV usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

A continuación, se evaluó el efecto de protección frente a la inactivación viral, pero sometiendo al virus a una temperatura baja. Los virus animales se pueden conservar por períodos muy prolongados a -70°C pero a 4°C pierden infectividad más rápidamente. Por esta razón, una suspensión de HSV-1 se mantuvo en la heladera durante un período de 60 días en total, y se tomaron alícuotas a los 0, 9, 30 y 60 días para calcular la infectividad residual. Dicha incubación se realizó en PBS (CV) o agregando 400 $\mu\text{g/ml}$ de S-layer o BSA a la suspensión viral. (Figura 64).

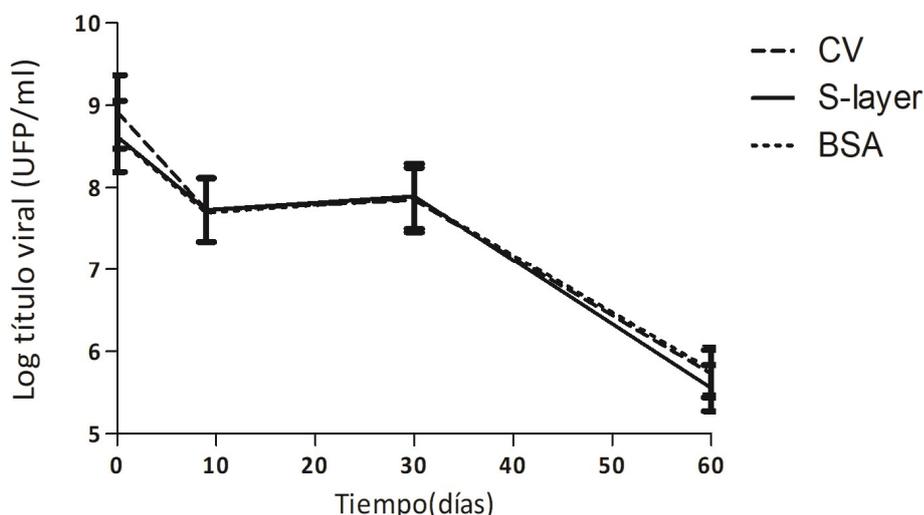


Figura 64 Protección de la S-layer frente a la inactivación de HSV-1 a 4°C. Una suspensión de HSV-1 se puso en contacto con PBS (CV), con 400 $\mu\text{g/ml}$ de S-layer o con 400 $\mu\text{g/ml}$ BSA durante 0, 9, 30 o 60 días a 4°C. El título viral se cuantificó por el método de unidades formadoras de placas de lisis. Las barras de error representan el error estándar de tres experimentos independientes.

En la Figura 64 se muestran los títulos virales obtenidos para HSV-1 en función del tiempo. La infectividad en el CV se redujo aproximadamente 3 logaritmos luego de 2 meses de conservación en la heladera. La curva de inactivación obtenida fue similar tanto en presencia como en ausencia de S-layer o BSA. Por lo tanto, la proteína S-layer no protege al virus herpes de la inactivación que sufre a 4°C.

3.3. Efecto Anti-adhesivo de la proteína S-layer

Como se mostró en el Capítulo 1, la proteína S-layer fue capaz de aglutinar microorganismos y además en los cúmulos de bacterias aglutinadas una gran proporción de células presentaron daño en las envolturas. Una de las bacterias evaluadas fue *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 la cual forma biopelículas. Según Rasamiravaka [131] las biopelículas son las determinantes del 65-80% de las infecciones bacterianas ya que constituyen un modo de crecimiento protegido que les permite sobrevivir en un entorno hostil. Las bacterias que residen en las biopelículas son muy difíciles de erradicar con antibióticos, con lo cual prevenir la formación de biopelículas sería un gran avance en el tratamiento de infecciones bacterianas.

A fin de determinar si la proteína S-layer tenía la capacidad de inhibir la formación de biopelículas, como primera aproximación se analizó la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a una microplaca de poliestireno con concentraciones crecientes de S-layer por la técnica de cristal violeta. El índice de formación de biopelícula se determinó como las células adheridas respecto a las células planctónicas (Figura 65).

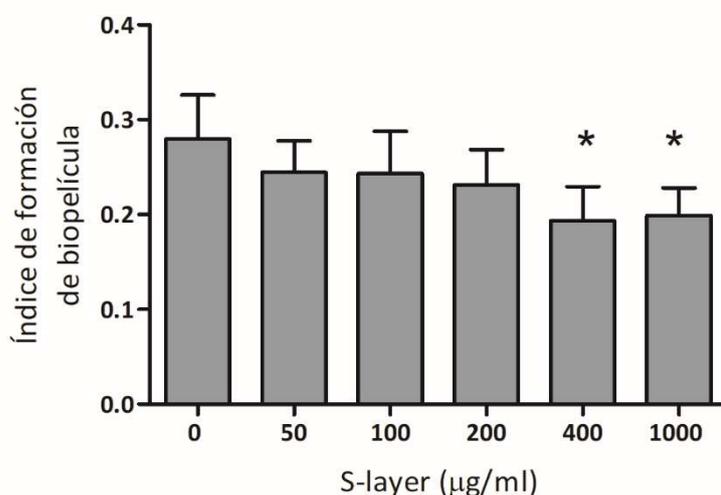


Figura 65 Efecto de S-layer en la formación de biopelículas. En una placa de poliestireno de 96 wells se evaluó la formación de biopelícula estática. Se muestra el índice de adherencia que es el cociente entre la absorbancia del Cristal Violeta (CV) CV550 y las células planctónicas (DO600nm). El asterisco (*) denota diferencia significativa respecto al control usando el método de ANOVA, Test de Bonferroni ($p < 0,05$).

Al analizar la formación de la biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en presencia de S-layer (Figura 65) se observa un menor índice de adherencia a una concentración de 400 o 1000 µg/ml de la proteína.

Por otra parte, el paso inicial para la colonización y posterior infección crónica que produce *Pseudomonas aeruginosa* a nivel pulmonar es la adhesión a las células epiteliales de las vías respiratorias. Por esta razón, se decidió investigar si la proteína S-layer era capaz de inhibir la adhesión de las *Pseudomonas* a las células A549, una línea celular derivada de epitelio alveolar humano. El tipo de ensayo que se realizó fue el de protección, que consiste en realizar el tratamiento con el inhibidor antes de la adhesión de las *Pseudomonas*. Para ello, monocapas de células A549 crecidas sobre cubreobjetos en microplaca de 24 pocillos se incubaron con 400 µg/ml de la proteína S-layer durante 1 h a 37°C. Luego se descartó la proteína, se realizaron lavados con PBS, y se añadió una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 que se dejó en contacto por un lapso de 1 h a 37°C. Por un lado, se determinó el número de *Pseudomonas* viables adheridas por pocillo mediante el recuento de UFC sobre placas de agar LB y por otro lado las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. Los resultados se expresan como porcentajes de adhesión relativos a las UFC de *Pseudomonas* adheridas en el control sin ningún tratamiento previo y que corresponden al 100% de adhesión.

adsorción. En el caso de VSV, este efecto estaría relacionado con la capacidad de lectina de la S-layer. En cambio, el pretratamiento de las células con la S-layer promueve la infección de VSV y AdV pero inhibe levemente la de HSV-1, sugiriendo una posible actividad antiviral.

La proteína S-layer es capaz de proteger al virus HSV-1 de la inactivación térmica por calor pero no por bajas temperaturas, y este efecto no estaría mediado por los CRD. Esta capacidad podría ser la responsable de obtener un mayor rendimiento de partículas virales infectivas en los cultivos tratados con la proteína durante todo el tiempo de incubación, luego de la adsorción del virus.

Por otra parte, también se pudo demostrar el efecto anti-adhesivo de bacterias patógenas, como *Pseudomonas aeruginosa*, ya que la S-layer fue capaz de disminuir la adherencia a células A549 y la formación de biopelículas en una superficie abiótica.

En conjunto, estos resultados permiten concluir que la S-layer obtenida de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es una proteína que exhibe varias bioactividades con potenciales aplicaciones biológicas.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta tesis se caracterizó funcionalmente la proteína S-layer predominante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, SlpA. Smith y Pouwels fueron pioneros en el estudio de esta proteína, sin embargo, a la fecha quedan muchos interrogantes abiertos acerca de su funcionalidad.

Desde la secuencia proteica se predice la presencia de dos CRDs en el dominio carboxilo-terminal de la proteína S-layer [48], a lo largo de la tesis quedó demostrado que la proteína S-layer tiene un comportamiento de tipo lectina. Fue capaz de aglutinar eritrocitos de carnero, y esta interacción fue inhibida por carbohidratos demostrando así la especificidad de unión (Tabla 5). La S-layer tuvo una amplia gama de afinidad a diversos carbohidratos, siendo la afinidad por D-manosa \geq D-lactosa > D-galactosa > D-glucosa.

Fue evidente la aglutinación de *Saccharomyces cerevisiae*, cuya pared es rica en manosa, quitina y otros glicanos (Figura 14) y además fue capaz de aglutinar bacterias patógenas, posiblemente interactuando con el lipopolisacárido presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas o con los polímeros de pared de las bacterias Gram positivas, se observó además una gran proporción de células con daños en la pared celular (Figura 13). De acuerdo con esto, fue descrito que las lectinas pueden inducir o promover la formación de poros en las células bacterianas, dando como resultado la fuga de contenidos celulares [132] que se correlacionaría con la actividad antimicrobiana informada para la proteína S-layer [48], [61]–[64], [114], [133]. Asimismo, la proteína fue capaz de interactuar con partículas virales (Figura 18), ésta interacción con virus podría implicar proteínas glicosiladas ya que no hubo interacción entre la S-layer y el bacteriófago J1 que no posee glicosilaciones en su estructura (Figura 19). En la superficie viral, las lectinas pueden interactuar con los glicanos y prevenir las interacciones con los receptores, pudiendo así prevenir la interacción con las células huésped.

Aunque la afinidad por carbohidratos obtenida para la proteína es baja en comparación con otras lectinas animales y vegetales [86], [87], [134], esta nueva función de lectina observada para la S-layer permite comprender los hallazgos de actividad inmunomoduladora, antiviral y propiedades antibacterianas descritas para esta proteína (Gao et al., 2016; Prado-Acosta et al., 2010; Prado Acosta et al., 2008;

Prado Acosta, Ruzal, & Cordo, 2016). Además proporcionaría beneficios biológicos en el tracto gastrointestinal como barrera contra los patógenos [136].

Empleando construcciones quiméricas de fusión a GFP de la proteína, con diferentes porciones de la SlpA, y tal como describió anteriormente Smit [137], se verificó que el dominio carboxilo-terminal (GFP-CT1) fue capaz de interactuar con la pared celular de *Lactobacillus acidophilus* (Figura 30). Aunque Smit y Pouwels [47] encontraron que sólo una repetición, de las dos repeticiones CRD presentes, es suficiente para anclar la proteína a la pared celular de *Lactobacillus acidophilus in vitro*, nuestros resultados de unión *in vivo* (Figura 30) indican que ambas repeticiones son necesarias para la unión, mostrando la necesidad de tener múltiples sitios de unión como los encontrados en las proteínas toxina (ToxA) de *Clostridium difficile* o en la glicosiltransferasa (GBP) de *Streptococcus mutans* a lo largo de sus extremos carboxilo que pueden fortalecer la unión a carbohidratos [108], [138].

Respecto a la actividad del tipo lectina de la S-layer, se observó un comportamiento mixto ya que reconoce polímeros como quitina con alta afinidad pero también carbohidratos como el ácido siálico/manosa, presentes en oligómeros (Figura 31).

La actividad lectina de unión a quitina observada, se asemeja a la descrita para la lectina del germen de trigo *Triticum vulgare* (WGA) que puede interactuar con oligosacáridos que contienen N-acetilglucosamina (NAG) terminal, como el peptidoglicano de la pared celular bacteriana, la quitina y los glicosaminoglicanos, y también puede interactuar con algunas glicoproteínas a través del ácido siálico [139], [140]. La capacidad de la S-layer para interactuar con la quitina y el quitosano podría correlacionarse con la actividad quitinasa descrita para *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [44]; ésta actividad podría constituir un sistema para utilizar los carbohidratos derivados de las mucosas, como así también actuar como un factor de adherencia, ya que NAG se encuentra en muchas glicoproteínas humanas de las superficies de las mucosas y probablemente representa una adaptación para poder desarrollarse en el nicho de las mucosas. De hecho, se encuentran codificadas en los genomas de *Lactobacillus acidophilus* NCFM y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 [44], [141] las funciones relacionadas con la utilización de quitina/NAG y el catabolismo del ácido siálico e incluyen el sistema de transporte PTS y las actividades catabólicas. A continuación se muestra un esquema representativo del metabolismo de quitina/NAG

(Figura 67) y del metabolismo del ácido siálico (Figura 68), en rojo se recuadran las enzimas codificadas en el genoma de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

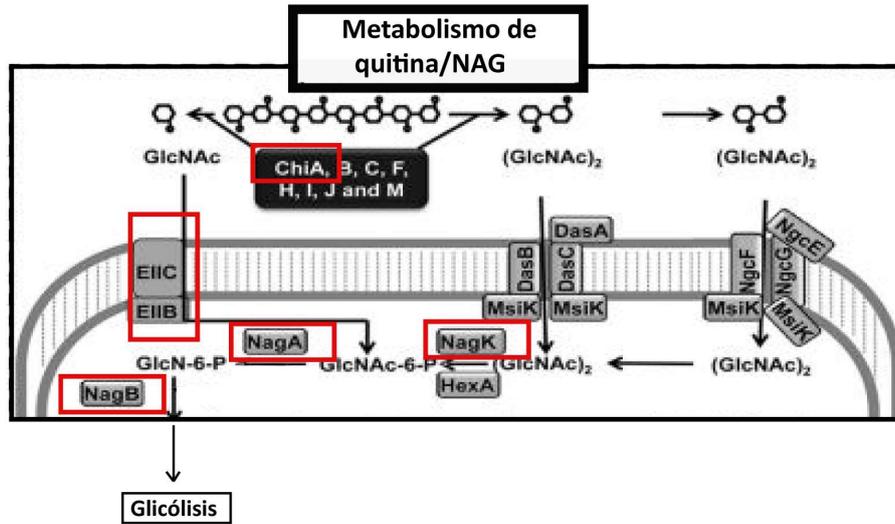


Figura 67 Esquema representativo del metabolismo de la quitina/N-acetilglucosamina (NAG). En rojo se indican las enzimas involucradas en metabolismo de la quitina/NAG que están codificadas en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Imagen modificada de [142]

En vista que la mayoría de las bacterias no patógenas, como es el caso de los lactobacilos, no sintetizan el ácido siálico más común (ácido N-acetilneuramínico Neu5Ac) ni sus derivados estructurales, la presencia de genes relacionados con el catabolismo de quitina, NAG o ácido siálico indicaría que es posible su utilización como una fuente nutricional.

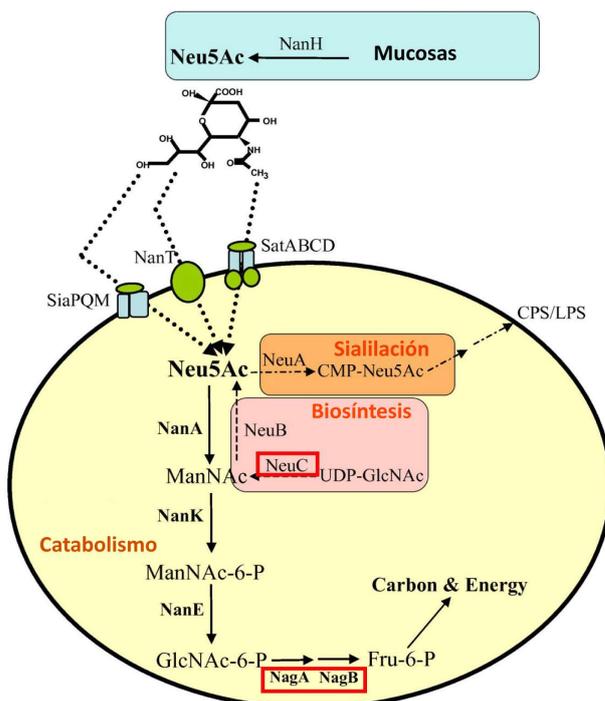


Figura 68 Esquema representativo del metabolismo del ácido siálico. En rojo se indican las enzimas involucradas en metabolismo del ácido siálico que están codificadas en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Imagen modificada de [143]

En adición, la interacción de S-layer con los carbohidratos también se asemeja a las lectinas que unen manosa/ácido siálico, como la lectina de *Polygonatum cyrtonema* Hua (PCL, GenBank Nº de registro AAM28644), aunque la afinidad obtenida para la S-layer es menor que la afinidad de la PCL con el ácido siálico y la manosa. Cuando se analizó la secuencia primaria de los CRDs presentes en el dominio carboxilo-terminal de la proteína SlpA, dentro de cada repetición se predicen las secuencias consenso propuestas por Von Eichel-Streiber para la toxina ToxA [108] y para la proteína GBP responsables de la interacción con carbohidratos [109]. Además al comienzo de cada CRD se encuentra una secuencia de cinco aminoácidos que posee similitud con las de las lectinas de unión a manosa [110] (Figura 28). Si bien se observaron interacciones entre la S-layer y la D-manosa, no hubo interacción con ARNasa B o glucosa oxidasa, ambas glicoproteínas que contienen N-glicanos con alto contenido de manosa. Estos resultados pueden reflejar una afinidad específica por los residuos de manosa con enlaces que no están presentes o expuestos en estos enlaces N-glicosídicos.

Por otra parte, el dominio carboxilo-terminal fue descrito en *Lactobacillus acidophilus* como el responsable de la unión a la pared celular a través de los ácidos teicoicos [47]. Sin embargo, aún no se estableció para la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 si la interacción es con los WTA o con los LTA. En un estudio reciente, Bönisch y colaboradores [89] describieron en *Lactobacillus buchneri* que la interacción de la S-layer con la pared celular es mediante los LTA. Fue posible determinar que el extremo carboxilo-terminal (GFP-CT1) de la S-layer se une a células de *Lactobacillus acidophilus* desprovistas de S-layer y que esta unión puede ser inhibida con anticuerpos específicos contra los LTA o tratando al lactobacilo con SDS, de manera tal de extraer sólo los LTA de la pared celular (Figura 35). Por consiguiente, el LTA sería la molécula con la cual interactúa naturalmente la S-layer en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 de forma equivalente a lo descrito para la proteína S-layer de *Lactobacillus crispatus* [144]. Las regiones carboxilo-terminal de las proteínas S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus crispatus* poseen una alta similitud de secuencia (76%) apoyando esta observación.

Por otra parte, el dominio GFP-CT1 fue capaz de interactuar con *Lactobacillus acidophilus* desprovisto de S-layer, pero no con células sin decapar, ni con células de *Lactobacillus casei*. ¿Cuáles son las diferencias entre estas dos especies? A diferencia

de *Lactobacillus acidophilus* por un lado, *Lactobacillus casei* además de no poseer S-layer, no presenta en su genoma los genes que codifiquen para la síntesis de WTA [44], [141], [145] y por otro lado, el LTA de *Lactobacillus casei* se sustituye con D-alanina [35]. La glicosilación de las moléculas de LTA se ha demostrado en varias especies pero aún no en *Lactobacillus acidophilus* [28], por ejemplo en *Lactobacillus buchneri* CD034 el LTA muestra un esqueleto típico de poliglicerol-fosfato con glucosa como única modificación y no presenta D-alanina como sustituyente. Además, en mutantes *dlt*, donde se inactivaron los genes para la D-alanilación, se observó un aumento de los niveles de glicosilación en los LTA de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 [32]. Queda pendiente la investigación para dilucidar si la glicosilación del LTA está involucrada en el reconocimiento de la S-layer en *Lactobacillus acidophilus*. Dos observaciones apoyan como posible hipótesis que el reconocimiento de la S-layer a los LTA sea mediante las glicosilaciones de los mismos. La primera es que cuando *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se creció en una alta concentración salina una gran proporción de la proteína S-layer se observó en el sobrenadante y además la unión del GFP-CT1 al lactobacilo disminuyó (Figura 51 y 33). Esta disminución podría ser consecuencia por un lado de una reducción en las glicosilaciones de los LTA, en contraste a lo reportado para *Staphylococcus aureus* donde ocurre un aumento de la glicosilación de los LTA cuando la bacteria es crecida en condiciones de alta sal [146] o por una disminución en el largo de las cadenas de LTA que provocaría un aumento de la liberación de la S-layer, en concordancia con los hallazgos previos para *Lactobacillus casei* donde se reportó una disminución de la longitud del LTA en condiciones de alto contenido de sal en el medio de cultivo [24]. Como perspectiva de trabajo y para poder responder estos interrogantes es necesario obtener la estructura detallada de los LTA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Fue posible predecir mediante un modelado bioinformático la estructura del dominio carboxilo-terminal, identificándose como los probables sitios de unión a carbohidratos a los residuos tirosina. Esto se verificó experimentalmente mediante el *quenching* de fluorescencia de las tirosinas (Figura 38 y 39).

Por otro lado, fue evaluado el crecimiento de la bacteria y la expresión de la proteína S-layer en condiciones de un estrés osmótico; los lactobacilos están normalmente sometidos a un estrés salino en su hábitat natural, en los procesos industriales y

también a lo largo del pasaje por el tracto gastrointestinal. Respecto al crecimiento de *Lactobacillus acidophilus*, se observó que remover la S-layer de la pared bacteriana provocó un retraso en el crecimiento tanto en condiciones de estrés salino como en condiciones control (Figura 45), el estricto requisito de la S-layer para el crecimiento en condiciones normales fue establecido por Goh y colaboradores teniendo en cuenta que una mutante *knock-out* de los genes *slp* de *Lactobacillus acidophilus* NCFM expresó *slpA* y *slpX* ó *slpB* y *slpX* simultáneamente [120], lo que indica que al menos un gen de proteína S-layer funcional es esencial para el crecimiento de los lactobacilos portadores de S-layer. Las variaciones en la expresión proteica de las S-layers mediadas por estrés han sido ampliamente estudiadas en *Lactobacillus* sp. por ejemplo, en *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 se observó una expresión diferencial de los genes *slpB* y *slpD* dependiendo del contenido de oxígeno del medio; mientras que en condiciones aeróbicas se detectó la expresión de ambos genes, cuando la bacteria fue crecida en condiciones anaeróbicas solo se observó la expresión de *slpB*. [123]. Respecto a la expresión de S-layer en condiciones de estrés salino, en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 se observó un aumento de la expresión de *slpA* en presencia de un estrés osmótico impuesto por sales biliares [147], asimismo en *Lactobacillus acidophilus* IBB 801, se detectó un aumento de la síntesis de S-layer cuando la cepa se creció en presencia de sales biliares o NaCl [55].

Respecto a la expresión de la proteína S-layer en condiciones de estrés salino en *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, se observaron perfiles diferenciales de expresión de los genes *slp* dependientes de la fase de crecimiento. Observándose un aumento en la expresión de *slpA* y *slpX* en condiciones de estrés salino, principalmente en la etapa de crecimiento estacionaria (Figura 50). En esta tesis se demostró que se requiere aumentar la concentración de NaCl por encima de 0,6 M (3,5% m/v) para que se vea aumentada la expresión de la S-layer auxiliar SlpX.

Un rol de cubierta protectora fue propuesto para la S-layer, pudiendo proteger a *Lactobacillus* de diversos factores ambientales, como el estrés mecánico y osmótico [42], [148], el aumento de la expresión génica de S-layer en condiciones de estrés osmótico se puede relacionar con la necesidad de mantener la integridad de la estructura celular. El requerimiento de la S-layer para el crecimiento incluso en condiciones normales, podría explicarse según lo descrito por Palomino y

colaboradores (2016) en donde se observó que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee una cantidad 3 veces menor de peptidoglicano en comparación con una cepa sin S-layer como *Lactobacillus casei* y en condiciones de alta salinidad, se observó una disminución de 2 veces en el peptidoglicano y un aumento de la fragilidad de la pared lo que puede determinar la necesidad de un componente externo para contrarrestar esa fragilidad.

Aunque es de esperar una correlación entre la transcripción y la traducción, esto no se observó en el caso de las proteínas S-layer. En parte podría ser explicado por el plegamiento diferencial de los ARNm de la *slpA* y *slpX* (Figura 56) que daría lugar a una eficiencia de traducción diferente entre ambos mensajeros. Además, una gran proporción de la proteína S-layer se libera al sobrenadante (Figura 51) y no puede descartarse la posibilidad de una mayor actividad proteolítica en condiciones de alta sal como se describe para *Lactobacillus casei* [37], lo que podría influir en la concentración final de proteína localizada en la superficie.

Las proteínas S-layers de *Lactobacillus* generalmente se consideran como no glicosiladas, sin embargo, en los últimos años se ha informado sobre la naturaleza glicoproteica de la S-layer de *Lactobacillus buchneri* 41021/251, CD034 y NRRL B-30929, *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus plantarum* 41021/252 y varias cepas de *Lactobacillus kefir*. En una investigación previa realizada por Martínez y colaboradores evaluando la naturaleza glicoproteica de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, no se obtuvieron resultados concluyentes. Es por ello, que se decidió evaluar la glicosilación de la proteína mediante un lectin-Blot, la S-layer fue reconocida por ConA (lectina de unión a manosa y glucosa) y por tinción utilizando reactivos que revelan glicoproteínas, obteniéndose que la S-layer está glicosilada (Figura 40). Al realizar un análisis de la secuencia aminoacídica se verificó la presencia de nueve secuencias consenso (Asn-X-Ser / Thr) características para N-glicosilaciones, 8 presentes en el dominio amino-terminal y una en dominio carboxilo-terminal de la SlpA madura. Además no se halló la presencia del péptido SSASSASSA, en la secuencia de SlpA, identificado como un motivo de O-glicosilación en *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus kefir* [113], [149].

Como se mencionó en la Introducción el género *Lactobacillus* se encuentra presente en los tractos vaginal y gastrointestinal y es ampliamente reconocido como

microorganismo promotor de la salud en los seres humanos. *Lactobacillus acidophilus* es residente del tracto gastrointestinal y es allí donde ejercería su rol como probiótico. Para que una cepa sea considerada probiótica, debe cumplir con ciertos requisitos como la seguridad, la tolerancia a las condiciones gastrointestinales, la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal y la competencia con patógenos. En particular, la adhesión al epitelio intestinal permite la colonización de los microorganismos probióticos en el tracto intestinal humano, y generalmente está mediada por proteínas de adhesión a la superficie celular y esto resulta en la persistencia de las bacterias en el intestino. Por otra parte, el epitelio intestinal está recubierto por la mucosa intestinal, compuesta en parte por mucinas, que son una familia de glicoproteínas de alto peso molecular secretadas por las células epiteliales. Las mucinas epiteliales y los O-glicanos unidos a la mucina desempeñan un doble papel en la infección bacteriana ya que por un lado median la adhesión de las bacterias a las células epiteliales, y por el otro actúan como citoprotectoras atrapando a los patógenos en el gel de mucina. Siendo las proteínas S-layers las primeras en tener contacto con las células del epitelio, es lógico pensar que podrían ser de gran importancia en la adhesión de los lactobacilos al intestino. De hecho, la adhesión de *Lactobacillus acidophilus* M92 al epitelio intestinal de cerdo y a las células epiteliales ileales de ratón se redujo cuando se eliminó la S-layer por un tratamiento de la bacteria con LiCl [53], asimismo una cepa de *Lactobacillus acidophilus* NCFM mutante para *slpA* perdió su capacidad de adherirse a células Caco-2 [107]. En este aspecto, los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran por un lado que, la S-layer pura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 es capaz de interactuar con células del epitelio intestinal (células Caco-2, Caco-2 TC/7 y HT-29) (Figura 23 y 24). Por otro lado, también se demostró la interacción de la S-layer pura con las mucinas, la fibronectina y el colágeno mediante ensayos de *dot-blot* (Figura 25). Asimismo, se logró establecer que los CRD de la porción carboxilo terminal están involucrados en la interacción con las mucinas, mientras que la porción amino terminal lo estaría en la interacción con la fibronectina y el colágeno (Figura 27 y 29). Sin embargo, cuando se analizó la interacción de ambos dominios con las células epiteliales vivas, el dominio CT sí se unió, pero sorprendentemente el dominio NT no interactuó con ninguna de las dos líneas celulares evaluadas (Figuras 35 y 36). Tal vez sea un problema de conformación de la proteína quimérica NT-GFP que en condiciones

in-vivo no pueda reconocer a estas dos proteínas, componentes de la matriz extracelular. Si bien todos estos resultados, señalan a la S-layer presente en la superficie de la bacteria cómo un potencial factor involucrado en la interacción con las células epiteliales, cuando la proteína S-layer forma parte de la bacteria interactuaría a través de los CRD del dominio CT con los LTA de la pared y no podría interactuar a través de este dominio con las mucinas. Aún resta identificar con precisión el mecanismo y las proteínas celulares involucradas en la interacción y todavía no es posible descartar que las mucinas sean las proteínas celulares implicadas en dicha interacción.

En los últimos años se han desarrollado o sugerido diversas aplicaciones biológicas para las proteínas S-layers obtenidas a partir de *Lactobacillus*, entre ellas utilizarlas como *carriers* en la inmunización oral de humanos o animales, y como agentes anti-adhesivos o preventivos contra enfermedades infecciosas bacterianas y virales [42]. El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos para combatir tanto a las bacterias resistentes a los antibióticos en uso clínico, como a las infecciones virales aún sin terapia disponible, es una necesidad imperiosa.

En particular, el bloqueo de la adherencia de las bacterias a las células eucariotas es un enfoque atractivo, complementario a los tratamientos actuales con antibióticos. La terapia anti-adhesiva con lectinas parece ser una estrategia prometedora contra el desarrollo de biopelículas en superficies bióticas y abióticas, impidiendo la adhesión temprana y, por lo tanto, el crecimiento de las bacterias. Dentro de este pensamiento los enzibióticos o antibióticos peptídicos son candidatos prometedores para utilizar en las terapias anti-adhesivas, por ejemplo, la utilización de hidrolasas, para prevenir o provocar la disrupción de las biopelículas mediante la degradación de los exopolisacáridos secretados por *Pseudomonas aeruginosa* [150]. La proteína S-layer podría ser utilizada con esa finalidad en vista de que fue capaz de inhibir la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* tanto a una superficie biótica cómo abiótica, resaltando su posible utilización como un agente antimicrobiano (Figura 65 y 66).

Respecto a la prevención de la infección viral, una de las estrategias utilizadas para el desarrollo de drogas antivirales es bloquear las glicoproteínas de la superficie viral, que interactúan con los receptores celulares, impidiendo así la entrada del virus a la célula hospedadora [101]. La presencia de glicanos en la superficie de los virus animales es

una característica de vital importancia para poder llevar a cabo la infección. Dentro de la caracterización de la actividad tipo lectina de la S-layer pura, se pudo establecer que la proteína es capaz de interactuar con partículas virales glicosiladas (HSV-1, VSV, AdV-5) a través de los CRD, pero sin inactivarlas (Figuras 17 y 18). Por lo tanto, no se podría pensar en su utilización como un agente virucida, que afecte la infectividad de las partículas virales cuando están fuera de la célula hospedadora. Sin embargo, la proteína S-layer podría ser utilizada como un método de concentración para detectar partículas virales en muestras naturales. Gracias a su capacidad intrínseca de formar productos auto-ensamblados y cubrir completamente nanopartículas [46], se podría asociar la S-layer a nanopartículas magnéticas para capturar a los virus y analizarlos posteriormente por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [151].

Por otra parte, en trabajos previos sí se reportó a la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 como un agente antiviral capaz de interferir con la multiplicación del virus Junín, del virus Influenza A H9N2, y del virus de la diarrea epidémica porcínavirus (PEDV) Martínez et al., 2012; Zhang, Li, Zheng, & Hou, 2019). Por el contrario, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, le adjudican un rol pro-viral a la proteína S-layer en la modulación de la multiplicación de HSV-1, VSV y AdV-5, ya que se obtuvo un marcado aumento de la infectividad cuando la proteína estuvo presente durante la adsorción viral (Figuras 57 y 59). Además, el efecto se contrarrestó con D-manosa, indicando que los CRD de la S-layer están involucrados en dicho aumento (Figura 60).

Este comportamiento de la proteína S-layer con roles opuestos en la infección de diferentes virus podría compararse con lo observado en las Galectinas. La Galectina-1 es capaz de interactuar con el virus Influenza aviar, reduciendo la infectividad de distintos subtipos [153]; y con el virus Dengue-1, inhibiendo la adsorción e internalización viral [154]. Pero también se demostró que la Galectina-1 favorece la interacción de la glicoproteína viral gp120 de HIV con el receptor celular CD4 facilitando así la entrada del virus [155]. Por otro lado, la Galectina 3 interactúa a través de sus CRD con las mucinas transmembrana presentes en las células epiteliales de la superficie ocular, formando una malla resistente. En el epitelio corneal, la asociación de Galectina 3 con las mucinas transmembrana contribuye al mantenimiento de la barrera epitelial que limita el acceso de los virus a su huésped

[156]. Sin embargo, a pesar de su rol protector la Galectina 3 es capaz de aumentar la interacción de HSV-1 con las células hospedadoras [157].

Tal como se describió en la Introducción, el mecanismo de acción antiviral propuesto en los trabajos previos para el virus Junín y el virus Influenza A, se asocia con la interacción de la S-layer y el receptor DC-SIGN [48], [64]. Sin embargo, no se han establecido las características de dicha unión. Ahora, teniendo en cuenta que ambas proteínas tienen propiedad de lectina, y que la S-layer está glicosilada, podría ocurrir que el DC-SIGN esté reconociendo dichas glicosilaciones o que la interacción esté mediada por los CRD de la S-layer.

En el caso de la actividad pro-viral, el mecanismo propuesto en este trabajo de Tesis es que la S-layer se comporta como una proteína accesoria que facilita la interacción del virus con su receptor celular aumentando la adsorción y/o entrada viral, aunque restan experimentos que confirmen esta hipótesis.

Frente a estos resultados, una posible aplicación biotecnológica sería emplearla en la inmunoterapia oncolítica, un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer, que utiliza virus como HSV, VSV y AdV modificados, que se replican preferentemente en células tumorales [158], [159]. Los virus oncolíticos lisan directamente las células tumorales, lo que lleva a la liberación de antígenos solubles, señales de daño e Interferón de tipo I, que activan la inmunidad antitumoral del huésped [160]. A nivel mundial, hay tres virus oncolíticos aprobados, un adenovirus (H101) para el tratamiento del cáncer avanzado de cabeza y cuello en China; un reovirus (Rigvir) aprobado para el tratamiento del melanoma avanzado en Estonia, Letonia, Polonia y Bielorrusia, y un herpesvirus (T-VEC), aprobado para el tratamiento del melanoma avanzado en los Estados Unidos, Europa y Australia [160], [161]. Sin embargo, su aplicación exitosa en la clínica se ha visto obstaculizada por la rápida eliminación mediada por el sistema inmunitario o la neutralización del virus, lo que reduce el acceso viral a los focos tumorales [162]. Entonces, por un lado la S-layer podría promover una mayor entrada de los virus oncolíticos a las células cancerígenas y por el otro, al menos en el caso de HSV, podría estabilizar al virus frente a la neutralización por anticuerpos, como lo hizo ante la inactivación por calor (Figura 61). Esta última propiedad observada en la S-layer, también fue descrita para la Galectina 1 con el enterovirus 71, cuya

multiplicación y estabilidad térmica se favorece por la interacción con dicha lectina [163].

En conjunto estos resultados aportan a comprender las características estructurales y funcionales de la S-layer, y permiten proponer futuras aplicaciones biológicas para esta proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. J. Claesson, D. Sinderen, and P. W. O'Toole, "The genus *Lactobacillus*---a genomic basis for understanding its diversity," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 269, 2007.
- [2] M. C. Allievi, S. M. Ruzal, and M. M. Palomino, "Modifications of *Lactobacillus* Surface Under Environmental Stress Conditions," in *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*, no. *Lactobacillus*, S. M. Ruzal, Ed. 2019, pp. 80–103.
- [3] M. J. Claesson, D. van Sinderen, and P. W. O'Toole, "*Lactobacillus* phylogenomics - towards a reclassification of the genus," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 58, no. 12, pp. 2945–2954, Dec. 2008.
- [4] M. D. Collins *et al.*, "Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 77, no. 1, pp. 5–12, Jan. 1991.
- [5] Z. Sun *et al.*, "Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera," *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015.
- [6] B. R. Goldin, S. L. Gorbach, M. Saxelin, S. Barakat, L. Gualtieri, and S. Salminen, "Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 121–128, Jan. 1992.
- [7] L. Bertuccini, R. Russo, and F. Iosi, "Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens," *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 30(2), pp. 163–167, 2017.
- [8] B. B. Oakley, T. L. Fiedler, J. M. Marrazzo, and D. N. Fredricks, "Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 15, pp. 4898–909, Aug. 2008.
- [9] D. E. O'Hanlon, T. R. Moench, and R. A. Cone, "Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota," *PLoS One*, vol. 8, no. 11, p. e80074, Nov. 2013.

- [10] S. Kaewnopparat, N. Dangmanee, N. Kaewnopparat, T. Srichana, M. Chulasiri, and S. Settharaksa, "In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman," *Anaerobe*, vol. 22, pp. 6–13, Aug. 2013.
- [11] J. Osset, R. M. Bartolomé, E. García, and A. Andreu, "Assessment of the Capacity of *Lactobacillus* to Inhibit the Growth of Uropathogens and Block Their Adhesion to Vaginal Epithelial Cells," *J. Infect. Dis.*, vol. 183, no. 3, pp. 485–491, Feb. 2001.
- [12] T. L. Cherpes, M. A. Melan, J. A. Kant, L. A. Cosentino, L. A. Meyn, and S. L. Hillier, "Genital Tract Shedding of Herpes Simplex Virus Type 2 in Women: Effects of Hormonal Contraception, Bacterial Vaginosis, and Vaginal Group B *Streptococcus* Colonization," vol. 40, no. September, pp. 0–6, 2017.
- [13] M. Hickson *et al.*, "Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial," *BMJ*, vol. 335, no. 7610, p. 80, Jul. 2007.
- [14] F. M. Trejo, J. Minnaard, P. F. Perez, and G. L. De Antoni, "Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion to enterocytes by Bifidobacterium supernatants," *Anaerobe*, vol. 12, no. 4, pp. 186–193, 2006.
- [15] P. Carasi, S. M. Racedo, C. Jacquot, D. E. Romanin, M. A. Serradell, and M. C. Urdaci, "Impact of kefir derived *Lactobacillus kefiri* on the mucosal immune response and gut microbiota," *J. Immunol. Res.*, vol. 2015, 2015.
- [16] P. F. Fox, J. M. Wallace, S. Morgan, C. M. Lynch, E. J. Niland, and J. Tobin, "Acceleration of cheese ripening," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 70, no. 2–4, pp. 271–97, Oct. 1996.
- [17] L. Søndergaard *et al.*, "Impact of NaCl reduction in Danish semi-hard Samsøe cheeses on proliferation and autolysis of DL-starter cultures," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 213, pp. 59–70, Nov. 2015.
- [18] H. Hahne *et al.*, "A comprehensive proteomics and transcriptomics analysis of *Bacillus subtilis* salt stress adaptation," *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 3, pp. 870–882,

- 2010.
- [19] S. Avall-Jaskelainen and A. Palva, “*Lactobacillus* surface layers and their applications,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 3 SPEC. ISS., pp. 511–529, 2005.
- [20] F. C. A. Buriti, J. S. da Rocha, and S. M. I. Saad, “Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage,” *Int. Dairy J.*, vol. 15, no. 12, pp. 1279–1288, Dec. 2005.
- [21] L. Ong, A. Henriksson, and N. Shah, *International dairy journal*. Elsevier Science, 2007.
- [22] A. Kasımoğlu, M. Göncüoğlu, and S. Akgün, “Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*,” *Int. Dairy J.*, vol. 14, no. 12, pp. 1067–1073, Dec. 2004.
- [23] M. Piuri, C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal, “Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, no. 1, pp. 84–95, 2005.
- [24] M. M. Palomino, M. C. Allievi, A. Gründling, C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal, “Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid,” *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 159, no. PART11, 2013.
- [25] M. C. Machado, C. S. López, H. Heras, and E. A. Rivas, “Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 422, no. 1, pp. 61–70, Feb. 2004.
- [26] M. L. F. Murga, G. M. Cabrera, G. F. de Valdez, A. Disalvo, and A. M. Seldes, “Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 88, no. 2, pp. 342–348, Feb. 2000.
- [27] M.-P. Chapot-Chartier and S. Kulakauskas, “Cell wall structure and function in lactic acid bacteria,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 13 Suppl 1, no. Suppl 1, p. S9, Aug.

- 2014.
- [28] T. Shiraishi, S. Yokota, S. Fukiya, and A. Yokota, "Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria.," *Biosci. microbiota, food Heal.*, vol. 35, no. 4, pp. 147–161, 2016.
- [29] P. M. Sánchez Carballo, H. Vilen, A. Palva, and O. Holst, "Structural characterization of teichoic acids from *Lactobacillus brevis*," *Carbohydr. Res.*, vol. 345, no. 4, pp. 538–542, 2010.
- [30] S. Tomita *et al.*, "Comparison of Components and Synthesis Genes of Cell Wall Teichoic Acid among *Lactobacillus plantarum* Strains," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 5, pp. 928–933, 2010.
- [31] E. Palumbo *et al.*, "D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin," *J. Bacteriol.*, vol. 188, no. 10, pp. 3709–3715, 2006.
- [32] M. P. Vélez *et al.*, "Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 11, pp. 3595–3604, 2007.
- [33] M. G. Percy and A. Gründling, "Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 68, no. 1, pp. 81–100, Sep. 2014.
- [34] K. Selle *et al.*, "Deletion of Lipoteichoic Acid Synthase Impacts Expression of Genes Encoding Cell Surface Proteins in *Lactobacillus acidophilus*," *Front. Microbiol.*, vol. 8, p. 553, Apr. 2017.
- [35] M. M. Palomino, M. C. Allievi, A. Gründling, C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal, "Osmotic stress adaptation in *Lactobacillus casei* BL23 leads to structural changes in the cell wall polymer lipoteichoic acid," *Microbiology*, vol. 159, no. Pt 11, pp. 2416–2426, 2013.

- [36] S. Lebeer, J. Vanderleyden, S. C. J. De Keersmaecker, S. C. J. De Keersmaecker, and S. C. J. De Keersmaecker, "Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 4, p. 728–764, Table of Contents, Dec. 2008.
- [37] M. Piuri, C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal, "Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes," 2003.
- [38] M. Sára and U. B. Sleytr, "MINIREVIEW S-Layer Proteins," *J. Bacteriol.*, vol. 182, no. 4, pp. 859–868, 2000.
- [39] U. B. Sleytr, B. Schuster, E. Egelseer, and D. Pum, "S-layers : principles and applications," *FEMS Microbiol Rev*, no. October, 2014.
- [40] C. M. Khursigara, S. F. Koval, D. M. Moyles, and R. J. Harris, "Inroads through the bacterial cell envelope : seeing is," *Can. J. Microbiol*, vol. 617, no. August, pp. 601–617, 2018.
- [41] U. B. Sleytr, C. Huber, N. Ilk, D. Pum, B. Schuster, and E. M. Egelseer, "S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 267, no. 2, pp. 131–144, 2007.
- [42] U. Hynönen and A. Palva, "*Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 12, pp. 5225–5243, 2013.
- [43] H. J. Boot and C. P. A. M. Kolen, "Identification , Cloning , and Nucleotide Sequence of a Silent S-Layer Protein Gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Which Has Extensive Similarity with the S-Layer Protein Gene of This Species," *J. Bacteriol.*, vol. 177, no. 24, pp. 7222–7230, 1995.
- [44] M. M. Palomino *et al.*, "Draft Genome Sequence of the Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356," *Genome Announcements*, vol. 3, no. 1, pp. 7–8, 2015.
- [45] E. Smit, F. Oling, R. Demel, B. Martinez, and P. H. Pouwels, "The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of

- domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding.," *J. Mol. Biol.*, vol. 305, pp. 245–257, 2001.
- [46] M. Malamud *et al.*, "S-Layer Proteins from Lactobacilli: Biogenesis, Structure, Functionality and Biotechnological Applications," in *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering*, S. M. Ruzal, Ed. 2019, pp. 105–129.
- [47] E. Smit and P. H. Pouwels, "One repeat of the cell wall binding domain is sufficient for anchoring the *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 16, pp. 4617–4619, 2002.
- [48] M. G. Martínez, M. Prado Acosta, N. A. Candurra, and S. M. Ruzal, "S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 422, no. 4, pp. 590–595, Jun. 2012.
- [49] S. Avall-Jääskeläinen, U. Hynönen, N. Ilk, D. Pum, U. B. Sleytr, and A. Palva, "Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287.," *BMC Microbiol.*, vol. 8, no. 1, p. 165, Oct. 2008.
- [50] C. Zhu *et al.*, "Diversity in S-layers," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 123, pp. 1–15, Jan. 2016.
- [51] Allievi *et al.*, "Metal biosorption by surface-layer proteins from *Bacillus* species," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 21, no. 2, pp. 147–153, 2011.
- [52] S. Jordan, M. I. Hutchings, and T. Mascher, "Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 1, pp. 107–146, 2008.
- [53] J. Frece *et al.*, "Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 98, no. 2, pp. 285–292, Feb. 2005.
- [54] H. Engelhardt, "Mechanism of osmoprotection by archaeal S-layers: A theoretical study," *J. Struct. Biol.*, vol. 160, no. 2, pp. 190–199, Nov. 2007.
- [55] S.-S. S. Grosu-Tudor *et al.*, "S-layer production by *Lactobacillus acidophilus* IBB

- 801 under environmental stress conditions," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 10, pp. 4573–4583, May 2016.
- [56] S. Koch, G. Oberson, E. Eugster-Meier, L. Meile, and C. Lacroix, "Osmotic stress induced by salt increases cell yield, autolytic activity, and survival of lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 117, no. 1, pp. 36–42, Jun. 2007.
- [57] D. Pum, J. L. Toca-Herrera, and U. B. Sleytr, "S-layer protein self-assembly," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 2484–501, Jan. 2013.
- [58] S. Hu, J. Kong, Z. Sun, L. Han, W. Kong, and P. Yang, "Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the s-layer protein," *Microb. Cell Fact.*, vol. 10, no. 1, p. 86, 2011.
- [59] S. Mesnage, E. Tosi-Couture, and A. Fouet, "Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase," *Mol. Microbiol.*, vol. 31, no. 3, pp. 927–936, Feb. 1999.
- [60] M. A. Golowczyc, P. Mobili, G. L. Garrote, A. G. Abraham, and G. L. De Antoni, "Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 118, no. 3, pp. 264–73, Sep. 2007.
- [61] P. Carasi, F. M. Trejo, P. F. Pérez, G. L. De Antoni, and M. de los A. Serradell, "Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins," *Anaerobe*, vol. 18, no. 1, pp. 135–142, Feb. 2012.
- [62] M. Prado Acosta, M. M. Palomino, M. C. Allievi, C. S. Rivas, and S. M. Ruzal, "Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 24, pp. 7824–7827, Dec. 2008.
- [63] M. Prado-Acosta, S. M. Ruzal, M. C. Allievi, M. M. Palomino, and C. Sanchez Rivas, "Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 3, pp. 974–977,

- 2010.
- [64] X. Gao, L. Huang, L. Zhu, C. Mou, Q. Hou, and Q. Yu, "Inhibition of H9N2 Virus Invasion into Dendritic Cells by the S-Layer Protein from *L. acidophilus* ATCC 4356 Xue," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 6, no. October, Oct. 2016.
- [65] S. R. Konstantinov *et al.*, "S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 49, pp. 19474–9, Dec. 2008.
- [66] T. Minko, "Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 4, pp. 491–509, Mar. 2004.
- [67] J. Bouckaert *et al.*, "Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the Escherichia coli FimH adhesin," *Mol. Microbiol.*, vol. 55, no. 2, pp. 441–455, Nov. 2004.
- [68] G. A. Rabinovich, M. A. Toscano, S. S. Jackson, and G. R. Vasta, "Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 17, no. 5, pp. 513–20, Oct. 2007.
- [69] A. F. Santos, M. D. Da Silva, T. H. Napoleão, P. M. G. Paiva, C. M. T. Dos Santos, and L. C. B. B. Coelho, "Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications," *Curr. Top. Pept. Protein*, vol. 15, 2014.
- [70] N. Sharon and H. Lis, *Lectins*. Springer Netherlands, 2007.
- [71] D. Wang and A. M. Wu, "Carbohydrate Microarrays for Lectin Characterization and Glyco-Epitope Identification," in *Lectins*, Elsevier, 2007, pp. 167–192.
- [72] L. Zhang, S. Luo, and B. Zhang, "The use of lectin microarray for assessing glycosylation of therapeutic proteins.," *MAbs*, vol. 8, no. 3, pp. 524–35, 2016.
- [73] J. J. Lyons, J. D. Milner, and S. D. Rosenzweig, "Glycans Instructing Immunity: The Emerging Role of Altered Glycosylation in Clinical Immunology," *Front. Pediatr.*, vol. 3, Jun. 2015.
- [74] W. J. Peumans, Q. Hao, and E. J. Van Damme, "Ribosome-inactivating proteins

- from plants: more than RNA N-glycosidases?," *FASEB J.*, vol. 15, no. 9, pp. 1493–506, Jul. 2001.
- [75] E. A. Machala, B. P. McSharry, B. T. Rouse, A. Abendroth, and B. Slobedman, "Gal power: the diverse roles of galectins in regulating viral infections," *J. Gen. Virol.*, pp. 1–17, 2019.
- [76] K. Kolbe, S. K. Veleti, N. Reiling, and T. K. Lindhorst, "Lectins of *Mycobacterium tuberculosis* – rarely studied proteins," *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2019.
- [77] A. Wellens *et al.*, "The Tyrosine Gate as a Potential Entropic Lever in the Receptor-Binding Site of the Bacterial Adhesin FimH," *Biochemistry*, vol. 51, no. 24, pp. 4790–4799, Jun. 2012.
- [78] M. A. Golowczyc, P. Mobili, G. L. Garrote, M. de los Angeles Serradell, A. G. Abraham, and G. L. De Antoni, "Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins," *J. Dairy Res.*, vol. 76, no. 01, p. 111, Feb. 2009.
- [79] L. C. B. B. Coelho, P. Marcelino, S. Silva, and W. F. De Oliveira, "Lectins as antimicrobial agents," 2018.
- [80] M. Piuri, W. R. Jacobs, and G. F. Hatfull, "Fluoromycobacteriophages for Rapid, Specific, and Sensitive Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis*," *PLoS One*, vol. 4, no. 3, p. e4870, Mar. 2009.
- [81] M. E. Dieterle *et al.*, "Exposing the secrets of two well-known *Lactobacillus casei* phages, J-1 and PL-1, by genomic and structural analysis.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 22, pp. 7107–21, Nov. 2014.
- [82] S. Morath, A. Geyer, and T. Hartung, "Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 3, pp. 393–7, Feb. 2001.
- [83] A. Grundling and O. Schneewind, "Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic

- acid in *Staphylococcus aureus*,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, no. 20, pp. 8478–8483, May 2007.
- [84] J. A. Naughton *et al.*, “Divergent Mechanisms of Interaction of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with Mucus and Mucins,” no. August, pp. 2838–2850, 2013.
- [85] M. Prado Acosta, M. Mercedes Palomino, M. C. Allievi, C. Sanchez Rivas, and S. M. Ruzal, “Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 24, pp. 7824–7827, 2008.
- [86] P. P. Bose *et al.*, “A glucose/mannose binding lectin from litchi (*Litchi chinensis*) seeds: Biochemical and biophysical characterizations,” *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 6, pp. 242–252, Jul. 2016.
- [87] D. K. Patel, K. R. Shah, A. Pappachan, S. Gupta, and D. D. Singh, “Cloning, expression and characterization of a mucin-binding GAPDH from *Lactobacillus acidophilus*,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 91, pp. 338–346, 2016.
- [88] R. F. Cleveland, A. J. Wicken, L. Daneo-Moore, and G. D. Shockman, “Inhibition of wall autolysis in *Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids,” *J. Bacteriol.*, vol. 126, no. 1, pp. 192–7, Apr. 1976.
- [89] E. Bönisch *et al.*, “Lipoteichoic acid mediates binding of a *Lactobacillus* S-layer protein,” *Glycobiology*, vol. 28, no. 3, pp. 148–158, 2018.
- [90] P. Carasi, N. M. Ambrosis, G. L. De Antoni, P. Bressollier, M. C. Urdaci, and M. D. L. A. Serradell, “Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus,” *J. Dairy Res.*, vol. 81, no. 1, pp. 16–23, 2014.
- [91] L. Gasmi, J. Ferré, and S. Herrero, “High Bacterial Agglutination Activity in a Single-CRD C-Type Lectin from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).,” *Biosensors*, vol. 7, no. 1, Mar. 2017.
- [92] S. Galié, C. García-Gutiérrez, E. M. Miguélez, C. J. Villar, and F. Lombó, “Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods,” *Front. Microbiol.*,

- vol. 9, p. 898, May 2018.
- [93] H. Lund-Palau *et al.*, “*Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches,” *Expert Rev. Respir. Med.*, vol. 10, no. 6, pp. 685–697, Jun. 2016.
- [94] X. Song *et al.*, “A sialylated glycan microarray reveals novel interactions of modified sialic acids with proteins and viruses,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 36, pp. 31610–22, Sep. 2011.
- [95] K. S. Brown *et al.*, “Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry,” *Protein cell*, 2010.
- [96] A. C. S. Gondim *et al.*, “Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity,” *Medchemcomm*, 2019.
- [97] M. K. Kukhanova, A. N. Korovina, and S. N. Kochetkov, “Human herpes simplex virus: Life cycle and development of inhibitors,” *Biochem.*, vol. 79, no. 13, pp. 1635–1652, Dec. 2014.
- [98] Organización mundial de la Salud, “Virus del herpes simple,” 2017. [Online]. Available: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. [Accessed: 28-Feb-2019].
- [99] D. S. Lyles, K. I. V., and C. E. Rupprecht, “*Rhabdoviridae*,” in *Fields Virology*, 6th ed., B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds. Philadelphia, 2013, pp. 885–922.
- [100] B. Saha, C. Wong, R. Parks, B. Saha, C. M. Wong, and R. J. Parks, “The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion,” *Viruses*, vol. 6, no. 9, pp. 3563–3583, Sep. 2014.
- [101] R. Kaur, Neetu, R. Mudgal, J. Jose, P. Kumar, and S. Tomar, “Glycan-dependent chikungunya viral infection divulged by antiviral activity of NAG specific chi-like lectin,” *Virology*, vol. 526, pp. 91–98, Jan. 2019.
- [102] M. D. Blanco Fernández, M. E. Barrios, R. V. Cammarata, C. Torres, O. A. Taboga,

- and V. A. Mbayed, "Comparison of internal process control viruses for detection of food and waterborne viruses," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 10, pp. 4289–4298, May 2017.
- [103] T. Mukai, K. Arihara, and H. Itoh, "Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* strain JCM 1026," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 98, no. 1–3, pp. 71–74, Nov. 1992.
- [104] M. Yamada, T. Saito, T. Toba, H. Kitazawa, J. Uemura, and T. Itoh, "Hemagglutination Activity of *Lactobacillus acidophilus* Group Lactic Acid Bacteria," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 58, no. 5, pp. 910–915, Jan. 1994.
- [105] R. Campana, S. Federici, E. Ciandrini, and W. Baffone, "Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*," *Curr. Microbiol.*, vol. 64, no. 4, pp. 371–8, Apr. 2012.
- [106] Z. Wu, G. Wang, W. Wang, D. Pan, L. Peng, and L. Lian, "Proteomics Analysis of the Adhesion Activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Upon Growth in an Intestine-Like pH Environment," *Proteomics*, vol. 18, no. 5–6, p. 1700308, Mar. 2018.
- [107] B. L. Buck, E. Altermann, T. Svingerud, and T. Klaenhammer, "Functional analysis of adhesion factors and signaling mechanisms in *Lactobacillus acidophilus* NCFM," vol. 71, no. 12, pp. 8344–8351, 2006.
- [108] J. G. S. Ho, A. Greco, M. Rupnik, and K. K.-S. Ng, "Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 51, pp. 18373–18378, Dec. 2005.
- [109] C. von Eichel-Streiber, M. Sauerborn, and H. K. Kuramitsu, "Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases," *J. Bacteriol.*, vol. 174, no. 20, pp. 6707–6710, 1992.
- [110] J. An *et al.*, "Anti-HIV I/II activity and molecular cloning of a novel mannose/sialic acid-binding lectin from rhizome of *Polygonatum cyrtoneuma* Hua," *Acta*

- Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 38, no. 2, pp. 70–78, 2006.
- [111] S. Zoll *et al.*, “Ligand-binding properties and conformational dynamics of autolysin repeat domains in staphylococcal cell wall recognition.,” *J. Bacteriol.*, vol. 194, no. 15, pp. 3789–802, Aug. 2012.
- [112] E. J. Sosa *et al.*, “Target-Pathogen: a structural bioinformatic approach to prioritize drug targets in pathogens.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D413–D418, Jan. 2018.
- [113] G. J. Cavallero, M. Malamud, A. C. Casabuono, M. de L. Á. Serradell, and A. S. Couto, “A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated.,” *J. Proteomics*, vol. 162, pp. 20–29, Jun. 2017.
- [114] S. R. Konstantinov *et al.*, “S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 49, pp. 19474–9, 2008.
- [115] M. M. Palomino, C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal, “High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4* as a peptidoglycan hydrolase,” *Res. Microbiol.*, vol. 160, no. 2, pp. 117–124, 2009.
- [116] T. R. Klaenhammer, R. Barrangou, B. L. Buck, M. A. Azcarate-Peril, and E. Altermann, “Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health,” *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 3 SPEC. ISS., pp. 393–409, 2005.
- [117] M. Minekus *et al.*, “A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 6, pp. 1113–1124, May 2014.
- [118] J. M. Wood, “Osmosensing by bacteria.,” *Sci. STKE*, vol. 2006, no. 357, p. pe43, Oct. 2006.
- [119] M. M. Palomino *et al.*, “Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 100, no. 19, pp. 8475–8484, 2016.

- [120] Y. J. Goh *et al.*, “Development and Application of a upp-Based Counterselective Gene Replacement System for the Study of the S-Layer Protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM †,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 10, pp. 3093–3105, 2009.
- [121] K. Ramiah, C. A. van Reenen, and L. M. T. Dicks, “Expression of the Mucus Adhesion Gene Mub, Surface Layer Protein Slp and Adhesion-Like Factor EF-TU of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Under Digestive Stress Conditions, as Monitored with Real-Time PCR,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 1, no. 1, pp. 91–95, 2009.
- [122] H. J. Boot and P. H. Pouwels, “Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins.,” *Mol. Microbiol.*, vol. 21, no. 1 996, pp. 1117–1123, 1996.
- [123] M. Jakava-Viljanen, S. Avall-Jääskeläinen, P. Messner, U. B. Sleytr, and A. Palva, “Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions.,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 24, pp. 6786–95, Dec. 2002.
- [124] K. Papadimitriou *et al.*, “Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria,” 2016.
- [125] J. Kok *et al.*, “Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 80, no. 3, pp. 837–890, 2016.
- [126] C. Tauer, S. Heintl, E. Egger, S. Heiss, and R. Grabherr, “Tuning constitutive recombinant gene expression in *Lactobacillus plantarum*,” 2014.
- [127] I. A. Osterman, S. A. Evfratov, P. V. Sergiev, and O. A. Dontsova, “Comparison of mRNA features affecting translation initiation and reinitiation,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 474–486, 2013.
- [128] M. Prado Acosta, S. M. Ruzal, and S. M. Cordo, “S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, pp. 998–1005, Nov. 2016.

- [129] Y. Liu, J. Liu, X. Pang, T. Liu, Z. Ning, and G. Cheng, "The roles of direct recognition by animal lectins in antiviral immunity and viral pathogenesis," *Molecules*, vol. 20, no. 2, pp. 2272–2295, 2015.
- [130] K. Sugimoto *et al.*, "Simultaneous Tracking of Capsid, Tegument, and Envelope Protein Localization in Living Cells Infected with Triply Fluorescent Herpes Simplex Virus 1," *J. Virol.*, vol. 82, no. 11, pp. 5198–5211, 2008.
- [131] T. Rasamiravaka, Q. Labtani, P. Duez, and M. El Jaziri, "The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms," *Biomed Res. Int.*, vol. 2015, pp. 1–17, Mar. 2015.
- [132] T. Talas-Oğraş, Z. Ipekçi, K. Bajrović, and N. Gözükirmizi, "Antibacterial activity of seed proteins of *Robinia pseudoacacia*," *Fitoterapia*, vol. 76, no. 1, pp. 67–72, Jan. 2005.
- [133] Z. Liu, T. Shen, P. Zhang, Y. Ma, and H. Qin, "*Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*," *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, no. 5, pp. 3471–3480, Jun. 2011.
- [134] S. Patel, N. Mathivanan, and A. Goyal, "Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 93, pp. 763–771, Sep. 2017.
- [135] M. Prado Acosta, S. M. Ruzal, and S. M. Cordo, "S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 92, 2016.
- [136] M. P. Arena, V. Capozzi, G. Spano, and D. Fiocco, "The potential of lactic acid bacteria to colonize biotic and abiotic surfaces and the investigation of their interactions and mechanisms," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 101, pp. 2641–2657, 2017.
- [137] E. Smit, F. Oling, R. Demel, B. Martinez, and P. H. Pouwels, "The S-layer Protein

- of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 : Identification and Characterisation of Domains Responsible for S-protein Assembly and Cell Wall Binding,” *J. Mol. Biol.*, vol. 305 (2), pp. 245–257, 2001.
- [138] A. Greco, J. G. S. Ho, S.-J. Lin, M. M. Palcic, M. Rupnik, and K. K.-S. Ng, “Carbohydrate recognition by *Clostridium difficile* toxin A,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 460–461, May 2006.
- [139] Y. Itakura, S. Nakamura-Tsuruta, J. Kominami, H. Tateno, and J. Hirabayashi, “Sugar-Binding Profiles of Chitin-Binding Lectins from the Hevein Family: A Comprehensive Study,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 6, p. 1160, May 2017.
- [140] E. Leyva *et al.*, “Bacterial expression, purification and biophysical characterization of wheat germ agglutinin and its four hevein-like domains,” *Biopolymers*, vol. 110, no. 1, p. e23242, Jan. 2019.
- [141] E. Altermann *et al.*, “Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 11, pp. 3906–3912, 2005.
- [142] B. Nazari, M. Kobayashi, A. Saito, A. Hassaninasab, K. Miyashita, and T. Fujii, “Chitin-Induced Gene Expression in Secondary Metabolic Pathways of *Streptomyces coelicolor* A3(2) Grown in Soil,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, no. 2, pp. 707–713, Jan. 2013.
- [143] S. Almagro-Moreno and E. F. Boyd, “Insights into the evolution of sialic acid catabolism among bacteria,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 9, no. 1, p. 118, May 2009.
- [144] J. Antikainen, L. Anton, J. Sillanpää, and T. K. Korhonen, “Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly,” *Mol. Microbiol.*, vol. 46, no. 2, pp. 381–394, Oct. 2002.
- [145] A. Mazé *et al.*, “Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23.,” *J. Bacteriol.*, vol. 192, no. 10, pp. 2647–2648, 2010.
- [146] K. Kho and T. C. Meredith, “Salt-Induced Stress Stimulates a Lipoteichoic Acid-

- Specific Three Component Glycosylation System in *Staphylococcus aureus.*," *J. Bacteriol.*, vol. 200, no. 12, pp. e00017-18, Apr. 2018.
- [147] M. Khaleghi, R. K. Kermanshahi, M. M. Yaghoobi, S. H. Zarkesh-Esfahani, and A. Baghizadeh, "Assessment of bile salt effects on S-layer production, slp gene expression and, some physicochemical properties of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20, no. 4, pp. 749–756, 2010.
- [148] E. Gerbino, P. Carasi, P. Mobili, M. A. Serradell, and A. Gómez-Zavaglia, "Role of S-layer proteins in bacteria," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31, no. 12, pp. 1877–1887, 2015.
- [149] J. Anzengruber *et al.*, "Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*," *Glycoconj. J.*, vol. 31, no. 2, pp. 117–131, Feb. 2014.
- [150] P. Baker *et al.*, "Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Sci. Adv.*, vol. 2, no. 5, p. e1501632, 2016.
- [151] J. C. Phan, B. J. Nehilla, S. Srinivasan, R. W. Coombs, K. A. Woodrow, and J. J. Lai, "Human Immunodeficiency Virus (HIV) Separation and Enrichment via the Combination of Antiviral Lectin Recognition and a Thermoresponsive Reagent System," *Pharm. Res.*, vol. 33, no. 10, pp. 2411–2420, Oct. 2016.
- [152] X. Zhang, P. Li, Q. Zheng, and J. Hou, "*Lactobacillus acidophilus* S-layer protein-mediated inhibition of PEDV-induced apoptosis of Vero cells," *Vet. Microbiol.*, vol. 229, pp. 159–167, Feb. 2019.
- [153] M.-L. Yang *et al.*, "Galectin-1 binds to influenza virus and ameliorates influenza virus pathogenesis," *J. Virol.*, vol. 85, no. 19, pp. 10010–20, Oct. 2011.
- [154] K. A. Toledo *et al.*, "Galectin-1 Exerts Inhibitory Effects during DENV-1 Infection," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e112474, Nov. 2014.
- [155] C. St-Pierre *et al.*, "Host-Soluble Galectin-1 Promotes HIV-1 Replication through a Direct Interaction with Glycans of Viral gp120 and Host CD4," *J. Virol.*, vol. 85, no. 22, pp. 11742–11751, 2011.

- [156] A. F. Ablamowicz and J. J. Nichols, "Ocular Surface Membrane-Associated Mucins," *Ocul. Surf.*, vol. 14, no. 3, pp. 331–341, Jul. 2016.
- [157] A. M. Woodward, J. Mauris, and P. Argüeso, "Binding of transmembrane mucins to galectin-3 limits herpesvirus 1 infection of human corneal keratinocytes.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 10, pp. 5841–7, May 2013.
- [158] R. Yokoda *et al.*, "Oncolytic virus delivery: from nano-pharmacodynamics to enhanced oncolytic effect.," *Oncolytic virotherapy*, vol. 6, pp. 39–49, Nov. 2017.
- [159] J. Yin, J. M. Markert, and J. W. Leavenworth, "Modulation of the Intratumoral Immune Landscape by Oncolytic Herpes Simplex Virus Virotherapy.," *Front. Oncol.*, vol. 7, p. 136, Jun. 2017.
- [160] P. K. Bommareddy, M. Shettigar, and H. L. Kaufman, "Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 8, pp. 498–513, Aug. 2018.
- [161] R. H. I. Andtbacka *et al.*, "Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma," *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 25, pp. 2780–2788, Sep. 2015.
- [162] R. Mooney *et al.*, "Enhanced Delivery of Oncolytic Adenovirus by Neural Stem Cells for Treatment of Metastatic Ovarian Cancer," *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 12, pp. 79–92, Mar. 2019.
- [163] P. H. Lee *et al.*, "Enterovirus 71 virion-associated galectin-1 facilitates viral replication and stability," *PLoS One*, vol. 10, no. 2, pp. 1–16, 2015.