



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Estudio del dominio carboxilo terminal de
SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
para la exhibición de proteínas heterólogas en
la superficie de bacterias ácido lácticas**

Iara Gabriela Jastrebow

Directora: Dra. María Mercedes Palomino

Directora asistente: Lic. Tania Belén Gordillo

Laboratorio de Bacterias Gram Positivas, sus Aplicaciones y Estrés
Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA

Diciembre 2024

Agradecimientos

Si hace 6 años alguien me decía que hoy iba a estar sentada, habiendo escrito una tesis de licenciatura y transitado una carrera completa, preocupada por hacerle justicia con mis agradecimientos al camino que me llevó a este punto, no sé si les creía. Pero bueno, acá estoy, se logró y no me puedo quedar sin decirle gracias a todos los que lo hicieron posible.

Gracias a Mer y a Tania. Gracias a Mer por darme la oportunidad cuándo lo único que buscaba era una pasantía, para conocer cómo era trabajar en un laboratorio. Gracias por después aceptar ser mi directora de tesis, por anotar y explicar tantos protocolos que nunca había hecho y por ayudarme corrigiendo siempre que tuve que escribir, desde mi primer póster y resumen, hasta esta tesis. Gracias a Tania por ser mi directora asistente, por estar desde mi primer día en el laboratorio, por ser mi guía en el día a día y acompañarme cada vez que tenía que hacer un experimento por primera vez. Gracias a las dos por su paciencia infinita, buena onda y por siempre escuchar y contestar todas y cada una de mis millones de preguntas.

Gracias a mi familia. Gracias a mi papá y mi mamá, que sin su apoyo no habría llegado jamás a este punto. Gracias por estar abiertos a la carrera que elegí, por escucharme mientras hablaba de mis materias o lo que había hecho en el laboratorio y por siempre darme una mano si lo necesitaba. Gracias a Mati también, que aunque al principio estaba un poco confundido sobre qué carrera había elegido, siempre contó con orgullo lo que hacía su hermana y fue con quién pasé muchos de estos últimos días en casa, mientras yo escribía y él estudiaba. Gracias también a todo el resto de mi familia, por apoyar mi elección de carrera y por estar siempre orgullosos de mí.

Gracias a mis amigos. Gracias a Anto, que conocí en ese verano de 2020, cursando mi primer materia de la carrera y desde entonces no nos separamos más. Gracias, primero que nada, por ser mi amiga y por todos estos años juntas, gracias también por todo el apoyo, tanto en las materias, como con el trabajo de laboratorio, como en el día a día, gracias por todas esas charlas y esos mates y por estar siempre. Gracias a las chicas del colegio, Flor, Valen, Marti y Rebe, por bancarme desde tan chicas y seguir estando ahora que estamos más grandes. Por entender que no siempre estaba, que a veces iba a llegar tarde a los cumpleaños, y por emocionarse

conmigo cada vez que avanzaba un poquito más. Gracias a las chicas del CBC, Pili, Valen, Ale, Mechi, Agus y Agus. Gracias por ser mis primeras amigas en la facu, gracias por esos primeros años en pandemia, por esos zooms de estudio y por las charlas cada vez que nos cruzamos en los pasillos. Gracias a Gonza, Cielo, Meli y Lu, por todas las materias cursadas juntos, por todos los almuerzos, las meriendas, las juntadas, los festejitos y por todo este tiempo. Gracias a todos los demás amigos que fui conociendo a lo largo de la carrera, que hicieron los malos momentos más amenos y los buenos todavía mejores.

Gracias a QB. Gracias a las chicas de QB 40 y QB 15, Sabri, Viqui, Flor, Nati, Sol y Julia, que más que compañeras de trabajo se convirtieron en amigas. Gracias por todos los cultivos largados, plaquitas sacadas y por todos los mates compartidos y los días de trabajo que siempre son mejores con buena compañía. Gracias a Carlo, que se sumó a muchos de esos mates y sin quién no hubiera podido armar los modelos de distribución de carga de mis proteínas. Gracias a los chicos de QB, por las materias que cursamos juntos y las charlas en los pasillos. Gracias al Dr. Sergio Nemirovsky, por toda la ayuda con la estadística y la paciencia con todas las preguntas y las veces que le toqué la puerta. Gracias también a Sandra, por acordarse de mí cuando buscaban un nuevo pasante y a Mariana que me vió y me escuchó un montón estos últimos días sentada con el mate y buscando la inspiración para escribir.

Gracias por todas las que conocí en actividades de extensión, vinculadas o no con el departamento. Gracias a Erina, que fue quién me dió la entrada a ese mundo y gracias también a Mariel y a Cecilia y a todos los que ayudaron a organizar las distintas actividades de las que tanto disfruto participar.

Gracias a todos los docentes que me enseñaron a lo largo de esta carrera, sobre todo, gracias a todos los que estuvieron siempre dispuestos a contestar mis preguntas, que nunca eran pocas. Gracias a los jurados de esta tesis, por estar dispuestos a serlo y por tomarse el tiempo de leerla y evaluarla.

Y, finalmente, gracias a la educación pública y en particular, a la FCEN UBA, por ser mi segunda casa todos estos años. Agradezco haber tenido la oportunidad de estudiar ciencia de forma pública y gratuita, en una facultad con altísima calidad docente y humana.

Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	5
Abstract.....	8
Introducción.....	11
Hipótesis y Objetivos.....	21
Materiales y Métodos.....	24
Cultivo de Cepas Bacterianas.....	25
Técnicas de Biología Molecular: Clonado, Expresión y Purificación de Proteínas Recombinantes.....	25
Extracción de ADN genómico de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356.....	25
Extracción de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> JM109.....	26
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	26
Electroforesis en geles de agarosa.....	27
Preparación de células electrocompetentes.....	27
Transformación de células electrocompetentes.....	27
Clonado.....	28
Expresión proteica.....	29
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	29
Western Blot.....	30
Purificación y cuantificación de proteínas.....	30
Técnicas de Microbiología: Ensayos de <i>Binding</i> y de Preservación en el Tiempo.....	31
Ensayo de <i>binding</i>	31
Evaluación del <i>binding</i>	31
Curva de <i>binding</i> en función del tiempo.....	32
Conservación de viabilidad en el tiempo.....	32
Evaluación de la estabilidad del <i>binding</i> ante la preservación en el tiempo.....	32
Evaluación de conservación de la viabilidad post-liofilización.....	32
Análisis <i>in Silico</i>	33
Análisis de secuencias de ADN <i>in silico</i>	33
Modelado de proteínas.....	33
Análisis Estadísticos.....	33
Resultados.....	35
Análisis preliminares <i>in silico</i>	36
Clonado de GFP-SLAP2.....	39
Expresión, purificación y evaluación de las proteínas de fusión.....	40
Optimización del protocolo de <i>binding</i>	43
Conservación de la viabilidad a lo largo del tiempo.....	45
Conservación del <i>binding</i> a lo largo del tiempo.....	47
Conservación de la viabilidad post-liofilización.....	49
Discusión y Conclusiones.....	52
Referencias Bibliográficas.....	61
Apéndice.....	68
Composición de Soluciones Tampón o <i>Buffer</i> y Otras.....	69
Para usos generales.....	69
Para extracción de ADN.....	69
Para electroforesis.....	69
Para Western Blot.....	69
Para purificación de proteínas.....	70

Resumen

Estudio del dominio carboxilo terminal de SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para la exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de bacterias ácido lácticas

Las proteínas de capa-S (*S-layer*) prometen ser una gran herramienta de anclaje para desarrollar sistemas de display en la superficie de bacterias probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. En este estudio se evaluó, específicamente, el uso del extremo carboxilo-terminal (C-terminal) de SlpA, la proteína principal de capa-S en esta especie, responsable de la unión a la superficie celular, para exhibir proteínas heterólogas.

Para ello, se clonaron los dos dominios SLAP, que constituyen el C-terminal completo (CT) de SlpA, en quimeras con la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando sistemas heterólogos en *Escherichia coli*. Se emplearon los vectores pET28-GFP con las construcciones correspondientes a SLAP1, SLAP2 y CTSlpA, con el objetivo de evaluar el potencial de cada dominio como *carrier* para la exhibición de proteínas heterólogas funcionales en la superficie de bacterias ácido láctica (BAL).

La proteína GFP-SLAP1 fue expresada y purificada, y posteriormente utilizada en ensayos de *binding* a *L. acidophilus* desprovista de su capa-S nativa. La capacidad de unión fue analizada mediante microscopía de fluorescencia, mostrando que SLAP1 por sí solo no resulta suficiente para lograr un decorado efectivo de las bacterias.

En cuanto a GFP-SLAP2, se realizó todo el clonado y se logró expresar la proteína quimera, sin embargo, ésta se acumula en cuerpos de inclusión. Esto último implicaría complicaciones técnicas y costos adicionales en el proceso de producción, lo que no resulta atractivo ni práctico para utilizarlo, eventualmente, a gran escala.

Con el objetivo de optimizar el protocolo de *binding*, se llevaron a cabo ensayos utilizando GFP-CTSlpA. Los resultados mostraron que reducir los tiempos de incubación a 45 minutos permite alcanzar un nivel de unión equivalente al obtenido tras una hora, lo que representa una mejora en la eficiencia del ensayo. Aunque en intervalos de incubación más cortos, de 5 a 30 minutos, la unión tiende a ser menor, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.

Para evaluar la viabilidad de las células probióticas decoradas en el tiempo, se realizaron ensayos de preservación a 4 °C. Los resultados indicaron que el decorado

con GFP-CTSlpA produce un aumento significativo en la supervivencia de *L. acidophilus* durante el almacenamiento en refrigeración. Adicionalmente, durante los primeros 14 días de esta preservación en heladera, se midió la estabilidad del *binding*, que se mantuvo constante durante los primeros 7 días, mientras que a los 14 días no se registraron diferencias significativas. Esto sugiere que la estrategia de decoración podría mejorar la estabilidad y viabilidad de las bacterias probióticas, lo que tiene implicancias positivas para su conservación y uso en aplicaciones funcionales.

Finalmente, se evaluó la liofilización como una estrategia para preservar *Lactobacillus acidophilus* de forma más estable a largo plazo. Sin embargo, se observó que esta bacteria no tolera bien el proceso, con una reducción drástica de su viabilidad a menos del 0,2% del nivel inicial. Para mitigar este efecto, se realizaron ensayos con distintos protectores, incluyendo suero de queso, leche, trehalosa y lactosa. Todos ellos demostraron ser efectivos, logrando mantener la viabilidad de las bacterias significativamente más alta, con valores entre el 40% y el 50%.

Estos resultados destacan el potencial de las proteínas de capa-S (*S-layer*) como herramientas para la exhibición de proteínas funcionales en bacterias probióticas, sin necesidad de modificaciones genéticas. Esto permite conservar el estatus GRAS (*Generally Recognized As Safe*) de las bacterias, lo que amplía sus posibilidades de aplicación en biotecnología y productos funcionales.

Palabras clave: *Lactobacillus acidophilus*, capa-S, dominio *carrier*, proteína de fusión, preservación.

Abstract

Studying the carboxyl terminus of the *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 SlpA protein for heterologous protein display on the surface of lactic acid bacteria

S-layer proteins are a promising anchoring tool for the development of heterologous protein display systems on the surface of probiotic bacteria, like *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Specifically, this study explores the use of the carboxyl terminus (C-terminus) of the main S-layer protein of this species, SlpA, which is known to be responsible for cell wall binding.

To this end, the two SLAP domains, which make the whole SlpA C-terminus (CT), were cloned in chimeras with the green fluorescent protein (GFP). pET28-GFP vectors with SLAP1, SLAP2, and CTSlpA were utilized to evaluate the carrier potential of each independent domain for the display of functional proteins on the surface of lactic acid bacteria (LAB).

The GFP-SLAP1 fusion protein was expressed in *Escherichia coli* and later purified. It was then used in binding assays to *L. acidophilus*, which had previously been stripped of its native S-layer. After these assays, the binding capacity was analyzed through flow cytometry. Results showed that SLAP1 alone was not enough to decorate the bacteria.

GFP-SLAP2 was cloned into heterologous *E. coli* systems, and the chimeric protein was successfully produced. However, it aggregated into inclusion bodies. This would imply extra difficulties and costs in the production process, making it impractical and unattractive for its eventual large-scale use.

Aiming to optimize the binding protocol, assays utilizing GFP-CTSlpA were carried out. These demonstrated that an equivalent level of decoration can be achieved by reducing the time from 60 to 45 minutes, implying an improvement in the assay's efficiency. From 5 to 30 minutes of incubation time, despite noticing a tendency towards lower decoration levels, these did not translate into significant differences.

To evaluate the viability of the decorated cells over time, preservation assays at 4 °C were carried out. Results indicated that decoration with GFP-CTSlpA produces a significant increase in the viability of *L. acidophilus* during this refrigerated storage. Additionally, during the first 14 days of this time in the fridge, the stability of the binding was measured. The decoration levels remained constant during the first 7 days, and still, by day 14, no significant differences from the input were registered.

This suggests that this decoration strategy could improve the stability and viability of the probiotic bacteria, which has positive implications for its conservation and use in functional applications.

Finally, the strategy of freeze-drying or lyophilization was considered to preserve the bacteria more stably and for a longer time. However, *L. acidophilus* does not withstand the process well, reducing its cell count to less than 0.2% of the input. To counter this, several protectants were trialed: cheese whey, milk, lactose, and trehalose. All four were successful, resulting in four candidate protectants through which bacterial viability remains significantly higher (between 40 and 50% of the input).

These advances highlight the potential of S-layer proteins as tools for heterologous functional protein display in probiotic bacteria without the need for genetic modification. This allows them to keep their GRAS (Generally Recognized as Safe) status, which widens the horizons regarding their application in biotechnological and functional products.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, S-layer, carrier domain, fusion protein, preservation.

Introducción

Las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un vehículo altamente atractivo para la presentación de proteínas debido a múltiples características favorables. En primer lugar, cuentan con el estatus GRAS (*Generally Recognized As Safe*), lo que las certifica como seguras para el consumo humano. Además, poseen la capacidad de sobrevivir en el ambiente hostil del tracto gastrointestinal, caracterizado por un bajo pH, alta concentración de sales biliares y presencia de proteasas. En este entorno, las BAL pueden permanecer activas durante 2 a 3 días, colonizando las mucosas gracias a su capacidad de adhesión. Por último, estos microorganismos destacan por su baja inmunogenicidad intrínseca y sus propiedades adyuvantes, lo que refuerza aún más su potencial biotecnológico (Vizoso Pinto *et al.*, 2009; Rocha-Ramírez *et al.*, 2017).

Lactobacillaceae es una familia perteneciente al grupo de BAL que incluye a más de 200 especies, muchas de las cuales forman parte de la microbiota de diversos animales, entre ellos, los humanos (Figura 1). Las comunidades microbianas que forman la microbiota de un mismo animal son muy variadas. La que habita el tracto gastrointestinal, por ejemplo, se caracteriza por su alta densidad de población, gran diversidad y complejidad de las interacciones. Predominan las bacterias, pero también se encuentran virus, protozoos, levaduras y bacteriófagos.

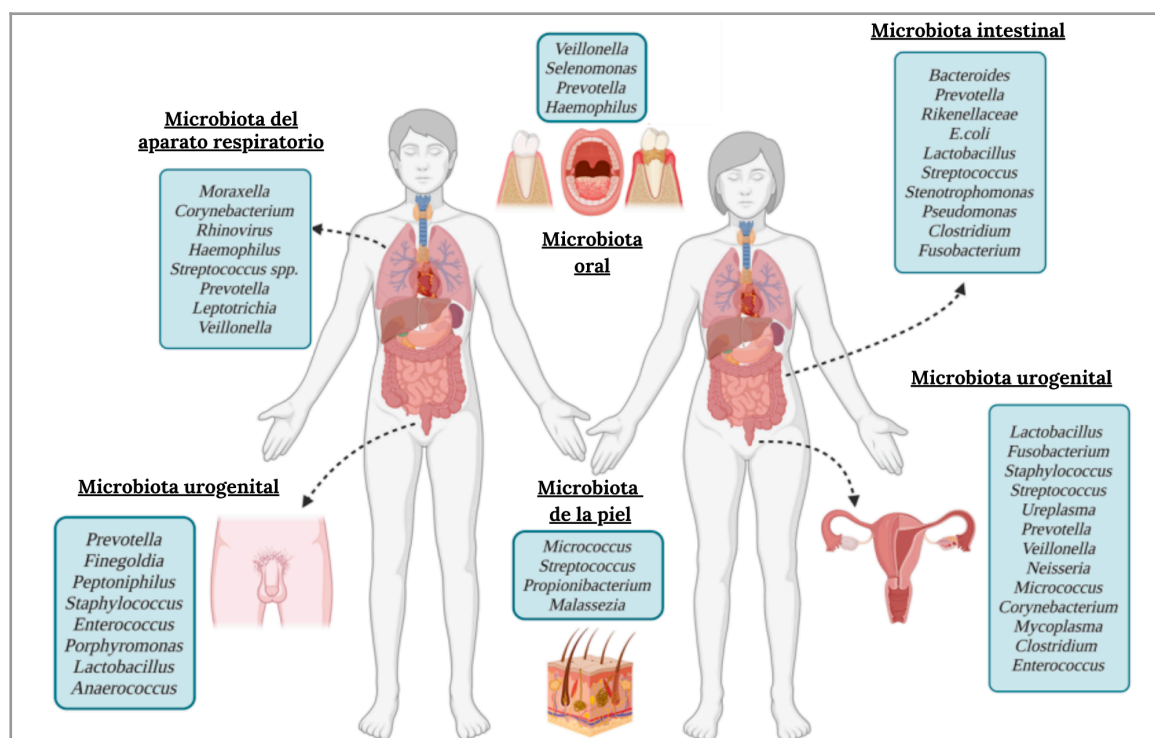


Figura 1. Organismos característicos del microbioma humano en varias mucosas. Figura adaptada de Kotthapalli y Archer (2024).

En el intestino, la función principal de gran parte de la microbiota es la competencia para prevenir la colonización por microorganismos potencialmente patógenos, lograda mediante, por ejemplo, la producción de metabolitos ácidos o bacteriocinas (Figura 2). Estas últimas son un diverso grupo de péptidos antimicrobianos secretados principalmente por bacterias Gram Positivas en ambientes polimicrobianos (Lee C. G. *et al.*, 2023).

Algunas de estas bacterias Gram Positivas son especies autóctonas del tracto gastrointestinal, es decir, que establecen una asociación duradera y forman poblaciones estables en una región específica del mismo, en un huésped particular. Entre ellas se encuentran varias de la familia *Lactobacillaceae* y en particular, del género *Lactobacillus*, que alcanza su densidad máxima dentro del intestino delgado y grueso. Aún así, se han aislado especies de este último a lo largo de todo el tracto intestinal de humanos sanos.

Por otro lado, con el advenimiento de nuevas disciplinas como la metagenómica, se han encontrado diversas evidencias experimentales que indican que muchas otras especies halladas en el tracto gastrointestinal son alóctonas, o sea, colonizadoras transitorias que se originan a partir de los alimentos o de la cavidad oral. Entre ellas se encuentran, nuevamente, diversas especies de *Lactobacillus* que históricamente han sido utilizados para el procesamiento y la preservación de alimentos (Marco *et al.*, 2021).

En la actualidad, las especies de este género desempeñan un papel fundamental en la industria alimentaria, especialmente en la producción de alimentos fermentados, lo que resalta su relevancia industrial. Entre estos productos destacan los alimentos funcionales, que no solo aportan beneficios nutricionales básicos, sino que también ofrecen efectos positivos en la salud. Dentro de este grupo, los probióticos se posicionan como uno de los componentes más investigados y valorados por sus propiedades saludables (Balthazar *et al.*, 2022).

Los probióticos han sido definidos por la FAO-OMS (2006) como microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador (Figura 2). Se entiende que los efectos benéficos de estas bacterias radican en su capacidad de mejorar la función de la barrera intestinal, inhibir la colonización por patógenos, aumentar la proporción de microorganismos benéficos y modular las respuestas inmunes (Lee C. G. *et al.*, 2023) (Figura 2).

Esta cualidad es asignada a cepas específicas, y no a una especie (con ciertas excepciones). Una cepa, para ser considerada probiótica, debe caracterizarse *in vitro*, demostrando carecer de resistencia a antibióticos o determinantes de patogenicidad y verificando su carácter GRAS. Además, deben realizarse ensayos en los que presente resistencia a la acidez gástrica, a las sales biliares y adhesión al epitelio intestinal y que prueben su acción benéfica. Es necesario que entre estos últimos se encuentren ensayos *in vivo* realizados en humanos (Hill *et al.*, 2014).

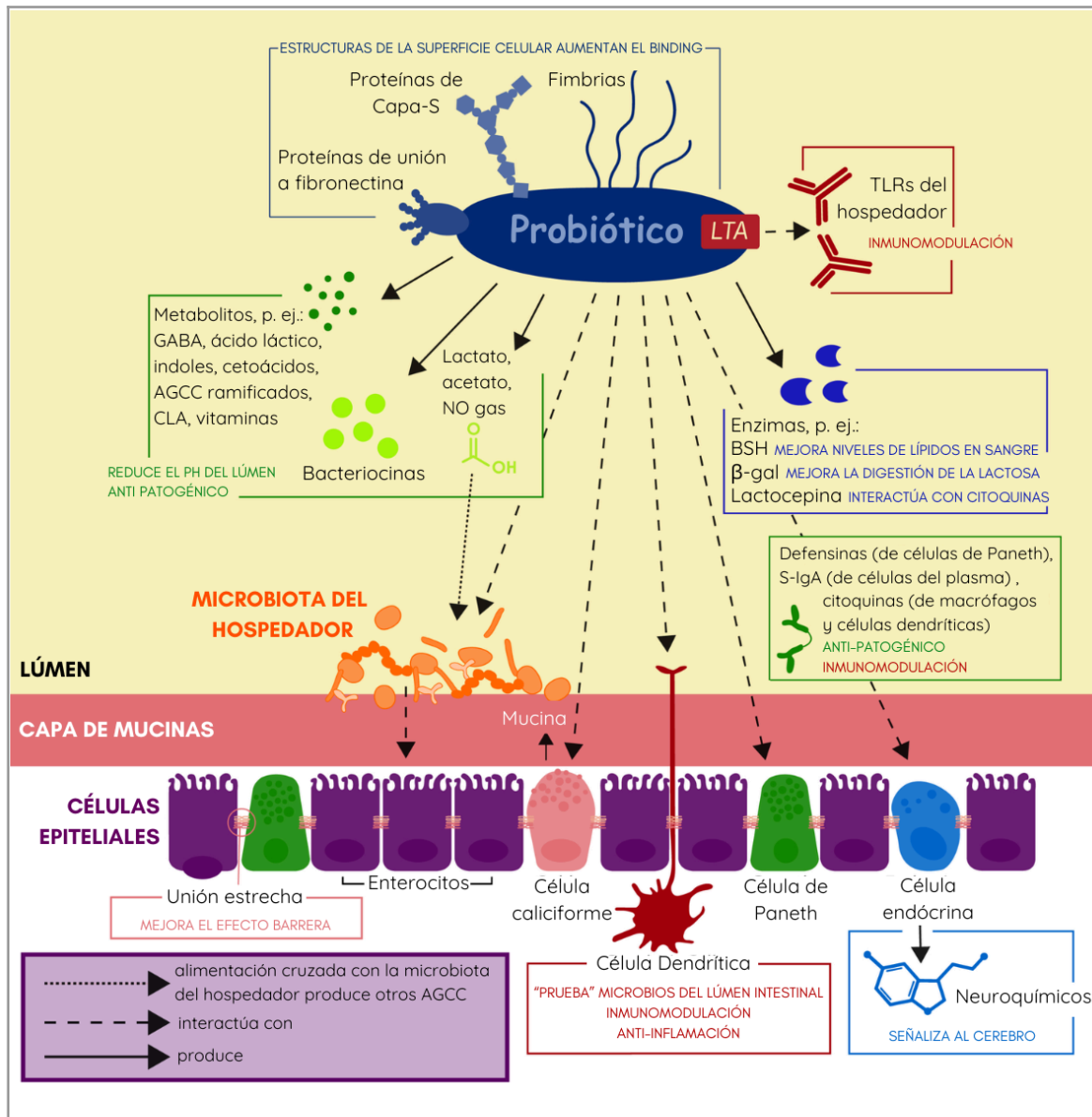


Figura 2. Algunos mecanismos clave investigados como mediadores del efecto benéfico de los probióticos. Adaptado de International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (2020).

Estos efectos positivos que ejercen distintos probióticos en el organismo humano han sido científicamente documentado por múltiples grupos, tanto en el país como

en otras partes del mundo (Maldonado Galdeano *et al.*, 2007; Castillo *et al.*, 2013; Wieërs *et al.*, 2020; Leach, 2024). Por ejemplo grupos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET) en Tucumán, han demostrado que la administración de *Lactobacillus paracasei* CASEI CRL 431 previo a la infección con *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium reduce la severidad de la infección en modelos de ratón (de LeBlanc *et al.*, 2010). También, en un ensayo aleatorizado, con doble ciego y control con placebo, mostraron que un preparado probiótico incluyendo *Lactobacillus johnsonii* CRL1693, *Ligilactobacillus murinus* CRL1695, *Limosilactobacillus mucosae* CRL1696 y *Ligilactobacillus salivarius* CRL1702 promueve la recuperación de cachorros con gastroenteritis (Molina *et al.*, 2023).

Como demuestran numerosos estudios, muchos de los probióticos actualmente conocidos pertenecen a la familia *Lactobacillaceae*. Entre ellos destaca *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, una cepa aislada originalmente de humanos y considerada probiótica desde hace tiempo. En 1997, Mustapha *et al.* demostraron que esta bacteria puede mejorar la digestión de lactosa en humanos. Posteriormente, en 2017, Elnaz *et al.* observaron que la administración de yogures enriquecidos con esta cepa y *Bifidobacterium bifidum* ATCC 59521 reducía la persistencia de *Streptococcus mutans*, uno de los principales agentes iniciadores de caries, en la cavidad oral de los pacientes estudiados. Más recientemente, se han explorado sus beneficios en modelos murinos, incluyendo su capacidad para proteger contra infecciones por *Toxocara canis* (Cadore *et al.*, 2021) y su papel en el alivio de lesiones renales por isquemia-reperfusión (Zhen *et al.*, 2021).

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356, al igual que toda la familia *Lactobacillaceae*, se clasifica entre las bacterias Gram Positivas, presentando las características típicas de estas últimas en cuanto a su envoltura. Esta tiene múltiples funciones durante el crecimiento, 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. La superficie celular también media las interacciones con factores abióticos, bacteriófagos y células eucariotas.

Las envolturas de Gram Positivas están constituidas por una membrana celular y una gruesa capa de peptidoglicano (PG) (Figura 3). Esta se encuentra frecuentemente adornadas por polímeros como los ácidos teicoicos (WTA), anclados al mismo PG, y los lipoteicoicos (LTA), anclados a la membrana celular. Los WTA se

asocian covalentemente al peptidoglicano por enlaces fosfodiéster y los LTA, a la membrana por un ancla de diglucosildiacilglicerol. En algunas especies de la familia *Lactobacillaceae*, como *Lactobacillus acidophilus*, existe también una capa adicional llamada *S-layer* o capa-S (Gerbino *et al.*, 2015; Gordillo *et al.*, 2020; Palomino *et al.*, 2023).

Se define a esta capa externa de la envoltura, como un arreglo monomolecular cristalino que se autoensambla en forma multimérica (Figura 3). Estas proteínas recubren la superficie entera de la célula, llegando a representar hasta el 20% de las proteínas totales.

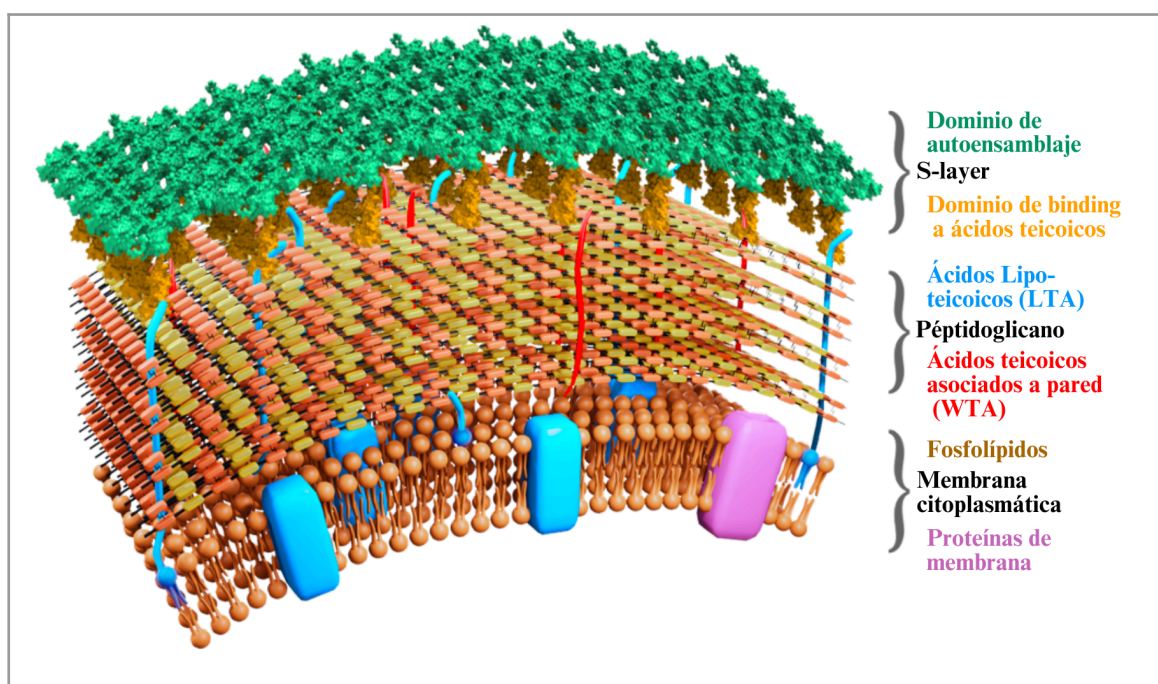


Figura 3. Diagrama de la composición de la envoltura de *Lactobacillus*. Proteínas de membrana representadas en azul y violeta. Adaptado de Sagmeister *et al.* (2024).

Las proteínas de capa-S de *Lactobacillus* que han sido caracterizadas tienen un peso molecular de entre 25-71 kDa y están enriquecidas en aminoácidos básicos e hidrofóbicos, frecuentemente exhibiendo un pI de 9,4 a 10,4 (Palomino *et al.*, 2023). Además, se ha encontrado que las de varias especies tienen propiedades bactericidas (Prado Acosta *et al.*, 2016). Estas proteínas se encuentran ancladas a los LTA y WTA que, en este género, suelen ser largas cadenas de poliglicerol-fosfato cargadas negativamente (Shiraishi *et al.*, 2016) (Figura 3). Se ha propuesto, entonces, que la interacción responsable de mediar la unión a la pared celular, sería entre los aminoácidos básicos de la región C-terminal de la proteína de superficie y

las cargas negativas presentes en estos polímeros (Fina Martin *et al.*, 2019; Gordillo *et al.*, 2020, Sagmeister *et al.*, 2024).

Un modelo ideal para el estudio de las proteínas de *S-layer* es *Lactobacillus acidophilus*. Este posee genes que codifican para 3 proteínas de capa-S, SlpA, SlpB y SlpX. En condiciones normales de crecimiento, SlpA constituye más del 90% de la capa externa, mientras que SlpX representa menos del 10% restante. Por otro lado, el gen *slpB* se encuentra inactivo en estas condiciones (Palomino *et al.*, 2016). En la presente tesis, el análisis se centrará en la proteína predominante, SlpA, debido a su rol clave en la estructura y función de la *S-layer*.

Esta proteína tiene una estructura bi-modular con dos dominios funcionales bien distinguidos (Figura 3). Uno es la región involucrada en el ensamblado de la proteína (N-terminal) y el otro la involucrada en la unión a la superficie celular (C-terminal) (Smit *et al.*, 2001; Prado Acosta *et al.*, 2008) (Figura 4). Este último es predominantemente básico, conformado por dos dominios del tipo SLAP (pfam 03217) incluidos dentro de la base de datos de las Familias de Dominios de Proteínas Conservadas (Wang J. *et al.*, 2023) (veáse en el siguiente link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=397362>)

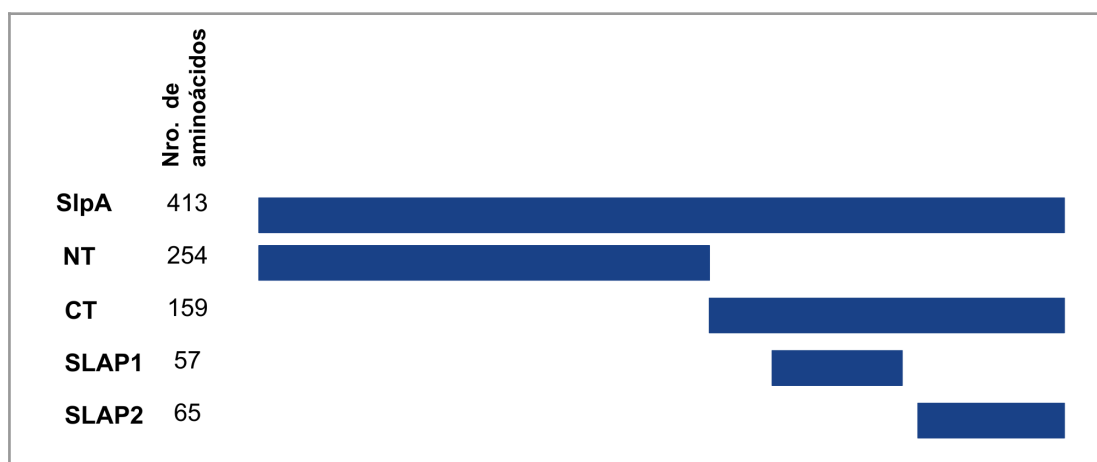


Figura 4. Diagrama de los N-terminal y C-terminal de la proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus*. Incluye los dominios SLAP del carboxilo terminal.

El dominio SLAP, conformado por 60 residuos, aloja un motivo de reconocimiento a carbohidratos y se encuentra repetido en tándem en el C-terminal (CT) de la proteína en estudio. Este tipo de dominios se han encontrado en diversas especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. kefiranofaciens*, *L. crispatus*, *L. helveticus*, *L. amylolyticus*, *L. gallinarum*, *L. amylovorus*, y la bacteria a utilizar, *L. acidophilus* (Palomino *et al.*, 2023; Sagmeister *et al.*, 2024).

Particularmente, en *L. acidophilus* ATCC 4356 se ha confirmado experimentalmente que el dominio CT entero (formado por dos dominios SLAP) está implicado en la interacción de SlpA con la pared celular. Esto explicaría la capacidad de tipo lectina de esta proteína al interaccionar con componentes glicoconjugados de origen procariota (PG y LTA) y eucariota (mucinas y quitina) (Fina Martin *et al.*, 2019).

Debido a esta capacidad de anclaje a la pared celular, varias proteínas *S-layer* ya han sido utilizadas en varias ocasiones como proteína *carrier* en BAL, especialmente *Lactococcus* y *Lactobacillus* (Qin *et al.*, 2014; O'Flaherty y Klaenhammer, 2016). Sin embargo, en la mayoría de estos abordajes se plantea el uso de cepas genéticamente manipuladas, capaces de expresar la proteína quimera y dirigirla hacia su propia envoltura. Esta modificación genética, sin embargo, afecta el estatus GRAS de los microorganismos y compromete, de tenerla, su cualidad de probiótico.

Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se propone una estrategia alternativa: la posibilidad de conjugar los beneficios de las características del probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con la posibilidad de exponer proteínas en alta densidad en su superficie celular. Esto se lograría utilizando proteínas de fusión con el carboxilo terminal entero de la proteína SlpA (ya evaluado), o, potencialmente, con alguno de los dos dominios SLAP que lo conforman (cuya capacidad de *binding* se evaluará en la presente tesis) como *carrier*.

Las proteínas quimeras funcionales pueden producirse de manera heteróloga y posteriormente anclarse exógenamente a la superficie de *Lactobacillus acidophilus*, según lo reportado por Gordillo *et al.* (2020) (Figura 5). Este enfoque permitiría desarrollar una formulación que combine las propiedades probióticas de la bacteria con su capacidad como bio-presentador de péptidos funcionales, prescindiendo del empleo de microorganismos genéticamente modificados.

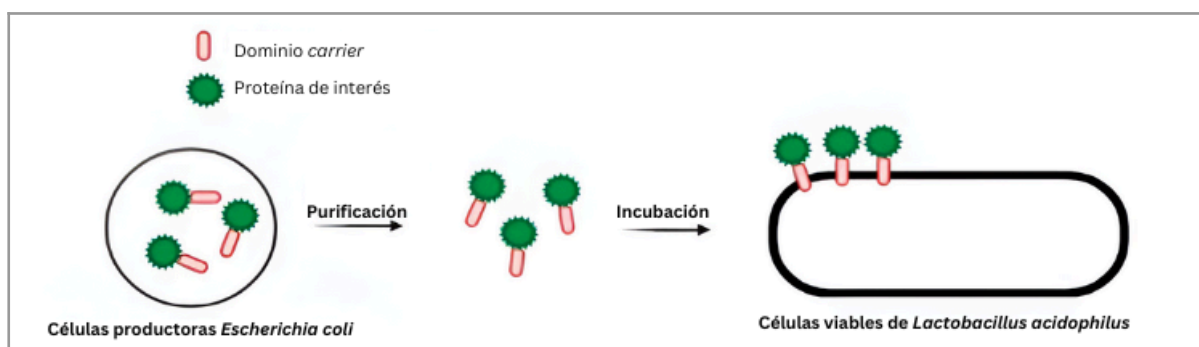


Figura 5. Esquema del sistema de exhibición de proteínas heterólogas en la superficie de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Adaptado de Gordillo *et al.* (2020)

Una vez obtenidas las células viables decoradas, el siguiente paso consiste en definir la formulación adecuada para su administración. Para maximizar la sinergia entre los beneficios de las proteínas de interés y las propiedades probióticas de *L. acidophilus* ATCC 4356, es fundamental garantizar la viabilidad del microorganismo en el sitio de acción (FAO-OMS, 2006; Hill *et al.*, 2014). Esto requiere, en primer lugar, asegurar su estabilidad y supervivencia a lo largo de los procesos de producción y almacenamiento.

Este proceso puede variar enormemente de producto a producto. Tradicionalmente, las bacterias ácido lácticas probióticas han sido incorporadas en productos lácteos fermentados, con necesidad de conservarse en frío y una vida útil limitada. Actualmente, pueden también ser incorporados como suplementos o en otros formatos “secos”, los cuales pueden llevar su estabilidad hasta incluso 24 meses a temperatura ambiente (Fenster *et al.*, 2019).

En el contexto del método tradicional de administración de estas bacterias, la principal preocupación radica en mantener su viabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Por ello, es crucial garantizar que el proceso de decoración de las bacterias probióticas con proteínas quimera funcionales no comprometa su viabilidad a lo largo del tiempo.

Una vez garantizada la viabilidad, este formato tradicional ofrece un contexto amigable y atractivo para la administración de las bacterias decoradas. Un ejemplo destacado es el yogur, alimento ampliamente consumido a nivel mundial, incluso por poblaciones con aparente incapacidad para digerir lactosa. Esta digestión se debe a la acción de la lactasa presente en las bacterias típicas del yogur (Savaiano, 2014) y podría potenciarse aún más si dichas bacterias no solo contaran con la enzima intrínseca, sino también la exhibieran activamente en su superficie.

Por otro lado, los formatos “secos” suelen implicar una liofilización, ya que este proceso permite obtener una deshidratación exhaustiva, compatible con períodos muy largos de almacenamiento. Sin embargo, la liofilización no siempre resulta un proceso inocuo, ya que requiere de un congelamiento inicial de las muestras (que en este trabajo se realiza *overnight*) y luego el secado en sí, que se da por sublimación debido a una gran disminución de la presión. *Lactobacillus acidophilus* ha mostrado una viabilidad inferior al 1% inicial cuando es sometida a este proceso (Lee J. *et al.*, 2023), lo que resalta la necesidad de implementar estrategias que aseguren el mantenimiento de su viabilidad durante el mismo.

Con este propósito, el proceso de liofilización puede optimizarse mediante diversos métodos para preservar su viabilidad durante y después del procedimiento. Los posibles tratamientos van desde resuspender los pellets celulares en soluciones acuosas de azúcares o en matrices más complejas como la leche (Montel Mendoza *et al.*, 2016; Lee J. *et al.*, 2023), hasta tratamientos de pre-crecimiento en altas concentraciones de NaCl (Louesdon *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2022) o pre-tratamientos de shock térmico (Zhen *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2022).

Estos formatos secos resultantes son ideales para productos como las vacunas de mucosas, que pueden resultar ventajosas por sobre las vacunas sistémicas tradicionales desde diversos puntos de vista (Lycke, 2012). Por ejemplo, las de uso oral que no requieren purificación extensiva de los subproductos bacterianos asociados con su producción. Esto se debe a que el intestino ya posee una enorme población microbiana, mientras que en formulaciones inyectadas estos podrían representar niveles inaceptables de endotoxina. Adicionalmente, resultan muy prácticas para la vacunación masiva ya que carecen del riesgo de transmisión de enfermedades venéreas asociado con las agujas contaminadas y su facilidad de administración se traduce a que pueden ser aplicadas por personal sin capacitación médica (Lycke, 2012).

Con base en toda esta información, este trabajo busca destacar el potencial de la proteína SlpA de la *S-layer* como una herramienta innovadora para la exhibición de proteínas funcionales en bacterias probióticas sin recurrir a modificaciones genéticas, y conservando su estatus GRAS. Este enfoque no solo amplía las fronteras del diseño biotecnológico, sino que abre un abanico de aplicaciones prometedoras: desde el desarrollo de yogures funcionales enriquecidos con millones de probióticos decorados, hasta la creación de pastillas o cápsulas capaces de actuar como plataformas vacunales.

Hipótesis y Objetivos

La proteína de superficie *S-layer* (*surface layer*) o capa-S es la estructura más externa de muchas especies de la familia *Lactobacillaceae*. En general, las proteínas que componen esta capa presentan dos dominios estructurales bien definidos, un dominio carboxilo terminal (C-terminal), involucrado en el anclaje a pared celular y un dominio amino terminal (N-terminal) implicado en el autoensamblaje. En el caso de las proteínas de la *S-layer* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, los motivos de unión a carbohidratos presentes en los dominios SLAP del C-terminal sugieren que podrían reconocer glicosilaciones específicas de interactores celulares procariotas, como los ácidos lipoteicoicos (LTA). Además, el potencial electrostático positivo acumulado en estos sitios, indica que podrían interactuar con las cargas negativas del poliglicerol-fosfato de los LTA y WTA.

A partir de esta información, se plantea la **hipótesis** de que las características estructurales y funcionales de los dominios SLAP, que contienen motivos de unión a ácidos lipoteicoicos en el C-terminal de la proteína de *S-layer* SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, permiten su utilización como dominios de anclaje eficientes a la pared celular. Esto facilitaría la exhibición en alta densidad de proteínas heterólogas funcionales sobre la superficie de bacterias ácido lácticas (BAL).

Buscando poner a prueba esta hipótesis, se plantea el siguiente **objetivo general**: evaluar el potencial del dominio carboxilo terminal (C-terminal) de la proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 para la exhibición de proteínas heterólogas funcionales en la superficie de bacterias ácido lácticas (BAL), a partir de un análisis estructural con un enfoque en la optimización de su interacción y conservación. Este puede dividirse en cinco **objetivos específicos**:

Clonado y expresión de proteínas quimeras

Clonar y expresar el dominio SLAP2 del C-terminal de SlpA en fusión con la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando sistemas heterólogos de *Escherichia coli*. Evaluar la capacidad del dominio SLAP2 para reconocer la envoltura celular y analizar su potencial como herramienta para el decorado de proteínas heterólogas en BAL.

Análisis de interacción con la superficie bacteriana

Realizar un análisis comparativo de la capacidad de unión (*binding*) de las construcciones GFP-SLAP1 (disponible en el laboratorio), GFP-SLAP2 (construida

en esta tesis) y GFP-CTSIpA (disponible en el laboratorio) a la superficie de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.

Optimización del protocolo de *binding* a envoltura de *L. acidophilus* ATCC 4356.

Determinar la dinámica de *binding* mediante ensayos realizados a diferentes intervalos de tiempo de incubación para identificar las condiciones óptimas.

Estudios de conservación:

Evaluar la viabilidad de las células de *L. acidophilus* decoradas con GFP-CTSIpA durante la conservación a 4 °C en diferentes períodos de tiempo.

Analizar la estabilidad del *binding* de GFP-CTSIpA durante el almacenamiento a 4 °C para determinar su persistencia.

Estudios de viabilidad post-liofilización:

Evaluar la viabilidad de *L. acidophilus* tras el proceso de liofilización utilizando diferentes protectores, como leche descremada, suero de queso, lactosa y trehalosa.

Materiales y Métodos

Cultivo de Cepas Bacterianas

Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 se cultivó en condiciones anaeróbicas a 37 °C, en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) (Biokar, Beauvais, Francia).

Como cepa de clonado se utilizó *Escherichia coli* JM109 (Promega) y, como cepa de expresión, *E. coli* HMS174 (Novagen Merck Millipore, EEUU). Ambas cepas se crecieron en medio Luria Bertani (LB) a 37°C en condiciones aeróbicas con kanamicina (Sigma, EEUU) 30 µg/mL, según requerimiento.

Técnicas de Biología Molecular: Clonado, Expresión y Purificación de Proteínas Recombinantes

Extracción de ADN genómico de Lactobacillus acidophilus ATCC 4356

Un cultivo de 6 mL de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 crecido en MRS a 37°C por 16 h se cosechó por centrifugación a 2000 xg por 5 minutos. A continuación se realizó un lavado de las células en Tampón Fosfato Salino (PBS por las siglas en inglés de *Phosphate Buffered Saline*) (Apéndice). 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 resuspendió el pellet en 1,5 mL de LiCl 5 M y se lo incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se centrifugó a 2000 xg y se lavó con 10 mL de EDTA 50 mM a pH 8. El pellet obtenido luego de los lavados fue resuspendido en 500 µL de Solución I (Apéndice) e incubado por 2 h a 37 °C para fragilizar la pared celular. Luego se agregó ARNasa A 0,05 mg/mL y proteinasa K 0,2 mg/mL y se incubó 15 minutos a 50 °C.

Las células se lisaron añadiendo Sarkosyl hasta una concentración final del 1% v/v y luego 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 xg durante 20 minutos para finalmente extraer la fase acuosa. Se realizaron 2 extracciones adicionales consecutivas con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).

Los ácidos nucleicos se precipitaron por adición de 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M (mezclado 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.

Extracción de ADN plasmídico de *Escherichia coli* JM109

Se cultivaron células *E. coli* JM109 transformadas en medio líquido o sólido, con agregado de kanamicina. Luego, se cosechó 1 mL de cultivo líquido, o se levantaron las colonias crecidas utilizando un ansa, según correspondiese. Con estas células se procedió a realizar una extracción de ADN con el protocolo de extracción detallado a continuación o utilizando el kit PURO plásmido (PB-L Productos Bio-Lógicos®) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la extracción casera, primero se resuspendieron las células en 300 µL de Solución I (Apéndice), seguida por el agregado de 300 µL de Solución II (Apéndice) que se mezcla por inversión suave y, finalmente 300 µL de Solución III (Apéndice) mezclada por inversión brusca. Esta resuspensión de células fue luego centrifugada a 14000 rpm por 15 minutos, a una temperatura de 10 °C.

A continuación, se tomó el sobrenadante obtenido, descartando el pellet, y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, para ser incubado a -20 °C durante un mínimo de 30 minutos.

Finalmente, se centrifugó nuevamente a 14000 rpm y 10 °C durante 25 minutos, se descartó el sobrenadante y dejando el pellet secar *overnight*. Al día siguiente se lo resuspendió en 50 µL de H₂O libre de nucleasas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación del SLAP2 se realizó la técnica de PCR utilizando como templado ADN genómico de *L. acidophilus* ATCC 4356. Los *primers* o cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia del gen SlpA (GenBank: CAA61560.1) con el fin de clonar el SLAP2 del carboxilo terminal de esta proteína, río abajo y en fase con GFP en el plásmido pET28b-GFP.

Los *primers* utilizados en la PCR fueron:

- AGTGGATCCGATGGTACTAAGCG como *primer forward* con sitio de corte para BamHI subrayado;
- y TAGGAGCTCTAATCTAAAGTTTGC como *primer reverse* con sitio de corte para SacI subrayado.

Para realizar PCRs se utilizó la enzima 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 minutos a 98 °C seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 98 °C, 30 segundos a 50 °C y 20 segundos a 72 °C (correspondientes a las etapas de desnaturalización, *annealing* y extensión), y un paso final de extensión de 10 minutos a 72 °C.

Electroforesis en geles de agarosa

Se prepararon los geles a una concentración de 1,0 o 0,7 % de agarosa y 0,6 mg/mL de Bromuro de Etidio (BrEt).

Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE (Apéndice) a 100 V en cubas de Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se utilizó el 1 kb de PB-L Productos Bio-Lógicos®.

Los geles fueron examinados y fotografiados utilizando el Transiluminador Benchtop 3UV.

Preparación de células electrocompetentes

Para la obtención de células electrocompetentes de *E. coli* JM109 o *E. coli* HMS174 se inocularon 3 mL de LB a partir de una colonia de la cepa correspondiente para luego se incubó toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Este precultivo se utilizó para inocular 100 mL de medio LB, partiendo de una DO_{600nm} inicial de 0,05. El cultivo se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,7-0,8. A partir de una centrifugación (10 min a 3200 x g a 4 °C) se obtuvo el pellet celular de este cultivo que luego se lavó tres veces con 30 mL de agua miliQ a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en aproximadamente en 1 mL agua miliQ, se separaron en alícuotas de 50 µL y se conservaron a -70 °C hasta su uso.

Transformación de células electrocompetentes

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

Una vez electroporadas, las células se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo LB y se dejaron recuperar a 37 °C con agitación durante 1 hora. Transcurrido el

tiempo de recuperación se plaquearon e incubaron en el medio correspondiente en presencia kanamicina 30 µg/mL para realizar la selección de las bacterias transformantes. La confirmación de clones positivos se realizó posteriormente por PCR y por retraso plasmídico en geles de agarosa.

Clonado

La región de SLAP2 fue amplificada a partir de DNA cromosómico de *L. acidophilus*, según el procedimiento indicado en la sección de PCR y clonada río abajo y en fase con GFP en el plásmido pET28b-GFP (Gordillo *et al.* 2020)

Los amplicones y el plásmido pET28b-GFP fueron digeridos con SacI y BamHI durante 2 hs, seguido de una incubación de 5 minutos a 65 °C para inactivar las enzimas.

El plásmido fue luego incubado a 37 °C por 30 minutos con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP) (Promega) que después fue inactivada a 74 °C durante 15 minutos. A continuación, se lo sembró en un gel de agarosa 0,7 %. Luego de la corrida electroforética, se recortó la sección con el pET28b-GFP correctamente digerido que luego se purificó utilizando el kit PURO gel extraction (PB-L Productos Bio-Lógicos®).

Una vez obtenidos y purificados tanto el inserto como el vector, se los cuantificó mediante el uso de NanoDrop (especificaciones del equipo).

Se ligaron el plásmido pET28b-GFP con el inserto SLAP2 incubando con ligasa (Promega) a 15 °C *overnight*, seguido de una inactivación a 65 °C por 15 minutos.

La reacción de ligación se llevó a cabo siguiendo las relaciones inserto/vector y PM de los mismos de acuerdo a la ecuación 1:

$$\frac{\text{Largo de inserto (kb)} \times \text{ng vector}}{\text{largo vector (kb)}} \times \frac{I}{V} = \text{ng Inserto}(1)$$

El producto de ligación se transformó a *E. coli* JM109 como cepa de clonado y, eventualmente, también a *E. coli* HMS174 como cepa de expresión. Las transformaciones se realizaron por electroporación y la confirmación de clones positivos se realizó posteriormente por PCR y retraso plasmídico en geles de agarosa.

Expresión proteica

Se realizaron las expresiones de la construcción pET28b-GFP-SLAP2 (esta tesis) y adicionalmente de las construcciones que portaban las fusiones pET28b-GFP-SLAP1 y pET28b-GFP-CTSlpA, contruidos previamente en el laboratorio (Fina Martin *et al.*, 2019).

Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa *E. coli* HMS174. Las células fueron crecidas a 37 °C en LB hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6-0,7. Luego, la expresión fue inducida por el agregado 0,1 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) por 16 hs a 19 °C y 100 rpm. Adicionalmente se propagaron las células transformadas sin el agregado de IPTG como control de no inducción.

Posteriormente al tiempo de incubación, las células se centrifugaron a 3200 x g durante 10 minutos y los pellets bacterianos se homogeneizaron en *Buffer de Lisis* (Apéndice). La ruptura celular se llevó a cabo por sonicación. La sonicación se realizó en pulsos de 30% de amplitud durante 10 segundos seguidos de 40 segundos de descanso para evitar el sobrecalentamiento. Durante todo el proceso, la muestra se mantuvo sobre hielo para controlar la temperatura realizando 5 ciclos en total. El debris celular y las células enteras se eliminaron con una centrifugación a 16000 x g por 20 minutos. El sobrenadante clarificado se utilizó para la purificación proteica.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Con el objeto de separar las proteínas según su peso molecular se realizaron electroforesis a temperatura ambiente en geles desnaturalizantes de SDS-PAGE 10% y concentradores 4,5% en una cuba Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en *buffer* Tris-Glicina (Apéndice) a 110 volts constantes.

Luego de la corrida electroforética, 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.

Western Blot

Para analizar la expresión de las proteínas recombinantes se realizó la técnica de *Western Blot*. Para ello, una vez finalizada la electroforesis, se transfirieron las proteínas de los geles de poliacrilamida a una membrana de Polivinil Difluoruro (PVDF) previamente activada con metanol, en *Buffer* de Transferencia (Apéndice) empleando un equipo transfer ECL-Semi-dry Blotter (Amersham Biosciences). La electrotransferencia se realizó a 45 mA durante una hora.

Luego de transferir, se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS (Apéndice). A continuación se bloqueó con 20 mL de *Buffer* de Bloqueo (Apéndice) durante 48 hs a 4° C. Finalizado el bloqueo, se lavó la membrana 6 veces durante 5 minutos cada vez con 20 mL de *Buffer* de Lavado (Apéndice), para eliminar el remanente del *buffer* de bloqueo.

Hecho esto, 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 *buffer* de lavado y se incubó con 10 mL de anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (Santa Cruz Biotechnology) (dilución 1/5000 en PBS) durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana 5 veces durante 5 minutos, con 20 mL de *buffer* de lavado. Posteriormente se reveló por quimioluminiscencia con el reactivo ECL (Sigma) utilizando el equipo digitalizador de imágenes Amersham Imager 600.

Purificación y cuantificación de proteínas

Se centrifugaron los lisados obtenidos a 12,000 ×g por 20 minutos y luego se pasaron los sobrenadantes a través de filtros Millipore de 0,22 µm para eliminar cualquier resto celular remanente. El filtrado fue luego sembrado en una columna HisTrap™ HP (GE Healthcare, EEUU), previamente equilibrada con *Buffer* de Siembra (Apéndice). A continuación, se realizaron lavados de la columna pasando, en cada uno, 3 volúmenes (3 mL) de *buffers* de creciente concentración de imidazol (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM) hasta el *Buffer* de Elución final con 500 mM de imidazol (Apéndice).

Las proteínas de interés eluyeron a concentración de 100 mM de imidazol. Luego de la purificación, los eluidos se dializaron, primero *overnight* en *Buffer* de Diálisis (Apéndice) a 4 °C y luego una segunda diálisis por 6 hs renovando el *buffer* y

adicionando 30% de glicerol.

La concentración de proteína del purificado obtenido se cuantificó por el método de Bradford (Quick Start™ Bradford 1 X Dye Reagent, Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante del reactivo.

Técnicas de Microbiología: Ensayos de *Binding* y de Preservación en el Tiempo

Ensayo de binding

Se cultivó *L. acidophilus* ATCC 4356 *overnight* en las condiciones previamente establecidas. Se cosecharon las células en fase estacionaria y luego se lavaron en PBS.

Para remover la *S-layer* nativa, se incubaron con LiCl 5 M a temperatura ambiente con rotación circular durante 45 minutos. Luego se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, se llevó a una suspensión bacteriana en PBS de una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1,0.

Se prepararon alícuotas de suspensión bacteriana de 300 μL que se incubaron durante 60 minutos a 37 °C con 10 μg de proteína quimera pura a ensayar. Luego del *binding*, las células se cosecharon a 10,000 $\times g$ por 5 min y se lavaron 2 veces con PBS (Gordillo *et al.*, 2020).

Evaluación del binding

Se utilizaron dos métodos para evaluar el nivel de *binding* obtenido: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

Una vez realizado el ensayo de *binding*, se observaron en primera instancia las bacterias decoradas con GFP usando microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Scope A1.

Adicionalmente, estas se fijaron (con paraformaldehído:PBS en proporciones 1:1) y se montaron con Mowiol para observar en microscopio confocal de fluorescencia (FV1000 Olympus confocal microscope, Olympus Inc., Japan) con lente de 63x y apertura numérica de 1,4 del Centro de Microscopía Weber de la FCEN-UBA. En estas últimas observaciones se excitó con un láser de 488 nm y se registró emisión entre 490 y 659 nm.

Para cuantificar los niveles de *binding* se utilizó el servicio de citometría de flujo de la FCEN-UBA. Los registros obtenidos fueron analizados mediante el software de

FlowJo 10.0.7 (<https://www.flowjo.com/>). Los ensayos se realizaron con pseudo-duplicados que se promediaron al momento del análisis.

Curva de binding en función del tiempo

Se realizaron ensayos de *binding* como el descrito anteriormente a distintos tiempos de incubación (0, 5, 10, 15, 30, 45 o 60 minutos). El *binding* en las células decoradas fue luego cuantificado por citometría de flujo. Se realizaron cuatro ensayos independientes, medidos en el citómetro BD FACSAria con su software correspondiente (BD FACSDiva, firmware version 6.1.3; BD Bioscience, San Jose, CA, EEUU).

Conservación de viabilidad en el tiempo

Se evaluó la viabilidad en el transcurso del tiempo (21 días) de tres tipos celulares, conservados a 4 °C: *L. acidophilus* con su *S-layer* nativa, *L. acidophilus* decapado y *L. acidophilus* decorado con GFP-CTSlpA mediante el ensayo de *binding* previamente descrito. Se calculó el título inicial y luego se determinó el número de células viables al conservar los pellets celulares a 4 °C a lo largo del tiempo.

A distintos intervalos de tiempo, se plaquearon diluciones en Solución Fisiológica (SF) desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en MRS agar. Luego de 48h de incubación a 37 °C se realizó el recuento y el cálculo de las UFC/mL.

Evaluación de la estabilidad del binding ante la preservación en el tiempo

Se evaluó la estabilidad del *binding* en el tiempo en las condiciones de preservación anteriormente mencionadas realizando un seguimiento de la fluorescencia en el tiempo de las células de *L. acidophilus* decorado. Como controles de autofluorescencia se utilizaron tanto *L. acidophilus* con su *S-layer* nativa como *L. acidophilus* decapado.

Se midió el nivel de fluorescencia a tiempo 0 y a los 7 y 14 días de conservación de los pellets celulares a 4 °C, realizando la cuantificación por citometría de flujo.

Evaluación de conservación de la viabilidad post-liofilización

Se evaluó la viabilidad celular de *L. acidophilus* inmediatamente después de un proceso de liofilizado.

Para esto se tomaron alícuotas a DO_{600nm} 1,0 de la bacteria con su *S-layer* nativa y

se cosecharon los pellets celulares. Estos se resuspendieron en 100 μ L de PBS, como control, o en 100 μ L de alguno de los siguientes protectores: leche descremada 21%, suero de queso 7,5% (Lácteos Vidal, Argentina), lactosa 7,5% o trehalosa 13%.

Se midió la viabilidad inicial inmediatamente después de resuspender los pellets, luego de un congelado *overnight*, y, finalmente, luego del liofilizado. El recuento de UFC/mL se realizó a partir de diluciones en SF desde 10^{-1} hasta 10^{-6} y plaqueo en medio MRS agar

Análisis *in Silico*

Análisis de secuencias de ADN *in silico*

Se utilizó como secuencia de referencia de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 el genoma completo subido a GenBank por Kumar *et al.* en 2023 (CP139575.1).

Además, se realizaron clonados *in silico* utilizando el software ApE- A plasmid Editor (Davis y Jorgensen, 2022) para obtener las secuencias nucleótidos correspondientes a cada una de las proteínas quimera y poder luego traducirlas a sus secuencias primarias.

Modelado de proteínas

Se utilizó el software de Alpha Fold (Mirdita *et al.*, 2022 ; Abramson *et al.*, 2024) para generar modelos tridimensionales de las proteínas quimera GFP-CTSlpA, GFP-SLAP1 y GFP-SLAP2.

Adicionalmente, se utilizó el sitio <https://server.poissonboltzmann.org/> (Jurrus *et al.*, 2018) para modelar la matriz de potenciales de carga de cada una de las proteínas de fusión, que luego se visualizaron mediante el software VMD - Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996).

Análisis Estadísticos

Todos los modelos y análisis estadísticos se realizaron utilizando Rstudio y en colaboración con el Dr. Sergio Nemirovsky, realizando modelos lineales mixtos que permitieran tener en cuenta cada experimento como un factor aleatorio, utilizando los paquetes lmer, lme4 y emmeans.

Para análisis estadísticos de los ensayos de optimización del proceso de *binding*,

luego de generar el modelo, se utilizó una prueba de comparación post hoc múltiple ajustada a Tukey ($p < 0,05$). Mientras que para analizar los resultados de la conservación del *binding* luego de 7 y 14 días de preservación en heladera se realizó, como prueba de comparación post hoc, un test de Dunnet ($p < 0,05$).

Por otro lado, la conservación de la viabilidad en el tiempo se modeló aplicando el logaritmo en base 10 a las UFC/mL (+1 para que al hacer el logaritmo de los valores en 0, este resulte igual a 0) obtenidas en los recuentos de cada día. En el modelo realizado, se consideró a cada experimento como un factor que agrega variabilidad de forma aleatoria, y se permitió que para cada uno hubiera una ordenada al origen distinta, y que, para cada tratamiento, un mismo experimento pudiera tener distintas pendientes con el pasar de los días. Se realizó una prueba de comparación post hoc múltiple ajustada a Tukey ($p < 0,05$) para comparar las pendientes estimadas para cada tratamiento.

Finalmente, la viabilidad a lo largo del proceso de liofilización, se modeló aplicando la raíz cuadrada a los datos. Luego se realizaron dos pruebas de comparación post hoc múltiple ajustada a Tukey ($p < 0,05$), una agrupando según el lioprotector utilizado y otra según el momento del proceso (*input*, luego de congelar o luego de liofilizar).

Resultados

Análisis preliminares *in silico*

Con el objetivo de realizar una evaluación preliminar del potencial de cada uno de los dominios SLAP para ser utilizados como *carrier* en comparación con el C-terminal entero, se modeló el plegado de cada una de las proteínas fusión. Al comparar estos tres modelos, se apuntó a corroborar si las proteínas quimera con cada uno de los SLAP aislados, mantienen el plegado y la distribución de carga observados en la quimera con el C-terminal entero.

Se comenzó realizando un clonado virtual a partir de la secuencia del plásmido pET28b-GFP (construido previamente en el laboratorio) y las secuencias que se amplificaron con cada par de *primers*, correspondiendo tanto al C-terminal entero, como cada uno de los dominios SLAP que lo forman, SLAP1 y SLAP2 (en orden de N-terminal a C-terminal). A partir de esto se obtuvieron plásmidos como el mostrado a continuación (Figura 6), y de ellos, se pudieron tomar las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada una de las proteínas de fusión.

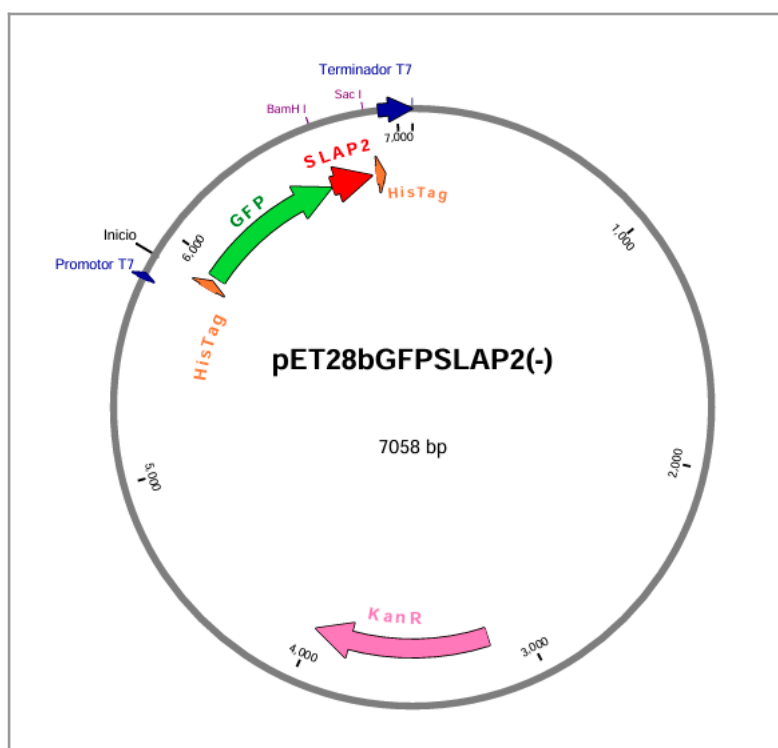


Figura 6. Diagrama del plásmido obtenido a partir de la ligación de pET28b-GFP y el inserto SLAP2. Realizado con ApE - A plasmid Editor.

Se tradujeron estas tres secuencias nucleotídicas a sus respectivas secuencias primarias de aminoácidos (Tabla 1), y a partir de estas últimas se modeló el plegamiento esperado para cada una de las proteínas.

SLAP1	MHNAYYYDKDAKRVGTDSVKRYNSVSVLPNTTTINGKTTYQVVENGKAVDKYINAAN
SLAP2	DGTRKTLKHNAVYVASSKKRANKVVLKKGEVVTTYGASYTFKNGQKYYKIGDNTDKTYV KVANFR

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos correspondiente a cada los dominios SLAP utilizados en esta tesis (en rojo se destacan los residuos conservados y directamente involucrados en el *binding* a ácidos teicoicos y lipoteicoicos).

Con estos modelos se buscó evaluar dos cosas: por un lado, que el plegado general de los dominios no se viera alterado al estar aislados (Figura 7.A y 7.B), y, por el otro, la posición en de los residuos responsables del *binding*, altamente conservados

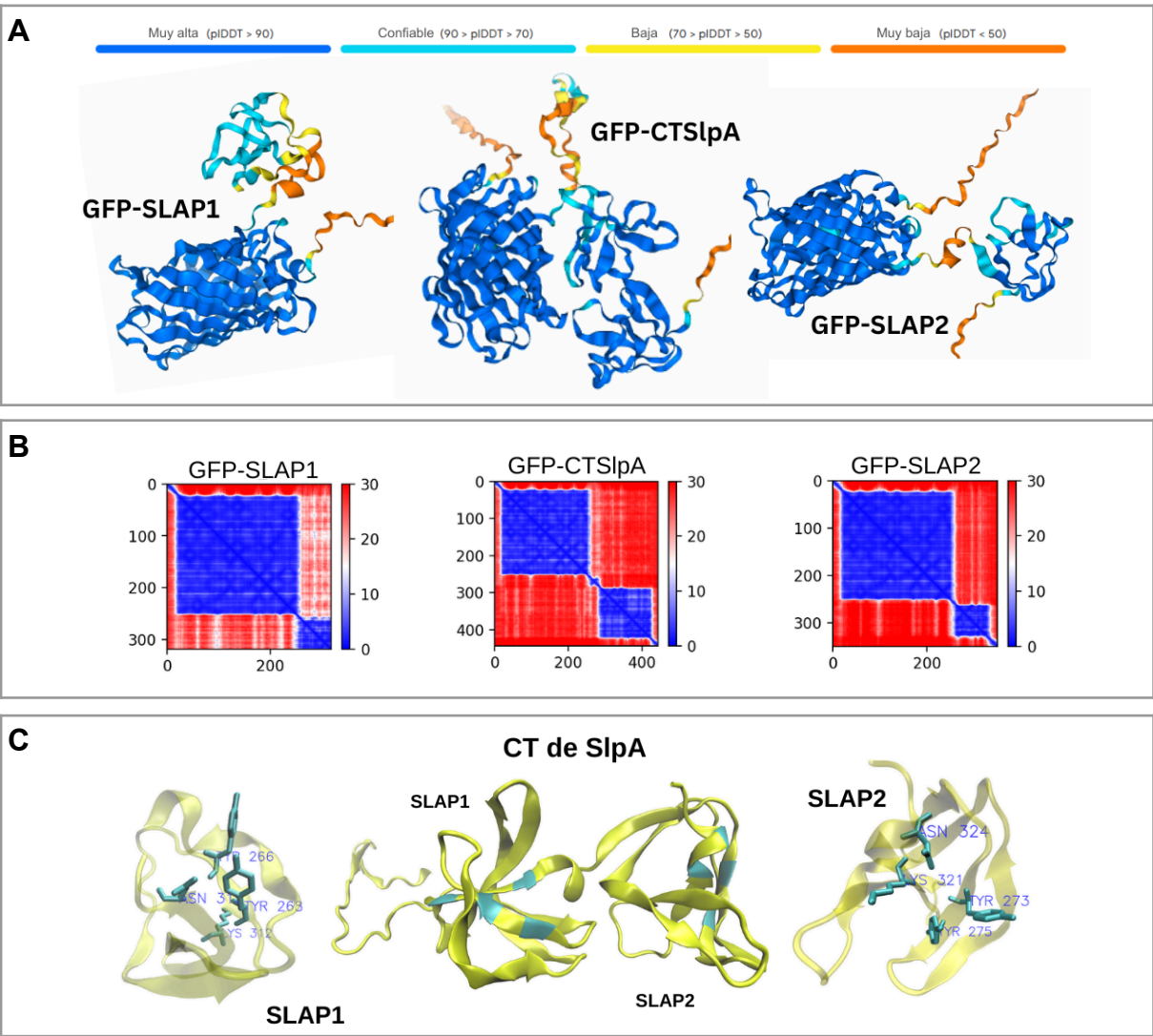


Figura 7. Plegado (A) y Alineamiento Predicho por Posición (B) obtenido con AlphaFold para cada una de las construcciones. La sección C muestra la ubicación de cada uno de los residuos conservados en las proteínas plegadas (realizado con VMD).

y que interactúan con las cargas negativas del poliglicerol-fosfato de los LTA y WTA (Figura 7.C) (Fina Martin *et al.*, 2019; Sagmeister *et al.*, 2024).

A continuación, se generó la matriz de potenciales electrostáticos de cada una de las quimeras, representado en azul los positivos y en rojo los negativos. Al comparar estos resultados (Figura 8) con los obtenidos en el trabajo de Sagmeister *et al.* (2024), donde se evaluó el C-terminal entero, sin encontrarse en quimera con otra proteína, se observa una notable consistencia, lo que sugiere que las cargas no se ven alteradas ni por estar en quimera con GFP, ni por encontrarse aislados los dominios SLAP del C-terminal. Adicionalmente, se visualiza claramente que la mayor densidad de cargas positivas se encuentra alrededor del sitio conservado en el SLAP2, sugiriendo que este podría tener interacciones más fuertes con las cargas negativas de los fosfatos de los polímeros de pared. Esta característica resalta su potencial como un *carrier* prometedor para la exhibición de proteínas heterólogas.

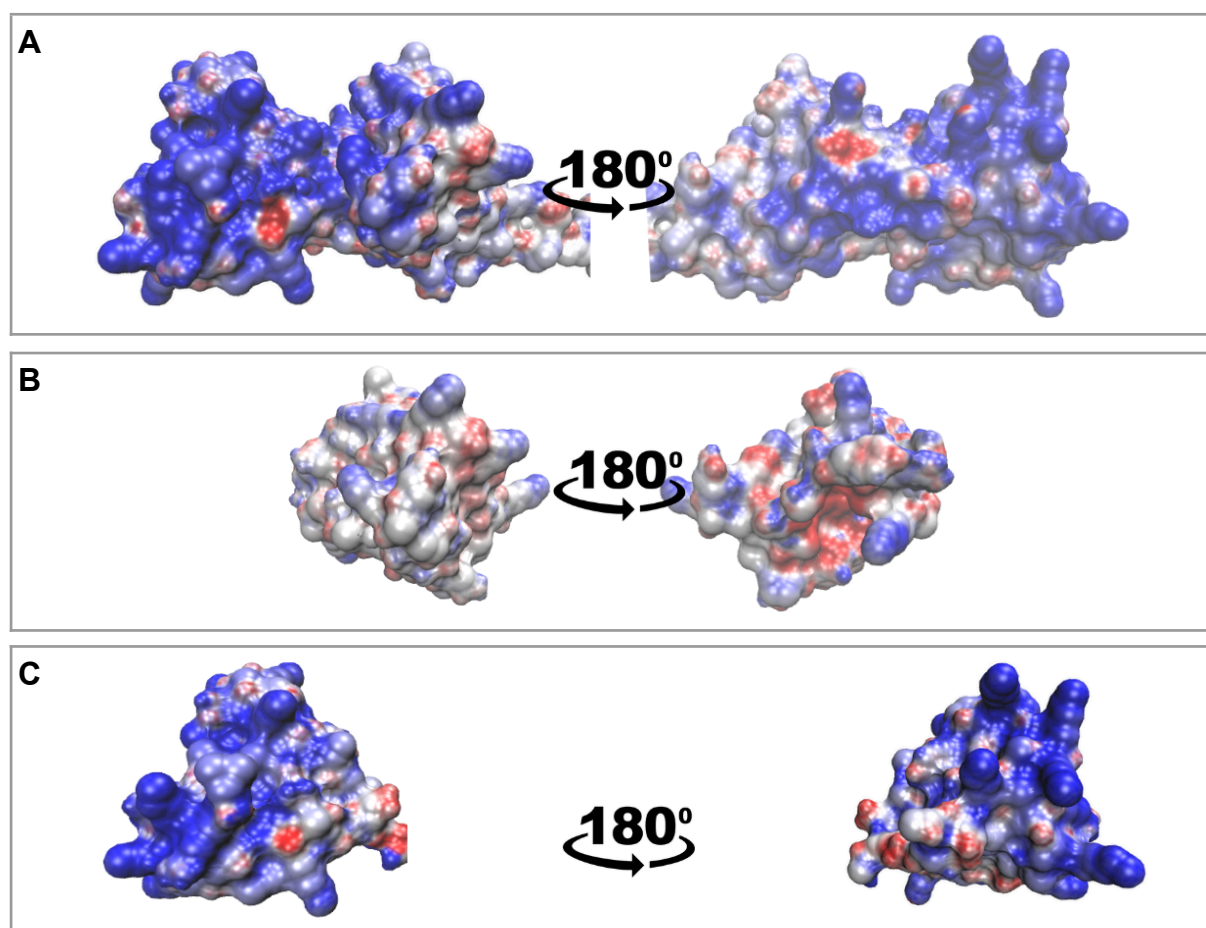


Figura 8. Modelos de superficie de CTSIpA (A), SLAP1 (B) y SLAP2 (C) en quimera con GFP. Coloreado según potencial de cargas, siendo azul las más positivas y rojo las más negativas.

Clonado de GFP-SLAP2

Realizados los estudios estructurales *in silico*, que respaldaron el potencial del dominio SLAP2 como *carrier*, y contando con las construcciones pET28b-GFP-CTSlpA y pET28b-GFP-SLAP1 previamente disponibles en el laboratorio, se llevó a cabo el clonado de GFP-SLAP2 para proceder con su expresión y evaluación experimental.

En primer lugar, se extrajo de ADN genómico de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Figura 9.A), y se amplificó por PCR la porción de 0,21 kpb correspondiente a SLAP2 (Figura 9.B) del gen *slpA* para luego digerirlo con las enzimas de restricción SacI y BamHI. Paralelamente, se extrajo ADN plasmídico de células *Escherichia coli* JM109 transformadas con pET28b-GFP (Dieterle *et al.*, 2014), de 6,86 kpb, que luego se digirió con las mismas enzimas de restricción (Figura 9.A), se incubó con CIAP (Promega) para ser, finalmente, purificado.

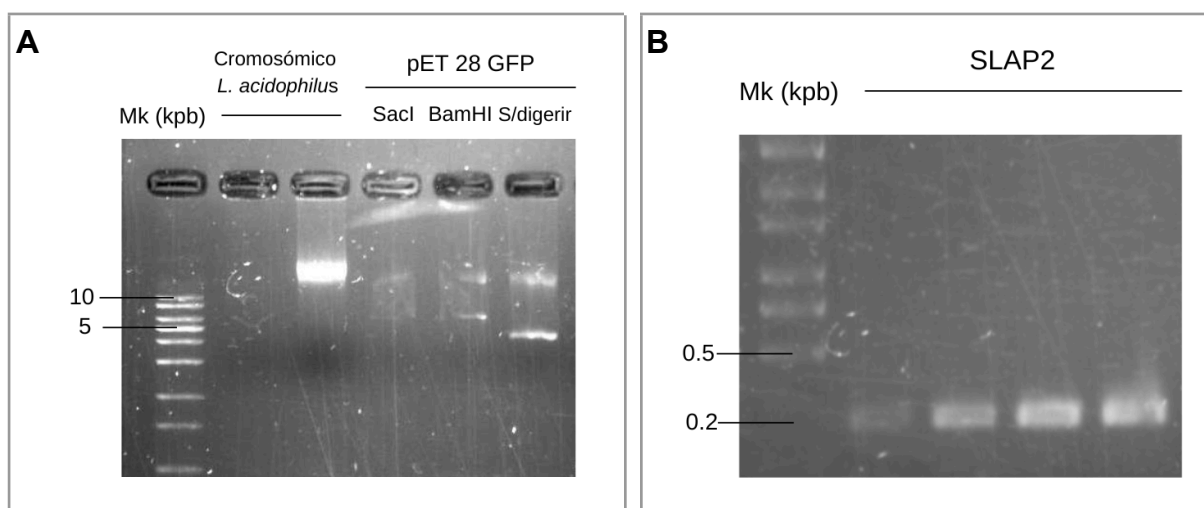


Figura 9. Electroforesis en geles de agarosa 1%. ADN Cromosómico extraído de *L. acidophilus* ATCC 4356 (A), pET28b-GFP digerido con SaCI, con BamHI y sin digerir (A) y fragmento correspondiente al dominio SLAP2 del CT de SlpA obtenido por PCR (B)

Una vez purificado el vector de geles de agarosa 0,7% corridos de modo preparativo, se lo cuantificó junto con el inserto y se procedió con la ligación. Se transformó el producto de ligación, de unas 7,05 kpb, a *E. coli* JM109 por electroporación. El chequeo de clones positivos se realizó mediante PCR (Figura 10.A) y por retraso plasmídico en gel (Figura 10.B). Una vez corroborados los clones con la construcción deseada, se purificó el plásmido a partir de estas bacterias de la cepa de clonado y se procedió con la transformación de la cepa de expresión

(*Escherichia coli* HMS174) para poder posteriormente realizar la inducción y la expresión de la proteína de fusión de interés.

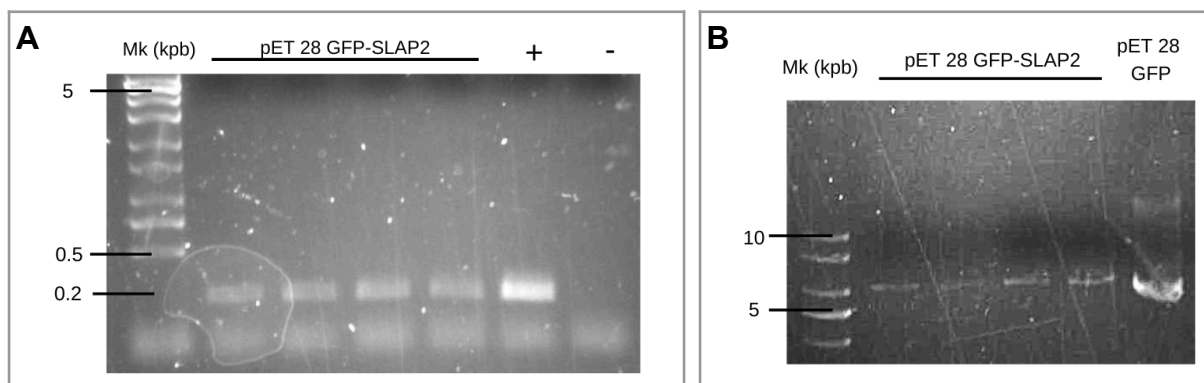


Figura 10. Electroforesis en geles de agarosa 1%. Identificación de clones positivos por PCR (A) y por retraso plasmídico (B).

Expresión, purificación y evaluación de las proteínas de fusión

Para poder eventualmente evaluar al dominio SLAP2 como proteína *carrier*, primero se debieron poner a punto las condiciones de expresión de GFP-SLAP2 teniendo en cuenta temperatura, nivel de agitación y concentración de inductor (IPTG). Para corroborar que lo expresado fuera efectivamente esta quimera, luego de la inducción e incubación, se cosecharon las células, se lisaron y finalmente se corrieron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes a partir de los extractos proteicos, revelados por tinción con Coomassie Blue.

Las condiciones más favorables fueron a 19 °C, 200 rpm y con una concentración de IPTG de 0,1 mM dado que al cosechar las células se notaba más verde el pellet y parecía haber mejor solubilización (Figura 11.A y 11.C). Dicho eso, es necesario mencionar que, a pesar de esta aparente mejora en la solubilización, la presencia de los cuerpos de inclusión siguió siendo evidente en comparación con la observada en cualquiera de las otras purificaciones de proteínas de fusión. Esto se visualizó tanto al realizar otras electroforesis en geles de poliacrilamida, como simplemente observando las fracciones solubles e insolubles obtenidas luego de sonicar (Figura 11.B).

A continuación, con el objetivo de purificar y concentrar la escasa cantidad de proteína soluble obtenida, se procedió con el protocolo de purificación utilizando una columna de afinidad de HisTrap. Sin embargo, posterior a los pasos de elución, se pudo evidenciar la pérdida de la fluorescencia previamente observada indicativo de

la presencia de GFP-SLAP2. Es debido a eso que para confirmar la identidad de la proteína quimera, cuyo peso molecular es aproximadamente de 39 kDa, se realizaron ensayos de *Western Blot* revelando con anticuerpo policlonal anti *S-layer* (Figura 11.D). De esta manera se ha podido corroborar la expresión de la proteína quimera deseada y que la misma se acumula en cuerpos de inclusión. Por ese motivo, durante los pasos de purificación, GFP-SLAP2 queda retenida tanto en el filtro utilizado post-sonicación como en la columna de afinidad.

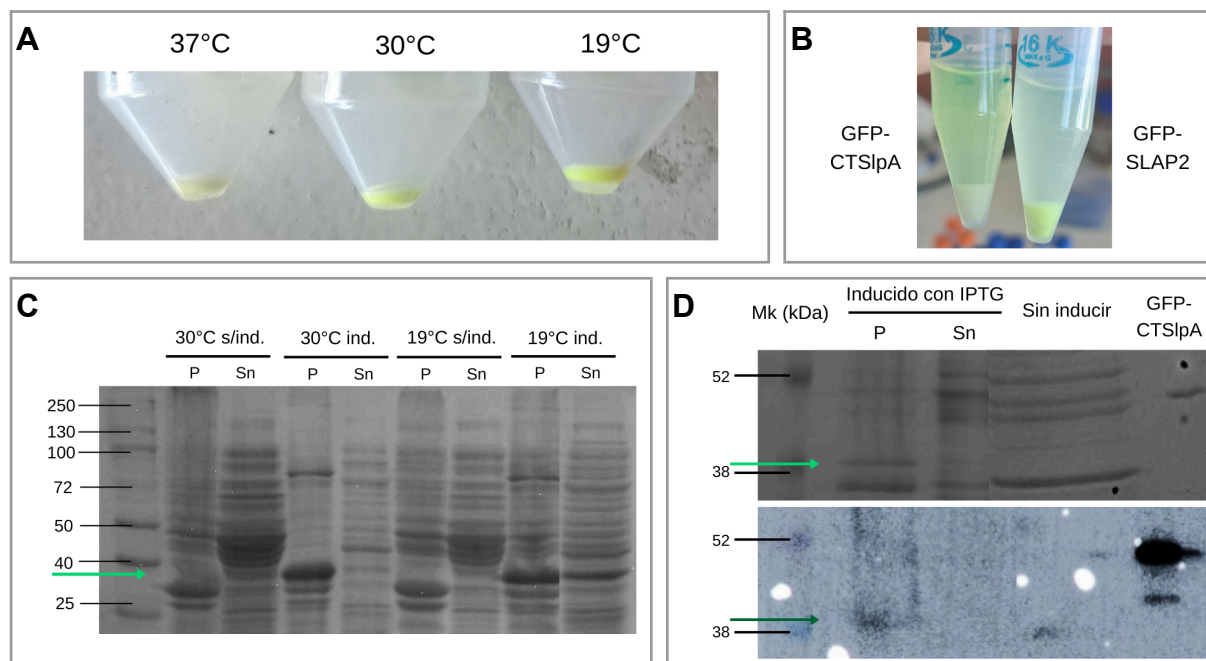


Figura 11. Pellets celulares de expresiones de SLAP2 (PM= 39.2 kDa) inducidas con 0,1 mM de IPTG, a 200 rpm y 37 °C, 30 °C y 19 °C respectivamente (A). Pellets y sobrenadantes obtenidos post-sonicación luego de las inducciones (B) a 30 °C y 19 °C ya mencionadas y SDS-PAGE 10% de los mismos y sus controles (C). SDS-PAGE 10% de inducción a 19 °C y control revelado por tinción con Coomassie Blue (superior) y *Western Blot* (inferior) (D).

A partir de estos resultados, se pudo concluir que el dominio SLAP2 no sería una opción adecuada para ser utilizado como *carrier* de proteínas heterólogas funcionales en la superficie de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, ya que su uso requeriría etapas adicionales para la purificación a partir de cuerpos de inclusión, lo que resultaría en procedimientos más complejos, prolongados y considerablemente menos operativos.

Posteriormente, se procedió a expresar y purificar las construcciones quimera GFP-SLAP1 y GFP-CTSlpA, para poder evaluar la capacidad de *binding* de este primer dominio. Ambas proteínas de fusión fueron purificadas con éxito: GFP-SLAP1

eluyó a una concentración de 100 mM de imidazol (Figura 12.A), obteniéndose un purificado final de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Figura 12.B); mientras que GFP-CTSlpA eluyó a 150 mM de imidazol, alcanzando una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

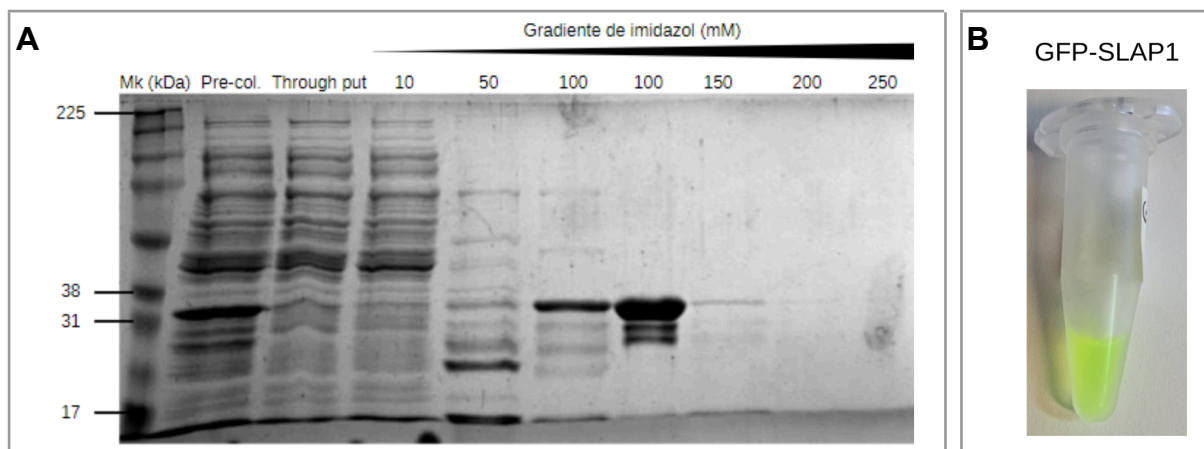


Figura 12. SDS-PAGE mostrando el esquema de purificación de GFP-SLAP1 (A) y eppendorf conteniendo el purificado final (B).

Una vez purificadas GFP-SLAP1 y GFP-CTSlpA, se procedió a realizar los ensayos de *binding* con cada una de ellas a fin de evaluar el potencial de SLAP1 para unirse a la envoltura bacteriana y ser usado como molécula *carrier*. El ensayo de *binding*, permitió por un lado, comparar el nivel de adhesión logrado para cada *carrier*, y por otro lado confirmar la importancia del paso de decapado de la *S-layer* nativa. Para ello, se evaluó el *binding* tanto en bacterias decapadas como en aquellas que conservaban su *S-layer* nativa, y las muestras obtenidas se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia (Figura 13).

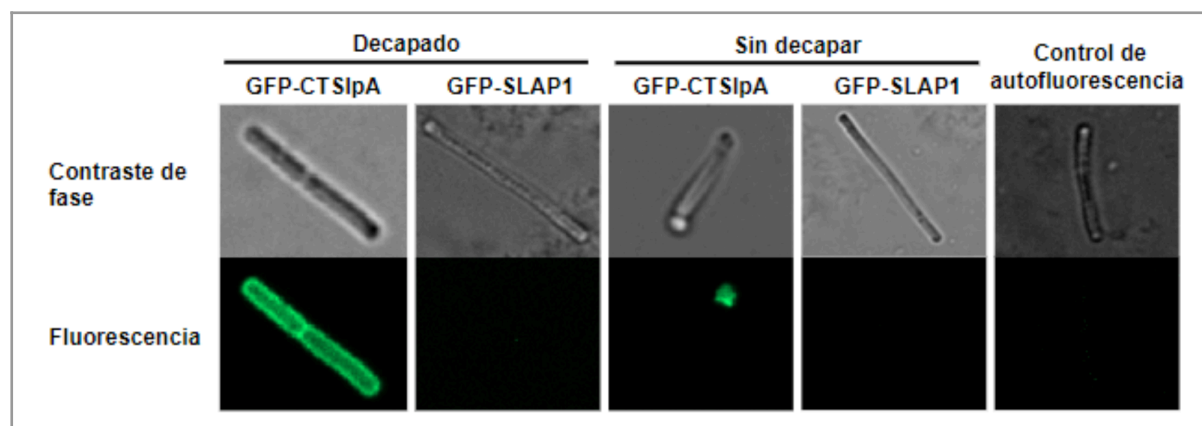


Figura 13. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia obtenidas con lente de 63x y apertura numérica de 1,4. Se excitó con láser de 488 nm y se registró emisión entre 490 y 659 nm.

Los resultados mostraron que el dominio SLAP1, por sí solo, no es capaz de adherirse a la envoltura de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Asimismo, se evidenció claramente la necesidad del proceso de decapado previo al *binding* o decorado, dado que, incluso al emplear un control con máxima fluorescencia y adhesión comprobada, únicamente se observó un *binding* mínimo, localizado en los polos de las bacterias (Figura 13)

Optimización del protocolo de *binding*

Un ensayo de *binding* estándar, realizado bajo las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos, requiere aproximadamente dos horas, de las cuales una se corresponde al tiempo de incubación con la proteína quimera. Por ello, este estudio tuvo como objetivo hallar tiempos menores de incubación que alcancen los mismos niveles de *binding* y así optimizar el proceso para hacerlo más eficiente.

El *binding* se midió a través de la fluorescencia emitida por la proteína GFP de las quimeras. Esta fluorescencia se cuantificó por citometría de flujo, que permite distinguir poblaciones de bacterias sin decorar de poblaciones decoradas (Figura 14.A). Para este ensayo se cuantificó la fluorescencia a distintos tiempos de incubación (0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos) de *L. acidophilus* ATCC 4356 con la proteína de fusión (Figura 14.C).

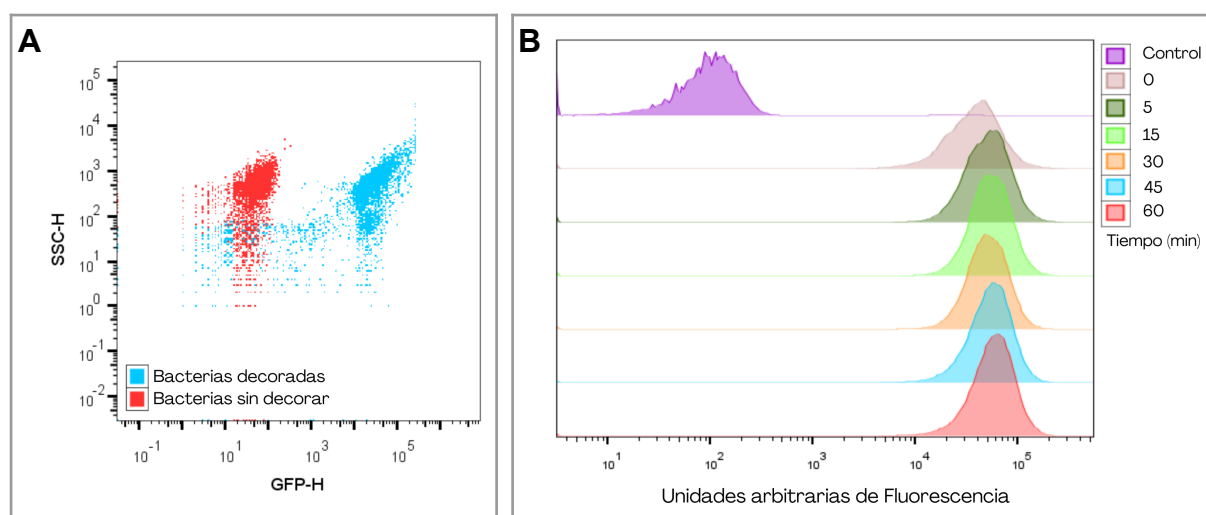


Figura 14. Distribución de poblaciones de bacterias decoradas y sin decorar (A) e histogramas de intensidad de fluorescencia para cada tiempo de incubación (B).

Es necesario mencionar que surgieron diversos inconvenientes técnicos con el servicio de citometría, por lo que cada uno de los experimentos presenta considerable variabilidad respecto a los otros (Figura 15.A), y fue necesario incorporar esto al modelo como un factor aleatorio.

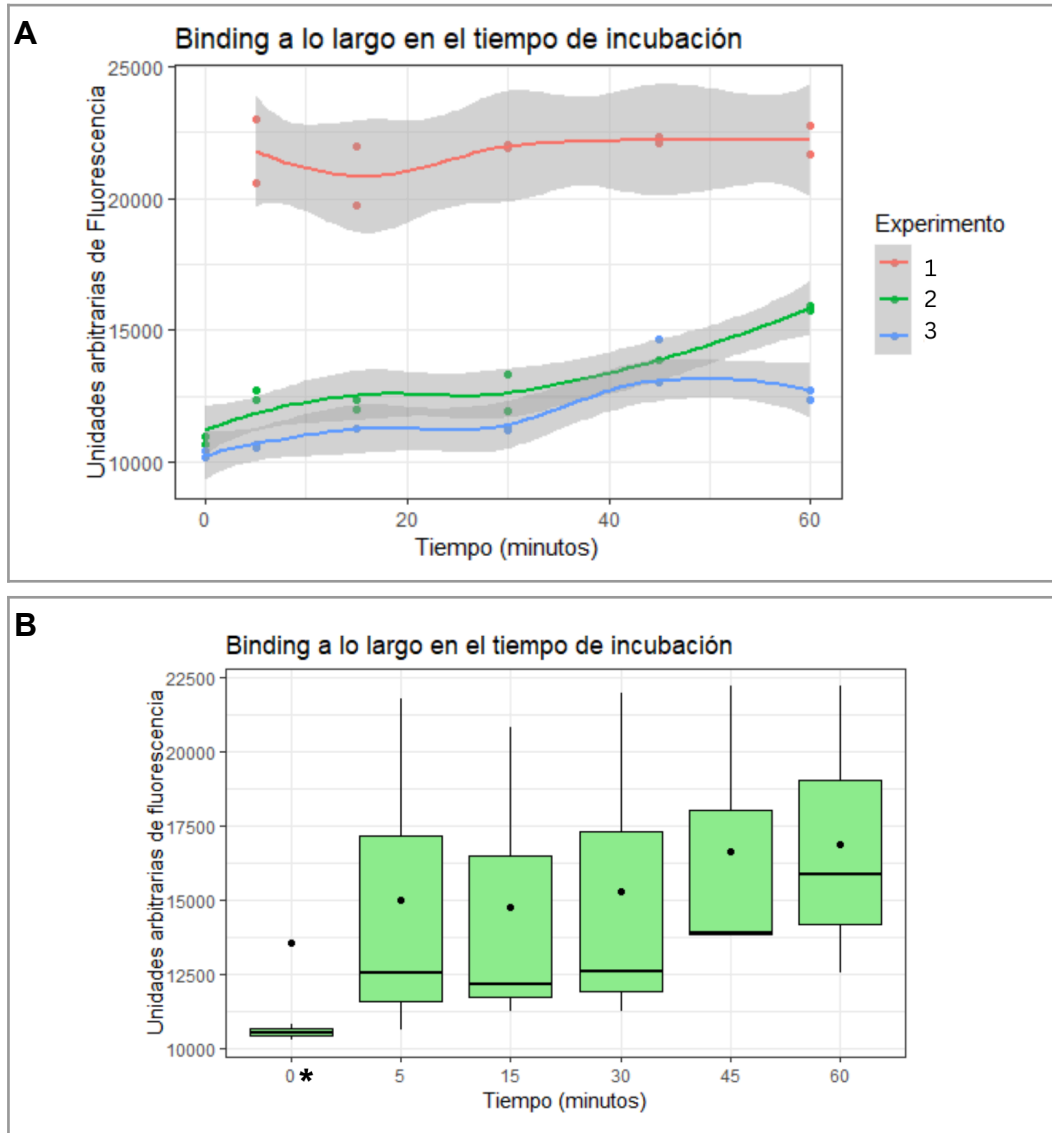


Figura 15. Curvas de los datos de fluorescencia correspondientes a cada una de las tres réplicas (A) y boxplots para cada tiempo medido (B), representando la media estimada por el modelo con un punto. El * junto al tiempo 0 indica $p < 0,05$ comparando su media con la de 60 minutos.

Se observó que el único tiempo cuya media presentó una diferencia significativa respecto a la media máxima (60 minutos) fue el tiempo 0, con un valor de p obtenido en el contraste de 0,0163 (Figura 15.B). Los tiempos de 5, 25 y 30 minutos no mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el de 60

minutos, aunque presentaron una tendencia a una menor fluorescencia. Por otro lado, a los 45 minutos se obtuvo un valor de p de 0,9991, lo que indica que este tiempo puede considerarse equivalente a una incubación de 60 minutos.

De este modo, se logró reducir el tiempo de incubación mínimo necesario para obtener las bacterias completamente decoradas, estableciendo que 45 minutos es suficiente para alcanzar este objetivo.

Conservación de la viabilidad a lo largo del tiempo

Una vez obtenidas las células viables decoradas, es necesario definir una formulación adecuada para su administración. Esta debe maximizar la sinergia entre los beneficios de las proteínas de interés y las propiedades probióticas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Para lograrlo, es crucial garantizar la viabilidad del microorganismo en el sitio de acción (FAO-OMS, 2006; Hill *et al.*, 2014).

Es por eso que, tras haber determinado que el único dominio evaluado que realmente resulta un candidato prometedor para funcionar como *carrier* de proteínas heterólogas en la superficie de *Lactobacillus acidophilus* (BAL) es el C-terminal entero, se debió verificar que el decorado con el mismo no afectase la viabilidad de las bacterias. Por lo tanto, se llevaron a cabo ensayos para evaluar la conservación de la viabilidad en el tiempo ante el almacenamiento en refrigeración, similar al que podrían tener productos convencionalmente utilizados para *delivery* de probióticos, como, por ejemplo, el yogur.

Los ensayos de conservación se llevaron a cabo durante 21 días de almacenamiento a 4 °C. Se realizaron mediciones en el día 0 (input) y luego a los días 7, 14 y 21, con algunos tiempos intermedios de conservación variables. Se evaluó la viabilidad en el transcurso del tiempo de tres tipos celulares, conservados a 4 °C: *L. acidophilus* con su *S-layer* nativa, *L. acidophilus* decapado y *L. acidophilus* decorado con CTSIpA-GFP mediante el ensayo de *binding* previamente descrito.

Al analizar la distribución de los datos, se observó un patrón similar a un decaimiento exponencial. Por lo tanto, para poder aplicar modelos lineales, se realizó una transformación logarítmica de los datos. Esta transformación permitió que la variación de Y en función del tiempo adoptara un comportamiento más lineal (Figura 16.A). Además, incluso sin aplicar el modelo, resulta evidente que los puntos correspondientes al tratamiento decorado se encuentran en la parte superior de la

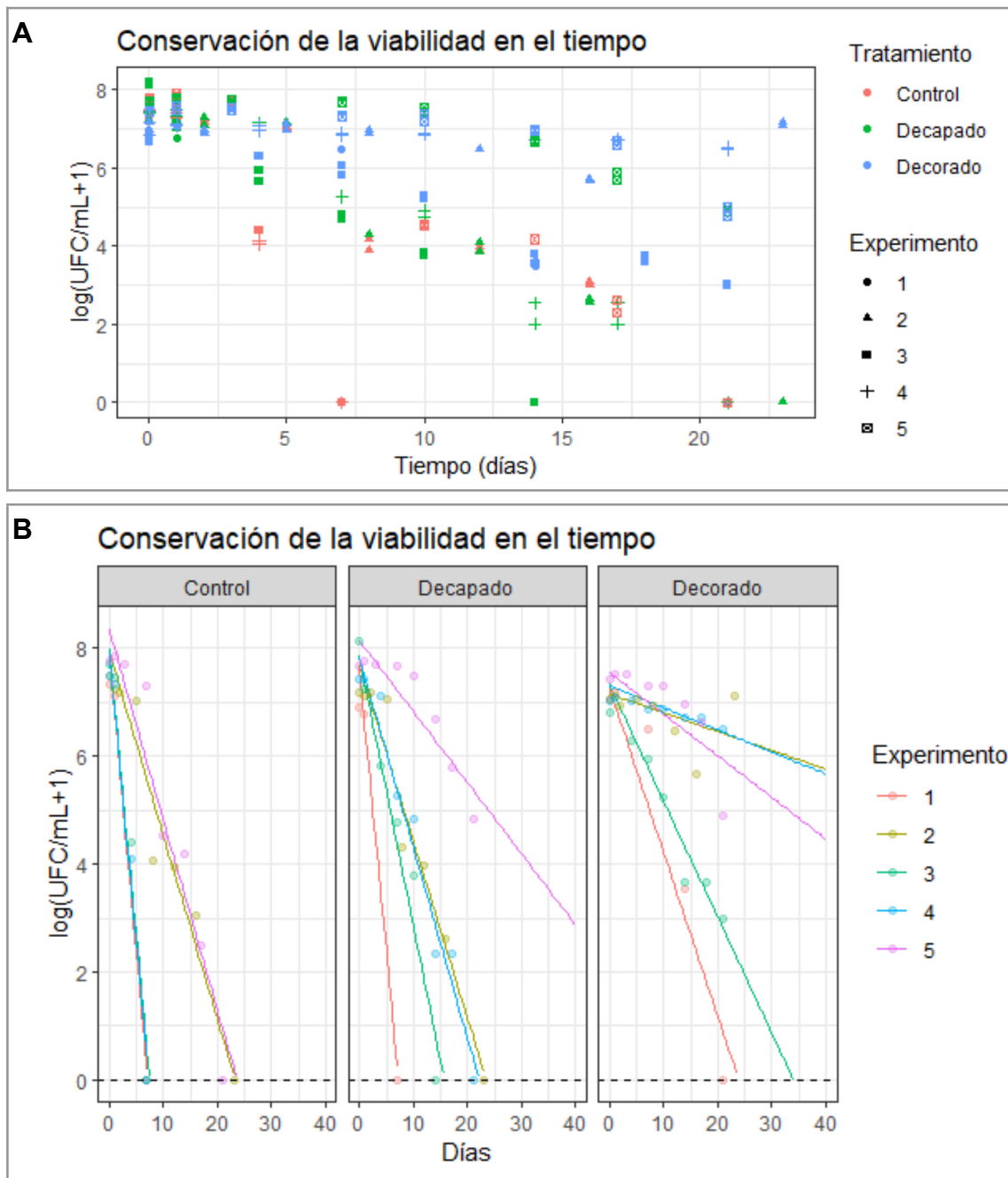


Figura 16. Cinéticas del recuento de viables expresado en logaritmo en base 10 de las UFC/mL medidas en cada día para cada tratamiento (A) y curvas obtenidas al modelar dicho comportamiento, separadas por tratamiento.

distribución, mientras que aquellos con la capa-S *wild type* se ubican en la parte inferior (Figura 16.A).

Una vez observada la distribución de los datos, se procedió a modelar su comportamiento. Al graficar los resultados de los modelos obtenidos, se pudo observar que las pendientes de decaimiento de *Lactobacillus acidophilus* control son considerablemente más pronunciadas que las de la bacteria decorada (Figura 16.B).

Esta diferencia fue estadísticamente significativa, con un valor de p de 0,02, lo que resulta muy prometedor en términos de la viabilidad de almacenamiento de un producto final. Adicionalmente, con respecto a las células desprovistas de su capa-S nativa se observó que las pendientes de sus curvas no presentan diferencias significativas con respecto de las curvas control. Observando los gráficos, es posible apreciar que el comportamiento ante este tratamiento resultó un intermedio entre el control con *S-layer wild type* y el tratamiento decorado con las proteínas quimera (Figura 16.B).

Conservación del *binding* a lo largo del tiempo

En los experimentos de almacenamiento a 4 °C por 21 días, no sólo se midió la viabilidad, sino que también se midieron los niveles de *binding* (a través del seguimiento de células marcadas por fluorescencia) en los días 0, 7 y 14. Se realizaron estas mediciones con el objetivo de verificar por cuánto tiempo se mantiene de manera estable el decorado. Los datos del día 21 no se pudieron recolectar por inconvenientes técnicos con el servicio de citometría. Sin embargo, mediante análisis por microscopía, se confirmó la persistencia de la marca, aunque no fue posible determinar con precisión la proporción respecto a la intensidad original.

Al analizar los datos obtenidos por citometría de flujo (Figura 17.A), se observó claramente que no sólo existe variabilidad aleatoria para cada experimento, sino que también hay una variabilidad explicada por el citómetro utilizado. Fue necesario utilizar un citómetro distinto para algunos de los experimentos, y, aunque las curvas

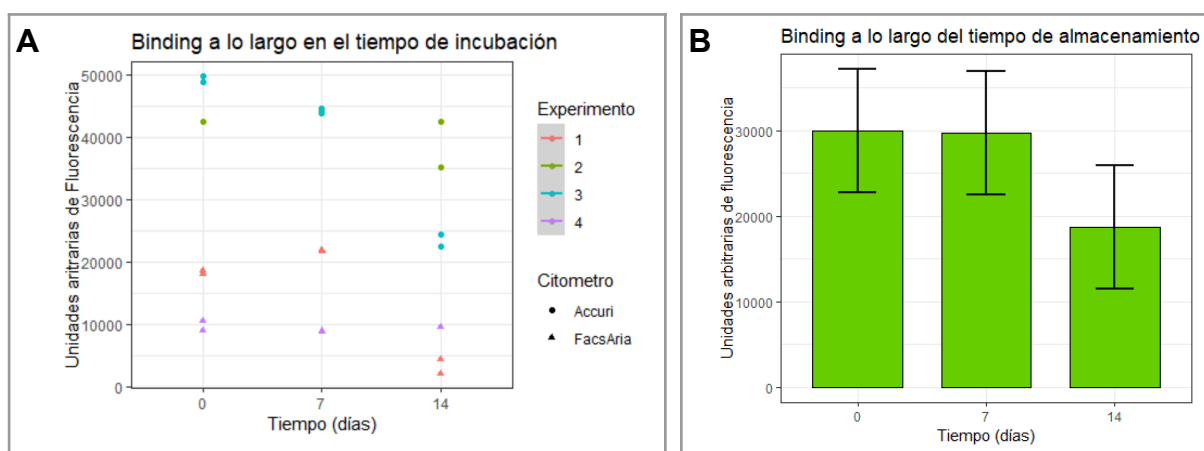


Figura 17. Datos obtenidos por citometría de flujo (A) y las medias obtenidas a partir del modelado (B).

muestran la misma tendencia, los valores resultan mucho más elevados. Por esto se incluyó el citómetro como un factor fijo en el análisis.

Habiendo aplicado el modelo, se obtuvieron medias estimadas para cada tiempo, junto con un límite inferior y superior (Figura 17.B). Al comparar estas medias, las diferencias entre ellas no resultaron significativas, sin embargo, aunque al comparar el día 0 con el 7 el p valor es de 0,9987, lo que indica que el *binding* se mantuvo totalmente estable, entre el día 0 y el 14 y el día 7 y el 14, los valores de p obtenidos fueron de 0,0950 y 0,1011 respectivamente, lo que no llega a ser significativo, pero muestra una tendencia al descenso de los niveles de *binding*.

De este modo, se demostró que el decorado de las células no solo incrementa significativamente la supervivencia de la bacteria durante su almacenamiento a 4 °C, sino que además el *binding* permanece estable durante siete días y se mantiene incluso hasta los 14 días.

Cabe destacar que, antes de analizar los datos de citometría, tanto para este ensayo como para el de optimización del proceso de *binding*, se corroboró que todos los controles dieran valores de fluorescencia despreciables en comparación a las bacterias fluorescentes. En efecto, los valores de autofluorescencia de *L. acidophilus* con su capa S nativa y decapada, así como los correspondientes a agua y PBS (*buffer* utilizado para resuspender las muestras), fueron más de dos órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos para *L. acidophilus* decorada (Figura 18).

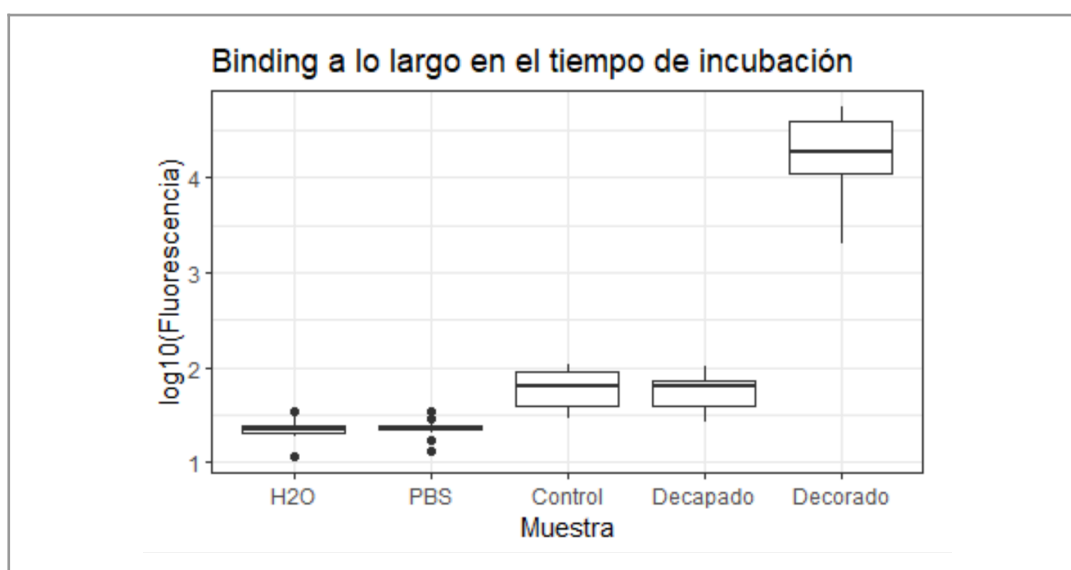


Figura 18. Boxplot del logaritmo en base 10 de las unidades arbitrarias de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo para cada uno de los controles y para la muestra decorada.

Conservación de la viabilidad post-liofilización

Con el objetivo de maximizar la vida útil del potencial producto final, se evaluó el proceso de liofilización como una estrategia prometedora para la preservación de bacterias viables (Montel Mendoza *et al.*, 2016; Zhen *et al.*, 2020; Lee J. *et al.*, 2023). Se realizó un ensayo preliminar en el que se liofilizaron células de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con su capa-S *wild type*, sin su capa-S y decoradas con la proteína quimera GFP-CTSlpA.

Como resultado de este ensayo, se obtuvo un descenso promedio al 0,2% de la viabilidad inicial, semejante al documentado por otros investigadores (Lee J. *et al.*, 2023). Por lo tanto, se procedió a evaluar tratamientos potenciales para proteger a las bacterias y maximizar su supervivencia durante el proceso de liofilización.

Se llevaron a cabo diversos ensayos preliminares en los que se evaluaron un total de 13 tratamientos distintos. Estos abarcaron desde resuspender los pellets celulares en soluciones acuosas de azúcares o en matrices más complejas como la leche (Montel Mendoza *et al.*, 2016; Lee J. *et al.*, 2023), hasta tratamientos de pre-crecimiento en altas concentraciones de NaCl (Louesdon *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2022) o pre-tratamientos de shock térmico (Zhen *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2022) y tuvieron resultados variables en cuanto a su efectividad.

A partir de estos ensayos, se seleccionaron 4 tratamientos que mostraron los mejores resultados iniciales: resuspensión del pellet celular en leche descremada al 21%, suero de queso al 7.5%, lactosa al 7.5% y trehalosa al 13%. Con estos cuatro candidatos, se realizaron ensayos adicionales para medir la viabilidad celular en tres etapas: la viabilidad inicial, la viabilidad posterior al proceso de congelado previo a la liofilización, y la viabilidad tras la liofilización (Figura 19 y Tabla 2).

	Control	Leche	Suero	Lactosa	Trehalosa
Input	7,65 ± 0,46	7,78 ± 0,09	7,83 ± 0,22	7,65 ± 0,26	7,64 ± 0,32
Post-congelado	7,17 ± 0,31	7,72 ± 0,17	7,67 ± 0,22	7,50 ± 0,29	7,57 ± 0,34
Post-liofilizado	3,51 ± 0,19	7,43 ± 0,26	7,47 ± 0,09	7,31 ± 0,22	7,31 ± 0,23
Supervivencia	0,26%	49,02%	45,18%	49,08%	48,42%

Tabla 2. Logaritmo en base 10 de las UFC/mL a lo largo del proceso de liofilización y porcentaje de supervivencia final

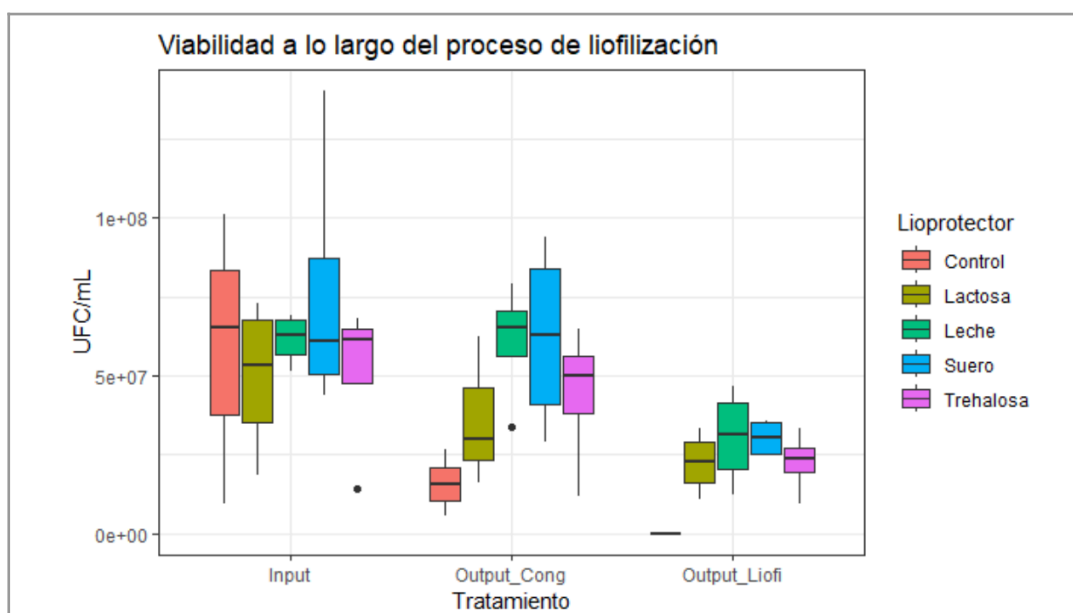


Figura 19. Boxplots de viabilidad en cada paso del proceso de liofilización, diferenciados según los protectores utilizados

Primero, se realizaron contrastes entre cada etapa del proceso de liofilizado, separados por lioprotector utilizado (Tabla 3). En ellos, se pudo observar que, respecto a su control, todos las post-liofilización presentaban una diferencia significativa, sin importar el lioprotector utilizado. Vale la pena resaltar el hecho de que las diferencias en el tratamiento control resultan muchísimo más pronunciadas.

	Control	Leche	Suero	Lactosa	Trehalosa
<i>Input</i> vs. Congelado	0,0040	0,9908	0,5658	0,7211	0,7943
<i>Input</i> vs. Liofilizado	<0,0001	0,0127	0,0020	0,0271	0,0220

Tabla 3. P-valores obtenidos de los contrastes entre las medias del *Input* y el *output* obtenido post-congelado y el *Input* y el *output* final, post-liofilizado, separado por lioprotector utilizado.

A continuación, se realizaron también contrastes dentro de cada grupo, es decir, se contrastaron las medias de todos los *inputs*, las de las viabilidades post-congelado y las de las viabilidades finales (Tabla 4).

	Ctrl. vs. Leche	Ctrl. vs. Suero	Ctrl. vs. Lactosa	Ctrl. vs. Trehalosa
<i>Input</i>	0,9788	0,8148	0,9998	1,000
Congelado	0,0484	0,0513	0,4512	0,3122
Liofilizado	0,0056	0,0047	0,0208	0,0202

Tabla 4. P-valores obtenidos de los contrastes entre las medias del control y cada uno de los protectores utilizados, separados por el momento del proceso.

A partir de estos resultados, se observa que las viabilidades iniciales fueron prácticamente iguales tanto para el control como para todos los protectores evaluados (Tabla 4) y que estas disminuyeron progresivamente a lo largo del proceso de liofilización (Tabla 3). Sin embargo, al comparar las medias de UFC/mL obtenidas con cada lioprotector tras la liofilización con las del control, se evidenciaron diferencias significativas (Tabla 4). Esto demuestra la eficacia de los agentes lio- y crioprotectores en mejorar la supervivencia de las bacterias durante este proceso.

Discusión y Conclusiones

Las bacterias ácido lácticas presentan varias ventajas para ser utilizadas como vehículos de presentación de proteínas heterólogas. Entre ellas se encuentran su uso seguro debido a su carácter GRAS, su capacidad de sobrevivir al ambiente hostil del tracto gastrointestinal (bajo pH, alta concentración de sales biliares, resistencia a proteasas) donde son retenidas de 2 a 3 días y colonizan las mucosas, y su baja inmunogenicidad intrínseca y propiedades adyuvantes (Vizoso Pinto, 2009; Rocha-Ramírez *et al.*, 2017).

En particular *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, cepa aislada originalmente de humanos, presenta ventajas adicionales gracias a su carácter probiótico (Mustapha *et al.*, 1997; Elnaz *et al.*, 2017; Cadore *et al.*, 2021; Zhen *et al.*, 2021). Los probióticos han sido definidos como “microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador” (FAO-OMS, 2016; Hill *et al.*, 2014).

Adicionalmente, esta cepa cuenta con una capa capa-S que se autoensambla sobre la superficie de la célula (Figura 3) y está formada principalmente por la proteína SlpA, cuyo dominio carboxilo terminal logra la unión a la envoltura de la bacteria mediante interacciones con los LTA y WTA asociados a ella (Fina Martin *et al.*, 2019). Tras analizar las secuencias de las proteínas de capa-S de diferentes especies de lactobacilos, Sagmeister *et al.* (2024) concluyeron que la identidad entre estas proteínas es relativamente baja, excepto en los dominios de unión a la envoltura, los cuales están altamente conservados. El dominio C-terminal de *L. acidophilus*, ha sido utilizado exitosamente como *carrier* para exhibir diversas proteínas heterólogas sobre su superficie (Gordillo *et al.*, 2020; Uriza *et al.*, 2020; Gilfillan *et al.*, 2023).

Estos antecedentes abren la posibilidad de conjugar los beneficios del probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 con la habilidad de exponer proteínas en alta densidad. En este contexto, el presente trabajo evaluó el potencial del dominio C-terminal de la proteína SlpA de esta cepa (dominio de unión a la envoltura) como *carrier* así como de cada uno de los dos dominios SLAP (pfam 03217) que lo forman.

Los análisis de secuencias de dominios de unión a la envoltura de proteínas de *S-layer* de diversas cepas de *Lactobacillus* revelaron un nivel particularmente alto de conservación en cuatro residuos putativamente responsables del *binding* a ácidos teicoicos (vistos en Tabla 1) (Fina Martin *et al.*, 2019; Sagmeister *et al.*, 2024), presentes en cada uno de los dominios SLAP que lo forman. Adicionalmente,

modelos realizados en AlphaFold sugieren que se mantiene el mismo plegado y organización de dominios para la mayoría de las *S-layer* formadas por proteínas SlpA y SlpX (Sagmeister *et al.*, 2024), donde estos últimos se encuentran muy próximos en el espacio.

Es debido a estos altos niveles de conservación que se consideró necesario realizar modelos propios de las tres proteínas de fusión utilizadas en este trabajo para corroborar que el estar en quimera con GFP no afectase su *folding*, evidentemente muy asociado con la capacidad de cumplir su función, permitiendo el acercamiento de los residuos potencialmente responsables de la unión a la envoltura. Los modelos obtenidos en esta tesis (Figura 7.A) mostraron una alta similitud con los reportados por Sagmeister *et al.*, (2024), lo que indicaría que la fusión con GFP no interfiere en el plegamiento del dominio de unión completo (C-terminal) ni en el de cada uno de los dominios SLAP que lo componen (Figura 7.B).

Cabe mencionar que el modelo de la quimera GFP-SLAP1 sí muestra una menor confianza (Figura 7.a y 7.b) que los otros, sin embargo, el plegado predicho parece muy similar al anterior, manteniendo la posición de sus cuatro residuos conservados (Figura 7.C). Por otro lado, la ausencia de interferencia observada al trabajar con el dominio entero era esperada considerando el *binding* validado tanto en este trabajo como por Fina Martin *et al.* (2019) y por Gordillo *et al.* (2020).

Adicionalmente, mapeos realizados de las cargas en la superficie del C-terminal SlpA de *L. acidophilus* indica una región con cargas positivas en el bolsillo que se forma entre los dos dominios SLAP y en el extremo más cercano al carboxilo terminal (Sagmeister *et al.*, 2024). En estas áreas de carga positiva, se identificaron sitios de unión a fosfatos en la estructura experimental reportada por Sagmeister *et al.* (2024). Estas regiones cargadas coinciden, además, con los sitios donde se encuentran los cuatro residuos altamente conservados (Tabla 1 y Figura 7.C), los cuales probablemente desempeñen un papel clave en la interacción con los LTA (ácidos lipoteicoicos) formados por poliglicerol-fosfato.

A partir de los datos bibliográficos, se decidió también modelar la distribución de cargas para las proteínas de fusión. Al realizar este análisis con el C-terminal entero se observa una concentración de cargas positivas similar a la reportada previamente, destacándose especialmente en el extremo carboxilo terminal correspondiente al dominio SLAP2 (Figura 8.A). Este resultado fue alentador, considerando el probable rol de estas cargas positivas en la interacción con las

cargas negativas del poliglicerol-fosfato presente en los LTA y WTA (Fina Martin *et al.*, 2019).

Por otro lado, en el modelo correspondiente a la quimera con SLAP1 (Figura 8.B), no se observan concentraciones significativas de cargas positivas. Esto podría explicar los resultados experimentales posteriores, específicamente su incapacidad para lograr la unión a la envoltura. En contraste, el modelo para SLAP2 (Figura 8.C) sí conserva una alta concentración de cargas positivas en su extremo C-terminal, lo que lo posiciona como una opción más prometedora para funcionar como *carrier*.

Estos resultados sugieren que, en teoría, cada uno de los dominios SLAP podría actuar como ancla, siendo el dominio SLAP2 especialmente prometedor en este rol. Por lo tanto, se procedió con el clonado y expresión de GFP-SLAP2, que ya había sido logrado exitosamente por Kong *et al.* (2022) con otra cepa de *L.acidophilus*. En esta tesis, si bien se logró clonar el inserto en el vector pET28b-GFP (Figuras 6 y 9) y obtener células transformadas de *E. coli* HMS174, no fue posible expresar GFP-SLAP2 de manera soluble, ya que esta se acumuló en cuerpos de inclusión.

Esta diferencia en los resultados no parece ser atribuible a variaciones en las características de la región SLAP2 seleccionada, ya que son idénticas, con excepción de los cinco residuos adicionales en el N-terminal de la construcción realizada en este trabajo. Sin embargo, esta pequeña diferencia no parece afectar significativamente el plegamiento, que se mantiene como lo esperado y con alta confianza, ni la distribución de cargas del dominio. Por lo tanto, es más probable que la discrepancia en los resultados se deba al uso de sistemas y protocolos de expresión diferentes.

Kong *et al.* (2022) utilizaron la cepa *E. coli* BL21 con el plásmido pET22, mientras que en este trabajo se empleó *E. coli* HMS174 con pET28b. Esta diferencia probablemente afecta la expresión y posterior purificación de la quimera, especialmente considerando que pET22 contiene una señal de localización en el periplasma, lo que facilita la solubilización de la proteína. Además, los protocolos de expresión también difieren considerablemente: Kong *et al.* (2022) incubaron durante solo 4 horas, mientras que el protocolo utilizado en este trabajo requirió 16 horas. En consecuencia, queda pendiente evaluar la posibilidad de utilizar el plásmido pET22 para intentar una expresión y solubilización exitosa, o continuar ajustando el protocolo de expresión, no solo modificando factores como la agitación y la temperatura, sino también variando otros aspectos, como el tiempo de incubación.

Ante estos resultados se procedió con la expresión y purificación de GFP-SLAP1 y GFP-CTSlpA, ambas logradas con éxito. Con los purificados obtenidos, se realizaron ensayos de *binding* tanto con el procedimiento estándar de remoción de la capa-S nativa de *L. acidophilus*, como sin removerla. La observación de las células en el microscopio confocal de fluorescencia reveló que el dominio SLAP1, por sí solo, no es suficiente para lograr la adhesión a la envoltura bacteriana (Figura 13).

Esto, nuevamente, difiere de lo observado por Kong *et al.* (2022), que no solo lograron expresar ambos SLAP en quimera con GFP, sino que también observaron que los dos lograban la unión a la envoltura. Esta diferencia podría explicarse por el uso de diferentes cepas: *L. acidophilus* CICC 6074 en el estudio de referencia y *L. acidophilus* ATCC 4356 en este trabajo. Es posible que ambas cepas presenten diferencias en la composición de su envoltura. Por ejemplo, si *L. acidophilus* CICC 6074 tuviera una mayor concentración de LTAs (ácidos lipoteicoicos), esto podría incrementar su susceptibilidad al *binding*, lo que explicaría las discrepancias observadas en los resultados.

La ausencia de *binding* del SLAP1, no resultó particularmente sorprendente dado que resultados similares habían sido reportados por Fina Martin *et al.* en 2019. Sin embargo, los análisis mediante microscopía confocal revelaron un hallazgo inesperado: la presencia de *binding* en los polos de las bacterias no decoradas. Para que se dé la unión a la envoltura, es necesario que los LTA de la misma se encuentren disponibles para el *binding*, es decir, deben estar descubiertos de capa-S nativa, por lo tanto, no se esperaría observar *binding* en las células de *L. acidophilus* sin decapar. De todas formas, este decorado visto en los polos, podría ser explicado por la biogénesis de la *S-layer* que ocurre desde el septo central hacia los polos (Malamud *et al.*, 2019). Lo que implicaría que estos últimos estarían más desprovistos de proteínas de capa-S y se asemejarían, de esa forma, a la condición artificial de decapado.

Tras completar los experimentos descritos, se concluyó que, por el momento, ni SLAP1 ni SLAP2 son buenos candidatos para su uso como *carriers* en la exhibición de proteínas funcionales heterólogas en la superficie de BAL. En consecuencia, se decidió centrar el interés en el dominio C-terminal completo de SlpA, comenzando con la optimización del proceso de *binding*.

Un ensayo de *binding* estándar realizado en este laboratorio, requiere aproximadamente dos horas, de las cuales una entera se corresponde al tiempo de

incubación con la proteína quimera. Sin embargo, en otros trabajos ese tiempo de incubación es más reducido, como en el del grupo Uriza *et al.* en 2020 que implica sólo 30 minutos de incubación con la proteína. Por lo tanto, se planteó como objetivo hallar tiempos menores de incubación que alcancen los mismos niveles de *binding* para así optimizar el proceso.

Se realizaron ensayos de *binding* a distintos tiempos de incubación (0, 5, 10, 15, 30, 45 o 60 minutos). Estos demostraron que reduciendo los tiempos de incubación a 45 minutos se logra una unión equivalente a la obtenida con una hora de incubación, lo que implica una mejora en la eficiencia del ensayo. De 5 a 30 minutos, aunque el *binding* tiende a ser menor, las diferencias tampoco resultan significativas. Será necesario realizar más réplicas del ensayo para determinar con precisión el tiempo óptimo de incubación; sin embargo, estos hallazgos confirman que el proceso puede ser optimizado para mayor eficiencia sin comprometer la eficacia.

Luego de trabajar sobre el proceso de obtención de células decoradas, se avanzó sobre la formulación para su administración. Para maximizar la sinergia entre los beneficios de las proteínas de interés y las propiedades probióticas de *L. acidophilus* ATCC 4356, es fundamental garantizar la viabilidad del microorganismo en el sitio de acción (FAO-OMS, 2006; Hill *et al.*, 2014). Esto requiere, en primer lugar, asegurar su estabilidad y supervivencia a lo largo de los procesos de producción y almacenamiento.

Este proceso varía enormemente de producto a producto. Tradicionalmente, las BAL probióticas han sido incorporadas en productos lácteos fermentados, con necesidad de conservarse en frío y una vida útil limitada. Actualmente, pueden también ser incorporados como suplementos o en otros formatos “secos”, lo que permite extender su estabilidad hasta incluso 24 meses a temperatura ambiente (Fenster *et al.*, 2019).

En el contexto del método tradicional de administración de estas bacterias, la principal preocupación radica en mantener su viabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. De hecho, la viabilidad de los microorganismos probióticos dentro de productos alimenticios probióticos es un parámetro clave para poder efectivamente definirlos como tal, requiriendo de títulos de al menos 10^6 UFC/g al momento de consumirlos (Sah *et al.*, 2015). Por ello, es crucial garantizar que el proceso de decoración de las bacterias probióticas con proteínas quimera funcionales no comprometa su viabilidad a lo largo del tiempo.

Por lo tanto, se consideró necesario evaluar la viabilidad en el tiempo de las células probióticas decoradas. Para eso se realizaron ensayos de preservación a 4 °C. Los resultados indicaron que el decorado con GFP-CTSIpA produce un aumento significativo en la supervivencia de *L. acidophilus* durante el almacenamiento en refrigeración. Este aumento podría deberse, por ejemplo, a que el decorado artificial permite el binding de una mayor cantidad de proteína que lo que se da naturalmente, brindando una mayor protección contra el estrés frío. Se ha calculado que cada unidad formadora de colonias exhibe en su superficie exhibe en su superficie $1,14 \times 10^6$ moléculas de proteína (Gordillo *et al.*, 2020). Sería necesario, entonces, para corroborar esta teoría, cuantificar la cantidad de proteínas *S-layer* que se adhieren de forma natural a la envoltura.

Además, estos ensayos revelaron un hallazgo inesperado: aunque las células decoradas muestran una supervivencia significativamente mayor que las que conservan su capa-S nativa, no se observan diferencias significativas al compararlas con las células decapadas. Este resultado contradice lo esperado, dado el papel protector que generalmente se atribuye a la capa-S frente al estrés ambiental (Grosu-Tudor *et al.*, 2023).

Las tendencias reveladas sugieren que la estrategia de decoración podría mejorar la estabilidad y viabilidad de las bacterias probióticas, lo que tiene implicancias positivas para su conservación y uso en aplicaciones funcionales. Sin embargo, estos ensayos se realizaron almacenando los pellets celulares a lo largo del tiempo, sin resuspenderlos en ningún tipo de matriz. Por lo tanto, los comportamientos observados no necesariamente reflejan lo que se observaría si estuvieran en una matriz más compleja como es el yogur, que podría, por ejemplo, proveer protección contra la desecación y además proveer nutrientes y un ambiente más favorable para su supervivencia.

Durante los primeros 14 días de preservación en condición de refrigeración, se midió la estabilidad del *binding*, la cual mantuvo constante durante los primeros 7 días, mientras que a los 14 días no se registraron diferencias significativas (Figura 17).

Finalmente, se consideraron los formatos “secos”. El secado resulta una solución práctica, logra la preservación de la viabilidad y actividad metabólica mediante la eliminación de agua, lo que aumenta la estabilidad de los productos durante el almacenamiento (Tyagi *et al.*, 2023). Entre los distintos métodos de secado, la liofilización es preferida para producir productos de alta calidad, ideal para la

conservación de productos biológicos y con una alta capacidad de rehidratación (Coulibaly *et al.*, 2018).

Sin embargo, la liofilización no siempre resulta un proceso inocuo (Coulibaly *et al.*, 2018; Tyagi *et al.*, 2023), ya que requiere de un congelamiento inicial de las muestras (que en este trabajo se realiza *overnight*) y luego el secado en sí, que se da por sublimación debido a una gran disminución de la presión. *Lactobacillus acidophilus*, en particular, ha mostrado una viabilidad inferior al 1% inicial cuando es sometida a este proceso (Lee J. *et al.*, 2023), lo que resalta la necesidad de implementar estrategias que aseguren el mantenimiento de su viabilidad durante el mismo.

Con ese fin, se realizaron pruebas con diversos protectores: dos matrices proteicas complejas, suero de queso y leche, y dos azúcares simples, trehalosa y lactosa. La selección de estos cuatro protectores para un análisis más profundo se basó en varios criterios, entre ellos su disponibilidad en el laboratorio, la eficacia reportada en bibliografía y el éxito observado en las pruebas preliminares. Todos ellos demostraron ser efectivos, manteniendo niveles de viabilidad significativamente superiores al control, con valores que oscilaron entre el 40 % y el 50 % (Tabla 2).

La acumulación de disacáridos como la trehalosa y la lactosa es un mecanismo comúnmente involucrado en la respuesta al estrés por parte de los lactobacilos (Cui *et al.*, 2022). Se ha demostrado que la adición de lactosa aumenta la viabilidad celular de los *Lactobacillus* post-liofilización al aumentar la viscosidad de la solución intracelular y así reducir el daño generado por cristalización. A su vez, se plantea que la trehalosa podría reducir la temperatura de *melting* (T_m) de la membrana desecada, formando una mayor matriz vítrea que promueve la protección durante el secado (Shu *et al.*, 2018).

Las matrices proteicas más complejas crean una estructura porosa luego del proceso de desecación que facilita el consiguiente proceso de rehidratación (Montel Mendoza *et al.*, 2014; Wang Y. *et al.*, 2024). La leche descremada logra reducir el daño a la célula bacteriana gracias a una capa protectora que forma por sobre la superficie celular (Montel Mendoza *et al.*, 2014). El suero de queso exhibe un comportamiento similar (Wang Y. *et al.*, 2024), y además, es un subproducto de la producción de quesos y su utilización en la formulación de estos productos podría contribuir a una economía más circular.

En conclusión, este trabajo, a través de un enfoque estructural y funcional, resalta el

potencial de la proteína SlpA de la *S-layer* como una herramienta innovadora para la exhibición de proteínas funcionales en bacterias probióticas. Este enfoque evita modificaciones genéticas, preservando así el estatus GRAS de los probióticos. Además de ampliar las fronteras del diseño biotecnológico, esta estrategia abre la puerta a un amplio rango de aplicaciones prometedoras, marcando un avance significativo en el desarrollo de tecnologías basadas en bacterias probióticas.

Referencias Bibliográficas

- Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A., Ronneberger, O., Willmore, L., Ballard, A. J., Bambrick, J., Bodenstein, S. W., Evans, D. A., Hung, C. C., O'Neill, M., Reiman, D., Tunyasuvunakool, K., Wu, Z., Žemgulytė, A., Arvaniti, E., ... Jumper, J. M. (2024). Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 630(8016), 493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
- Balthazar, C. F., Guimarães, J. F., Coutinho, N. M., Pimentel, T. C., Ranadheera, C. S., Santillo, A., Albenzio, M., Cruz, A. G., y Sant'Ana, A. S. (2022). The future of functional food: Emerging technologies application on prebiotics, probiotics and postbiotics. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 21(3), 2560–2586. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12962>
- Cadore, P. S., Walcher, D. L., Sousa, N. F. G. C., Martins, L. H. R., Hora, V. P. D., Groll, A. V., Moura, M. Q., Berne, M. E. A., Avila, L. F. D. C., y Scaini, C. J. (2021). Protective effect of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 63, e9. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946202163009>
- Castillo, N. A., de Moreno de LeBlanc, A., M. Galdeano, C., y Perdigon, G. (2013). Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic Lactobacilli. *Journal of applied microbiology*, 114(3), 861–876. <https://doi.org/10.1111/jam.12074>
- Coulibaly, I., Kouassi, E. K., N'guessan, E., Destain, J., Béra, F., y Thonart, P. (2018). Lyophilization (Drying Method) Cause Serious Damages to the Cell Viability of Lactic Acid Bacteria. *Annual Research & Review in Biology*, 24(4), 1–15. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/39265>
- Cui, S., Hu, M., Sun, Y., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J., Tang, X., y Zhang, H. (2022). Effect of Trehalose and Lactose Treatments on the Freeze-Drying Resistance of Lactic Acid Bacteria in High-Density Culture. *Microorganisms*, 11(1), 48. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010048>
- Davis, M. W., y Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in bioinformatics*, 2, 818619. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>
- de LeBlanc, A. de M., Castillo, N. A., y Perdigon, G. (2010). Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *International journal of food microbiology*, 138(3), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.020>
- Dieterle, M. E., Bowman, C., Batthyany, C., Lanzarotti, E., Turjanski, A., Hatfull, G., y Piuri, M. (2014). Exposing the secrets of two well-known *Lactobacillus casei* phages, J-1 and PL-1, by genomic and structural analysis. *Applied and environmental microbiology*, 80(22), 7107–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02771-14>
- Fenster, K., Freeburg, B., Hollard, C., Wong, C., Rønhave Laursen, R., y Ouwehand, A. C. (2019). The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*, 7(3), 83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- Fina Martin, J., Palomino, M. M., Cutine, A. M., Modenutti, C. P., Fernández Do Porto, D. A., Allievi, M. C., Zanini, S. H., Mariño, K. V., Barquero, A. A., y Ruzal, S. M. (2019). Exploring lectin-like activity of the S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(12), 4839–4857. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09795-y>

- Food and Agriculture Organization of the United Nations, cuerpo emisor, y World Health Organization, cuerpo emisor. (2006). *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation* (pp. 1-31). World Health Organization.
- Gao, X., Kong, J., Zhu, H., Mao, B., Cui, S., y Zhao, J. (2022). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Lactococcus* response to environmental stress: Mechanisms and application of cross-protection to improve resistance against freeze-drying. *Journal of applied microbiology*, 132(2), 802–821. <https://doi.org/10.1111/jam.15251>
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., y Gómez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World journal of microbiology & biotechnology*, 31(12), 1877–1887. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1952-9>
- Ghasemi, E., Mazaheri, R., y Tahmourespour, A. (2017). Effect of Probiotic Yogurt and Xylitol-Containing Chewing Gums on Salivary S Mutans Count. *The Journal of clinical pediatric dentistry*, 41(4), 257–263. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-41.4.257>
- Gilfillan, D., Vilander, A. C., Pan, M., Goh, Y. J., O'Flaherty, S., Feng, N., Fox, B. E., Lang, C., Greenberg, H. B., Abdo, Z., Barrangou, R., y Dean, G. A. (2023). *Lactobacillus acidophilus* Expressing Murine Rotavirus VP8 and Mucosal Adjuvants Induce Virus-Specific Immune Responses. *Vaccines*, 11(12), 1774. <https://doi.org/10.3390/vaccines11121774>
- Gordillo, T. B., Palumbo, M. C., Allievi, M. C., Fernández Do Porto, D. A., Ruzal, S. M., y Palomino, M. M. (2020). Strategies to display heterologous proteins on the cell surface of lactic acid bacteria using as anchor the C-terminal domain of *Lactobacillus acidophilus* SlpA. *World journal of microbiology & biotechnology*, 36(11), 169. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02945-9>
- Grosu-Tudor, S. S., Angelescu, I. R., Brînzan, A., y Zamfir, M. (2023). Characterization of S-layer proteins produced by lactobacilli isolated from Romanian artisan fermented products. *Journal of applied microbiology*, 134(1), 1x063. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac063>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., y Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Humphrey, W., Dalke, A., y Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. (2020). *Probiotics*. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. <https://isapscience.org/for-scientists/resources/probiotics/>
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookes, D. H., Wilson, L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., ... Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(1), 112–128. <https://doi.org/10.1002/pro.3280>
- Kong, W., Gan, J., Su, M., Xiong, B., Jiang, X., Zhang, T., Zeng, X., Wu, Z., Sun, Y., Pan, D., Liu, Q., Ling, N., y Guo, Y. (2022). Identification and Characterization of Domains Responsible for Cell Wall Binding, Self-Assembly, and Adhesion of S-layer Protein from *Lactobacillus acidophilus* CICC

6074. *Journal of agricultural and food chemistry*, 70(40), 12982–12989. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03907>
- Kotthapalli, P. y Archer, A.C. (2024). An Introduction to the Human Microbiome. En Khurshid, M., Akash, M.S.H. (Eds), *Human Microbiome* (pp. 1-25). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-97-3790-1_1
- Leach S. T. (2024). Role of Probiotics and Prebiotics in Gut Symbiosis. *Nutrients*, 16(2), 238. <https://doi.org/10.3390/nu16020238>
- Lee, C. G., Cha, K. H., Kim, G. C., Im, S. H., y Kwon, H. K. (2023). Exploring probiotic effector molecules and their mode of action in gut-immune interactions. *FEMS microbiology reviews*, 47(4), fuad046. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad046>
- Lee, J.; Ji, Y. R., Cho, Y., y Choi, M. J. (2023). Effects of lyoprotectant and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* KBL409 on freeze-drying and storage stability. *LWT* 182:114846. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114846>.
- Louesdon, S., Charlot-Rougé, S., Juillard, V., Tourdot-Maréchal, R., y Béal, C. (2014). Osmotic stress affects the stability of freeze-dried *Lactobacillus buchneri* R1102 as a result of intracellular betaine accumulation and membrane characteristics. *Journal of applied microbiology*, 117(1), 196–207. <https://doi.org/10.1111/jam.12501>
- Lycke N. (2012). Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature reviews. Immunology*, 12(8), 592–605. <https://doi.org/10.1038/nri3251>
- Malamud, M., Bolla, P., Carasi, P., Gerbino, E., Gómez-Zavaglia, A., Mobili, P. y Serradell, M.. (2019). S-Layer Proteins from Lactobacilli: Biogenesis, Structure, Functionality and Biotechnological Applications. En Ruzal, S. M. (Ed) *Lactobacillus Genomics and Metabolic Engineering* (pp. 105-130) Caister Academic Press. 10.21775/9781910190890.06.
- Maldonado Galdeano, C., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M. E., y Perdígón, G. (2007). Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and vaccine immunology*, 14(5), 485–492. <https://doi.org/10.1128/CVI.00406-06>
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., y Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 18(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., y Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Misra, S., Raghuwanshi, S.. (2023). A Survey of Commercially Available Probiotics. En Kothari, V., Kumar, P., Ray, S. (Eds) *Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, and Postbiotics* (pp. 489-512). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-1463-0_24
- Molina, R. A., Villar, M. D., Miranda, M. H., Maldonado, N. C., Vignolo, G. M., y Nader-Macías, M. E. F. (2023). A multi-strain probiotic promoted recovery of puppies from gastroenteritis in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 64(7), 666–673.

- Montel Mendoza, G., Pasteris, S. E., Otero, M. C., y Fatima Nader-Macías, M. E. (2014). Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage. *Journal of applied microbiology*, 116(1), 157–166. <https://doi.org/10.1111/jam.12359>
- Mustapha, A., Jiang, T., y Savaiano, D. A. (1997). Improvement of lactose digestion by humans following ingestion of unfermented acidophilus milk: influence of bile sensitivity, lactose transport, and acid tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy science*, 80(8), 1537–1545. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76083-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76083-1)
- O'Flaherty, S., y Klaenhammer, T. R. (2016). Multivalent Chromosomal Expression of the *Clostridium botulinum* Serotype A Neurotoxin Heavy-Chain Antigen and the *Bacillus anthracis* Protective Antigen in *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 82(20), 6091–6101. <https://doi.org/10.1128/AEM.01533-16>
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gordillo, T. B., Bockor, S. S., Fina Martin, J., y Ruzal, S. M. (2023). Surface layer proteins in species of the family Lactobacillaceae. *Microbial biotechnology*, 16(6), 1232–1249. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14230>
- Palomino, M. M., Waehner, P. M., Fina Martin, J., Ojeda, P., Malone, L., Sánchez Rivas, C., Prado Acosta, M., Allievi, M. C., y 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. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7698-y>
- Prado Acosta, M., Mercedes Palomino, M., Allievi, M. C., Sanchez Rivas, C., y Ruzal, S. M. (2008). Murein hydrolase activity in the surface layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Applied and environmental microbiology*, 74(24), 7824–7827. <https://doi.org/10.1128/AEM.01712-08>
- Prado Acosta, M., Ruzal, S. M., y Cordo, S. M. (2016). S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *International journal of biological macromolecules*, 92, 998–1005. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.096>
- Qin, J., Wang, X., Kong, J., Ma, C., y Xu, P. (2014). Construction of a food-grade cell surface display system for *Lactobacillus casei*. *Microbiological research*, 169(9-10), 733–740. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.001>
- Rocha-Ramírez, L. M., Pérez-Solano, R. A., Castañón-Alonso, S. L., Moreno Guerrero, S. S., Ramírez Pacheco, A., García Garibay, M., y Eslava, C. (2017). Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *Journal of immunology research*, 2017, 4607491. <https://doi.org/10.1155/2017/4607491>
- Sagmeister, T., Gubensäk, N., Buhlheller, C., Grininger, C., Eder, M., Đordić, A., Millán, C., Medina, A., Murcia, P. A. S., Berni, F., Hynönen, U., Vejzović, D., Damisch, E., Kulminkaya, N., Petrowitsch, L., Oberer, M., Palva, A., Malanović, N., Codée, J., ... Pavkov-Keller, T. (2024). The molecular architecture of *Lactobacillus* S-layer: Assembly and attachment to teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(24), e2401686121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2401686121>
- Sah, B. N., Vasiljevic, T., McKechnie, S., y Donkor, O. N. (2015). Effect of refrigerated storage on probiotic viability and the production and stability of antimutagenic and antioxidant peptides in yogurt supplemented with pineapple peel. *Journal of dairy science*, 98(9), 5905–5916. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9450>

- Savaiano D. A. (2014). Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. *The American journal of clinical nutrition*, 99(5 Suppl), 1251S–5S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.073023>
- Shiraishi, T., Yokota, S., Fukiya, S., y Yokota, A. (2016). Structural diversity and biological significance of lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria: focusing on beneficial probiotic lactic acid bacteria. *Bioscience of microbiota, food and health*, 35(4), 147–161. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2016-006>
- Shu, G., Wang, Z., Chen, L., Wan, H., y Chen, H. (2018). Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. *LWT*, 90(1), 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.013>
- Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B., y Pouwels, P. H. (2001). The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *Journal of molecular biology*, 305(2), 245–257. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4258>
- Tyagi, N., Gidlöf, Z., Osanlöö, D. T., Collier, E. S., Kadekar, S., Ringstad, L., Fureby, A. M., y Roos, S. (2023). The Impact of Formulation and Freeze Drying on the Properties and Performance of Freeze-Dried *Limosilactobacillus reuteri* R2LC. *Applied Microbiology*, 3(4), 1370-1387. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol3040092>
- Uriza, P. J., Trautman, C., Palomino, M. M., Fina Martin, J., Ruzal, S. M., Roset, M. S., y Briones, G. (2020). Development of an Antigen Delivery Platform Using *Lactobacillus acidophilus* Decorated With Heterologous Proteins: A Sheep in Wolf's Clothing Story. *Frontiers in microbiology*, 11, 509380. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.509380>
- Vizoso Pinto, M. G., Rodriguez Gómez, M., Seifert, S., Watzl, B., Holzapfel, W. H., y Franz, C. M. (2009). Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.013>
- Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic acids research*, 51(D1), D384–D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>
- Wang, Y., Liu, X., Shao, Y., Guo, Y., Gu, R., y Wang, W. (2024). Cheese Whey Protein and Blueberry Juice Mixed Fermentation Enhance the Freeze-Resistance of Lactic Acid Bacteria in the Freeze-Drying Process. *Foods (Basel, Switzerland)*, 13(14), 2260. <https://doi.org/10.3390/foods13142260>
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J. M., Dequenne, I., de Timary, P., y Cani, P. D. (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 454. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>
- Zhang, P., Han, X., Zhang, X., y Zhu, X. (2021). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Alleviates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Through Antioxidant Stress and Anti-inflammatory Responses and Improves Intestinal Microbial Distribution. *Frontiers in nutrition*, 8, 667695. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.667695>

Zhen, N., Zeng, X., Wang, H., Yu, J., Pan, D., Wu, Z., y Guo, Y. (2020). Effects of heat shock treatment on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* after freeze-drying. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 136, 109507. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109507>

Apéndice

Composición de Soluciones Tampón o *Buffer* y Otras

Para usos generales

Tampón Fosfato Salino (PBS)

NaCl 0,8% m/V, KCl 0,02% m/V, Na_2HPO_4 10 mM y KH_2PO_4 1.8 mM a pH 7.4 en solución acuosa.

Solución Fisiológica (SF)

NaCl en solución acuosa 9% m/v.

Buffer Sodio-Fosfato

Na_2HPO_4 1M y NaH_2PO_4 1M en H_2O miliQ.

Para extracción de ADN

Solución I

Para Gram positivas: Tris HCl 25 mM, EDTA 10 mM, 1 mg/mL de lisozima y 25 $\mu\text{g/mL}$ de mutanolisina en H_2O miliQ.

Para Gram negativas: Tris HCl 50 mM a pH 7,5, EDTA 10 mM a pH 8,0, ARNsa A 10 $\mu\text{g/mL}$ (Mackerey-Nagel, Alemania) en en H_2O miliQ.

Solución II

NaOH 0,2 N y SDS 1% en en H_2O miliQ.

Solución III

Acetato de potasio (AcoK) 5 M a pH 5,0 en en H_2O miliQ.

Para electroforesis

Buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE)

Tris-acetato de 0,04 M, EDTA 1 mM a pH 8,0 en H_2O miliQ.

Buffer Tris-Glicina

Tris 25 mM, glicina 250 mM y 0,1% de SDS en H_2O .

Para Western Blot

Buffer de Transferencia

Buffer Tris-Glicina, 20% metanol en H_2O miliQ

Buffer de Bloqueo

5% m/v de leche en polvo y tween 20 0,05 % v/v en PBS

Buffer de Lavado

PBS con tween 20 al 0,05% v/v.

Para purificación de proteínas

Buffer de Lisis

20 mM *Buffer* Sodio-Fosfato, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 2% Tritón y 1 mM PMSF a pH 7,4 en H₂O miliQ

Buffer de Siembra

20 mM *buffer* sodio fosfato, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol y 2% Tritón a pH 7,4

Buffers de Elución

20 mM *buffer* sodio fosfato, 500 mM NaCl y 2% Tritón a pH 7,4 en solución acuosa, cada uno con concentraciones de imidazol de 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM y hasta 500 mM.

Buffer de Dialisis

50 mM Tris-HCl a pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol en H₂O miliQ.