

Tesis Doctoral

S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional

Prado Acosta, Mariano

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:

Prado Acosta, Mariano. (2010). S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Prado Acosta, Mariano. "S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA**

**“S-layer de *Lactobacillus acidophilus*:
caracterización y análisis funcional”**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
EN EL AREA QUÍMICA BIOLÓGICA**

**AUTOR:
Lic. MARIANO PRADO ACOSTA**

**DIRECTOR: Dra. SANDRA M. RUZAL
CONSEJERO DE ESTUDIO: Dra. JULIA PETTINARI**

**LABORATORIO DE ESTRÉS OSMÓTICO DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Buenos Aires, 2010

Los resultados de esta Tesis de Doctorado fueron publicados en:

Prado-Acosta M, Ruzal SM, Allievi MC, Palomino MM, Sanchez Rivas C.
(2010) Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* surface layer and nisin on bacterial growth. *Appl Environ Microbiol.* 2010 Feb;
76(3):974-7.

Prado-Acosta M, Palomino MM, Allievi MC, Sanchez Rivas C and SM Ruzal (2008) Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Environ Microbiol.* 2008 vol **74**:7824-7827

Índice

RESUMEN.....	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN.....	12
Introducción: Parte 1	13
Microflora intestinal.....	14
Bacterias Ácido lácticas (BAL)	16
<i>Lactobacillus</i>	17
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
Proteínas S-layer	20
Propiedades de las S-layer de <i>Lactobacillus</i>	23
Anclaje de la proteína S-layer a la pared celular	25
Regulación de la expresión de genes S-layer	26
Genes S-layer en <i>Lactobacillus</i>	29
Función de las proteínas S-layer	30
Aplicaciones potenciales de las proteínas S-layer.....	32
Aplicaciones nanobiotecnológicas	33
Introducción: Parte 2.....	36
Bacteriocinas.....	37
Clases de bacteriocinas.....	39
Importancia en la industria	42
Importancia en la clínica	45
Introducción: Parte 3.....	47
Respuestas a estrés en Bacterias Acido Lácticas (BAL)	48
Respuesta a estrés osmótico	49
Estrés osmótico en bacterias lácticas	51
Respuesta a estrés osmótico en <i>Lactobacillus</i>	53
Estrés osmótico y S-layer	54
MATERIALES y MÉTODOS	58
Cepas Utilizadas	59
Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	59
Medios de cultivo.....	60
Técnicas moleculares.....	60
Manipulación de proteínas	66
Obtención y titulación del antisuero de ratón anti-S-layer	68
Ensayos con Bacteriocina	69
Ensayos sobre Pared Celular	70
Ensayos de estrés osmótico	72
Anexo: Materiales y Métodos.....	76
RESULTADOS	83
RESULTADOS Capítulo 1: "Estructura y purificación de la proteína S-layer"	84
Purificación.....	86
Análisis de secuencia nucleotídica	87
Análisis de la secuencia de aminoácidos.....	88
Análisis Filogenético.....	90

Perfil estructural de la proteína S-layer.....	92
RESULTADOS Capítulo 2: “Función y expresión de la proteína S-layer durante el estrés osmótico”	94
Efecto de alta salinidad en las células de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	96
Expresión de la proteína S-layer en estrés osmótico	99
Función de la proteína S-layer en el crecimiento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante el stress osmótico	102
RESULTADOS Capítulo 3: “Función hidrolítica de la proteína S-layer” ..	106
Co-cultivo entre <i>Salmonella enterica</i> serovar Newport y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	108
Actividad hidrolítica de S-layer de <i>Lb. acidophilus</i> ATCC 4356 sobre <i>Salmonella enterica</i> serovar Newport.....	110
Actividad de la S-layer sobre pared celular y células enteras de <i>Salmonella</i>	111
Mecanismo de acción de la actividad hidrolítica de la proteína S-layer.....	113
Análisis de secuencia de la proteína S-layer	117
Expresión heteróloga de la proteína S-layer en <i>E. coli</i> JM109 y <i>Bacillus subtilis</i> 168.....	119
RESULTADOS Capítulo 4: “Efecto sinérgico de la proteína S-layer con nisina”	122
Efecto sinérgico entre el antibiótico nisina y la proteína S-layer de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	123
Efecto sinérgico contra Gram negativas	124
Efecto sinérgico contra Gram positivas.....	126
Efecto en <i>Bacillus cereus</i>	127
Efecto en <i>Staphylococcus aureus</i>	129
Mecanismo de acción de la S-layer en el efecto sinérgico con nisina	132
DISCUSIÓN y CONCLUSIONES	137
Estructura, dominios y actividad enzimática de la proteína S-layer.	138
Sinergismo con nisina	141
Regulación y expresión de la proteína durante el estrés osmótico..	143
Aspectos de potencial aplicación	146
BIBLIOGRAFÍA.....	153

Abreviaturas

Ap/Ap ^r	ampicilina/ampicilina resistente
ATP	adenosina trifosfato
cDNA	ácido desoxiribonucleico copia
CIM	concentración inhibitoria mínima
Cm/Cm ^R	cloranfenicol/cloranfenicol resistente
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
g	gramos
GRAS	generalmente reconocidas como seguras (generally recognised as safe)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
hs	horas
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranosido
Kb	kilobases
kDa	kilodalton
Km/Km ^r	kanamicina/kanamicina resistente
l	litros
M	molar
M _r	masa molecular relativa
min	minutos
ml	mililitros
N	normal
nm	nanómetros
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNA	ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
rRNA	ácido ribonucleico ribosomal
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
T _m	temperatura de fusión
μl	microlitros
μmax	velocidad máxima específica de crecimiento
UV	ultravioleta
vol	volumen

RESUMEN

Resumen

“S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional”

Las S-layers son estructuras externas de una sola especie de (glico) proteína, Se calcula que aproximadamente 5×10^5 monómeros de la proteína S-layers son necesarios cubrir una célula bacilar procariótica. Las funciones biológicas que se han sugerido para las S-layer son aún hipotéticas y requieren de mayor comprobación experimental. Se las asocia con roles de protección contra enzimas hidrolíticas, cambios de pH y estrés, la captación de moléculas y iones. Otra posible función que cumplirían sería la de adhesina, facilitando que la bacteria se adhiera a distintas superficies y ayudar a mantener la forma y rigidez de la célula. Durante el transcurso de mi tesis de Doctorado, he elegido a la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*, la opción de este microorganismo se debió a las características probióticas y la importancia del mismo en la industria alimentaria.

Se caracterizó una nueva función biológica para la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 que no había sido descrita previamente. La capacidad de murein-hidrolasa es una característica nueva que cumpliría un rol adaptativo en esta bacteria. La actividad lítica de la proteína S-layer de demostró sobre la pared celular y células enteras de *Salmonella entérica* serovar Newport el cual fue usada como patógeno modelo. Esta actividad respaldaría la característica probiótica de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Prado Acosta *et al.* 2008).

También se utilizó a la S-layer como compuesto sinérgico con el antibiótico nisina, esto sirvió para disminuir la concentración inhibitoria mínima casi un 50 % en organismos patógenos del tracto intestinal como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Prado Acosta *et al.* 2009).

Nuestros resultados también mostraron una variación de la expresión de S-layer en *Lactobacillus acidophilus* creciendo en condiciones de alta

salinidad y se mostró que son de gran importancia para la supervivencia de la célula en estas condiciones.

Palabras claves: *Lactobacillus acidophilus*, S-layer, probióticos, nisina, estrés osmótico,

ABSTRACT

ABSTRACT

“S-layer of *Lactobacillus acidophilus*: characterization and functional analysis”

Lactobacillus acidophilus is one of the major species found in human intestines. Some strains of lactobacilli are believed to be probiotic and are extremely used in food industry

Many species of the genus *Lactobacillus* possess S-layers, this proteins are arrays composed of a single protein that constitute the outermost cell envelope in numerous Bacteria, they have been considered to function as protective coats, cell shape determinants, and be involved in cell adhesion. To date several studies focus on the structure of S-layers, but their biological functions remain poorly understood.

Zymogram analysis with cell-wall extracted from *Salmonella enterica* serovar Newport as substrate revealed a true uncharacterized lytic activity coincident with that identified by western blot. This activity was also observed with both cell wall and whole cells. The analysis of the peptidoglycan breakage products showed an increase of free amino-acids suggesting that this S-layer acts as an endopeptidase. This gene was sequenced and showed 99% homology with other *slpA* from *Lb. acidophilus* strains and *in silico* analysis of the deduced protein showed a C-terminal motif which aligned with murein hydrolases of several *Lactobacillus* strains. The C-terminal motif was cloned and expressed in *Bacillus subtilis* where it conserved the murein hydrolase activity.

Due to this enzymatic activity we show that in combination with nisin they act synergistically to inhibit the growth of *Salmonella*, *Staphylococcus* and *Bacillus*. We postulate that S-layer enhanced nisin incorporation into the cell membrane enabling it to penetrate the cell wall resulting in increased inhibitory activity.

We also proved the S-layer protein is essential in the adaptation of the *Lactobacillus* during osmotic stress. We analyzed the role of the S-layer

by exposing cells to osmotic stress, we found an over expression in this condition demonstrate by Western blot and real time PCR to quantify mRNA. We also tested the growth aptitude of *Lactobacillus acidophilus* in high osmotic conditions with and without S-layer protein showing its importance in the adaptation to this kind of stress.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, S-layer, probiotics, nisin, osmotic stress

INTRODUCCIÓN

Introducción: Parte 1

Microflora intestinal

El tracto gastrointestinal de una persona sana se coloniza desde el momento del nacimiento, durante las primeras semanas de vida, y desde la primera toma de alimento, con bacterias intestinales, que van a constituir la flora intestinal normal, generalmente de predominio anaerobio. Inicialmente se produce el contacto con la flora intestinal de la madre y a los pocos días de nacer, la totalidad de niños están colonizados por bacterias anaeróbicas. A los 5 días de vida ya están colonizados por bifidobacterias y a los 10 días por una microflora heterogena.

Se han cultivado más de 400 especies diferentes, pero aunque existen variaciones de la composición de la microflora entre unos individuos y otros, éstas solamente comprenden un pequeño número de especies bacterianas y un mismo individuo tiende a mantener una composición estable a lo largo de su vida.

La colonización por microorganismos no es imprescindible para la vida, pero es cierto que la microflora del tracto gastrointestinal del hombre juega un papel clave en la nutrición y en la salud ya que completa la digestión mediante un proceso fermentativo, protege frente a bacterias patógenas y estimula el desarrollo del sistema inmune.

La microflora del estómago está formada fundamentalmente por bacterias Gram positivas en escasa cantidad. En los tramos altos intestinales persiste un pH relativamente ácido por lo que la colonización es similar a la del estómago. Según se avanza en el intestino delgado disminuye la acidez, estableciéndose un medio alcalino, debido a la dilución de los ácidos y sales biliares, lo que facilita la colonización bacteriana, que aumenta claramente en el colon. En el colon existe una flora dominante constituida por bacteroides, eubacterias, bifidobacterias y peptoestreptococos y una flora satélite formada por: enterobacterias, estreptococos y lactobacilos. El desarrollo de una flora residual constituida por gérmenes oportunistas que pueden causar

enfermedad si disminuyen los mecanismos de defensa intestinal o por determinados microorganismos patógenos, dan lugar a un desequilibrio en el ecosistema y a la aparición de enfermedades (Figura1).

Aproximadamente el 50% de las personas sanas tienen una población de lactobacilos estable que no suele alcanzar el 1%. Las bifidobacterias constituyen entre el 6-11% de la flora bacteriana del adulto. El desarrollo de una flora bacteriana normal influye en todos los mecanismos de defensa del organismo humano tanto de tipo inmunológico como no inmunológico y en particular en el desarrollo de la barrera intestinal

La influencia de la enorme población de microorganismos que coloniza la luz intestinal es importante no solamente como barrera de protección, sino también porque cumplen una serie de funciones nutricionales. Durante los procesos metabólicos de las bacterias se producen diversas sustancias que son aprovechadas por el organismo hospedador. Como ejemplo se encuentra la síntesis de vitaminas hecha por las bacterias colonizantes, la producción de enzimas, como es el caso de lactasa producida por bacterias ácido-lácticas y que sustituye la enzima del hospedador en el caso de los individuos con mal absorción de lactosa, así como también una mejora en la digestión y absorción de nutrientes.

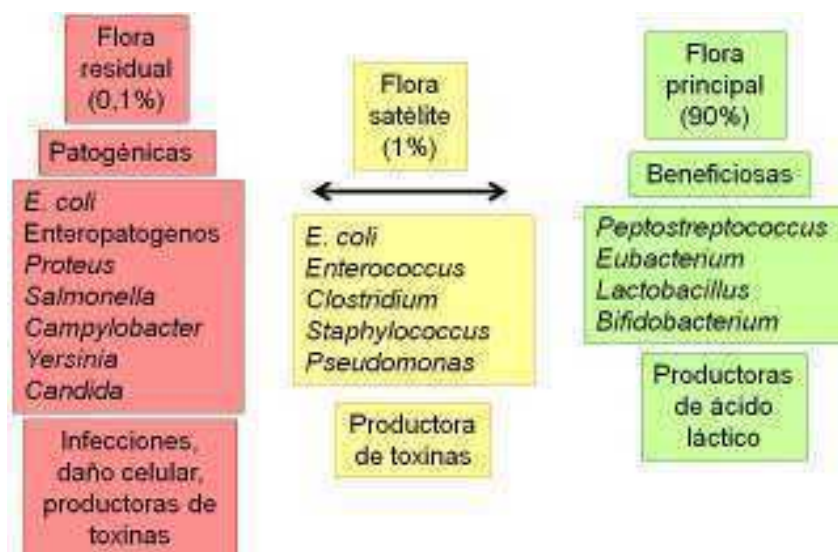


Figura1: Balance de la microflora intestinal humana

Bacterias Ácido lácticas (BAL)

Las interacciones de bacterias ácido lácticas (BAL) y los alimentos se conocen desde hace mucho tiempo. La capacidad de las bacterias lácticas para producir ácido láctico desde sustratos fermentables se ha utilizado como método de preservación de alimentos debido a que la acidificación del medio impide el crecimiento de la flora acompañante. Así, las BAL fueron típicamente involucradas en forma empírica desde el Neolítico (Mesopotamia) en fermentaciones espontáneas de alimentos. En 1873, Lister aisló a partir de la leche el primer cultivo bacteriano puro que denominó *Bacterium lactis* (*Lactococcus lactis*). El uso de cultivos iniciadores (*starters*) para fabricación de quesos fue introducido en 1890 por Weigmann en Kiel y Storch en Copenhague (Stiles *et al*, 1997)

Las primeras definiciones del grupo BAL basadas en la capacidad para fermentar y coagular la leche incluían a las bacterias coliformes junto con las lácticas. En 1901, Berijerinck describió a los organismos *Lactobacillus* como bacterias Gram positivas separando las coliformes de las BAL.

Las bacterias lácticas son microorganismos Gram positivos cuyo metabolismo es estrictamente fermentativo y presentan altos requerimientos nutricionales. Son inmóviles, no esporo formadoras, anaerobias aerotolerantes, que carecen de catalasa. Algunas sólo producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos (homo fermentativas) o una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (hetero fermentativas) (Kandler *et al*, 1983).

En esta descripción de bacterias lácticas se incluye tanto a cocos como a bacilos. Comprende los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella* y *Enterococcus* (Vandamme *et al*, 1996)

La taxonomía clásica se basó en características morfológicas y fisiológicas para definir a las bacterias lácticas. Sin embargo, las herramientas moleculares permitieron redefinir el grupo, en particular fundamentándose en la secuencia del ARN ribosomal 16s.

Estas evidencias genéticas indican que la definición de bacterias lácticas agrupadas en función de las características fisiológicas enumeradas anteriormente concuerda con la relación a nivel filogenético (Stackebrand *et al*, 1988) Así, se las clasifica como Gram positivas dentro de la sub-rama *Clostridium* que incluye organismos con un contenido G+C en el ADN inferior al 50%. Quedaría excluido del grupo el género *Bifidobacterium* que pertenece a la rama de *Actinomycetes* con un porcentaje de G+C superior al 50%.

Lactobacillus

El género *Lactobacillus* es un grupo heterogéneo con un porcentaje variable de G+C en el ADN de 33 -55%. Tiene un metabolismo estrictamente fermentativo con altos requerimientos nutricionales. Están asociados con diferentes hábitats como vegetales, productos lácteos, carnes, tracto intestinal, genital y cavidad oral.

Los lactobacilos se utilizan como cultivos iniciadores para muchas variedades de quesos, productos vegetales fermentados, carnes y productos lácteos.

El género fue clasificado artificialmente basado en la característica fenotípica del tipo de fermentación realizada. La base fisiológica es la presencia de las enzimas fructosa 1-6 difosfato aldolasa y fosfocetolasa que son clave en el metabolismo homo o hetero fermentativo de las hexosas y pentosas respectivamente (Kandler y Weiss, 1986). La división incluye tres grupos:

- Grupo 1: Son homo fermentadores obligados. Fermentan glucosa a ácido láctico y no fermentan pentosas ni gluconato. Carecen de enzima fosfocetolasa y poseen la enzima fructosa 1-6 difosfato

aldolasa. Pertenecen al grupo *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, y *Lb. delbrueckii*.

- Grupo 2: Incluye heterofermentadores facultativos. Fermentan hexosas a lactato, utilizan gluconato con producción de gas. También fermentan pentosas por una fosfoacetolasa inducible por pentosas produciendo lactato y ácido acético Son integrantes del grupo *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. Paracasei*
- Grupo 3: Son heterofermentadores obligados. Utilizan hexosas y producen ácido láctico, ácido acético y/o etanol y dióxido de carbono. Utilizan las pentosas por la vía del ácido 6-fosfogluconico con producción de ácido láctico y acético. Ejemplos del grupo son *Lb. fermentarum* y *Lb. reuteri*.

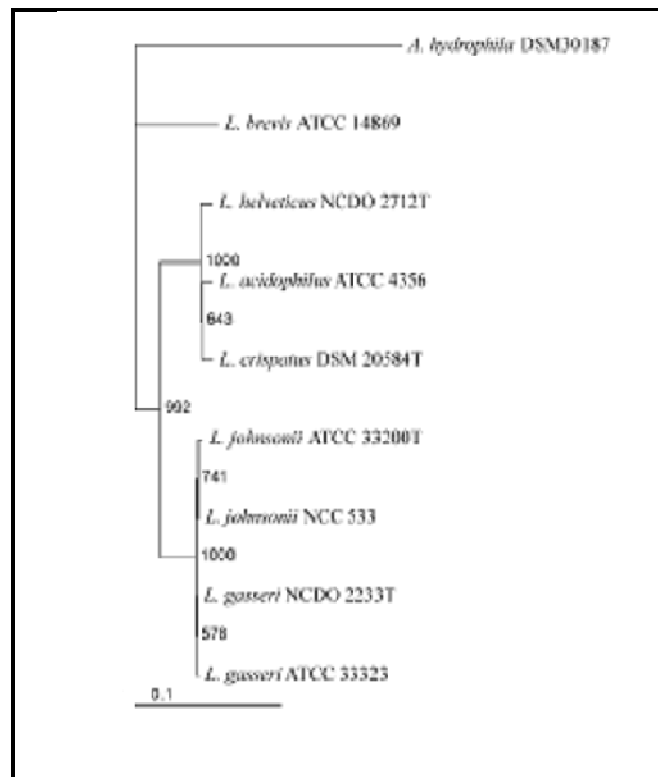


Figura 2: árbol filogenético usando el gen 16s

Lactobacillus acidophilus

Lactobacillus acidophilus es una bacteria del género *Lactobacillus*, el término acidophilus quiere decir con afinidad por los ácidos. Esta bacteria crece, fácilmente, en medios mucho más ácidos que los ideales para otros microorganismos (pH 4-5 o menores) y crece en condiciones óptimas a unos 45°C. *Lb. acidophilus* habita de manera natural en una gran variedad de alimentos, incluidos la leche, la carne, el pescado y los cereales. No solo está presente en el intestino de animales y del ser humano, sino también en la boca y la vagina. *Lb. acidophilus* utiliza la lactosa y la metaboliza formando ácido láctico. Ciertas variedades genéticamente similares (conocidas como heterofermentivas) también producen etanol, dióxido de carbono y ácido acético como subproductos.

Lb. acidophilus es una de las especies del género que se encuentra en mayor proporción en la flora intestinal en animales y humanos. Cuando se encuentran en suficiente proporción son considerados como probióticos, los cuales son capaces de modificar favorablemente el balance de la microflora intestinal, inhibiendo el crecimiento de bacterias nocivas y también potencian el funcionamiento del sistema inmunológico.

En el tubo digestivo, *Lb. acidophilus* comparte con los microorganismos que lo acompañan el uso de los mismos nutrientes entrando así en competencia con ellos; también le permite así controlar el desarrollo desmedido de estos por la disminución de nutrientes. Durante la digestión, asiste al intestino humano con la producción de niacina, ácido fólico y vitamina B6 (piridoxina). Algunos estudios demuestran que *Lb. acidophilus* puede ayudar a la desconjugación y separación de ácidos grasos por los ácidos biliares, que posteriormente pueden ser reciclados por el cuerpo.

Los lactobacilos y los bacilos bífidos mantienen un balance sano de la flora intestinal al producir compuestos orgánicos, como el ácido láctico,

agua oxigenada y ácido acético, que aumentan la acidez intestinal e inhiben el desarrollo de muchas bacterias nocivas. Las bacterias probióticas también producen unas sustancias del tipo de las llamadas bacteriocinas, que funcionan como antibióticos naturales, matando a microorganismos no deseados.

Otra característica que presentan algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* es poseer en su pared celular una envoltura adicional constituida por proteínas llamadas proteínas de capa S o surface layer (S-layer)

Proteínas S-layer

Las proteínas S-layers son arreglos mono-moleculares cristalinos de una única proteína que se auto ensambla formando multiméros y proveyendo a la bacteria de una capa adicional o S-layer. Estas cubren la superficie externa de la célula representando hasta el 15% de la proteína total. Son una estructura común de la superficie de bacterias y arqueas (Sleytr *et al*, 1997; Sleytr & Beveridge 1999; Luckevich *et al*, 1989; Bowditch *et al*, 1989, Jordan *et al*, 2008).

Las S-layers han sido observadas desde 1952 por ME en *Spirillum serpens* y se encontraron en arqueas y algunas bacterias. Pero ni *Escherichia coli* ni *Bacillus subtilis*, los microorganismos “elegidos” como modelos de estudios genéticos y moleculares, presentan dicha estructura. Recién en la década del 90 se la empieza a estudiar y se la encuentra en numerosas bacterias tanto Gram positiva como Gram negativa y en la mayoría de las arqueas (Engelhardt *et al*, 2007)

Esta capa protectora podría ayudar a mantener la forma y rigidez de la célula. Se la involucra en:

- la captación de moléculas, iones y metales pesados
- la adhesión a células eucariotas y así facilitar el ingreso de patógenos (*Bacillus anthracis*)
- de facilitar la adhesión a distintas superficies

- de servir de receptores para el ingreso de bacteriófagos (*Bacillus sphaericus*)
- en Arqueas facilitarían su capacidad de crecer en ambientes extremos (hipersalinos por ejemplo).
- en Arqueas proveen de una envoltura adicional que "frenaría" el estrés producido por ambientes extremos y así permitir el crecimiento (medios hipersalinos por ejemplo).

Estas funciones biológicas que se han sugerido para las S-layer son aún hipotéticas y requieren de mayor comprobación experimental.

En aquellas especies que se envuelven de S-layer, esta constituye el primer nivel de interacción con el medio externo (Figura 3).

En algunas especies se ha podido determinar que más de un gen interviene en su síntesis (Pollmann *et al*, 2005) y que estos no se expresan simultáneamente, indicando que responden a diferentes estados o condiciones ambientales (Schar-Zammaretti *et al*, 2005; Mignot *et al*, 2002). Se piensa que en *Lactobacilos* esta estructura tendría un rol en las propiedades probióticas de estas especies (Avall-Jaaskelaine & Palva 2005, 2008; Golowczyk *et al*, 2007). También se han podido aislar cepas de *Bacillus* cuya S-layer interviene en la captación de uranio (Pollmann *et al*, 2005 y 2007).

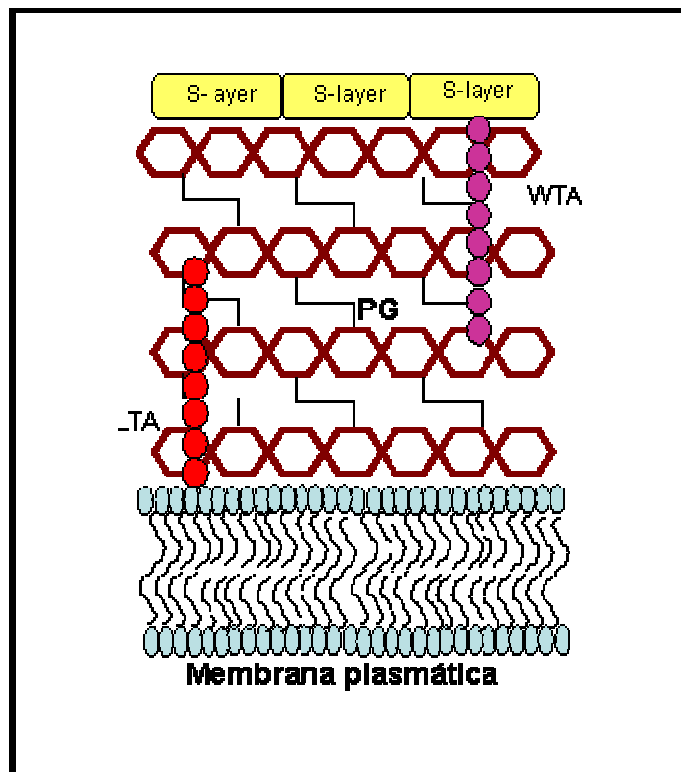


Figura 3: Composición de la Pared celular de Gram+

Las proteínas S-layer no se encuentran covalentemente unidas entre sí, así como tampoco lo están a la pared celular que las sostiene, esto hace que se puedan desagregar fácilmente con agentes desnaturizantes, como el cloruro de litio (LiCl) y el hidrocloreuro de guanidinio. Las sub-unidades de las S-layer pueden volver a formar una estructura cristalina sobre soportes, interfaces líquidas, films, liposomas o en suspensión una vez removido el agente desnaturizante (Figura 4). Esta propiedad hace que sean proteínas de gran interés en investigaciones nano-tecnológicas.

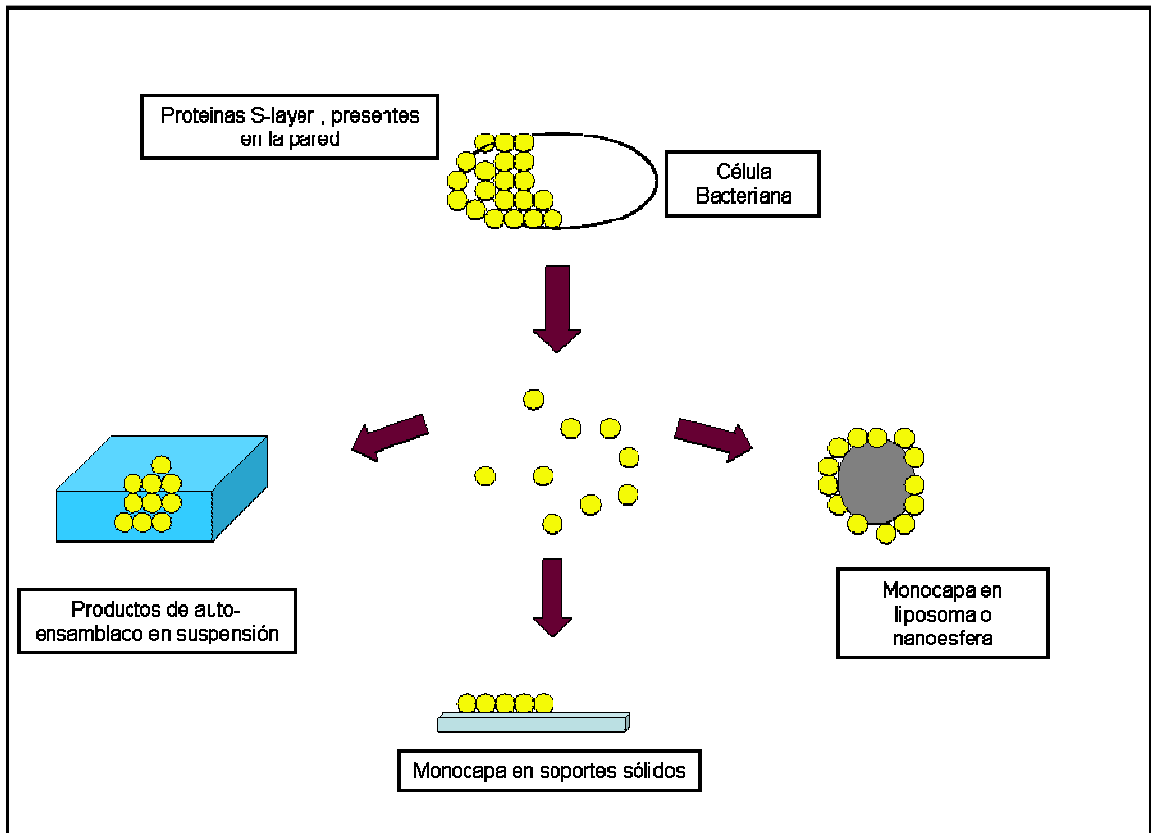


Figura 4: Propiedad de autoensamblado de proteínas S-layer

Propiedades de las S-layer de *Lactobacillus*

Muchas especies del género *Lactobacillus* poseen en sus envolturas una capa adicional de S-layer. Dentro de este género se encuentran especies como *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. crispatus*, *Lb. gasearii*, *Lb. helveticus*, *Lb. kefir* entre otros. Estas proteínas poseen un rango de masa molecular entre 25 y 71 Kda, siendo de las más pequeñas, ya que en otras especies estas proteínas pueden alcanzar tamaños de hasta 200 Kda.

Otra característica de las S-layer del género es su alto punto isoeléctrico los cuales están entre 9 y 10, lo que indica la alta basicidad de estas (Tabla 1). La composición de aminoácidos característica de S-layer de *Lactobacillus* es de aproximadamente un 35% de residuos básicos

(Slyter *et al.*, 2007). También se observa un bajo contenido en aminoácidos que contienen grupos sulfhídricos, encontrándose en menos de un 2% en la proteína.

Una de las características más importantes en todo el grupo de S-layer, incluidas las que se encuentran en *Lactobacillus* es un alto porcentaje de grupos carboxilo u oxidrilo alineados en la superficie, donde es posible un amplio espectro de modificaciones. El número de aminoácidos cargados positivamente es mayor en *Lactobacillus* que en otras especies, indicando el porqué de su alto pI. Siendo esta una característica típica del género.

Varias S-layer fueron caracterizadas en otras especies bacterianas y en Arqueas reportando glicosilaciones en su estructura, pero en la especie *Lactobacillus* se encuentra mayormente no glicosilada

El proceso de auto-ensamblado de las subunidades de las proteínas S-layer (mencionado en el ítem anterior) ha sido bien caracterizado en la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Powels *et al.*, 1997); en esta se encuentra una región en la porción N-terminal de la proteína que contiene la información necesaria para realizar el auto-ensamblado de la proteína en una estructura regular.

En cuanto a las estructuras primarias y secundarias características de las proteínas S-layer del género podemos resaltar que la de *Lactobacillus* es muy variable, incluso comparada con proteínas de la misma especie. Además presentan una gran variabilidad de estructura primaria en diferentes S-layer de la misma cepa. La falta de identidad de estas proteínas tanto intra como inter especies es una característica común entre todas las clases de S-layer.

En cuanto a las estructuras secundarias presentes las S-layer en general presentan un promedio de 40% de estructura α -hélice y un 20% de hoja plegada β . Las hélices se encuentran en su mayoría localizadas en el extremo N-terminal (Slyter *et al.*, 2002).

En *Lactobacillus* estas contienen también en promedio una proporción de 14% α -hélices, este porcentaje se achica a medida que la proteína

se va anclando a la pared, ya que esta estructura esta comprendida en el péptido señal de anclaje. El resto muestra en 39% de proteína sin plegar y un 47% de plegamiento al azar (random coil).

Especie	Cepa	Masa Molecular	Punto Isoeléctrico	% de aminoácidos hidrofóbicos	% de aminoácidos con sulfuro	Residuos cargados pos/neg
<i>Lb.acidophilus</i>	ATCC 4365	44 Kda	10,4	36,4	0,2	6,8/10,4
<i>Lb.helveticus</i>	CNZR 892	43,1 Kda	10,19	35,9	0,7	8,8/11,2
<i>Lb.crispatus</i>	JCM 5810	43,9 Kda	-	36,8	2	7,1/11,2
<i>Lb.gasseari</i>	VPI 1175	29,8 Kda	9,98	32,9	1,1	5,1/8,7
<i>Lb.johnsonii</i>	ATCC 332	26,8 Kda	-	37,7	0,9	6/6,9
<i>Lb.kefir</i>	CIDCA 8321	67 Kda	-	-	-	-
<i>Lb.brevis</i>	ATCC 8287	46 Kda	9,88	32,4	0,9	6,6/10,9

Tabla1: Propiedades de la proteína S-layer en el genero *Lactobacillus*

Anclaje de la proteína S-layer a la pared celular

Sumado al peptidoglicano, la pared celular de los *Lactobacillus* contiene una capa de polímeros de pared celular secundaria (SCWP), que consiste en ácidos teicoicos, lipoteicoicos, lipoglicanos, ácidos teicurónicos. (Navarre *et al*, 1999). Muchas de las S-layer mencionadas poseen en su extremo N-terminal los motivos llamados homólogos en S-layer (SLH motif) los cuales son responsables del anclaje a la pared celular o a la pared celular secundaria (SCWP) (Mesnage *et al*, 2000) y en algunos casos directamente al peptidoglicano. En el caso de *Lactobacillus* la interacción S-layer SCWP se describe como la más importante (Ilk *et al*, 2008).

Los ligandos a los cuales la S-layer parece adherirse incluyen ácidos teicoicos, lipoteicoicos y polisacáridos neutros. En particular en *Lb. acidophilus* se determinó que la porción N-terminal sería la responsable del anclaje a ácidos teicoicos, mientras que la C terminal estaría

comprometida con la unión a la pared celular y la interacción con el peptidoglicano de la bacteria.

En microorganismos Gram negativos la asociación de las S-layer con la membrana externa esta mediada por la interacción de cationes divalentes con los componentes cargados de los lipopolisacáridos (Garduno *et al*, 1992; Walker *et al*, 1994). Esta interacción esta dada por una sección específica en la porción N-terminal de la proteína y formas particulares del los lipopolisacáridos.

En todos los casos la presencia de S-layer tiene influencia sobre las características físico-químicas de las envolturas que se encuentran asociadas a estas. Se ha reportado que cuando se remueve artificialmente la S-layer, las células se vuelven mas fluidas, mas flexibles, pierden estabilidad y resistencia al calor, así como también pierden resistencia a la presión hidrostática y presumiblemente se vuelvan mas sensibles a cualquier tipo de stress ambiental (Engelhardt *et al*, 2007).

La asociación de las proteínas S-layer directamente con la membrana citoplasmática se da solamente en el reino Archeae, donde las proteínas se agrupan sobre la membrana directamente (Lembeck *et al*, 1992). En estos casos las S-layers son el único componente de la pared celular.

Regulación de la expresión de genes S-layer

La proteína S-layer es una de las más abundantes en los microorganismos que las contienen, ya que cubren la totalidad de la superficie de la pared celular, alcanzando un 15% de la producción de proteína total. Es por esto que los genes que codifican para las S-layer deben tener un eficiente sistema de transcripción y/o traducción.

Para alcanzar estos altos niveles de expresión, los diferentes microorganismos que poseen estas proteínas han adoptado varias estrategias Como ejemplo en el genero *Lactobacillus* muchas especies poseen promotores múltiples, *Lb .acidophilus* y *Lb. brevis* poseen dos posibles regiones promotoras, esto garantizaría una transcripción

eficiente de esta proteína. En *Lb. acidophilus* solo uno de estos promotores (el más cercano a la región codificante) probó tener actividad en diferentes fases de crecimiento (Boot *et al*, 1997) mientras que en *Lb. brevis* los dos son activos a lo largo del crecimiento de la bacteria (Kahala *et al*, 1997).

Por otro lado los transcritos de mRNA para estas proteínas mostraron tener una vida media mucho mayor a otros transcritos, en *Lb. acidophilus* esto se debe a las estructuras que adopta el mRNA, una estructura en forma de horquilla (Figura 5), donde el mensajero se encuentra más estable y protegido de la degradación. Estructuras similares fueron encontradas en otras especies de *Lactobacillus*, como *Lb. johnsonii*. Todas estas características son utilizadas para que la proteína pueda expresarse en cantidad para tomar su lugar como componente extracelular de la pared de la bacteria.

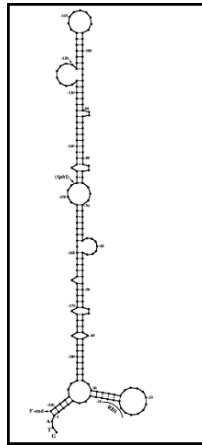


Figura 5: Estructura en forma de horquilla del mRNA mensajero de el gen *slpA* de *Lb. acidophilus*

Como el código genético es degenerado, varios tripletes codifican un mismo aminoácido que a su vez requiere su propio tRNA. Esto permite una regulación a nivel de traducción ya sea por el uso de codones únicos o raros (tRNA poco abundante), o por el uso de codones frecuentes (tRNA correspondiente abundante). De hecho, esta

estrategia es utilizada para aumentar los niveles de expresión de las S-layer

La combinación de tripletes (64 de ellos) que codifican para los 20 aminoácidos es muy superior al número de aminoácidos existentes, con lo cual varios tripletes pueden codificar un mismo aminoácido (el código es degenerado); a su vez cada triplete requiere su propio tRNA. Esto permite un nivel de regulación ya sea por el uso de codones más frecuentes o por la presencia de tRNAs únicos. Esta estrategia es utilizada para aumentar los niveles de expresión de las S-layer

Un ejemplo de esto es el caso de *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii*, donde con solo 7 tripletes se codifica un 50% de la proteína final (Ventura *et al*, 2002).

En *Lactobacillus acidophilus* el uso de codones que utilizan las S-layers es típico de proteínas de alto nivel de expresión común al género.

Otra estrategia que posee *Lb. acidophilus* y que comparte con otras bacterias como *Campylobacter fetus* y *Bacillus stearothermophilus*, es la variación de la proteína S-layer mediante re-arreglos en el DNA bacteriano. *Lb. acidophilus* tiene además del gen *slpA* de S-layer que es normalmente expresado, otro gen silenciado de una proteína similar a *slpA*, llamado *slpB*. Estos genes se encuentran a una distancia de 6 Kb y en orientación opuesta uno del otro. Se cree que cuando ocurre una mutación que afecta al gen *slpA*, ocurre un rearrreglo en el cromosoma que lleva a la expresión del gen *slpB* (Kleanhammer *et al*, 2008).

En cuanto a efectos regulatorios por cambios ambientales, se mostró en cepas de *Lb. brevis* una expresión diferencial cuando se las cultivaba en diferentes concentraciones de oxígeno, expresando las dos formas de proteínas o solo una, dependiendo si las condiciones eran anaerobias o no. Variaciones en la expresión de la proteína ya sean cuantitativos o cualitativos por modificaciones post-traduccionales son una estrategia adaptativa común en bacterias Gram positiva y podrían responder a la gran variedad de hábitat en las que estas se encuentran.

En la mayoría de las especies se ve expresión constante a lo largo de todo el crecimiento, pero el máximo de expresión se da en fase exponencial.

Con la información que se encuentra disponible sobre la expresión de los genes de S-layer, en especial en *Lactobacillus*, podría concluirse que cada cepa a desarrollado una estrategia de expresión como respuesta a los requerimientos que su hábitat común les impone.

Genes S-layer en *Lactobacillus*

Muchas de la especies mencionadas en los ítems anteriores poseen los genes que codifican para las proteínas S-layer clonados y secuenciados, estos genes se hayan en las bases de datos (GeneBank National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA)

Como fue descrito en el ítem anterior, muchas especies poseen varios genes para proteínas S-layer, la presencia de varios genes se da tanto en el genero *Lactobacillus* como en otros microorganismo así como también en Archea.

Estos arreglos genéticos son dependientes de la cepa estudiada y no se deduce una estructura genética en particular.

Muchos de los genes duplicados se encuentran separados por una pequeña región de DNA intergénico, y pueden encontrarse en la misma orientación como el caso de *Lb. brevis* y *Lb. johnsonii* o en dirección opuesta, como es el caso de *Lb. acidophilus*. Lo que tiene en común la mayoría de los genes investigados es la proximidad en la que se encuentran el uno del otro.

Homología de secuencias nucleotídicas de los genes codificantes para S-layer, solo pueden encontrarse entre genes de especies relacionadas; esta falta de homología entre especies no relacionadas también se ve reflejada en la baja identidad entre proteínas.

Función de las proteínas S-layer

Si bien tanto la estructura como las propiedades físico-químicas de las proteínas han sido bien estudiadas, las funciones biológicas no están totalmente establecidas. Pues no se dispone de herramientas genéticas adecuadas en los microorganismos que la poseen, lo que dificulta la obtención de mutantes nulas y el análisis de las funciones. La obtención de un mutante (condicional) de S-layer, permitiría conocer sobre la importancia para el microorganismo de mantener la expresión de esta proteína. Es por esto que muchas de las funciones asignadas a las S-layer son aun hipotéticas y necesitan un cambio en las estrategias experimentales. También surge de manera obvia que no todas tendrán la misma función, debido al amplio rango de nichos y de microorganismo en los que se hayan. En la Tabla 2 se enumeran algunas de las funciones adjudicadas a estas proteínas.

Como fue explicado en Archeas, las S-layer son el único componente de la pared celular. Su función evidente es determinar y mantener la forma celular de estos microorganismos (Egelseer *et al*, 1996), pues la remoción de las S-layer llevan a una pérdida de la forma celular correspondiente.

Las funciones tanto en *Lactobacillus*, como en otras especies tampoco han sido bien caracterizadas. En *Lb. brevis* una de las funciones adjudicadas a estas proteínas es la de adhesión al organismo hospedador, en especial a las células epiteliales del tracto gastrointestinal humano y a las fibronectinas en la matriz extra celular (Korben *et al*, 2002); en *Lb. crispatus* estas se adhieren al colágeno el cual es un componente de la matriz extracelular sub-intestinal.

La ausencia de S-layer anula las propiedades de auto agregado que tienen algunas bacterias tales como *Lb. kefir* y *Lb. parakefir*, donde están involucradas en la adhesión a células Caco-2 (DeAntoni *et al*, 2002- Golowczyc *et al*, 2009). Este auto agregado es de importancia tanto en los procesos de inhibición de otros micro-organismos, de

protección epitelial, como en los de intercambio genético entre cepas de *Lactobacillus*. En *Lb. brevis* se observó que la porción N-terminal es la que media la adhesión a las células epiteliales humanas.

En el transcurso de la investigación llevada a cabo en el laboratorio donde se realizó esta tesis, se hayo una nueva función biológica la cual se desarrollara en extenso en la sección resultados. La S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 tiene una capacidad de murein hidrolasa sobre la pared de *Salmonella* Newport (Prado Acosta *et al*, 2008). Esta actividad lítica se da sobre la pared celular de *Salmonella*, un conocido patógeno intestinal humano. La capacidad de la bacteria para hidrolizar un patógeno que coloniza su mismo hábitat indica una ventaja competitiva por el mismo nicho.

Con lo descrito anteriormente queda claro que no se puede asignar una función común a todas las proteínas S-layer presentes en diferentes especies, ninguno de los atributos que aparecen en la bibliografía son comunes para todos.

La característica en común que tiene todas es ser el primer contacto entre el microorganismo y el ambiente en el que se encuentra, es por esto que también se cree que juegan un importante rol en la integridad celular frente a diferentes estreses ya sean osmótico, producido por cambios bruscos de temperatura, así como también están involucradas en la termo-estabilidad de algunos microorganismos extremófilos (Engelhardt *et al*, 2007). Estas funciones reflejan una rápida adaptación tanto a cambios ambientales como a ambientes extremos, característicos de Archeas.

Por ultimo las bacterias que poseen S-layer forman un espacio periplásmico, el cual esta caracterizado por brindar protección al citoplasma, esto se da en su mayoría en bacterias Gram negativas; pero los trabajos de Matias y Beveridge aseguran que son de alta importancia en especies Gram positivas, mycobacterias y Archea.

función de las S-layer
Determinación de la forma celular y división celular (Archea)
Protección
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Resistencia a fagos ➤ Resistencia a fagocitosis
Adhesión
Superficie de reconocimiento de sustratos
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Son matrices físico-química definidas ➤ Enmascaramiento de las cargas negativas del peptidoglicano (<i>Bacillus</i>)
Tamices moleculares
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Limitan el espacio periplásmico en bacterias Gram positivas ➤ Previenen la adsorción no específica de macromoléculas
Factores de virulencia
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Importante en la invasión y supervivencia dentro del huésped ➤ Adhesión específica a moléculas del huésped ➤ Capa protectora frente a respuesta inmune
Resistencia a diferentes stress

Tabla2: Funciones adjudicadas a las S-layer

Aplicaciones potenciales de las proteínas S-layer

Las características únicas de las proteínas S-layer, tales como la regularidad de su estructura, su capacidad de auto ensamblado sobre diferentes matrices, así como también sus propiedades físico-químicas, las hacen candidatas para un gran espectro de aplicaciones biotecnológicas y nanobiotecnológicas.

Una de las principales aplicaciones que ya se encuentran en uso, es la utilización de las S-layer como matrices de inmovilización: se utiliza para inmovilizar anticuerpos, alérgenos o proteínas de interés (Slyter *et al*, 1992). También se utilizan en matrices porosas para membranas de ultrafiltración.

La S-layer al ser la estructura más externa, es utilizada para agregar grupos funcionales, enzimas y epítopes posicionándolos hacia el medio externo donde pueden cumplir importantes funciones. La incorporación de péptidos o dominios funcionales bien conocidos en regiones hidrofílicas de estas proteínas ha sido realizada con éxito por distintos grupos (Fouet *et al*, 1999, Mesnage *et al*, 1999, Vollenkle *et al* 2004;

Scheppler *et al*, 2002). Estas construcciones permiten el desarrollo de nuevos tipos de diagnóstico o de vacunas. Dominios SLH (S-layer homology-anchoring domain) de estas proteínas son suficientes para anclar enzimas o péptidos a las superficies celulares sobre la pared de la célula. Los determinantes expuestos conservan la antigenicidad e incluso la actividad enzimática. Utilizando el fragmento C de la toxina del tétanos (ToxC) de *Clostridium tetani* como antígeno heterólogo modelo fue posible emplear este sistema para propósitos de vacunación (Mesnage *et al*, 1999). También el grupo de Mesnage expresó la Levano sacarasa (SacB) de *Bacillus subtilis* en la S-layer de *B. anthracis*.

La mayoría de estas proteínas de fusión expresadas conservan las características de las S-layer, ya que se auto-ensamblan en estructuras regulares, tanto en soportes como en suspensión.

Si bien obtener en *Lactobacillus* construcciones de mutantes y recombinantes es mucho más difícil técnicamente que en otras bacterias Gram positivas, sus S-layers son de especial interés en el campo aplicable ya que son organismos con estatus de uso seguro ("GRAS" y "QPS" Qualified presumption of safety), sobreviven en el aparato gastrointestinal con una retención de 2 a 3 días, colonizan las mucosas por efectos de adhesión, tienen baja inmunogenicidad intrínseca y presentan propiedades adyuvantes (Boot *et al*, 1996, Hanniffy *et al*, 2004).

Es claro que una meta importante sería la de obtener en cepas de *Lactobacillus* de mayor persistencia en el intestino la expresión de S-layers modificadas con motivos antigénicos para la inmunización vía mucosas.

Aplicaciones nanobiotecnológicas

La utilización nanobiotecnológica de las proteínas S-layer esta basada en las propiedades de autoensablado de estas y tienen una gran rango de aplicaciones (Tabla 3).

La estrategia mas utilizada para la utilización de las S-layer, es la construcción de proteínas S-layer de fusión, estas proteínas quiméricas deban poseer ciertas cualidades (Sara *et al*, 2005):

- La porción N-terminal accesible para que pueda unirse a algún soporte y así poder orientar a la proteína.
- Poseer el dominio de autoensamblado
- Un dominio funcional fusionado a la porción C-terminal

El grupo de Vollenkle utiliza una proteína S-layer de fusión de *Bacillus sphaericus* donde se introduce un dominio de unión a la Fc de la IgG y se construyo unas microesfera cubierta de estas proteínas, estas podrían ser utilizadas luego para un sistema de detoxificación para la purificación extracorporal sanguínea.

Otra aplicación de esta tecnología es la fusión a un gen reportero, como por ejemplo la GFP (green fluorensence protein) y recubrir liposomas, estos son llamados S-liposomas y se utilizan para la investigación de la internalización de estos en células eucariotas.

Los S-liposomas tienen una estructura similar a la de la envoltura de ciertos virus y estos entran a las células, esta tecnología es muy prometedora para su uso en terapia génica y ensayos de inmunodiagnóstico (Kupuc *et al*, 1995, Sleytr *et al*, 1999, Mader *et al*, 2000).

Las características de las proteínas S-layer, las cuales se ensamblan en forma repetitiva, son utilizadas para la utilización de cómo membrana de ultrafiltración (S-layer ultrafiltration membrane SUM's) y estas son utilizadas para retener moléculas funcionales específicas (enzimas, anticuerpos, antígenos, proteínas, etc), las cuales pueden ser utilizadas como biosensores e inmunoensayos (Sleytr *et al*, 1998, 1999, 2000, 2003)

El desarrollo de la investigación y manipulación de estas proteínas, pueden llegar a ser una herramienta de gran importancia en el campo biomédica aplicada.

Aplicaciones de las Proteínas S-layer de fusión
➤ Sistemas de diagnóstico
➤ Biosensores
➤ Estructuras inmunogénicas
➤ Liposomas funcionales (S-liposomas)
➤ Nanopartículas de unión
➤ Bimineralización
➤ Membranas de ultrafiltración

Tabla 3: aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de fusión de S-layer

Introducción: Parte 2

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son pequeños péptidos que poseen actividad contra el crecimiento de otra bacteria. Dos características principales distinguen a la mayoría de las bacteriocinas, de los antibióticos clásicos: las bacteriocinas presentan síntesis ribosomal y tienen un espectro de acción relativamente estrecho, o sea, solo afectan a bacterias de la misma especie; si bien se han descrito ejemplos de amplio espectro, el cual tiene actividad frente a otros géneros (Bowdish *et al*, 2005).

El microorganismo productor de la bacteriocinas es inmune a ésta, característica que es mediada por proteínas específicas que le confieren la inmunidad.

Los primeros efectos de inhibición de crecimiento debido a la presencia de bacteriocinas fueron descritos 100 años atrás cuando se descubrió que ciertas cepas de *Escherichia coli* inhibían el crecimiento de otras cepas de la misma especie (Grafia, 1925) estas fueron llamadas colicinas (lo cual significa que “matan” al genero coli),

Luego se demostró que las colicinas eran proteínas y que estas poseían un rango limitado de acción debido a la presencia o ausencia de receptores específicos en la superficie.

Así fue como luego se comenzaron a descubrir muchas cepas que podían producir bacteriocinas que afectaban a bacterias de su misma especie, estos son los ejemplos de subtilisinas (para *Bacillus subtilis*), warnericina (*Staphylococcus warneri*) etc. También se probó que eran producidas por algunas Archaea (Riley & Wertz 2002; Shand & Leyv 2008).

El sistema de nomenclatura para las bacteriocinas resultó problemático, ya que el espectro de acción de algunas bacteriocinas era mas amplio que el nombre al que estas estaban relacionadas, o mismo pueden encontrarse bacterias de una especie resistentes a las bacteriocinas nombradas según este método. Mas aun los nombres que recibían estas bacteriocinas derivaban generalmente de la cepa productora y

no del microorganismo sensible a esta, por lo cual se comenzó a utilizar un sistema de nomenclatura alternativo, estos métodos se basaron en el mecanismo de acción (formación de poros, DNAsas, nucleasas, etc), peso molecular, las características químicas (composición de aminoácidos) y el mecanismo por el cual la bacteriocina es producida. Se cree que entre el 30 y el 90% de las bacterias y de las Archeas producen por lo menos una bacteriocina (Klaenhammer *et al*, 1988), muchas de estas bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales, como ya fue expuesto, son de gran uso en la industria alimentaria. La producción de estos péptidos ofrece la posibilidad de manipular el ecosistema presente en los alimentos aumentando o disminuyendo cierta población bacteriana. Es así que las bacteriocinas son usadas para proteger a los alimentos contra contaminación por bacterias específicas no deseadas o inhibiendo el crecimiento de las mismas. También las bacteriocinas de corto espectro pueden ser utilizadas para desplazar la población bacteriana hacia un microorganismo en particular, o hacia una cepa con particularidades deseadas.

Muchos estudios han revelado que las BAL utilizadas en la fabricación de quesos, las cuales convierten a la lactosa en ácido láctico son a la vez productoras de bacteriocinas, esto ejerce una influencia en la composición de la microflora presente en el alimento.

En el año 1928 se descubrió que ciertas cepas de *Lactococcus* tenían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de otras BAL (Rogers 1928); luego en 1933 el grupo de Whithead en Nueva Zelanda halló un antimicrobiano de origen proteico, pero no fue hasta 1947 que este péptido fue nombrado nisina.

La nisina fue comercializada por primera vez en Inglaterra en el año 1953, para la utilización como antimicrobiano y a partir de ese momento fue aprobado su uso en 48 países. Luego la Nisina probó ser segura para el uso en alimentos siendo aprobada por varios organismos internacionales (Joint of Food and Agriculture, World Health Organization

Expert Comitee on Food), para luego ser el único antimicrobiano en ser aprobado para el uso en la industria alimentaria por la FDA en Estados Unidos y en Europa (Figura 6)

El éxito de la nisina en el mercado comercial, incita a continuar investigando tanto, el descubrimiento de nuevas bacteriocinas, como aditivos que pueden ayudar a mejorar los efectos propios de la Nisina.

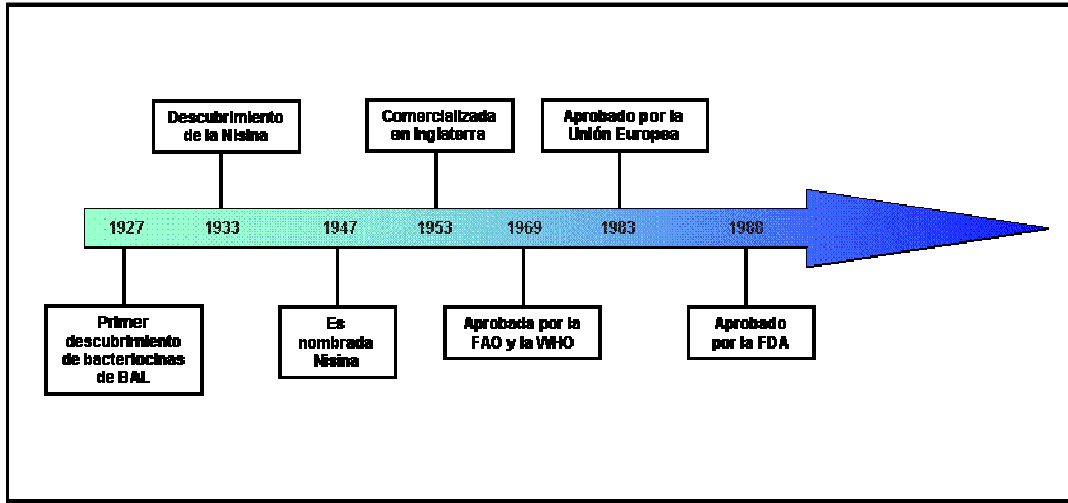


Figura 6: Línea de tiempo en el descubrimiento uso y comercialización de la Nisina

Clases de bacteriocinas

Hemos definido a las bacteriocinas como pequeños péptidos producidos por ciertas bacterias los cuales inhiben el crecimiento de otra población bacteriana. De las bacterias que los producen las BAL, son de especial interés por su uso en la industria alimentaria. Las bacteriocinas producidas por las BAL pueden ser de estrecho o amplio espectro de acción, pero generalmente poseen actividad contra bacterias Gram positivas cuyo genoma tiene bajo contenido en GC. La actividad contra bacterias Gram negativas es casi nula, solo se comprobó actividad contra esta clase de bacterias cuando la integridad de la membrana de las mismas fue perturbada.

Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos y las bacteriocinas producidas por BAL, que tienen una larga historia de uso

en fermentación y conservación de carne y leche, son las que mejor se han caracterizado. Se identifican cuatro clases: Clase I compuesta por bacteriocinas modificadas, conocidos como lantibióticos; Clase II incluye aquellas estables al calor, mínimamente modificadas; Clase III incluye bacteriocinas termo-lábiles y más grandes; y Clase IV se compone de complejos llevando grupos funcionales de lípidos o carbohidratos. Clases I y II ha sido el foco de la mayoría de probiótico de investigación (Gillor *et al*, 2008).

El grupo de Ross (Ross *et al*, 2005) las clasifica en tres clases diferentes dependiendo en el mecanismo de acción de las mismas:

➤ Bacteriocinas del grupo 1 (lantibióticos)

Los lantibióticos (antibióticos que contienen el residuo lantionina, Figura 7), son pequeños péptidos entre 19 y 38 aminoácidos resistentes al calor y que poseen este residuo en sus secuencia. Este residuo es poco común y tiene la característica de formar anillos internos en el péptido, dándole a los lantibióticos sus características estructurales. Por otro lado las bacteriocinas de este grupo pueden poseer otros residuos poco frecuentes que resultan de modificaciones post-traduccionales, como por ejemplo la sustitución de D-alanina por L- serinas (Xie *et al*, 2004 y Pag *et al*, 2002)

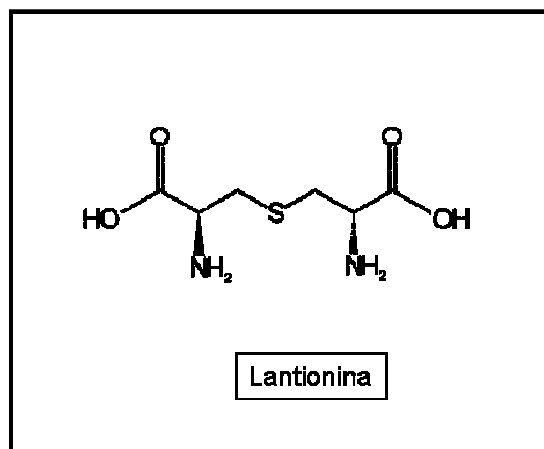


Figura 7: residuo Lantionina

Los lantibióticos, como es el caso de la Nisina, son péptidos catiónicos cuyo mecanismo de acción se basa en la formación de poros, que lleva a la dispersión del potencial de membrana y el flujo del contenido citoplasmático hacia el espacio extra celular.

Otro mecanismo de acción descrito, como es el caso de la Mersadicina es el de inhibición de enzimas importantes para el crecimiento bacteriano.

El mecanismo de acción de la Nisina parece depender de su estructura la cual presenta dos módulos, uno N- terminal y el otro C- terminal unidos por un segmento denominado bisagra. Por un lado los residuos presentes en el segmento N- terminal de la nisina, como de otras bacteriocinas similares, parecen ser los encargados de formar la unión de estas con el lípido II presente en la membrana (Hsu *et al*, 2004). Por otro lado la porción C- terminal y los residuos que forman la “bisagra” entre los dos fragmentos, parece ser esenciales para la formación del poro (Van Heusden *et al*, 2002)

➤ Bacteriocinas del grupo 2 (bacteriocinas sin lantionina)

Este grupo de bacteriocinas comparte las características del conjunto anterior (pequeñas péptidos de menos de 10 Kda y resistentes al calor), pero contrario al grupo anterior, no presentan modificaciones post-traduccionales de gran importancia.

La mayoría presente en este grupo basa su actividad en la inducción de una permeabilización de la membrana de la bacteria blanco. Las bacteriocinas de este grupo presentan un corto espectro de acción, teniendo una alta especificidad en el patógeno de alimentos *Listeria monocytogenes*, su mecanismo de acción se basa en los dos módulos repetidos. El N – terminal es una región mas conservada y facilita la unión al organismo blanco (Kazazic *et al*, 2002), mientras que el C – terminal es una región menos conservada y que llevan a la sub- división de este grupo dependiendo de las propiedades de esta porción.

➤ Grupo 3 Bacteriolisinas

Este grupo posee características muy diferentes a la de los grupos anteriores, y es por esto que no son llamados bacteriocinas. Por un lado poseen un gran tamaño comparado con las bacteriocinas frecuentes por lo cual son consideradas proteínas y no péptidos y además son sensibles al calor. Su estructura presenta diferentes dominios, con diferentes funciones, como por ejemplo, un dominio para translocación, uno para unión al receptor, y otro para la actividad antimicrobiana.

Otra característica que no comparten con el resto de las bacteriocinas es que las bacterias productoras de bacteriolisinas no poseen genes específicos de inmunidad (los cuales si están presentes en las productoras de bacteriocinas) y basan su inmunidad en modificaciones en la pared celular de la cepa productora.

De este tipo de bacteriolisinas solo cuatro de los producidos por BAL han sido caracterizados y estudiados genéticamente (Joerger *et al*, 1990 y Beukes *et al*, 2000)

Su mecanismo de acción es diferente al de las bacteriocinas, ya que este se basa en la lisis de los microorganismos blanco, esto se produce a través de una hidrólisis catalítica de la pared celular de las bacterias sensibles a estas proteínas. El dominio catalítico es por lo general el N – terminal, el cual tiene una alta homología con algunas endopeptidasas. Mientras que el dominio C-terminal sea probablemente el que reconoce al microorganismo. (Johnsen *et al*, 2004).

Importancia en la industria

La producción de alimentos seguros para el consumo humano es uno de los mayores retos que enfrenta la industria alimentaria. Para esto se debe controlar la presencia de patógenos, pero así también mantener al mínimo la cantidad de productos químicos que se agregan.

Las bacteriocinas surgen como una opción que suministra una solución a algunos de estos requerimientos. Estas son producidas por organismos

utilizados en la industria de alimentos. Sin embargo hasta hoy solo la Nisina es utilizada globalmente en la producción de alimentos, la preparación que se utiliza es:

- Nisina 2,5 %
- NaCl 75 %
- Leche deshidratada 22,5 %

La potencia de esta preparación es de 1000000 de Unidades Internacionales (UI) por cada gramo total de preparación.

Cuando se busca posibles bacteriocinas para el uso en alimentos se requiere que cumplan varios criterios, el principal es que estos provengan de microorganismo generalmente reconocidos como seguros (status GRAS) y luego que la bacteriocina tenga un amplio espectro y que este incluya bacterias patógenas y es muy importante que no genere ningún riesgo a la salud humana. Algunas otras como la estabilidad frente al calor, la mejora en el sabor y calidad del producto al que se la aplica también son buscadas.

Las bacteriocinas son utilizadas principalmente para evitar las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), a nivel mundial según la WHO (World Health Organization) se dan alrededor de diez mil muertes por años por causa de alimentos contaminados y entre 24 y 81 millones de casos de intoxicación por año. También se han clasificado ciertos microorganismos como los mayores causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, ya sea por la severidad de la enfermedad o por el número de casos que ella produce, estos se detallan en la tabla 1. Todos causan algunos síntomas que son típicos como lo son el dolor de cabeza, náuseas, diarrea, vómito, dolor abdominal y fiebre.

Las ETAs, además de causar la gastroenteritis, ameritan especial atención porque pueden generar complicaciones y secuelas como meningitis, artritis, desórdenes auto-inmunes, enfermedades cardiovasculares, neoplasias, y abortos. Por otra parte los gastos económicos causados por incapacidades laborales y por pérdidas

industriales debido al rechazo de productos contaminados con estos patógenos son bastante altos.

Los grupos de mayor riesgo son los niños, ancianos, mujeres embarazadas y pacientes inmunosuprimidos, aunque en la población sana de entre quince y cuarenta y cuatro años se presenten casos típicos de la gastroenteritis causada por estos microorganismos

Microorganismo	Síntoma	Origen
<i>Campylobacter jejuni</i>	diarrea	Carnes y pollos crudos o mal cocinados, leche cruda y agua sin tratamiento.
<i>E. coli</i> O157:H7	toxina mortal	Carnes mal cocidas, especialmente hamburguesas, leche cruda y productos agrícolas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	toxina que causa vómitos	Alimentos cocinados con alto contenido en proteínas (ejemplos: jamón cocido, productos de pastelería, productos lácteos).
<i>Vibrio vulnificus</i>	gastroenteritis o un síndrome septicemia primaria	mariscos crudos o mal cocidos
<i>Listeria monocytogenes</i>	listeriosis, una enfermedad grave en mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos con un sistema inmune débil	productos lácteos incluyendo quesos blandos, en carne cruda y mal cocida, en pollos y productos del mar frescos o en conserva.
<i>Shigella</i>	enfermedades diarreicas	ensaladas, leche, productos lácteos y agua sucia
<i>Clostridium botulinum</i>	parálisis muscular (botulismo)	Alimentos preparados en el hogar y aceite de hierbas.
<i>Salmonella</i>	causa más común de ETAs	huevos crudos, pollos y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales.
<i>Toxoplasma gondii</i>	desórdenes del sistema nervioso central, particularmente retardo mental y deterioro visual en niños (toxoplasmosis)	carnes, principalmente de cerdo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	diarrea y vómitos(yersiniosis)	Productos lácteos y agrícolas.

Tabla 4: patógenos mas frecuentes según la WHO

Importancia en la clínica

A pesar de que el uso más frecuente de bacteriocinas del grupo 1 (Lantibióticos) sea en la industria de alimentos, sus características no tóxicas para el organismo y su actividad contra bacterias patógenas Gram positivas tanto para humanos como para animales, es claro pensar que poseen un gran potencial para aplicaciones clínicas.

En especial algunos grupos han propuesto que el mecanismo de acción de ciertos lantibióticos posee actividad contra patógenos que presentan resistencia a múltiples drogas, lo cual resulta aun más interesante.

Su amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas, podría ser efectivo contra algunos patógenos humanos de gran importancia, como ejemplo de esto se encontró que un lantibiótico aislado de *Lactococcus lactis* llamado lacticina 3147 posee actividad *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* (incluyendo a la cepa resistente a metilicilina (MRSA)), *Enterococcus*, *Streptococcus* (*S. pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*), *Clostridium botulinum*, y *Propionibacterium acnes* (Galvin *et al*, 1999) todas de gran importancia en casos clínicos.

Ensayos *in vivo* han sido solo realizados en modelo animal para tratar enfermedades causadas por *S. pneumoniae* (Goldstein *et al*, 1998) y MRSA (Kruszewska *et al*, 2004) así como también prevenir enfermedades bucales como la pérdida de dientes, caries y gingivitis (Ryan *et al*, 1999)

La Nisina es actualmente utilizada en forma comercial (la licencia la tiene Biosynexus Incorporated) y la usa en el producto "Mast Out" para prevenir la mastitis bovina.

Desde la perspectiva clínica el problema de la emergencia de resistencias a antibióticos de bacterias patógenas, pone al descubierto la necesidad de encontrar nuevas alternativas para frenar el crecimiento microbiano. Sin duda la ingeniería genética puede ser

usada como estrategia para utilizar bacteriocinas más estables y darles una mayor actividad y espectro, así como también el uso de proteínas o sustancias que puedan servir de elementos sinérgicos de las bacteriocinas.

Es así que la investigación tanto en la industria de alimentos, como en industria farmacéutica es de una enorme importancia y necesita todavía un gran desarrollo, ya que ambos campos pueden usar a las bacteriocinas en numerosas aplicaciones.

Introducción: Parte 3

Respuestas a estrés en Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido-lácticas constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en nuestro aparato digestivo. En la actualidad también se hace buen uso de estos microorganismo en la elaboración de una amplia gama de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos, como el kefir, o densos y semisólidos, como el queso o el yogurt., así como también se emplean en la elaboración del vino, y para secar pescado, carne y embutidos.

Aunque sin comprender la base científica que explicase su acción, numerosos pueblos utilizaban estas bacterias hace ya miles de años para la elaboración de alimentos modificados, que podían conservarse mucho más tiempo, y estaban dotados de texturas y sabores característicos, distintos de los del producto original.

Así fue como diferentes cepas de BAL, fueron seleccionadas para la industria, por resistencia a bacteriófagos, por un rápido crecimiento y acidificación, por sus propiedades proteolíticas, por su resistencia a bacteriocinas, etc.

Sin embargo, estas cepas deben resistir también a las condiciones adversas encontradas en los procesos industriales, por ejemplo durante el manipuleo y almacenamiento de los cultivos iniciadores (liofilización, congelado, secado). El desarrollo de nuevas aplicaciones como vacunas vivas (Mercenier *et al*, 2000) y alimentos probióticos (Schiffrin *et al*, 2001) reafirma la necesidad de cepas robustas, ya que deben sobrevivir al tracto digestivo, resistir la flora intestinal, eventualmente colonizar la mucosa digestiva o uro-genital y expresar funciones específicas en condiciones desfavorables (por ejemplo durante la fase estacionaria, o el almacenamiento). Excepto para las cepas probióticas donde la alta tolerancia a sales biliares ha sido empleada como un

criterio de selección, las BAL raramente han sido seleccionadas por su resistencia a estrés.

Sin embargo, las bacterias no solo son sometidas a cambios ambientales que potencialmente pueden someterlas a estrés durante los procesos industriales. En la naturaleza se enfrentan a cambios drásticos, y es esencial para su supervivencia, la capacidad de responder rápidamente frente a los mismos.

Ha sido bien establecido que las BAL, como otras bacterias, poseen sistemas que le permiten sensor las señales de estrés y soportar condiciones drásticas y cambios ambientales repentinos, los microorganismos podrían tener reguladores específicos para cada uno de sus genes regulados y adaptar su expresión de acuerdo a su ambiente, pero esto representaría un enorme gasto energético. En cambio, los reguladores, generalmente controlan varios genes y a veces controlan también a otros reguladores (Van Bogelen *et al*, 1999). Las defensas a estrés son un buen ejemplo de estos sistemas de regulación integrados

Las respuestas a estrés de bacterias dependen de la expresión coordinada de genes que alteran diferentes procesos celulares (división celular, metabolismo de ADN, funciones de mantenimiento, composición de la membrana, transporte, etc) y actúan en conjunto para mejorar la tolerancia de la bacteria a stress.

Respuesta a estrés osmótico

Estrés osmótico es el aumento o la disminución en la fuerza osmótica del ambiente de un organismo; una respuesta a estrés osmótico es el conjunto de procesos adaptativos activos que suceden en una célula en oposición al cambio en la osmolaridad.

En ausencia de respuesta activa en un ambiente de hiperosmolaridad, el agua del interior celular fluirá al exterior hasta que la actividad del agua interior se equipare con la del exterior, esto ocasionará

disminución de la presión de turgencia y del volumen citoplasmático y aumentará la concentración intracelular de solutos. En un ambiente hipotónico, el agua ingresará a la célula aumentará volumen celular y la presión de turgencia. Ambos tipos de variaciones osmóticas resultan perjudiciales para las células vivas. Para sobrevivir, las bacterias utilizan sistemas de transporte y/o de síntesis de osmoprotectores (o solutos compatibles) que permiten mantener la homeostasis por acumulación en el citoplasma (por síntesis o ingreso) o por su expulsión (liberación al exterior o degradación) dependiendo del efector de estrés osmótico (Csonka *et al*, 1991) Los solutos compatibles son compuestos orgánicos que pueden ser acumulados sin interferir en los procesos celulares. Además de los efectos en el balance osmótico, estos solutos compatibles también estabilizan macromoléculas (enzimas y ácidos nucleicos) (Poolman *et al*, 1998).

Algunos de los solutos compatibles empleados por bacterias se muestran en la Figura 8 y son aminoácidos (prolina, glutamato), derivados de aminoácidos (ectoína, prolinbetaína), pequeños péptidos (N-acetilglutaminilglutamin-amida), metilaminas (glicín-betaína, carnitina), ésteres de sulfato, polioles (glicerol), azúcares (trehalosa, sacarosa)

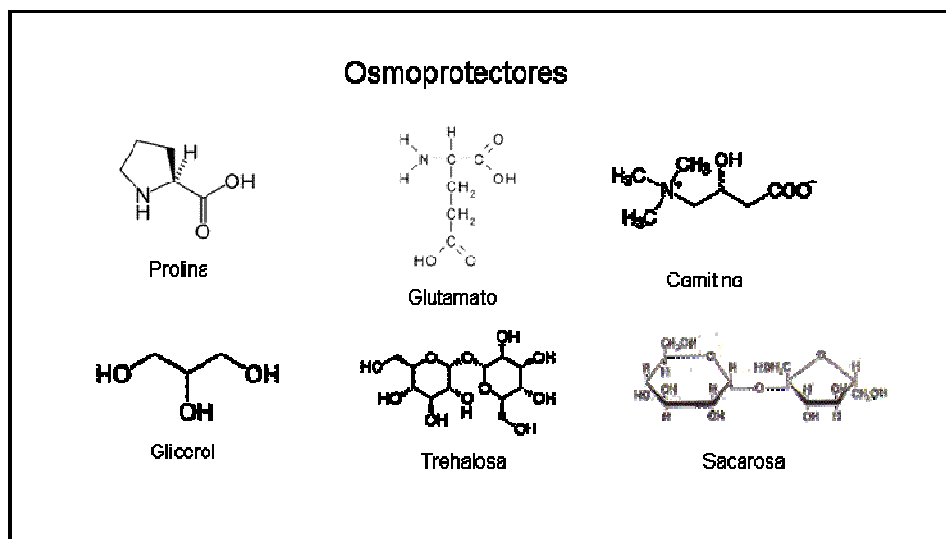


Figura 8: Osmoprotectores de uso mas frecuentes en microorganismos

Estrés osmótico en bacterias lácticas

En varias de las aplicaciones en la industria alimentaria, las BAL son expuestas a estrés osmótico por agregado de importantes cantidades de sal o azúcar al producto. En el medio ambiente natural, las bacterias lácticas también sufren variaciones en la concentración de osmolitos en el medio, como sucede en la desecación. A diferencia de lo que sucede en Enterobacterias y en *Bacillus subtilis*, las bacterias lácticas no pueden sintetizar solutos compatibles y dependen únicamente del transporte de compuestos del medio extracelular (Poolman *et al*, 1998). Las sales como el KCl y el NaCl inhiben el crecimiento de *Lb. plantarum* y *L. lactis* más que concentraciones osmóticas equivalentes de lactosa o sacarosa, y sólo se encontró efecto estimulador de glicín-betaína en estrés salino (Glaasker *et al*, 1998). Una de las explicaciones sería que los azúcares al ser incorporados sólo producen un estrés transitorio, por el contrario el estrés salino no solamente provoca estrés hiperosmótico sino también salino: los iones Na⁺ en particular son muy tóxicos lo que requiere un sistema eficiente de expulsión para sobrevivir.

Lb. plantarum es incapaz de responder al estrés osmótico por acumulación de K⁺ (Glaasker *et al*, 1998), como sí ocurre en varios microorganismos incluyendo *B. subtilis* y *E. coli*, donde constituye la primera señal para la respuesta (Csonka *et al*, 1991). En 1996, Glaasker y colaboradores determinaron la concentración de varios solutos compatibles durante el crecimiento de *Lb. plantarum* en medio mínimo en ausencia o presencia de 0,8 M KCl. En el medio con alta osmolaridad encontraron acumulados en mayor medida los aminoácidos glutamato y prolina. Como muchas otras bacterias en medio rico e hiperosmótico, *Lb. plantarum* acumula preferencialmente glicín-betaína y mucho menos glutamato.

Mientras que la incorporación de prolina y glicín-betaína es activada por un choque hiperosmótico, no se observa una activación de la incorporación del glutamato (Glaasker *et al*, 1996). *Lb. plantarum* no es capaz de sintetizar glicín-betaína y por lo tanto su rápida acumulación

depende exclusivamente de su transporte desde el medio extracelular. Posee un sistema de transporte de alta afinidad para glicín-betaína y carnitina y de baja afinidad para la prolina, denominado QacT (transportador de compuestos de amonio cuaternarios, dependiente de ATP) La regulación osmótica de este transportador está dada por un aumento en la actividad del transportador y no por el aumento de su expresión. (Glaasker, 1998).

En *L.lactis* también aumenta la osmotolerancia por la incorporación de glicín-betaína, pero a diferencia de lo encontrado en *Lb. plantarum* la osmorregulación del transportador se encuentra a dos niveles: en la expresión genética y en su actividad (van de Guchte *et al*, 2002)

Los estudios en *L. lactis* demostraron la existencia de un operón que codifica para un sistema de transporte con alta afinidad para glicín-betaína, llamado *OpuA* (o *BusA*), cuya expresión aumenta significativamente después de un choque hipertónico (Bouvier *et al*, 2000). *OpuA* de *L. lactis* no sólo actúa como osmorregulador, sino que funciona como osmosensor. Este operón en *Lactococcus lactis* está constituido por genes que codifican para dos proteínas (a diferencia de lo que sucede en *E. coli* donde son tres las proteínas que lo componen el transportador ABC). El primer gen (*opuAA*) codifica para una ATPasa citoplasmática. El segundo, (*opuABC*) codifica para una proteína que en su extremo amino terminal funciona como una permeasa que permite la entrada de glicín-betaína, y en su extremo carboxi terminal permite la unión del sustrato. Así, funciona como una proteína híbrida que une y transporta a la glicín-betaína (Obis *et al*, 1999)

El sensado del cambio en la fuerza iónica se transmite a *OpuA* a través de los efectos en las interacciones entre los lípidos de membrana y las proteínas (Van der Heide *et al*, 2001). Las variaciones en la composición de ácidos grasos observadas luego del crecimiento en un medio con alta osmolaridad (Guillot *et al*, 2000) podrían afectar también el transporte.

Para la identificación de otras funciones involucradas en la respuesta osmótica en *Lactococcus lactis*, Kilstrup y colaboradores (1997) utilizaron la técnica de electroforesis en dos dimensiones luego de un cambio a alta osmolaridad. Pese a las limitaciones de la técnica, identificaron las proteínas generales de estrés GroES, GroEL, y DnaK.

Además de los cambios mencionados en el grado de crecimiento, se afecta la composición de los lípidos (Machado *et al*, 2004) de la pared celular (Piuri *et al*, 2005) y la producción del exopolisacárido (Liu *et al*, 1998).

Respuesta a estrés osmótico en *Lactobacillus*

En respuesta a alta osmolaridad, en *Lb. casei* se registraron cambios de sensibilidad a antibióticos que actúan tanto a nivel de pared como en membrana celular y un aumento en el índice de hidrofobicidad respecto del crecimiento en la condición control, variaciones de la composición y estructura de la membrana y pared (envolturas) (Machado *et al*, 2004; Piuri *et al*, 2005)

En trabajos realizados dentro del laboratorio (Piuri *et al*, 2003) se analizó el efecto de los péptidos como osmoprotectores y el rol de las actividades proteolíticas de *Lactobacillus casei* ATCC 393 durante el crecimiento a altas concentraciones de sal. La disponibilidad de osmoprotectores en el medio afectan drásticamente la velocidad de crecimiento. Esta es mayor en medios ricos (como MRS) que en medio mínimo (químicamente definido ó CDM). El agregado al medio de péptidos ó carnitina aumenta la osmotolerancia.

Todos estos resultados indican que durante el crecimiento en alta osmolaridad, *Lactobacillus casei* utiliza un balance de actividades de proteasas y peptidasas para obtener un pool de aminoácidos o di-tri péptidos que actúan como osmoprotectores.

Estrés osmótico y S-layer

La relación entre el estrés osmótico y las proteínas S-layer esta ampliamente descrita para el genero *Archea*, donde la proteína es el único componente de la pared celular de las mismas. En las bacterias la presencia del peptidoglicano ayuda a compensar la diferencia de presión entre el medio interno y externo de la célula, esto no ocurre en *Archeas*, en estas el espacio periplasmico es menos restrictivo que el de las bacterias debido a la porosidad de las S-layer (Engelhardt y Peters, 1998), y probablemente estas no están equipadas para balancear el entorno osmótico con el del citoplasma.

A pesar de esto, la presencia de la S-layer, las cuales se encuentran ancladas a la membrana lipídica, el anclaje esta dado por interacciones hidrofobicas, las porciones hidrofóbicas de las S-layer en *Archea* interactúan con las moléculas lipídicas que la rodean; (Peters *et al*, 1996). La transferencia de estos residuos a un ambiente acuoso, requiere de energía y esto no ocurrirá hasta que la membrana sea destruida (Jensen y Mouritsen, 2004). Esta característica no solo estabiliza a la proteína en la membrana sino que también inmoviliza a la misma membrana a la S-layer. Esto genera que en la membrana se formen subdivisiones debido a el anclaje de los residuos hidrofóbicos de la S-layer.

Esta subdivisión en pequeños parches, de la membrana plasmática aumenta la estabilidad de la envoltura lipídica, cuando se la compara con una estructura sin S-layer (Engelhardt *et al*, 2007), esto le confiere una mayor resistencia a los cambios de presión de agua generados durante el estrés salino.

Si bien esto ayuda en las *Archea*, ningun grupo ha descrito aun la importancia de la proteina S-layer frente al estrés osmotico en bacterias, durante el desarrollo de esta tesis hemos podido establecer la importancia de la presencia de esta proteina durante el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en altas concentraciones de sal.

Objetivos

Objetivos

Las bacterias ácido-lácticas se han empleado para fermentar o crear cultivos con fines de preservación de alimentos durante al menos 4 milenios. Dentro de estas la especie *Lactobacillus acidophilus* es ampliamente usada en la industria alimentaria. Una de las razones por las que se utiliza este microorganismo es que este crea un ambiente saludable en el intestino, lo cual brinda efectos favorables, dando características probióticas a cepas de esta especie.

Si bien esta comprobado científicamente que algunas cepas brindan beneficios para la salud, no esta clara la razón.

Lb acidophilus posee en sus envolturas una proteína de cubierta autoensamblada o capa S (S-layer), siendo esta capa la primera barrera entre el microorganismo y su nicho ambiental. Si bien algunas características físico químicas de esta proteína se encuentran ampliamente descritas las funciones biológicas aun no han sido claramente establecidas.

Es por esto que hemos basado la investigación en identificar y correlacionar los beneficios para la salud que posee el *Lactobacillus acidophilus* y la presencia de la proteína S-layer en este.

Los objetivos de esta tesis fueron:

- Caracterizar las propiedades estructurales de las proteínas S-layer de *Lactobacillus acidophilus*
- Determinar y caracterizar una actividad biológica presente en la proteína
- Investigar la existencia de una relación funcional entre la proteína S-layer y la adaptación a variaciones ambientales utilizando como modelo la respuesta al estrés osmótico
- Desarrollar una posible aplicación de la proteína S-layer en la industria de alimentos.

MATERIALES y MÉTODOS

Cepas Utilizadas

- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, propagado en medio MRS a 37°C.
- *Salmonella entérica* serovar Newport, propagada en medio LB a 37°C
- *Bacillus cereus*, propagado en LB a 37°C
- *Staphylococcus aureus*, propagado en BHI a 37°C
- *Escherichia coli* JM109 (utilizada para amplificación de plásmido), propagada en LB
- *Bacillus subtilis* 168 (utilizado para expresión heteróloga), propagado en LB.

Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos o primers de ADN y los plásmidos utilizados en este trabajo se detallan en la siguiente tabla:

Nombre	Secuencia 5´ a 3´
Slas1	TAAGCTTGGGCCCGTGGTAAGTAATAGGACGTGC
Slac1	CAGAAAATGCAGGTAAGACTGTTTA
SlarT2	GTTGGTATTGATTGCTGATG
Slac2	GCGGAATTCGAGCTCAGCTTAGTGCTACGACT
16s fw	ACTGAGACACGGCCCAA
16s rev	CGCATTTACCGCTACACA

Plásmido	Características	Origen
pCR 2.1 -TOPO	Plásmido utilizado para clonado de fragmentos de PCR y transformación de <i>E.coli</i>	Invitrogen
pHCM 05	Plásmido e expresión en Gram. positivas y negativas	<i>Bacillus</i> Genetic Stock Center

Medios de cultivo

- **LB**: Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, Cloruro de sodio 5 g/L
- **LB Amp** : LB + 100mg/ml ampicilina
- **LB agar** : LB + 1,5% Agar
- **MRS** : Peptona de caseína 19g/L, Extracto de levadura 4 g/L; Extracto de carne 8 g/L, D(+) Glucosa 20 g/L, Fosfato de Potasio di-básico 2 g/L, Citrato de di-Amonio 2 g/L, Tween 80 1g/L, Acetato de sodio 5 g/L, Sulfato de magnesio 0,2 g/L, Sulfato de manganeso 0,04 g/L.
- **BHI** : Extracto de cerebro corazón y peptona 27 g/L, D(+) Glucosa 2 g/L, Cloruro de sodio 5 g/L, Fosfato de sodio di-básico 2,5 g/L

Técnicas moleculares

Aislamiento de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN plasmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando el *kit* Wizard Plus SV Minipreps ADN Purification System (Promega). Cuando los aislamientos de plásmidos se realizaron con el fin de verificar construcciones se utilizó el siguiente protocolo rápido: Se resuspendió el *pellet* (de 2 ml de cultivo en LB con el antibiótico correspondiente) en 0,2 ml de *Buffer* 1. Se agregaron 0,2 ml de *Buffer* 2. Se mezcló por inversión de y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,2 ml de *Buffer* 3 frío, y luego de mezclar por

inversión, se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm en microcentrífuga durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionaron 0,9 ml de etanol absoluto y se dejó una hora a -20 °C. Se volvió a centrifugar durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 0,02 ml de agua deionizada.

La extracción de plásmidos de *B. subtilis*, se realizó siguiendo el mismo protocolo pero el buffer 1 contiene 2mM Sacarosa

Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN se realizaron con enzimas de restricción según las recomendaciones del fabricante (Promega y Biolabs)

Purificación y recuperación de ADN

Se utilizaron los *kits* comerciales de Sigma (GenElute PCR Clean-up kit y GenElute Gel Extraction kit) para la purificación de fragmentos de ADN tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones o en geles de agarosa, así como también para la purificación de los fragmentos amplificados por PCR.

Reacciones de ligado

Se utilizó la enzima T4 ADN ligasa de Promega. La relación de extremos moleculares (ADN inserto/ADN vector) fue de 3:1. La reacción se llevó a cabo de 16 a 18 hs a 16°C.

Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook *et al.*, 1989. La concentración de los geles de agarosa varió entre 1% y 1.5 %, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE a 100 V en cubas de Bio-

Rad. Como marcadores de peso molecular se utilizó ADN del fago λ digerido con *HindIII* (NEB), la escalera de 1 kb de Fermentas.

Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) durante 15 minutos. El ADN se visualizó con un transiluminador de luz UV.

Extracción de ADN cromosómico de *Lactobacillus*

Se recogieron por centrifugación las células de 10 ml de un cultivo en fase exponencial en MRS y se lavaron con 10 ml de EDTA 50 mM.

El pellet se resuspendió en 600 μl de Tris HCl 50 mM, EDTA 20 mM con 5mg/ml de lisozima y 30 U de mutanolisina y se incubó 2 hs. a 37°C.

Luego se agregó RNAsa 0,1mg/ml y proteínasa K 0,2 mg/ml.

Las células se lisaron añadiendo Sarkosyl hasta una concentración final del 1% y se incubaron durante 2 hs. a 50 °C o 16 hs. a 42 °C.

Se realizaron 2 extracciones con fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y otras 2 extracciones con cloroformo/isoamílico (24:1).

Los ácidos nucleicos se precipitaron con 2 vol de etanol o 0,6 vol de isopropanol (dependiendo del volumen final alcanzado) a -20 °C.

Cuando se realizó la precipitación, el ADN se recuperó por centrifugación, se lavó con etanol frío al 50% se secó y se resuspendió en 50 μl de TE y se guardó a 4 °C.

Manipulación de DNA

Los procedimientos de manipulación de DNA, tales como transformación de *E.coli* JM109 , clonado en plásmidos TOPO y reacciones de PCR fueron realizados como esta descrito por Maniatis *et al* en 1982

También se clonó en el vector de expresión pHCMC un fragmento de 989 pares de bases para la transformación de *B.subtilis*.

La secuencia del gen *slpA* de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Accesion number: X89375; Boot *eta.* 1995) fue amplificado con primers específicos y clonado en el vector TOPO. Luego el producto de PCR se envió a secuenciar al servicio de secuenciación de la Facultad de Ciencias Exactas.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las condiciones de reacción para un volumen de muestra de 50µl fueron:

Buffer de GoTaq ADN Polimerasa (Promega) 1X, MgCl₂ 2,5mM, 1U GoTaq ADN Polimerasa (Promega), dNTPs 0,2 mM, 10-50 ng de ADN templado y 0,5µM de cada cebador ("primer").

Las temperaturas utilizadas para la reacción fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 10 min. a 94°C seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 94°C, 60 seg. a 50°C y 60 seg. a 72°C. Cuando fue necesario, la temperatura del paso de apareamiento del cebador ("annealing") fue modificada a la temperatura indicada para cada oligonucleótido y si los fragmentos eran mayores a 2,5Kpb se aumentó el tiempo del mismo a 90seg.

Cada reacción de PCR fue analizada por electroforesis en gel de agarosa 0,8% ó 1,5% en buffer TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1mM pH=8,0). Después de la tinción del gel con bromuro de etidio 1µg/ml. los geles fueron examinados con luz UV y fotografiados.

Sub-clonado del fragmento C-terminal de la proteína S-layer

Para el clonado del fragmento C-terminal de la proteína S-layer se diseñaron *primers* según la base de datos de nucleótidos secuenciados

para la proteína SA de *Lb. acidophilus* (Accession number X89375) los cuales se utilizaron para amplificar la porción del gen por PCR.

Se obtuvo un amplicón de 968 pb el cual fue clonado en el Vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y luego secuenciado; luego este fragmento se subclonó en el plásmido pHCMC05, el cual posee un promotor Pspac inducible por IPTG, Este se usó para transformar *Bacillus Subtilis* 168.

Para la expresión heteróloga de la proteínas S-layer, las células fueron inducidas con 0.5 mM IPTG. El análisis de la expresión se realizó por zymograma y Western blot, confirmando la actividad.

Extracción de ARN de *Lactobacillus*

Debido a la presencia de las proteínas S-layer en la capa externa las células recibieron un tratamiento previo el cual consistió en resuspender los pellets de 40 ml de cultivo en Cili 5 M y se los mantuvo en hielo por 15 minutos, luego se centrifugó a 14000 rpm 20 minutos y se repitió el proceso. Luego se resuspendió el pellet en 500 µl de Tris 50mM EDTA 2 mM pH 8, acetato de amonio 0,2 M pH 4 (pH 7 final).

Se agregó 1 vol de fenol:cloroformo ácido precalentado a 70 °C. Se mezcló bien empleando un "vortex" y se calentó a la misma temperatura durante 5 min.

Se volvió a mezclar con "vortex" y se dejó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Se centrifugó 15 min a 13000 rpm a 4 °C.

Se tomó la fase acuosa y se precipitó el ARN con 1/10 de volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol. Se mantuvo a -20 °C al menos 2 horas.

Luego se agregó 5 µl de DNAsa (1U/µl) (Promega) y se incubó 30 min a 37 °C. y se realizó una nueva extracción con fenol:cloroformo a temperatura ambiente se volvió a tomar la fase acuosa y se precipitó el ARN con 1/10 de volumen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol. Se mantuvo a -20 °C al menos 2 horas.

Se centrifugó durante 15 min. a 13000 rpm a 4 °C, el pellet se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 50 µl de agua DEPC.

La ausencia de ADN en las muestras se corroboró empleando la muestra como templado en una reacción de PCR.

Todas las soluciones que se emplearon en el protocolo de extracción fueron libres de RNAsa (Ambión).

Síntesis ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizaron primers específicos (detallados en la tabla de oligonucleotidos) y una mezcla de dNTP.

En un tubo eppendorf de 0.2 ml se mezcló 10 µg de ARN total con 6 µg de la mezcla de primers, en un volumen final de 15.5 µl. Se incubó a 90°C durante 10 min., y se enfrió en hielo durante 2 min.

Para la síntesis del ADNc se utiliza la enzima M-MLV Transcriptasa reversa de Promega durante 1 hora a 42 oC y por último 10 min a 92 oC.

RT-PCR semicuantitativa

Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de ARNm, se calculó el número de ciclos necesarios para alcanzar la fase exponencial de amplificación. En esa fase, la cantidad de amplicones es proporcional a la cantidad inicial de templado. Para ello se realizaron reacciones de PCR entre 16 y 30 ciclos usando una cantidad fija de ADNc de *SlpA* y.

El número de ciclos para *slpA* fue, 22 ciclos secuenciales a 95°C por 30 seg, 52°C por 1min y 72°C 1 min y para el ARNr 16s, 12 ciclos a 95°C por 30 seg, 50°C por 1 min y 72°C 1 min. En la PCR se emplearon, 3 µl de ADNc sin diluir, diluido 1/5 y 1/25 en agua.

15 µl de los productos de PCR de *slpA* y el ARNr 16s se sembraron en un gel de agarosa 2% y se tiñeron con bromuro de etidio 1 µg/ml. En todos los casos se realizó un control de ausencia de ADN en las muestras de ARN utilizando esas muestras como templado en la reacción de PCR. El

análisis densitométrico se realizó empleando el Fuji LAS 1000 y el programa Image Gauge.

Manipulación de proteínas

Aislamiento y purificación de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*

Las proteínas S-layer fueron purificadas en monómeros empleando 6M LiCl como agente desnaturalizante o desagregante. Se incubó con este por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos para bajar las células. Al sobrenadante se le realizó una diálisis (24-36 hs) contra agua destilada, la proteína se liofilizó y almacenó a -20°C .

Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método de Bradford siguiendo el *kit* comercial Bio-Rad. Se utilizó albúmina cristalina de suero bovino como estándar.

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

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una cuba electroforética Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra Cell de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970), utilizando un gel de corrida al 10% y un gel concentrador al 4,5%. Las soluciones madres se describen en el anexo, así como el *buffer* de corrida. Las electroforesis se llevaron a cabo a amperaje constante de 25 mA hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, para luego aumentarse a 30 mA.

Tinción de geles de poliacrilamida con Coomassie Blue R-250.

Los geles se tiñeron en una solución de 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético.

Zymogramas

Los Zymogramas se realizaron según Kakikawa *et al*, en 2002, un gel de poliacridamida 10%conteniendo 2% del sustrato (en este caso pared de *Salmonella* Newport la cual es el blanco de la acción) y 0,01% de SDS, enzimática, se corrió en una cuba electroforética a 25 mA como un gel regular. Luego de la electroforesis el gel es lavado con agua destilada y sumergido en buffer renaturalizante (10mM fosfato de sodio pH6; triton X100 1%) a 37 ° ON.

Luego el gel renaturalizado es teñido con 0.1% de azul de metileno y 0.01% Hidróxido de Potasio para luego desteñirlo con varios lavados de agua destilada.

Las zonas donde ocurrió la lisis de la pared no son teñidas quedando una banda transparente.

Ensayos de lisis en buffer

Los ensayos de lisis en buffer 10mM tris pH 7 se realizaron con pared de *Salmonella* Newport y con células enteras cosechadas en fase exponencial tardía estas se incubaron con diferentes concentración de proteínas S-layer y se midió DO a diferentes tiempo.

Obtención y titulación del antisuero de ratón anti-S-layer

Obtención del antisuero

Para fabricar el antisuero se utilizaron 3 hembras de ratón de la cepa CF1 que fueron inmunizadas vía intraperitoneal con dosis de 25 µg de la proteína S-layer purificada, que se administró emulsionada con adyuvante de Freund. Dos de los ratones se inmunizaron con 4 dosis, con intervalos de una semana. La tercera hembra se inmunizó con 2 dosis, con intervalos de 20 días. Cada antisuero fue titulado por separado como se describe a continuación.

Titulación de la concentración de antisuero anti-S-layer a utilizar en la técnica de Inmunoblot

El antisuero se tituló mediante la técnica de *Inmunoblot* utilizando 30 µg de proteínas totales transferidas a la membrana de PVDF

Los tres antisueros de ratón anti-S-layer se juntaron y se mezclaron alternativamente, probándose diversas diluciones de cada uno individualmente y de las mezclas, para ver cual daba mejor señal con el menor inespecífico

Western Blot

Luego de correr los geles de poliacrilamida, estos fueron transferidos a membranas de PVDF (Macherey-Nagel, Germany). Las muestras se electro-transferieron en un ECL-semi dry Blatter (Amersham) por 1 hora.

Luego se bloqueó la membrana con 20 ml de Buffer de bloqueo ON a 4°C. Luego de tres lavados con buffer de lavado se incubó con el primer anticuerpo policlonal, este fue usado en una dilución 1:1000 y se incubó con la membrana durante 90 minutos, luego se realizaron cinco lavados de cinco minutos con buffer de lavado y se colocó el segundo anticuerpo el cual esta conjugado con biotina y es anti IgG de ratón fue incubado con la membrana por 60 minutos.

La reacción de quimioluminiscencia fue detectada usando CDP-Star (GE-Biosciences).

Ensayos con Bacteriocina

Preparación de Nisina

Las Nisina utilizada (Sigma.-Aldrich) fue preparada a una concentración 2,5 % balanceada con cloruro de sodio y sólidos de leche desnaturalizados. El antibiótico posee un potencia de 1000000 IU/g y fue diluido en ácido clorhídrico 0,02 M y llevada a una concentración de 16000 UI/ml las cuales equivalen a 0,4 mg/ml de Nisina pura.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima

La CIM de Nisina y Nisina combinada con la proteína S-layer fue determinada para *Bacillus cereus* y *Salmonella enterica* serovar Newport y *Staphylococcus aureus*.

Se realizaron cultivos de 2 ml de volumen final de LB para *Salmonella* y *B. cereus* y de BHI para *Staphylococcus* y fueron incubados a 37 °C por 16 horas con concentraciones crecientes de antibiótico.

Después de la incubación se midió la DO 600 nm de cada uno de los tubos y se relativizaron a su correspondiente de concentración cero de antibiótico.

Las CIMs se calcularon a partir de gráficos de DO relativa en función de la concentración de antibiótico.

Efecto antibacteriano de Nisina y de S-layer

Para determinar el efecto que posee la Nisina y de la S-layer cada una por separado o en combinación sobre las cepas de *Salmonella* Newport, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, las células de estas

especies fueron propagadas a 37°C por 16 horas, de estos cultivos se tomaron 500ul y fueron agregados a 5 ml de medio fresco. Este medio contenía 100ug de S-layer, La mitad de la CIM calculada de Nisina (la CIM de cada microorganismo según correspondía) y la combinación de ambas. El crecimiento fue monitoreado cada hora, y fue medido por densidad óptica a 600nm

Recuento de células viables luego del tratamiento con Nisina, S-layer o la combinación de ambas

Para la determinación de efecto bactericida de la Nisina, de la proteína S-layer o de la combinación de ambas, se expuso a las tres cepas elegidas con uno de los agentes o con ambos, para luego realizar un recuento de células viables. Dicho recuento se hizo a las 2 horas de incubación y a las 4 horas y a las 6 horas. El recuento se realizó en placas de petri conteniendo medio LB agar y sembrando 0,1 ml de la dilución adecuada para cada ensayo. Este ensayo se realizó por triplicado

Ensayos sobre Pared Celular

Purificación extractos de peptidoglicano

Para la obtención de fracciones de pared celular suficientemente pura a fin de realizar zimogramas y análisis de sensibilidad de la pared a la S-layer se siguió el protocolo de extracción alcalina descrito por Bousfield *et al* en 1985.

Células del microorganismo blanco (*Salmonella* Newport, *Bacillus cereus*) fueron crecidas en el medio apropiado. Las células fueron cosechadas y luego lavadas en buffer fosfato 0.1M luego de la centrifugación los pellets celulares fueron resuspendidos en 3 ml de KOH 0.6M y autoclavados a 0.5atm por 5 minutos; se realizó luego un enfriado

rápido en hielo y se neutralizó con 8ml de HCl 2N. Se centrifugó por 30 minutos a 3000g obteniéndose un pellet de pared celular el cual fue lavado dos veces con agua destilada y almacenados a -20°C.

Cromatografía en capa delgada

Para caracterizar la composición de azúcares de la pared celular se siguió el protocolo descrito en Kachlany *et al* en 2001. Muestras de 5mg pared celular de *Salmonella* Newport que fueron incubadas con proteína S-layer. Luego de esto las muestras se liofilizaron y se suspendieron en solución de marcación (ver anexo) y se incubó por 20 horas a 32 °C. Luego se agregó 0,05ml de HCl concentrado y se extrajo tres veces con éter etílico (conservando la fase acuosa). Se dejó evaporar el solvente y el sólido remanente se resuspendió en 0,2 ml de HCl 6 N y se llevó a cabo la hidrólisis ácida a 100 °C por 20 horas. Luego de la evaporación del ácido las muestras se resuspendieron en 0,02 ml de NH₃ 50 mM.

Al mismo tiempo se llevó a cabo de forma análoga la marcación de los patrones de aminoácidos, con una concentración de 2 mg/ ml

Un volumen de 5 µl de la muestra fue sembrado sobre una placa de sílica gel 60 (Merck) para TLC. La placa fue desarrollada en el sistema de solventes compuesto por butanol: ácido acético: agua (3:1:1) para ser visualizados por fluorescencia.

Análisis FACE

Se analizó el contenido de carbohidratos de la pared celular de *Salmonella* Newport luego del tratamiento con la proteína S-layer empleando Fluorescence-assisted carbohydrate Electrophoresis (FACE) utilizado según lo descrito (Jackson *et al*, 1994).

La derivatización con el ácido 8-Aminonaphthaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS, Molecular Probes) fue realizada según Jackson (1994) en los tubos

que contenían pared celular liofilizada. Los azúcares derivatizados fueron disueltos en 50µl del glicerol al 5% (w/v) y almacenadas -20 °C antes de ser separadas en gel de poliacrilamida del 16cmx16cm el 30% (w/v) y 0,8% (w/v) N, N-methylenebisacrilamida con un gel stacking (1,5 centímetros) de poliacrilamida del 8% (w/v) y 0,2% (w/v) N, methylenebisacrilamida. Corrido en 0,1 M Tris -ácido bórico ajustado a pH 8,2. Los patrones de azucares hidrolizado (2M HCl 100°C 2 h) derivatizados con ANTS fueron utilizados como marcadores de corrida. Las muestras fueron sometidas a la electroforesis, inicialmente en 250 V por 30 minutos y luego 500 V por 60 minutos en frío. Para visualizar geles, se uso el analizador de imagen CCD Fuji LAS1000 y software, (Fuji Film, Japón). El tiempo de exposición fue optimizado para aumentar la sensibilidad sin la saturación de las bandas intensas. La intensidad de la fluorescencia se calculó para cada carril con el software Image Gauge 3,122 y Rf (relación de frente)

Ensayos de estrés osmótico

Ensayos de Osmorresistencia

Lactobacillus acidophilus fueron crecidas en medio líquido MRS con concentraciones crecientes de NaCl (0; 0.5 y 0.7 M). Luego se incubaron a 37°C, y se monitoreo su crecimiento por D.O a 600nm

Osmorresistencia y S-layer

Se investigó el rol de de la proteína S-layer de *Lb. acidophilus* en el crecimiento de las células en altas concentraciones de NaCl, para esto se midió el crecimiento de las bacterias con tratamiento de CLi, que deja a la célula sin S-layer, o sin ningún tratamiento. Luego de esto se

midió el crecimiento por densidad óptica en medio MRS control o con concentraciones de NaCl 0,5M y 0,7 M

Expresión de la proteína en estrés osmótico

Lactobacillus acidophilus se crecen en condición de estrés osmótico agregando NaCl a concentraciones finales 0,5 y 0,7 M

Para evaluar cuantitativamente la producción de S-layer en cada condición de crecimiento, se analizan células enteras liofilizadas y fraccionadas en alícuotas de igual masa de peso seco, que se siembran previo hervor en buffer Laemmli 1970 en SDS-PAGE. Las S-layer se revelan en el Western blot con los antisueros mencionados revelando con un segundo anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina y sustrato CDP-star (Amersham Biosciences) que produce quimioluminiscencia. Las bandas visualizadas se analizan por densitometría empleando el equipo y software Fuji LAS1000.

Real Time PCR

Para el protocolo de PCR en tiempo real (Real time PCR) se realizó la extracción de ARN de *Lactobacillus* según lo anteriormente descrito.

Una vez obtenido el ARN en fase exponencial de las bacterias crecidas en diferentes condiciones, se sintetizó el ADNc (ADN copia) con la enzima retro-transcriptasa reversa, esto se hizo con un primer específico de los genes que se deseaba cuantificar.

Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de ARNm, se realizó la reacción de PCR desde el ADNc con un volumen de 25 µl, en presencia de Sybr Green (Stratagene) como fluoroforo intercalante y se emplearon *primers* diseñados especialmente para utilizar en un ciclador

Real Time. Las características en el diseño de los *primers* es tal que el producto amplificado es de entre 150 a 300 nt desde la secuencia génica y cercano al inicio de transcripción del gen y se realizó con el software Beacon Designer.

El programa utilizado para la PCR en tiempo real fue el siguiente:

1 ciclo: 10 min 95°C

40 ciclos: 15 sec 95°C

1 min 50°C

Lectura

Los cálculos iniciales del número de copias de ARNm en cada muestra se hicieron en base al método C_T ("cycle threshold", o ciclo umbral). El C_T es el número de ciclos mínimos de PCR (amplificaciones) necesarias para que el producto de la amplificación sea detectado por el equipo. Es decir, que a menor valor de C_T , mayor es la concentración de sustrato original en la muestra con el que se inicia la reacción. Los valores de C_T fueron normalizados empleando la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S como control interno (denominado gen house keeping o mantenimiento). Se realizó un análisis de disociación de los productos de PCR para confirmar la especificidad de la reacción.

El C_T de cada muestra fue calculado en el límite fluorescencia (R_n) determinado automáticamente al utilizar el 5.700 SDS software (PerkinElmer). Para ambos pares de *primers* la linealidad de la señal de fluorescencia de la amplificación fue determinada por un amplio rango de diluciones seriadas del ADNc de referencia que cubre el rango de concentraciones en el cual se espera encontrar la muestra. Se encontró una clara correlación entre la cantidad de ADNc y el C_T por lo menos por la duración de 40 ciclos de RT-PCR. La expresión del el gen blanco *slpA* se normalizó contra la expresión del gen control ARNr 16S. Los resultados se expresan como cantidades relativas (QR) para comparar entre las distintas muestras. Las UA (unidades arbitrarias) se definen como los niveles de expresión relativos de las células tratadas (en

nuestro caso, crecidas en alta sal) respecto al de las células control (crecidas en MRS). El análisis de datos contempla las siguientes ecuaciones que permiten establecer la cantidad relativa (QR) del gen de interés.

C_T : n ciclos de PCR

ΔC_T : es la diferencia entre el promedio de los valores de C_T de las muestras de interés (*slpA*) y los valores de C_T de los controles internos (ARNr 16S) ($\Delta C_T = C_T \text{slpA} - C_T \text{16S}$)

$\Delta\Delta C_T$: es la diferencia entre los promedios de ΔC_T para el gen de interés entre la condición control (células crecidas en MRS) y el promedio de los valores C_T de cada muestra tratada (células crecidas con NaCl) ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{sla de células controles} - \Delta C_T \text{NP de células crecidas en NaCl}$)

QR (cantidad relativa): $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Anexo: Materiales y Métodos

Buffers y soluciones utilizadas para manipulación de proteínas

SDS PAGE (Laemmli, 1970)

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml)

Acrilamida	146 g
N, N'-Metilen-bisacrilamida	4 g

Buffer gel separador (4X, para 500 ml)

Tris base	90, 83 g
SDS	2 g

Se lleva a pH 8,8 con HCl

Buffer gel concentrador (4X, para 500 ml)

Tris base	30, 23 g
SDS	2 g

Se lleva a pH 6,8 con HCl

Gel separador (10%) (para 25 ml)

Buffer gel separador 4X	6,25 ml
Solución de acrilamida: bisacrilamida	8,35 ml
Persulfato de amonio 10%	0,130 ml
TEMED	0,014 ml
Agua deionizada	10, 5 ml

Gel concentrador (5%) (para 10 ml)

Buffer gel concentrador 4X	2,5 ml
Solución de acrilamida: bisacrilamida	1,7 ml
Persulfato de amonio 10%	0,04 ml
TEMED	0,02 ml
Agua deionizada	5,8 ml

Buffer de corrida (por litro)

Tris base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g

Buffer Tris-Borato (10Xpor litro)

Tris Base.....	72,6 g
Acido Bórico.....	60 g

Buffer de siembra (4X, para 10 ml)

Tris 0, 25M, pH 6,8	5 ml
SDS	0,6 g
sacarosa	4 g
Azul de bromofenol	0,004 g
2-mercaptoetanol	2 ml

Buffer de transferencia a membranas PVDF(por litro)

Tris base	5.8 g
Glicina	2.88 g
SDS	0.37 g
Metanol.....	200 ml

Buffers utilizados para la manipulación de ADN**Extracción rápida de ADN plasmídico** (Birnboim y Doly, 1979)**Buffer 1**

Tris · Cl 25 mM, pH 8,0
EDTA 10 mM
glucosa 50 mM
RNasa A 100 µg/ml

Buffer 2

NaOH 200 mM

SDS 1%

Buffer 3

Acetato de potasio 3.0 M, pH 5,5

Corrida de geles de agarosa

TAE 50X (por 1 litro) (Sambrook *et al.*, 1989)

Tris base 242 g

Acido acético glacial 57, 1ml

EDTA 0,5 M pH 8,0..... 100 ml

Buffer de siembra 6X (por 100 ml) (Sambrook *et al.*, 1989)

Azul de bromofenol 0,25 g

Sacarosa 40 g

Buffers utilizados para la preparación de *E. coli* competentes

Buffer de transformación I (TFBI)

Acetato de potasio 30 mM

MnCl₂ 50 mM

KCl 100 mM

CaCl₂ 10 mM

glicerol 15%

Se esterilizó por filtración.

Buffer de transformación II (TFBII)

MOPS-Na pH 7,0 10 mM

CaCl₂ 7,5 mM

KCl 10 mM

glicerol 15%

Se ajustó a pH 6,1 con KOH y se esterilizó por filtración.

Buffer utilizados para Western Blot

PBS 10X

0,58 M Na₂HPO₄.....8,23 gs

0,17 M NaH₂PO₄.....2,35 gs

0,68 M NaCl4 gs

Llevar c/H₂O dd a 100 mL

Buffer de Lavado

1X PBS10 mL 10X

0,05 % Tween 20 0,05 mL

Llevar c/H₂O dd a 100 mL

Buffer de Bloqueo

1X PBS10 mL 10X

5% Leche Molico.....5 gs

0,05% Tween 20 0,05 mL

Llevar c/H₂O dd a 100 mL

Buffer de Incubación

1X PBS.....1 mL 10X

0,5 % BSA0,05 gs

0,05% Tween 20..... 0,005 mL

Llevar c/H₂O dd a 10 mL

Buffer de Ensayo 10X

200 mM Tris (pH 9,8)

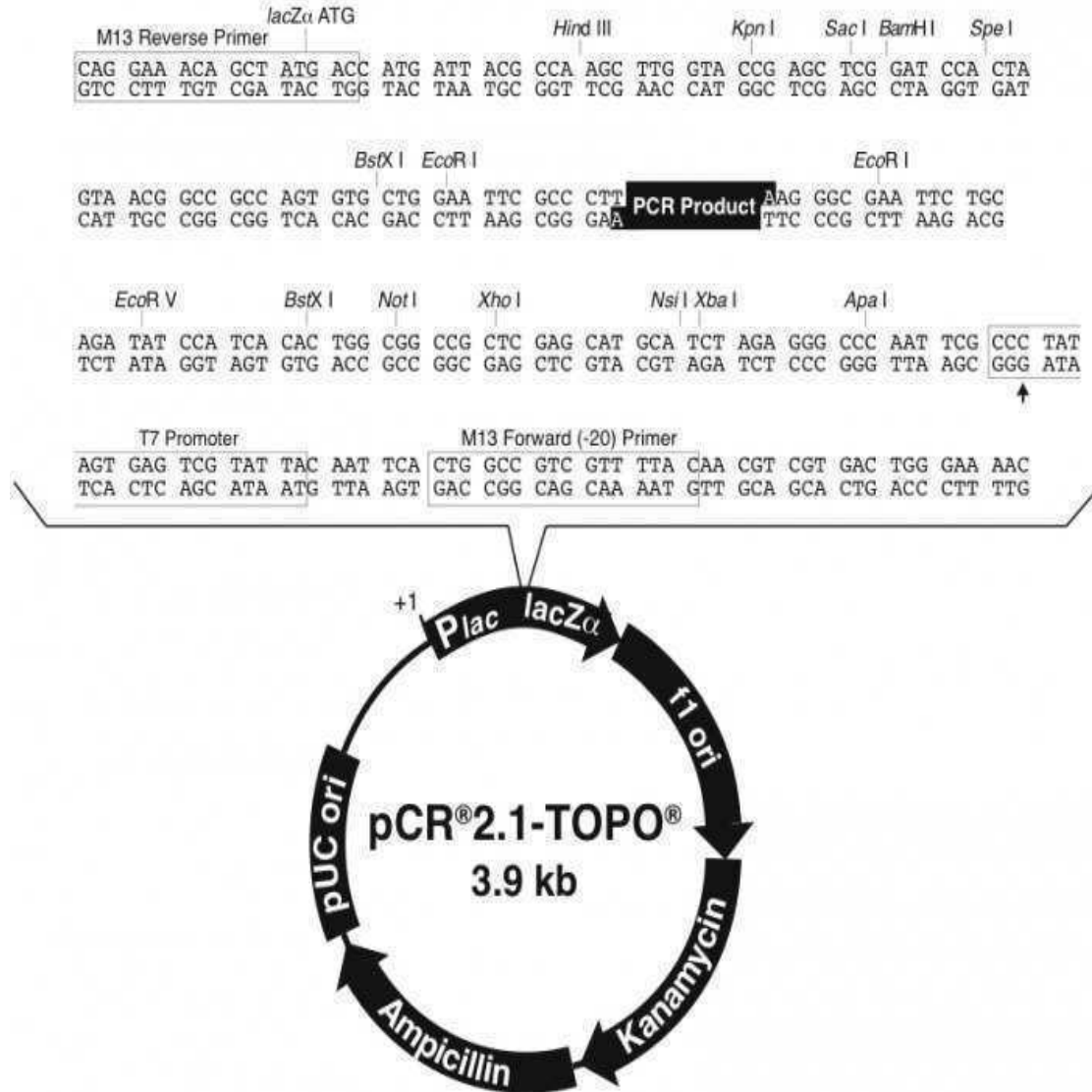
10 mM MgCl₂

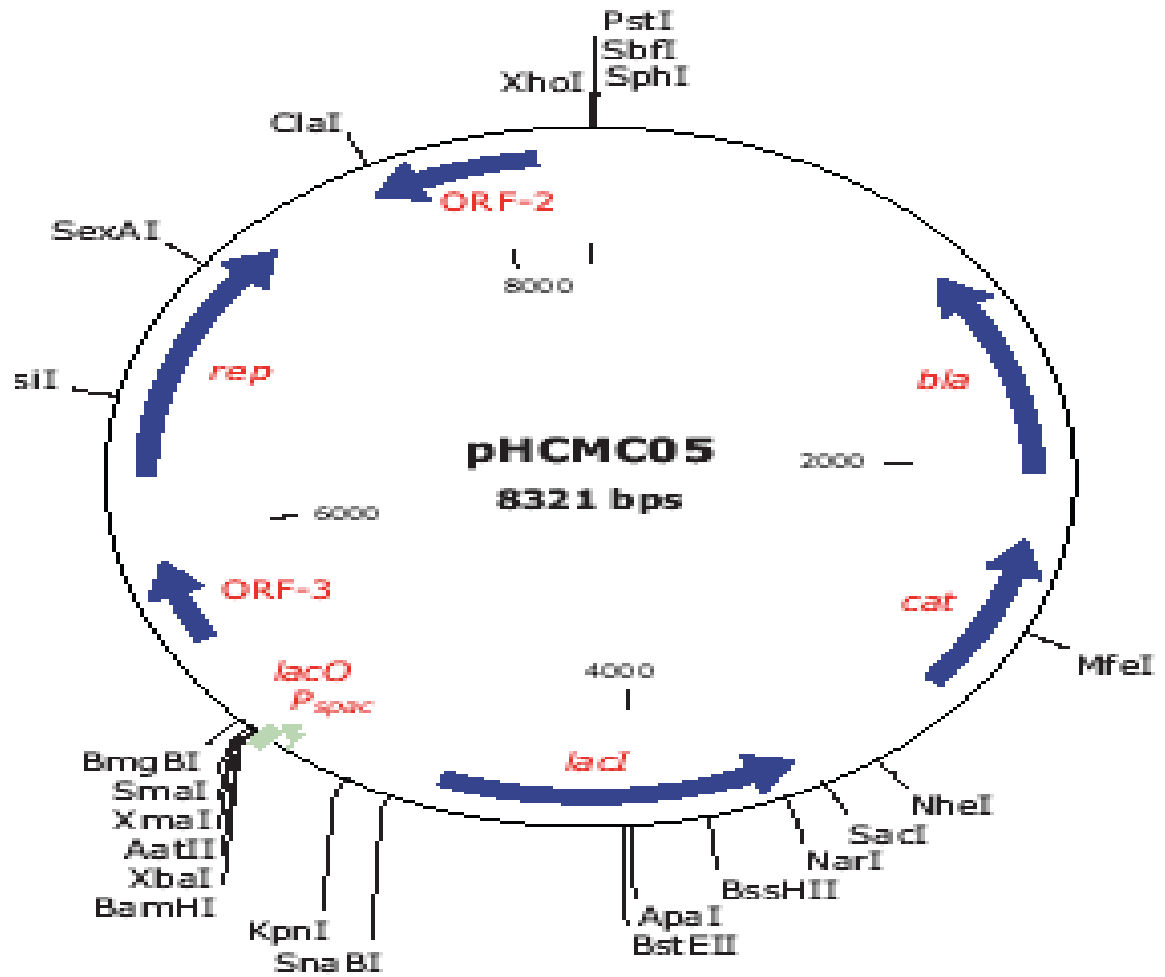
Buffer de Marcación

Na₂B₄O₇ (BORAX) 4%

2,4-dinitrofluorobenzeno (DNFB) en etanol 0,5%

Plasmidos utilizados





RESULTADOS

**RESULTADOS Capítulo 1:
“Estructura y
purificación de la
proteína S-layer”**

Muchas especies de *Lactobacillus* poseen S-layer en sus envolturas más externas como se observa en la Figura 9. Para esta tesis hemos elegido estudiar y caracterizar la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*. Hemos elegido a este microorganismo debido a su status GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros), a las características probióticas que se le adjudican y a su gran importancia en la industria alimentaria.

Lactobacillus acidophilus

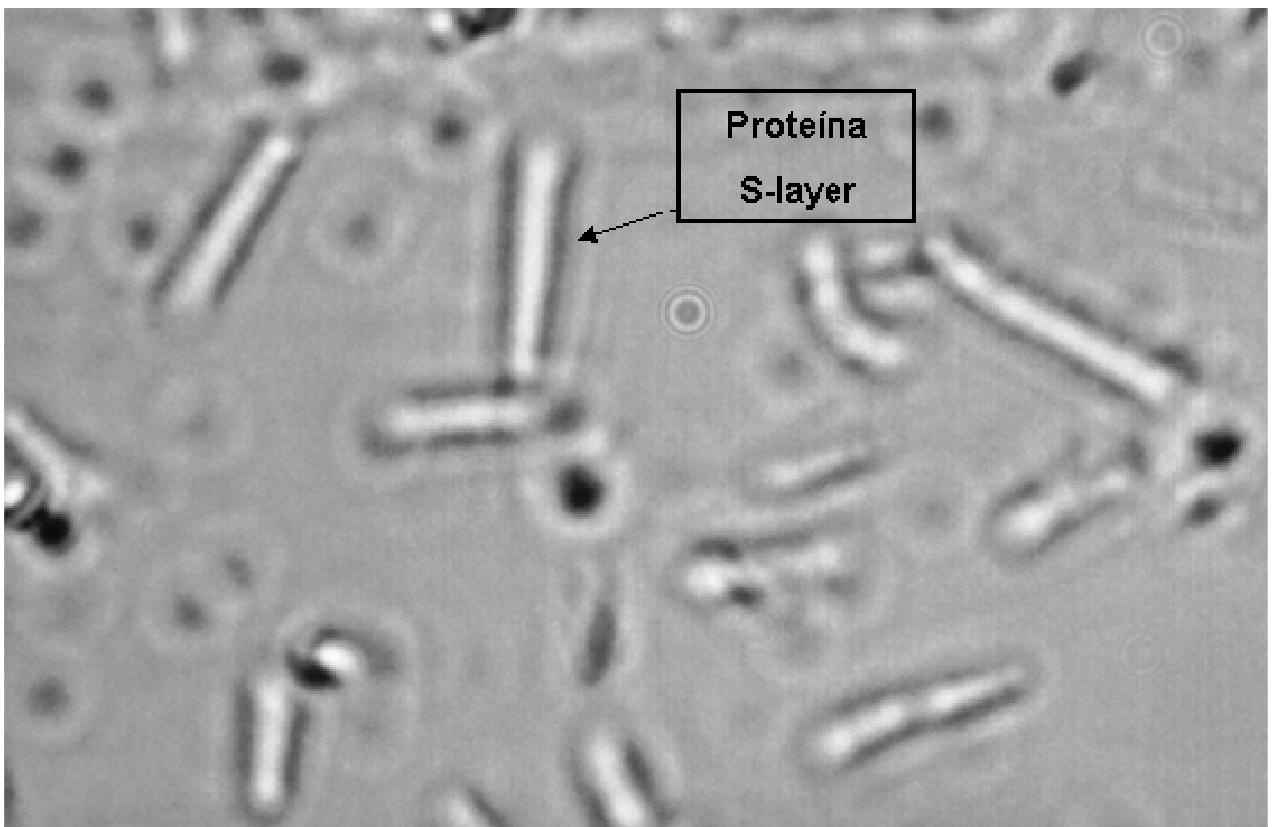


Figura 9: Microscopia de *Lb. acidophilus* donde se puede observar la proteína S-layer en su envoltura mas externa

Para comenzar a caracterizar la proteína se puso a punto una técnica de purificación de la misma y un método de identificación, para lo cual fue necesaria la preparación de un anticuerpo. También se analizó la secuencia de nucleótidos para realizar un análisis de la misma. Así como también se analizó a la secuencia de aminoácidos.

Purificación

La proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* tiene un peso molecular de 45 KiloDalton, esta puede purificarse de un cultivo de células mediante algún agente desagregante. Los agentes utilizados fueron EDTA, Cloruro de Guanidino y Cloruro de Litio.

Todos estos agentes funcionaron al momento de purificar la proteína (Figura 10) lo cual fue verificado por SDS-PAGE. Pero fue el Cloruro de litio el que tuvo el mayor rendimiento de extracción y la menor cantidad de impurezas comparado con EDTA y Cloruro de Guanidino a pH 2 y 5.

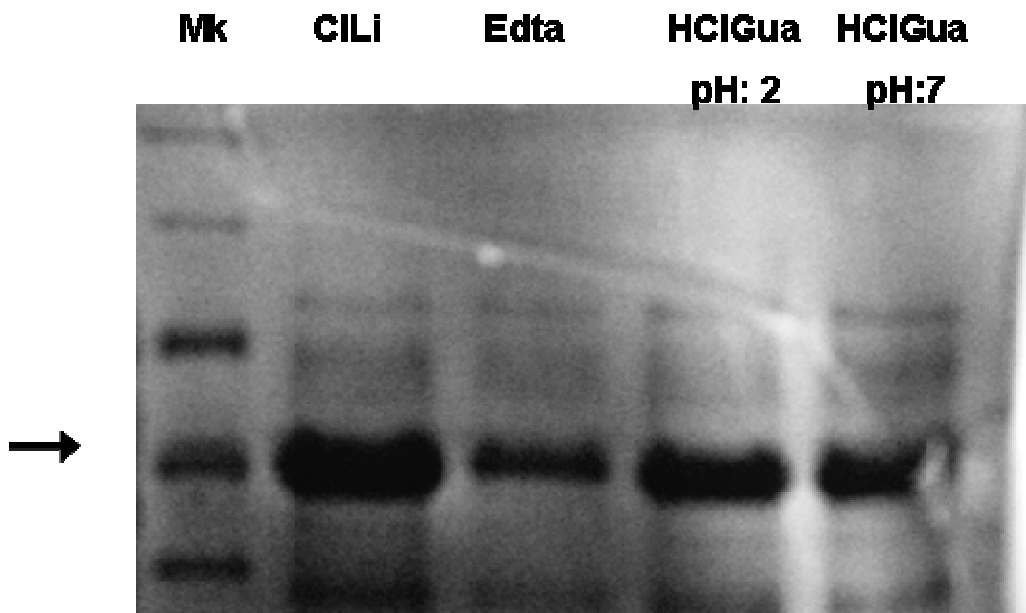


Figura 10: SDS-PAGE de los diferentes tratamientos para la purificación de la S-layer

Luego de la purificación de la proteína, esta se empleó para preparar anticuerpos para los ensayos en Western Blot. Con este fin se inmunizaron conejos y ratones para la obtención del anticuerpo.

Los experimentos realizados en conejos no lograron la generación del anticuerpo requerido, esto se debió probablemente a que el *Lactobacillus* es flora intestinal normal de estos quienes la adquieren en los primeros días de vida.

Fue por esto que los anticuerpos fueron generados en un sistema murino.

Luego de la obtención del anticuerpo policlonal en ratón, se procedió a realizar una titulación con la cual se obtuvo la dilución de anticuerpo que se debió usar en el western (Figura 11), el cual correspondió con el peso de la banda indicada.

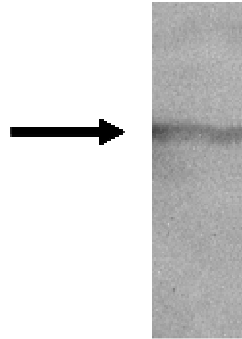


Figura 11: Western blot con el anticuerpo anti S-layer generado en ratón

Análisis de secuencia nucleotídica

Se analizó la secuencia nucleotídica para realizar experimentos de clonación de genes. Se buscó el gen *slpA* de *Lb. acidophilus* en la base de datos del NCBI (ACCESSION X89375) y se examinó la secuencia de nucleótidos (Figura 12), esto se realizó para generar distintos primer los cuales amplificarían diferentes regiones del gen. Esto se hizo con el objetivo de clonar los genes para eventualmente expresar la proteína en un sistema heterólogo

Luego de la amplificación de todos los fragmentos del gen por PCR, así como también el gen entero, estos fueron secuenciados para corroborar su identidad. Todos dieron homología del 99,9 % con respecto a la base de datos

Los fragmentos internos generados amplificaban:

- La zona N-terminal
- La zona C-terminal
- La secuencia codificante completa

Todos pudieron ser amplificados y verificados por secuenciación.

Esto resultado de gran utilidad a la hora de clonar diferentes porciones de la proteína como se vera en los capítulos siguientes.

```

1  tgcttggtgg gtaagcggta ggtgaaatat tacaaatagt atttttcggg cattttaact
61  tgctatctct tgaagaggtt agtacaatat gaatcgtggt aagtaatagg acgtgcttca
121 ggcgtggtgc ctgtacgcat gctgattctt cagcaagact actacctcat gagagtata
181 gactcatgga tcttgctttg aagggttttg tacattatag gctcctatca catgctgaac
241 ctatggccta ttacatcttt ttatatctca aggaggaaaa gaccacatga agaaaaattt
301 aagaatcgtt agcgtgctg ctgctgcttt acttgctggt gctccagttg ctgcttctgc
361 tgtatctact gttagcgtg ctactactat taacgcaagt tcatcagcaa tcaataccaa
421 cactaatgct aagtacgatg ttgatgtaac tcctagtgtt tctgcagttg ctgcaaatac
481 tgctaacaac actccagcta ttgccggtaa ccttactggt actatctcag caagttacaa
541 tggaagact tatactgcta acttaaaggc agatactgaa aatgccacta ttactgctgc
601 tggtagcact actgocggtt aacctgctga attagctgca ggtgtggctt acactgtaac
661 tgtaaacgat gtttcattta acttcgggtt agaaaatgca ggtaagactg ttacccttgg
721 ttcagctaac tcaaatgtaa aattcaccgg tacaaacagt gataatcaaa ctgaaactaa
781 tgtttctact ttgaaagtta agttagacca aaacggtggt gcttcactta ctaatgtttc
841 aattgcaaac gtatacgtca ttaacactac tgataacagt aacgtaaact tctacgacgt
901 aactagtgtt gctactgtaa ctaacgggtc cgtttcagtt aatgctgata accaagggtc
961 agttaatggt gcaaacgtag ttgcagcaat taattcaaaa tactttgcag cacaatacgc
1021 agataagaag ttaaatactc gtactgctaa tactgaagat gctattaagg cagccttaaa
1081 ggacccaaaag attgatgtaa actcagtagg ttacttcaaa gcacctcata ctttactgtt
1141 taacgtttaa gcaacttcaa ataactaatg taagtacgtt actttgcccag tagttgttac
1201 tgttcctaag gttgctgagc caactgtagc cagcgtaacg aagagaatta tgcacaacgc
1261 atactactac gacaaggacg ctaagcgtgt tggtagctac agcgttaagc gttacaactc
1321 agtaagcgtt ttgccaacaa ctactactat caacggtaag acttactacc aagtagttga
1381 aaacggtaag gctggtgaca agtacatcaa cgctgcaaac atcgatggtt ctaagcgtac
1441 tttgaagcac aacgcttacg tttacgcctc atcaaagaag cgtgctaaca aggttgattt
1501 gaagaagggt gaagttgtaa ctacttacgg tgcttcatac acattcaaga acggccaaaa
1561 gtactacaag atcggtgaca acactgacaa gacttacggt aaggttgcaa actttagata
1621 ataagtcgta gcaactaacg taacaaaatg aaaaaggcag agcgaagctt ctgtcttttt
1681 ttgtgtttta aatttttatt tcacttctaa acatacagtt ctaataggtt cttctg

```

Figura 12: Secuencia de nucleótidos del gen *SlpA* de *Lactobacillus acidophilus*

Análisis de la secuencia de aminoácidos

Una vez confirmada la secuencia, se analizó la secuencia de aminoácidos (Figura 13). Con esta pudimos calcular el punto isoeléctrico de la proteína, el cual fue de 10,4, confirmando la basicidad de la proteína. En la tabla 1 se encuentra el porcentaje de cada aminoácido, en este se notó que aminoácidos básicos como la arginina se encuentran en un alto porcentaje en la proteína. Aminoácidos con grupos sulfhídricos como la cisteína no se encuentra presente en la proteína y la metionina en halla en menos del 0,5%.

Una de las características mas importantes en todo el grupo de S-layer, y se confirma en *Lactobacillus* es un alto porcentaje de grupos carboxilo u oxidrilo alineados, ya que la treonina también se encuentra en un alto porcentaje.

```
"MKKNLRIVSAAAAALLAVAPVAASAVSTVSAATTINASSSAINT
NTNAKYDVDVTPSVSAVAANTANNTPAIAGNLTGTISASYNGKTYTANLKADTENAT
ITAAGSTTAVKPAELAAGVAYTVTVNDVSNFNGSENAGKTVTLGSANSNVKFTGTNS
DNQTEETNVSTLKVKLDQNGVASLTNVS IANVYAINTTDNSNVNFYDVTSGATVTNGA
VSVNADNQGQVNVANVVAAINSKYFAAQYADKKNLNRTRANTEDAIKAALKDQKIDVN
SVGYFKAPHTFTVNVKATSNINGKSATLPVVVTVPNVAEPTVASVSKRIMHNAYYYD
KDAKRVGTDVSKRYNSVSVLPNTTTINGKTYQVVENGKAVDKYINAANIDGTRKRTL
KHNAVYVYASSKKRANKVVLKKGVEVTTYGASYTFKNGQKYYKIGDNTDKTYVKVANF
R"
```

Figura 13: secuencia de aminoácidos de la proteína S-layer

aminoácido	%	aminoácido	%
Ala	14,6	Leu	3,6
Arg	1,8	Lys	8,6
Asn	11,7	Met	0,5
Asp	4,5	Phe	2
Cys	0	Pro	2
Gln	1,8	Ser	7,9
Glu	1,8	Thr	12,2
Gly	5,2	Trp	0
His	0,7	Tyr	5,2
Ile	3,6	Val	12,4

Tabla1: Porcentaje de cada aminoácidos presente en la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*

Con la secuencia aminoacídica también fue posible realizar un perfil de hidrofobicidad de la proteína (Figura 14) este se calculó dándole cierto valor a los aminoácidos hidrofóbicos, los aminoácidos mas hidrofobicos tienen un valor positivo, mientras que los hidrofílicos, son negativos. Se observó en la figura 14 que la proteína tiene una mayor cantidad de aminoácidos hacia la parte positiva del cuadro, es decir hacia la parte hidrofóbica.

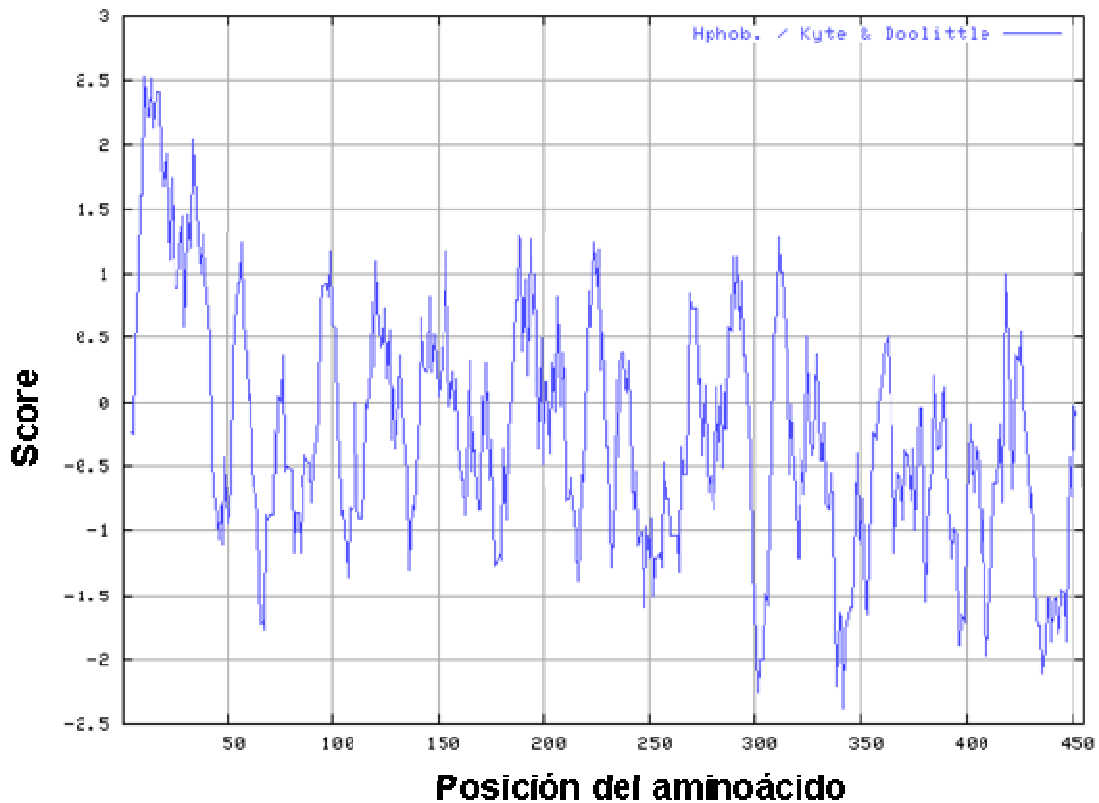


Figura 14: Perfil de hidrofobicidad de la proteína S-layer

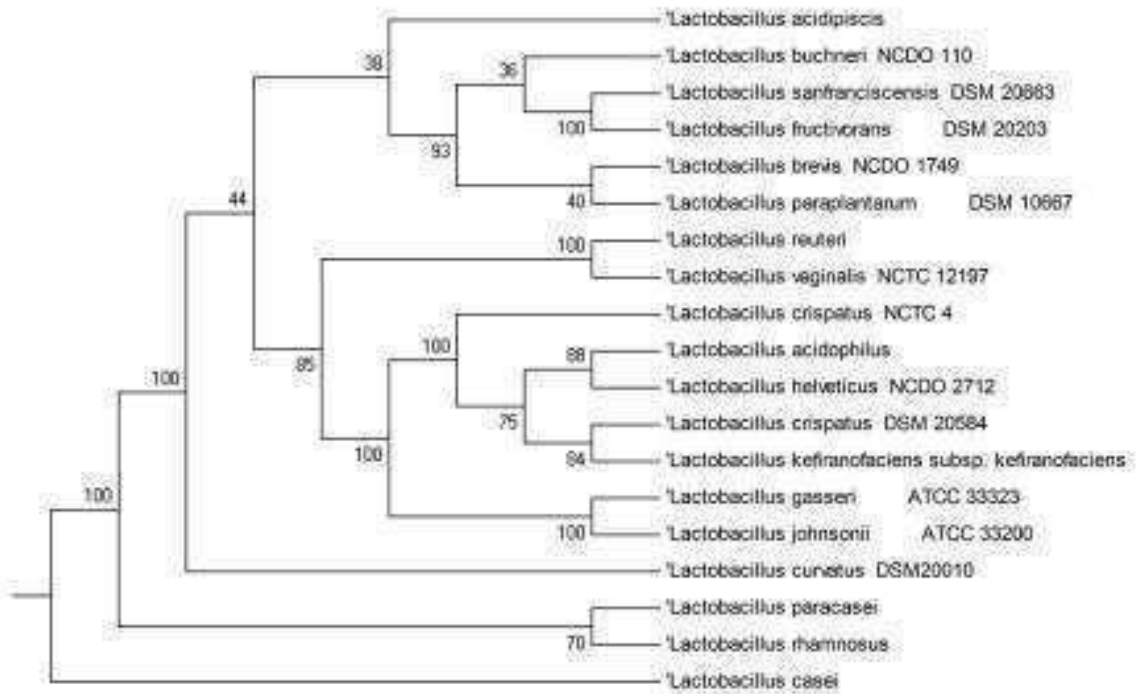
Análisis Filogenético

Se analizó la secuencia de el gen del *rARN 16S* para realizar un estudio filogenético de la especie *Lactobacillus acidophilus*, también se generó un árbol basado en la secuencia de la proteína S-layer (Figura 15) para esto se utilizo el programa MEGA.4 para realizar los alineamiento por ClustalW y los árboles se generaron usando el método del vecino mas cercano (Neighbour-joining)

De acuerdo con estos árboles los grupos que se obtienen cuando se estudia la proteína S-layer son los mismos que se obtiene con árboles basados en el gen del *rARN 16s* por un lado el grupo de *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii*. Luego vemos que en el grupo de *Lactobacillus acidophilus* se encuentran *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus helveticus*.

Según algunos autores (Palva et al, 2005) se inclinan a sugerir que la diferencia de estos análisis filogenéticos se debe a los diferentes hábitat de donde provienen estos lactobacilos, por un lado humano (*Lactobacillus acidophilus*), animal (*Lactobacillus crispatus*), plantas (*Lactobacillus brevis*) y productos lácteos (*Lactobacillus johnsonii*).

A)



B)

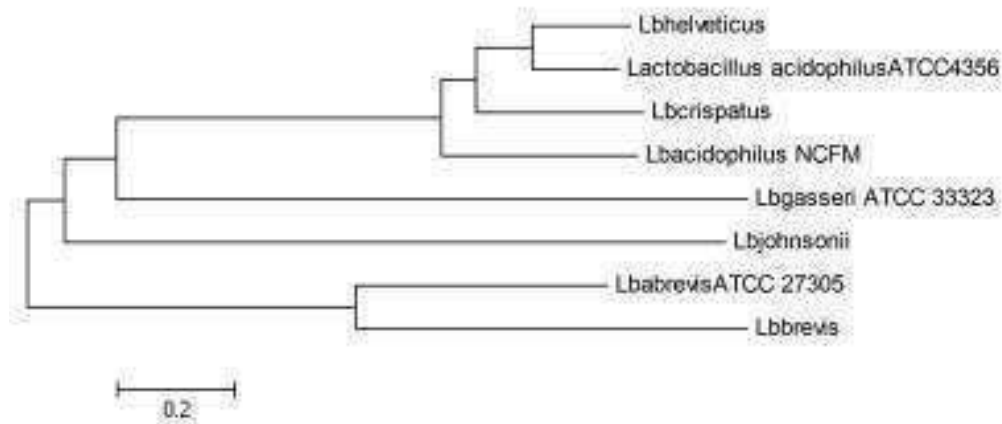


Figura 15: Árboles filogenéticos basados en el método del vecino mas cercano (NJ) A) Árbol del gen del rARN 16s y B) Árbol realizado con la secuencia de la proteína S-layer

Perfil estructural de la proteína S-layer

Con la secuencia de aminoácido también se pudo predecir la estructura de la proteína, esto se realizó *in silico*, mediante programas apropiados (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>), estos mostraron la estructura representadas en las figuras 16 y 17.

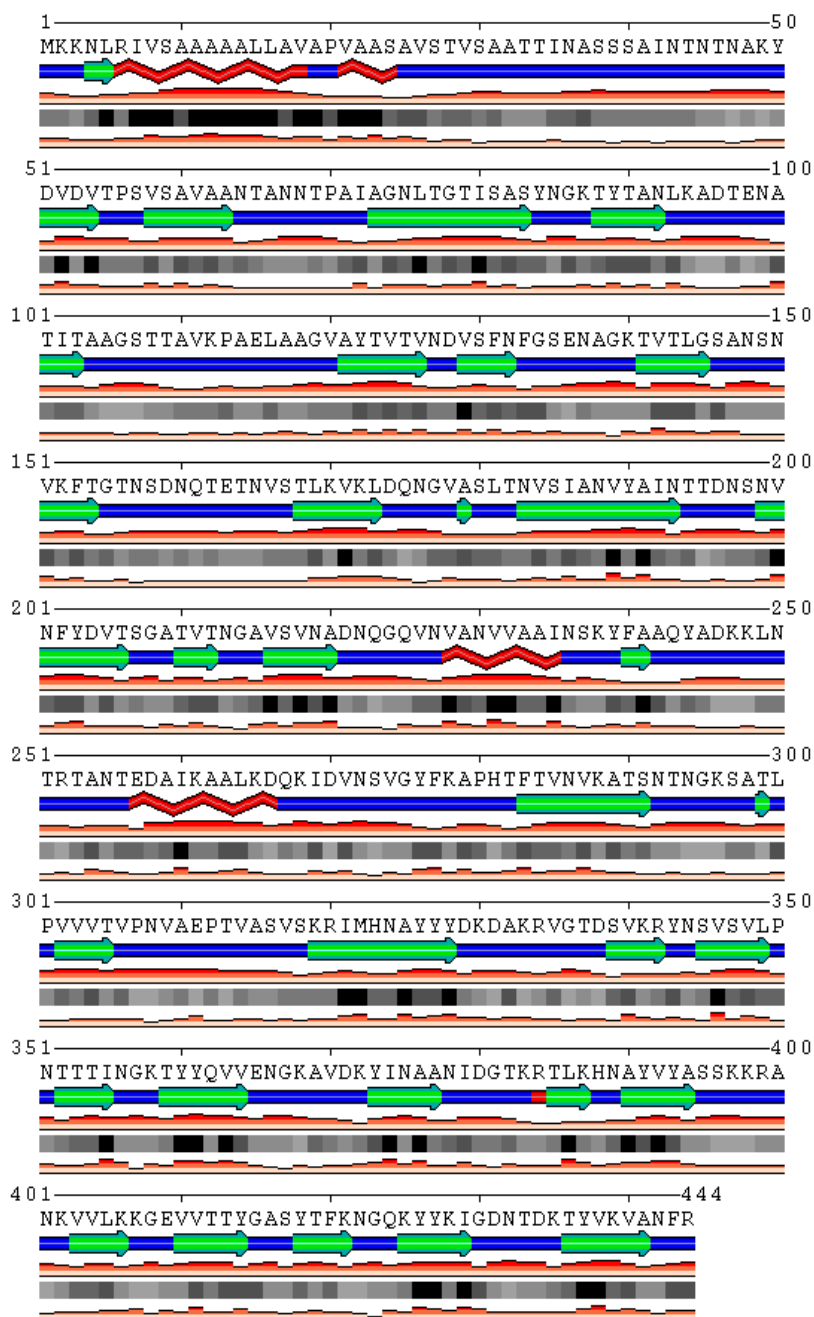


Figura 16: Estructura secundaria predicha para la proteína S-layer. En rojo, se grafican las estructuras en alfa- hélice, en verde, las hojas plegadas beta y en azul las plegadas al azar (random coil)

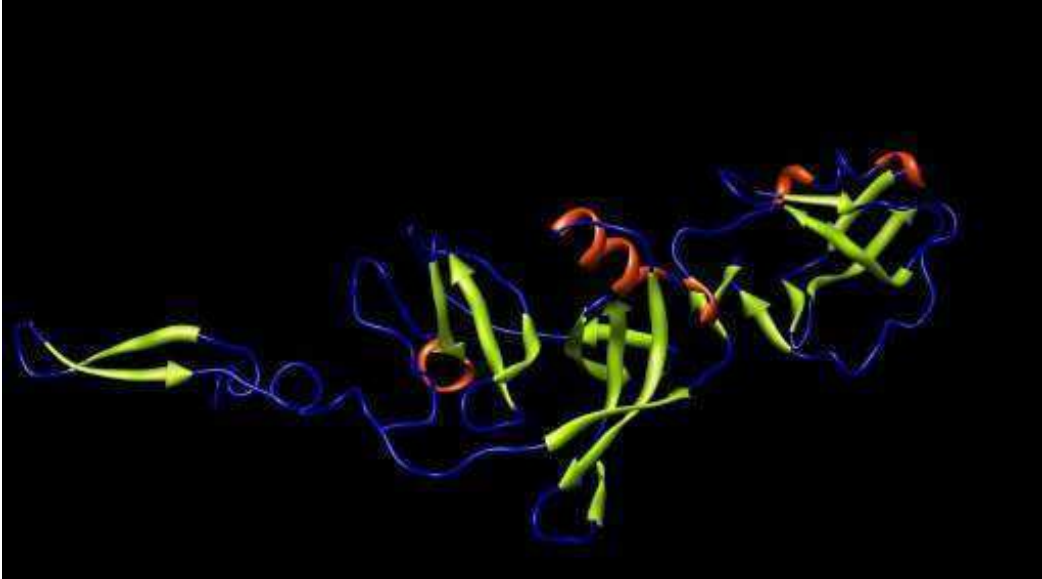


Figura 17: Estructura predictiva en 3 dimensiones de la proteína S-layer.

En las figuras se mostró que en la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* contiene una proporción de 14% α -hélices, este porcentaje se achica a medida que la proteína se va acercando a la región N-terminal, la cual esta anclada a la pared, ya que esta estructura esta comprendida en el péptido señal de anclaje. El resto muestra en 39% de proteína sin plegar y un 47% de plegamiento al azar (random coil).

Los resultados de la predicción estructural, también arrojaron un índice de estabilidad, este índice indica si la proteína es estable en diferentes sistemas de expresión. El índice fue de 10,87, y la clasificación fue de una proteína estable, tanto para ser expresada en células eucariotas, en levaduras y en bacteria.

**RESULTADOS Capítulo 2:
“Función y expresión de
la proteína S-layer
durante el estrés
osmótico”**

Las variaciones de las condiciones de crecimiento (carencia de nutrientes, pH, temperatura, salinidad, presión de O₂, tóxicos ambientales o producidos por el metabolismo, etc.) desencadenan en las células una serie de procesos destinados a mantener las constantes homeostáticas (soportar el impacto) o cambiarlas para crecer en esas condiciones (adaptación). La variación de los parámetros de crecimiento ya sea metabólicos o fisicoquímicos, son percibidos por la célula como señales de estrés. El crecimiento en fase estacionaria es asimilable a condiciones de múltiples estrés, razón por la cual en los últimos años existe una gran convergencia entre los hallazgos sobre genes y proteínas involucrados en las respuestas en fase estacionaria y las de estrés (Jenkins 1990).

La exposición de las células a altas concentraciones externas de osmolitos provoca una salida de agua desde el interior, por lo tanto el contenido en agua disminuye con lo cual la presión de turgencia se reduce, el volumen citoplasmático se contrae, la concentración de metabolitos intracelulares se incrementa y la concentración (actividad) de agua disminuye. En ausencia de un ajuste osmótico activo por parte de la célula, el volumen citoplasmático disminuirá hasta que la actividad del agua del interior sea igual a la externa y provocar el aumento en la concentración intracelular de metabolitos. Estos a su vez podrían actuar inhibiendo distintos procesos celulares a través de sus efectos sobre enzimas o debido a las altas concentraciones de iones podrían llegar a ser tóxicos para la célula. En la osmorespuesta la señal ambiental es un parámetro físico-químico: la concentración externa del agua. El agua se mueve desde o hacia el interior celular afín de mantener constante el volumen celular frente a variaciones de la concentración extracelular de solutos. De ese mantenimiento depende que la célula conserve activo en estado óptimo su metabolismo para lo cual parámetros como pH, composición iónica y niveles de metabolitos deben permanecer relativamente constantes. Si por el contrario este movimiento resulta en un cambio del volumen celular (con el

consiguiente cambio de concentración intracelular de solutos) y de presión, la célula desarrolla una serie de respuestas a fin de adaptar sus valores básicos a las nuevas condiciones. La capacidad en restablecer esas condiciones refleja la capacidad adaptativa de una determinada célula (Csonka & Hanson 1991; Whatmore *et al*, 1990)

Como se ha señalado, las bacterias Gram+ tienen mayor osmotolerancia. Esta puede ser dada tanto por la composición lipídica de su membrana como por la de su pared (espesor, composición). Algunas Archaea halófilas sintetizan una capa de polisacárido protector (Anton *et al* 1988) y también se han detectado cambios en las envolturas de bacterias halófilas (Vreeland *et al* 1984)

Efecto de alta salinidad en las células de *Lactobacillus acidophilus*

Las envolturas celulares tienen propiedades de protección pero también de contención y sensado del medio externo. Uno de los factores ambientales con el cual tropiezan las células bacterianas es la variación de la actividad del agua. En condiciones de alta salinidad las envolturas están involucradas en el mantenimiento de la presión de turgencia, y en el intenso transporte de osmolitos y provisión de osmo-protectores. Las bacterias Gram+ tienen mayor osmotolerancia que las Gram-. Esta puede ser dada tanto por la composición lipídica de su membrana como por la de su pared (espesor, composición) así como también el tamaño de las celular. Dichas envolturas tienen un rol muy importante en el mantenimiento de la forma, integridad y supervivencia. Durante el estrés la mayoría de las envolturas en la bacteria juegan un papel importante en la adaptación, no es extraño pensar que las proteínas de S-layers sean de gran importancia durante la variación osmótica.

El primer acercamiento que se realizó para estudiar la importancia de las S-layer fue analizar el perfil de crecimiento en alta sal (Figura 18) y

también el tamaño y forma de la células de *Lactobacillus acidophilus* crecidas en diferentes concentraciones de sal (Figura 19).

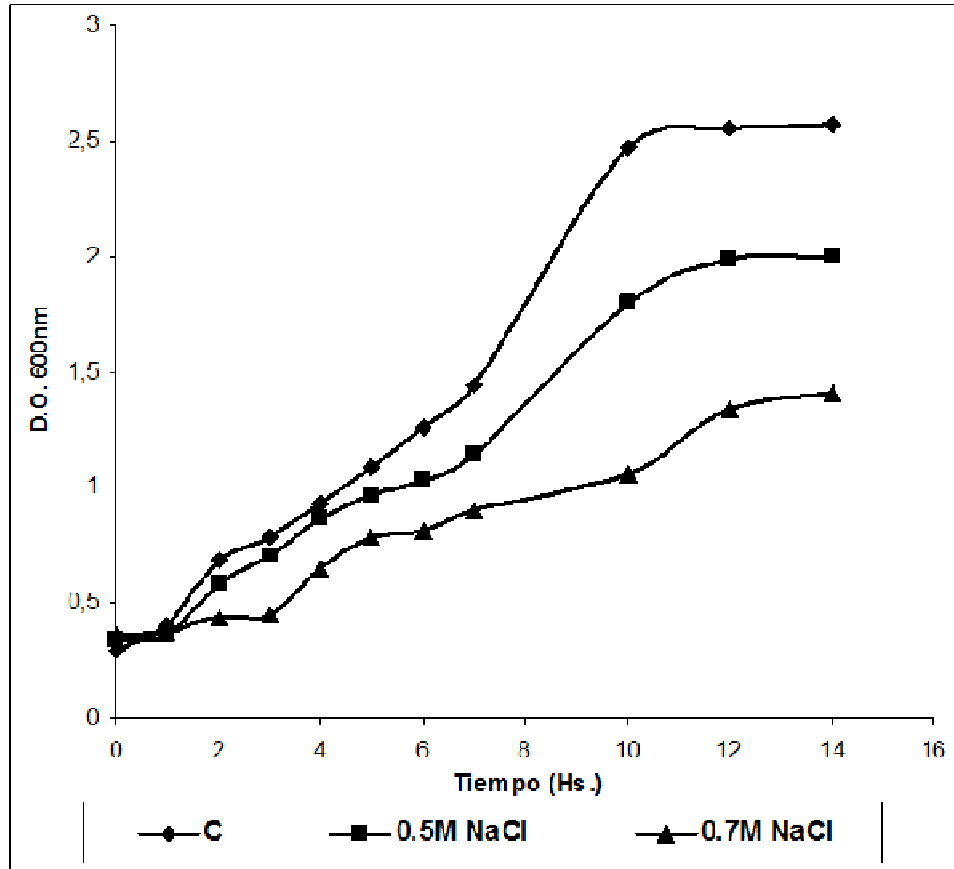
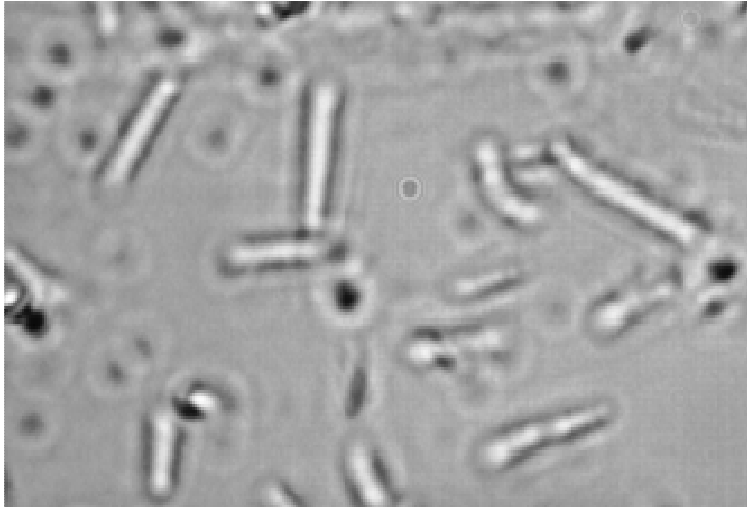


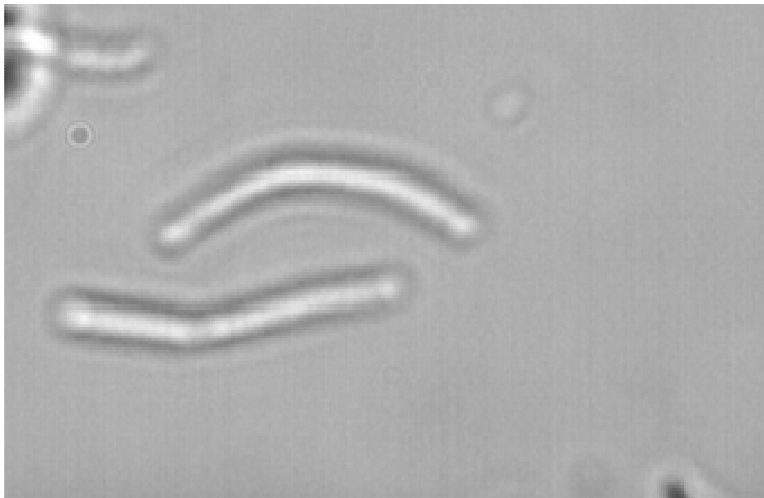
Figura 18: Perfil de crecimiento en condiciones de alta sal de *Lb. acidophilus*

Se observó que durante el crecimiento en alta sal, ocurren en la bacteria cambios con respecto a las células que crecen en medio control. Por un lado como se observó en la Figura 18, las bacterias que crecen en 0,5M de NaCl tienen un retraso en el crecimiento, y este efecto se acentúa con el aumento en la concentración de sal.

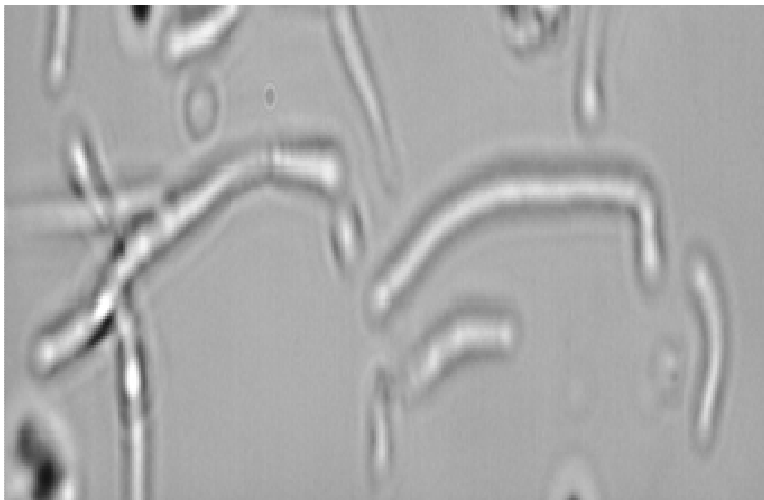
Por otro lado, como se observó en la Figura 19, las células en alta sal son diferentes que las crecidas en el control, estas adoptan una forma más alargada y angosta, también se observó que adoptan una conformación filamentosa, estas características solo se observaron en la condición de alta sal.



Control



0,5 M NaCl



0,7 M NaCl

Figura 19: Microscopia de células de *Lb acidophilus* crecidas medio control y en condiciones crecientes de cloruro de sodio. Se observó un aumento de tamaño y un perfil filamentosos a medida que se aumentaba la concentración de sal

Expresión de la proteína S-layer en estrés osmótico

Lactobacillus acidophilus se creció en condición de estrés osmótico agregando NaCl. A concentraciones finales 0.5 y 0.7 M para evaluar cuantitativamente la producción de S-layer en cada condición de crecimiento.

Para esto se realizó un Western Blot tanto de las células enteras liofilizadas y fraccionadas en alícuotas de igual masa de peso seco, como de los sobrenadantes de los medios de crecimiento. Esto se realizó para comprobar si la proteína S-layer se encuentra más desprendida de la pared celular en la condición de alta sal.

Se pudo observar un aumento significativo de la expresión de la proteína S-layer a medida que la concentración de sal aumenta, (Figura 20) en las células enteras.

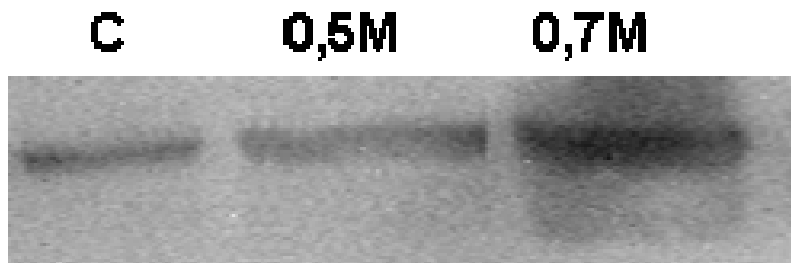


Figura 20: Western Blot de células enteras a distintas concentraciones de NaCl

También se observó una mayor cantidad de S-layer en los sobrenadantes de las condiciones de alta sal (Figura 21), comprobando que las proteínas S-layer se encuentran más sueltas en un medio de alta sal, esto se debe a que estas proteínas se encuentran unidas a la pared de forma no covalente, con lo cual la presencia de la fuerza iónica que genera el NaCl liberaría una mayor cantidad de S-layer al medio.

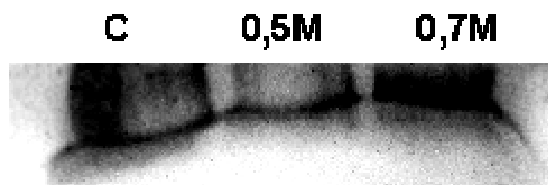


Figura 21: Western Blot de los sobrenadantes del medio de crecimiento de *Lb. acidophilus*, en distintas concentración de NaCl

Para corroborar el aumento de expresión mostrado por el Western blot se realizaron experimentos de Real Time PCR cuantitativa, este presenta una ventaja ya que identifica la expresión del mensajero de interés desde el ARN total extraído y no requiere de manipulaciones genéticas para la evaluación. Estos corroboraron la mayor expresión de la S-layer durante el estrés osmótico. En la Tabla 1 se puede observar que hay una mayor expresión de la proteína S-layer durante las condiciones de stress osmótico en las células.

Condición	Ct gen <i>slpA</i>	Ct gen 16s	ΔCt^a <i>slpA</i> -16s	$\Delta\Delta Ct_{control}^b$	Actividad relativa ^c
Control	30,5	27,95	2,55	0	1
0,5 M NaCl	25,85	27,57	-1,72	-4,27	19,2
0,7 M NaCl	19,98	23,5	-3,52	-6,05	66,2

Tabla 1: Resultados de la Real Time PCR cuantitativa realizada con el gen *slpA* y como gen control el gen del 16s ribosomal de *Lb acidophilus*

^a ΔCt , es el valor que se calcula cuando se realiza la diferencia entre el Ct del gen de interés (*slpA*) con respecto al gen control (16s)

^b El $\Delta\Delta Ct$ es la diferencia entre las valores de las condiciones de alta sal con respecto al control.

^c La actividad relativa se calcula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, este calculo da la idea de cuantas veces mas se encuentra activado el gen con respecto al control.

En la Figura 22 se puede observar de manera mas fácil la inducción del gen de la proteína S-layer en altas sal, se observó que el aumento de la expresión llega hasta 60 veces en las condiciones de alta sal con respecto al control.

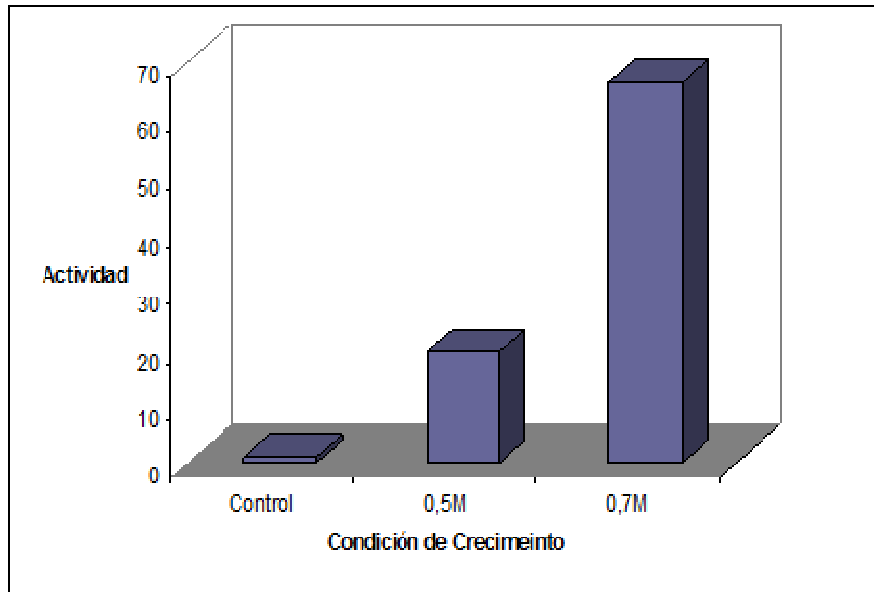


Figura 22: Grafico de inducción del gen *slpA* en alta sal con respecto al control

Por otro lado los resultados de la expresión en fase estacionaria fueron diferentes, los resultados con real time PCR cuantitativa fueron dudosos, esto se debió a que no se logro amplificar el gen de la proteína s-layer en la condición control, lo cual dificultó la tarea de comparar con las otras condiciones de alta sal. Para corroborar esto se realizó un ensayo de RT-PCR semi- cuantitativa (Retro-Trascriptasa PCR) (Figura 23)

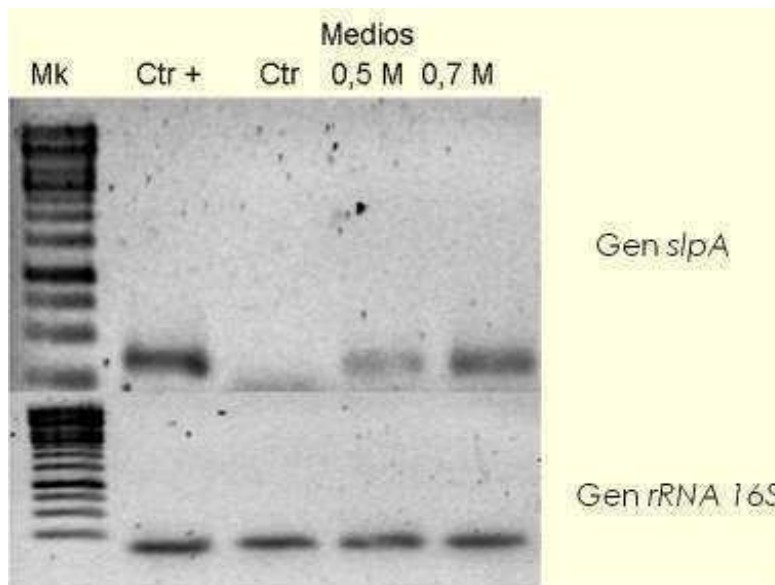


Figura 23: RT-PCR semi-cuantitativa de los genes *slpA* y *rRNA16s* en las diferentes condiciones control y medios con alta sal

Esto demuestra que el gen que codifica la proteína S-layer se apaga una vez llegada la fase estacionaria, pero se mantiene activo en medios con alta sal. Esto se debe a que la proteína está más desprendida, no así en el medio control, es por esto que la proteína se sigue sintetizando en alta sal.

Función de la proteína S-layer en el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* durante el stress osmótico

Pudimos comprobar una mayor expresión de la proteína S-layer durante el stress osmótico. El siguiente paso fue probar que dicha proteína era importante en la supervivencia de este microorganismo en el momento del estrés salino.

Para esto se despojó a las células de la proteína usando cloruro de litio luego de esto, se las colocó en un medio MRS, para su crecimiento en condiciones control, 0,5 M de cloruro de sodio y en 0,7 M de cloruro de sodio.

En la Figura 24 se observó el crecimiento seguido por densidad óptica de las células, con los diferentes tratamientos en condición control y en alta sal, se ve que la ausencia de la proteína S-layer causa un retraso en la recuperación de la célula en condiciones de stress osmótico. Esto ocurre en condiciones de 0,5 y el efecto se observa más claramente cuando la condición de alta sal es más extrema (0,7 M NaCl)

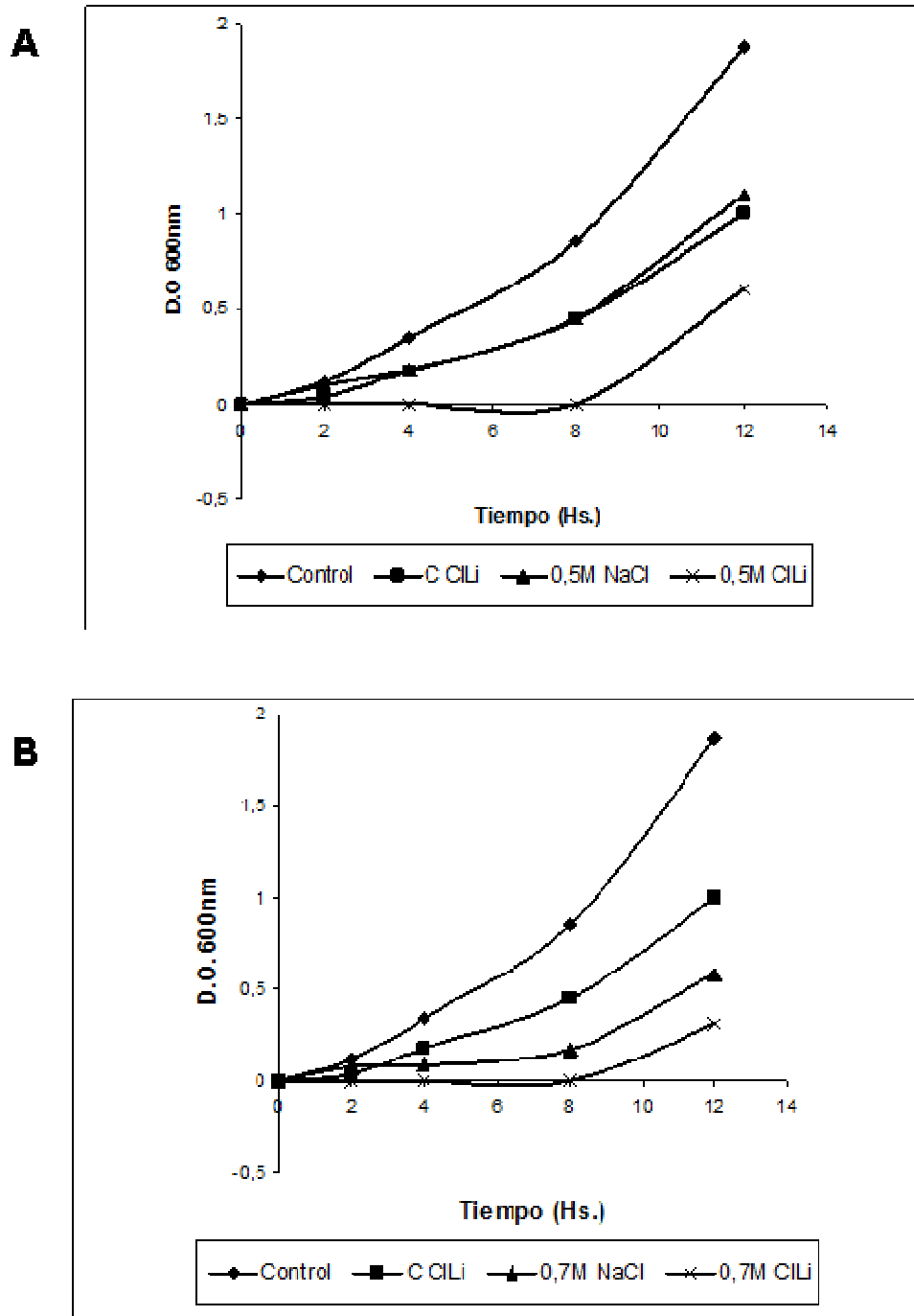


Figura 24: Crecimiento de *Lb.acidophilus* luego del tratamiento de CLi y su recuperación de diferentes concentraciones de CINa

A: Recuperación en 0,5 M de NaCl

B: Recuperación en 0,7 M NaCl

Para comprobar que la recuperación se debía a que la célula volvía a sintetizar la proteína S-layer, se siguió la síntesis de la proteína por

Western blot (Figura 25) en estas se ve que la recuperación de la célula va acompañada por la síntesis de S-layer, pudiendo esta contribuir al recobro durante el stress

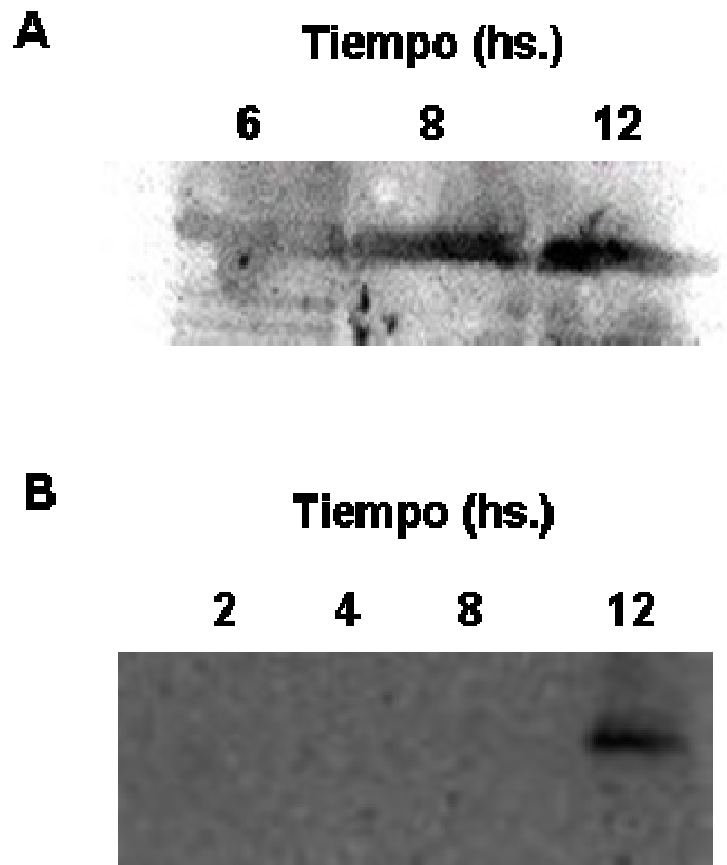


Figura 25: Western blot anti proteína S-layer, durante la recuperación luego de los tratamientos con CLi

A. Células recuperadas en MRS con 0,5M NaCl

B) Células recuperadas en MRS 0,7M NaCl

Hemos comprobado que la proteína S-layer es fundamental para que las células de *Lactobacillus acidophilus* se recuperen y crezcan en una condición de alta sal, esto se observó en las curvas de crecimiento de la Figura 24, donde vemos que la células logran recuperarse luego de 12 horas, y que la recuperación viene acompañada con una reaparición de la proteína S-layer.

También observamos una sobre expresión de la proteína en condiciones de estrés osmótico. Esto se correlaciona con los resultados donde se muestra un tamaño mas alargado de las células en alta sal, un mayor tamaño requiere de una mayor síntesis de proteína para poder cubrir con la proteína toda la célula. También se observó que en condiciones de alta salinidad la proteína se encuentra más desprendida de la pared y se pierde mas fácilmente, sabiendo la importancia que tiene esta proteína para poder crecer en alta sal, es lógico que la célula la exprese de más en un ambiente de estrés.

**RESULTADOS Capítulo 3:
“Función hidrolítica de
la proteína S-layer”**

Hemos descripto anteriormente las características estructurales y las características físico-químicas de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Aun así, la función biológica de la proteína todavía es desconocida.

La S-layer es la primera barrera entre la célula procariota y su ambiente, así como también es la primera en interactuar con otros géneros bacteriano. Es por esto que decidimos investigar la interacción de esta proteína con la pared bacteriana de otras bacterias que se encuentren en el mismo nicho.

Elegimos entonces a *Salmonella entérica* serovar Newport. La elección se hizo ya que este microorganismo es un patógeno intestinal. Esta bacteria pertenece a los bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos de la familia Enterobacteriaceae. Se encuentran fundamentalmente asociados a la flora intestinal y, por ello, a aguas y alimentos que hayan tenido contacto con material fecal.

Su infección comienza con la ingestión del inóculo, el cual puede estar presente en comida o agua contaminada. Si el inóculo es suficientemente grande, superará la barrera gástrica que crea el pH ácido del estómago. El patógeno logra atravesar la barrera intestinal y es fagocitado a nivel de las placas de Peyer. Su protección frente a al sistema del complemento e inmunoglobulinas le permite diseminarse linfáticamente y colonizar los territorios del sistema retículoendotelial, comenzará entonces a multiplicarse y a aumentar en número.

Dos tipos, *Samonella enteritidis* y *Samonella typhimurium*, son los que causan las infecciones más comunes y son responsables por la mitad de todas las infecciones en humanos. *S. typhimurium* es la causante de la fiebre tifoidea, la cual afecta entre 16 -33 millones de personas en el mundo, causando entre 500,000 y 600,000 muertes, la OMS identifica la fiebre tifoidea como un problema serio de salud pública. Su incidencia es mayor en personas de edades comprendidas entre los 5 a 19 años de edad (www.who.int). La enfermedad esta casi ausente en los países desarrollados, pero aún es frecuente en los países en desarrollo. Su

prevalencia es frecuente en el suroeste de Asia, Asia central, algunos países de América del sur, y África Subsahariana.

Los tipos que no causan síntomas en animales pueden enfermar personas y viceversa. Si el microorganismo se encuentra presente en el alimento, usualmente no afecta el sabor, olor o apariencia de los alimentos. La bacteria vive en el tracto intestinal de los animales y humanos infectados.

Debido a la importancia sanitaria de este patógeno y al hecho que *Lb acidophilus* y *Salmonella* habitan en el intestino humano decidimos investigar si la primer barrera de el *Lb. acidophilus* (la proteína S-layer) podría interactuar con las envolturas de este patógeno modelo.

En estos resultados describimos una actividad hidrolítica sobre la pared de *Salmonella* no antes descrita

Co-cultivo entre *Salmonella enterica* serovar Newport y *Lactobacillus acidophilus*

El primer acercamiento hacia la interacción entre *Salmonella* y *Lb. acidophilus* fue realizar co-cultivos entre ambas especies. Para esto se incubó a las dos bacterias en un buffer apropiado, los experimentos no se realizaron en un medio rico de crecimiento debido a las diferencias metabólicas y requerimientos nutricionales de ambas especies, por otro lado el co – cultivo en buffer mantuvo el pH constante durante todo el desarrollo del experimento, descartando la acidificación por la presencia del ácido láctico producido por el género *Lactobacillus*.

Luego de incubar ambas bacterias se realizó un recuento de células viables en un medio selectivo para cada bacteria, fue así como pudimos diferenciar la viabilidad de ambas bacterias.

En la Figura 26 se muestra el descenso de la viabilidad en las células de *Salmonella*, mientras que *Lb acidophilus*, mantiene un número constante de células viables.

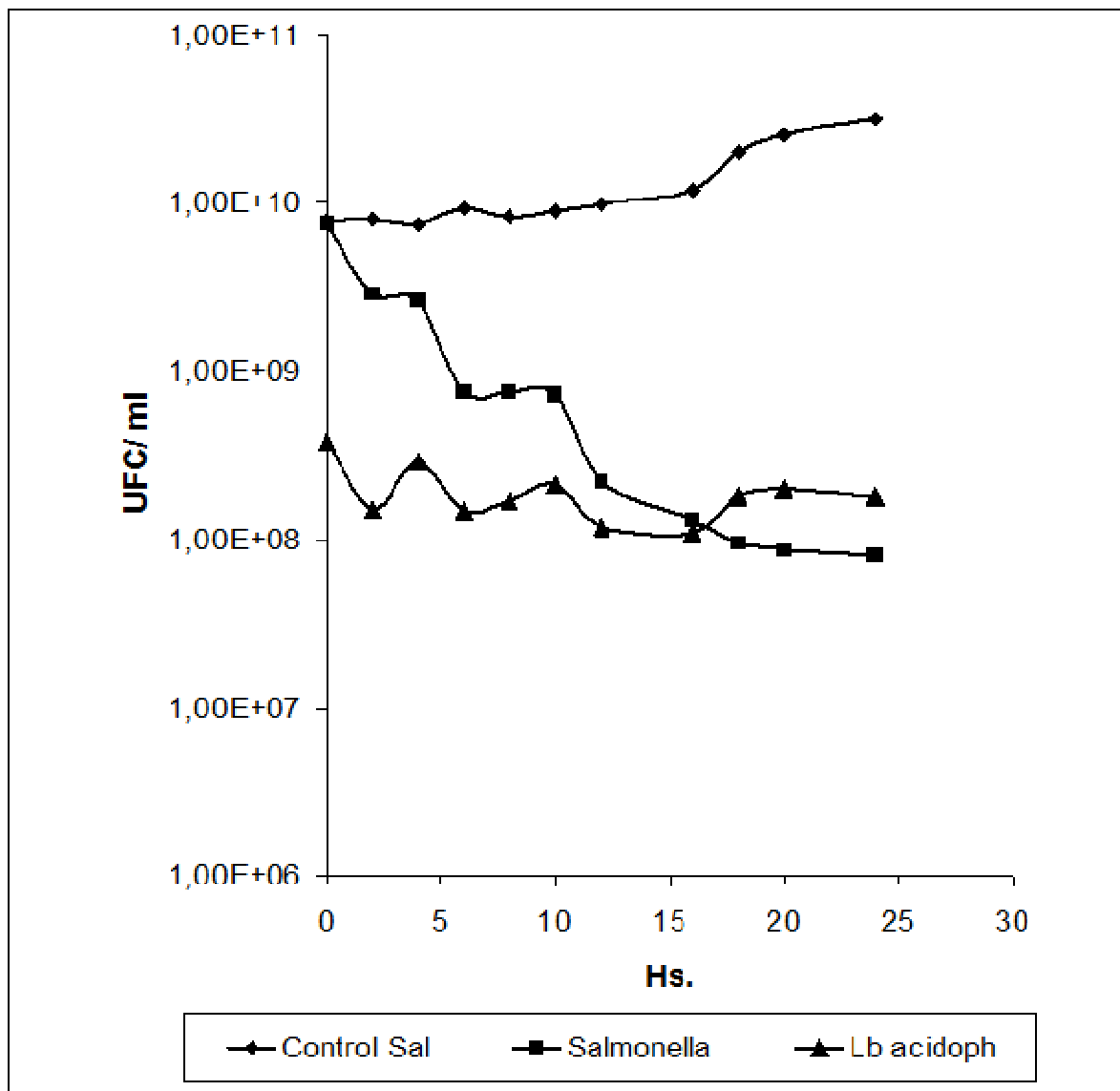


Figura 26: Co-cultivo entre *Salmonella* y *Lactobacillus acidophilus*, (-■-) muestra el descenso en el recuento de *Salmonella* cuando se la co-cultiva con *Lb. acidophilus*, (-▲-) representa el recuento de *Lb. acidophilus* en el medio apropiado, (-◆-) es el control de *Salmonella* en ausencia del *Lactobacillus* cultivado en buffer.

Si la presencia de *Lactobacillus acidophilus* afecta de alguna manera la supervivencia de *Salmonella*, esto podría deberse a una interacción entre las envolturas mas externas de este. Es por esto que se investigó la acción de la proteína S-layer sobre la pared de *Salmonella* Newport.

Actividad hidrolítica de S-layer de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 sobre *Salmonella enterica* serovar Newport

La proteína de *Lb. acidophilus* fue puesta a prueba para verificar su actividad con respecto a la hidrólisis de los polímeros pertenecientes a la pared celular bacteriana. Para esto se realizaron ensayos de zymograma, en estos se utilizó como sustrato peptidoglicano proveniente de *Salmonella* Newport en una concentración de 2% incorporado en PAGE para realizar una corrida electroforética

Luego de la corrida, se observó una clara actividad hidrolítica sobre el PG de *Salmonella*, (Figura 27), esta se observa como una zona clara en el gel impregnado con PG.

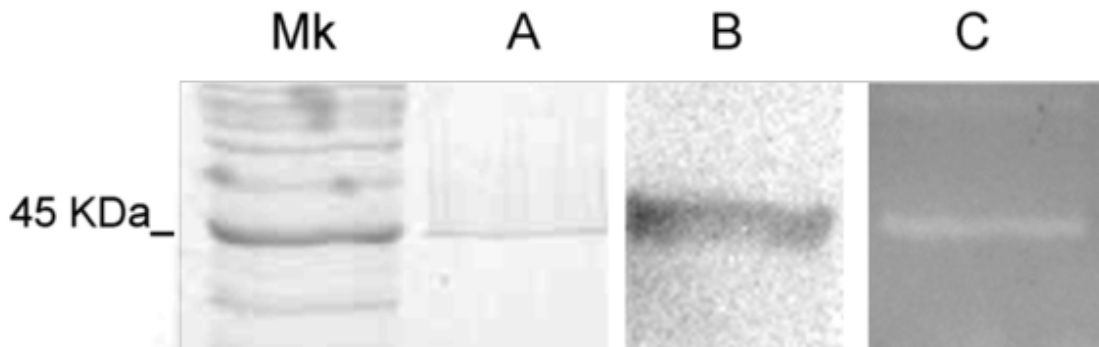


Figura 27: Perfiles de SDS PAGE, Western Blot y Zymograma de la S-layer obtenida de *Lb. acidophilus*

A: SDS-PAGE: Luego de la purificación de la proteína con LiCl y luego de la tinción con coomassie blue

B: Western blot revelado con anticuerpo anti-S-layer

C: Zymograma de S-layer mostrando una actividad lítica sobre la pared celular de *Salmonella* Newport

Luego de esto se comprobó que la misma actividad de hidrólisis podía ser detectada en peptidoglicano aislado de las paredes de *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*. En contraste no se observó esta actividad en los PG provenientes de los microorganismo Gram positivos evaluados como *Bacillus cereus* y *Lactobacillus casei*

Actividad de la S-layer sobre pared celular y células enteras de *Salmonella*

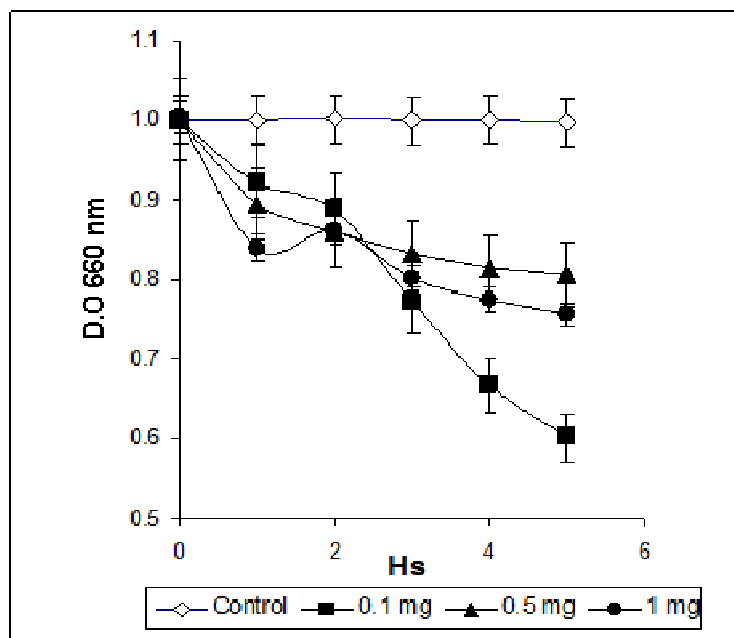
Se realizaron ensayos *in Vitro* para corroborar la actividad observada en los ensayos de zymograma y de co-cultivo. Estos ensayos se realizaron sobre pared celular purificada (Figura 28A) y células enteras (Figura 28B) de *Salmonella* Newport, ambas resuspendidas en buffer PBS, luego se agregó S-layer en distintas concentraciones y fueron incubadas a 37° por un periodo de 6 horas.

La lisis fue monitoreada por la disminución de la absorbancia a 660nm, se observó en ambos casos una baja en la densidad óptica indicando que ocurre una lisis con la presencia de S-layer.

En la preparación de paredes celulares purificadas, se observó que la mejor actividad fue a una concentración baja de proteína, correspondiente a 0,1 mg/ml, esto podría deberse a que a altas concentraciones, las propiedades intrínsecas de la proteína, como la de reensamblado y autoagregación, podrían enmascarar la actividad lítica.

En cambio cuando se evaluó la acción de la S-layer sobre células enteras de *Salmonella*, en tan bajas concentraciones no se observó un descenso significativo de densidad óptica. Este fenómeno podría deberse a la presencia de los lipo-polisacáridos que se encuentran presentes en la envoltura de las células enteras de *Salmonella*. Sin embargo a concentraciones mas altas, entre 0,5 a 1 mg/ml, la lisis vuelve a observarse, pero para que dicha lisis ocurriera fue necesario mas tiempo que para la pared sola. Estos resultados muestran claramente una actividad lítica sobre la pared de *Salmonella* Newport que no fue descrita con anterioridad.

A



B

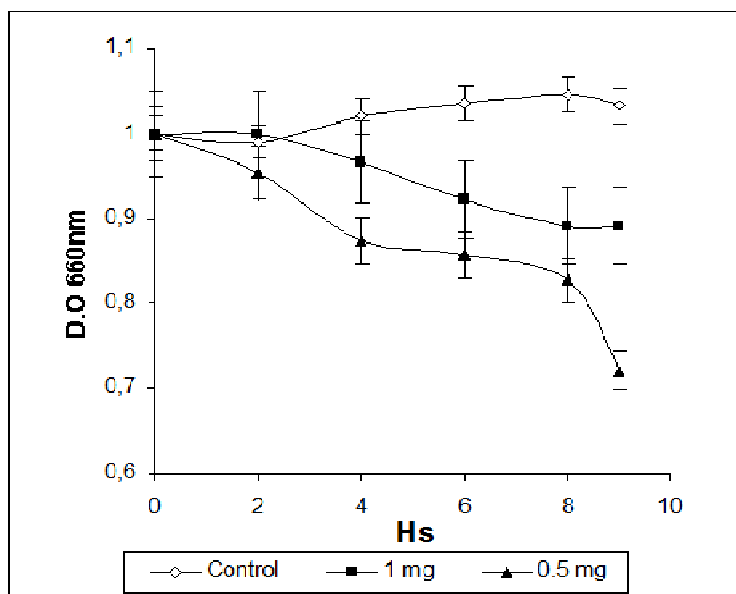


Figure 28: Lisis de *Salmonella* Newport provocada por S-layer

A: Actividad hidrolasa contra pared celular purificada de *Salmonella*

B: Lisis de células enteras de *Salmonella* Newport por S-layer.

Mezclas de pared celular o células enteras y diferentes concentraciones de S-layer de:

1mg/ml, 0.5 mg/ml y 0.1 mg/ml

Mecanismo de acción de la actividad hidrolítica de la proteína S-layer

Luego de comprobar la actividad lítica de la proteína S-layer, continuamos caracterizando su mecanismo de acción, para poder hacer esto corroboramos la especificidad de dicha actividad lítica.

Para entender este mecanismo de hidrólisis de pared, debemos recordar la composición de la pared celular bacteriana. Esta es una capa rígida que se localiza en el exterior de la membrana plasmática en las células de bacterias así como también en hongos, algas y plantas. La pared celular protege los contenidos de la célula, da rigidez a la estructura celular, media en todas las relaciones de la célula con el entorno y actúa como compartimiento celular

La pared celular se construye de diversos materiales dependiendo de la clase de organismo. En bacterias, la pared celular se compone de peptidoglicano. El peptidoglicano es un polímero de dos azúcares unidos a aminoácidos, el disacárido, está formado por N-acetilmurámico y N acetilglucosamina, esos dos azúcares están unidos por enlace β 1-4, y el primero de ellos, el N acetilmurámico está unido a unos 4 aminoácidos (Figura 29).

La pared celular Gram-positiva se caracteriza por la presencia de una capa de peptidoglicano muy gruesa, que es responsable de la retención de los tintes violetas durante la tinción de Gram. Las paredes celulares Gram-positivas contienen unos polialcoholes denominados ácidos teicoicos, algunos de los cuales se enlazan con lípidos para formar ácidos lipoteicoicos. Puesto que los ácidos lipoteicoicos tienen enlaces covalentes con los lípidos de la membrana citoplásmica, son responsables de enlazar el peptidoglicano a la membrana citoplásmica. Los ácidos teicoicos dan a la pared celular Gram-positiva una carga negativa total debido a la presencia de los enlaces de fosfodiéster entre los monómeros del ácido teicoico.

La pared celular Gram-negativa, por el contrario, contiene una capa fina de peptidoglicano adyacente a la membrana citoplásmica, que es

responsable de la incapacidad de la pared celular para conservar el color violeta en la decoloración con etanol durante la tinción de Gram. Además de la capa de peptidoglicano, la pared celular Gram-negativa también contiene una membrana externa adicional compuesta por fosfolípidos y lipopolisacáridos que hacen frente a las condiciones exteriores.

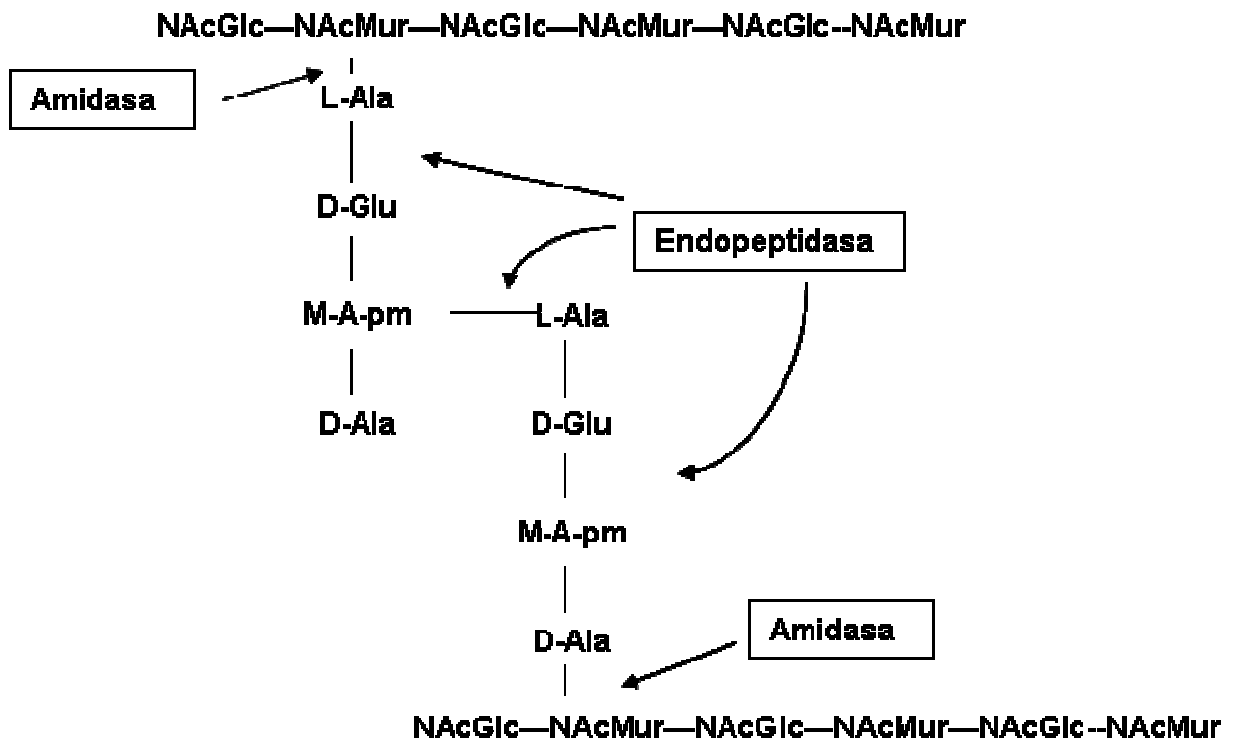


Figura 29: Estructura general del peptidoglicano y posibles lugares de acción de enzimas hidrolíticas.

Las amidasas hidrolizan específicamente las uniones entre azúcares y aminoácidos las cuales generan extremos reductores en los azúcares. Las endopeptidasas clivan la unión amida entre los péptidos.

Debido a la estructura de esta envoltura bacteriana, hubo varias posibilidades sobre la especificidad de acción de la proteína S-layer, para clivar al peptidoglicano. Esta podía actuar cortando entre la unión de los azúcares, dejando extremos reductores libres; como así también

podía cortar entre las cadenas de aminoácidos, lo cual dejaría extremos amino libres. Para diferenciar estos modos de acción se realizó la marcación de las paredes de *S. newport*, tanto de extremos de azúcares libres como la marcación de aminoácido luego del tratamiento con S-layer.

Los extremos reductores fueron marcados con ANTS y luego corridos en geles de poliacrilamida (Figura 30), pero en estos no se observaron diferencias.

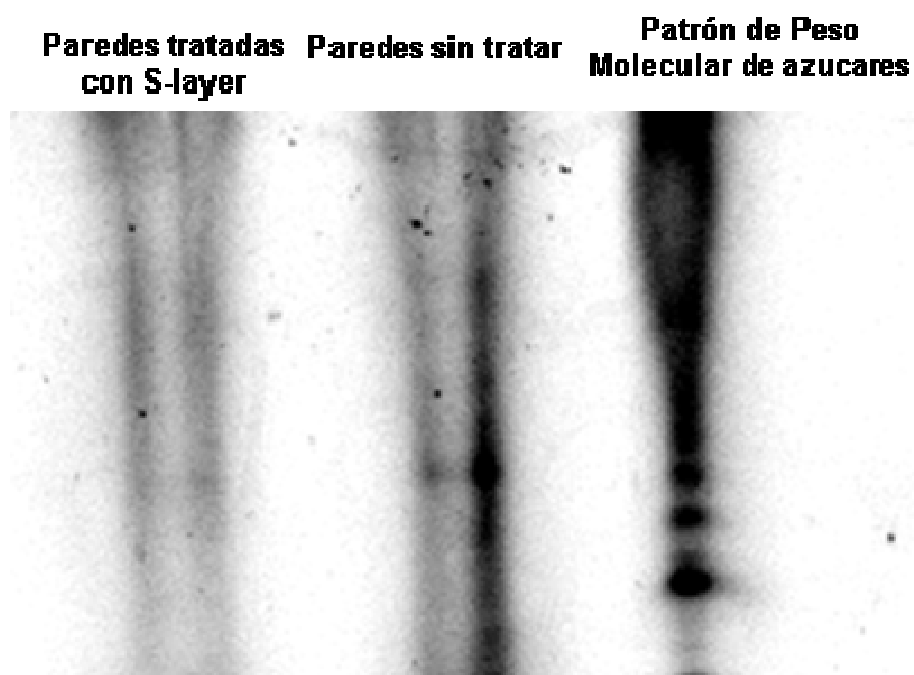


Figura 30: Perfil de corrida de azúcares liberados antes y después del tratamiento con S-layer sobre paredes de *Salmonella Newport*. En este no se observa un aumento de extremos reductores luego del tratamiento, por lo que se descarta que la S-layer actué como una amidasa

Por otro lado los aminoácidos marcados con Di-Nitro-Fenil-Benzeno (DFNB) fueron corridos por TLC (Thin Layer Chromatography). Estos mostraron un aumento en la cantidad de aminoácidos libres en función del tiempo, el cual es inversamente proporcional a la turbidez de la muestra (Figura 31).

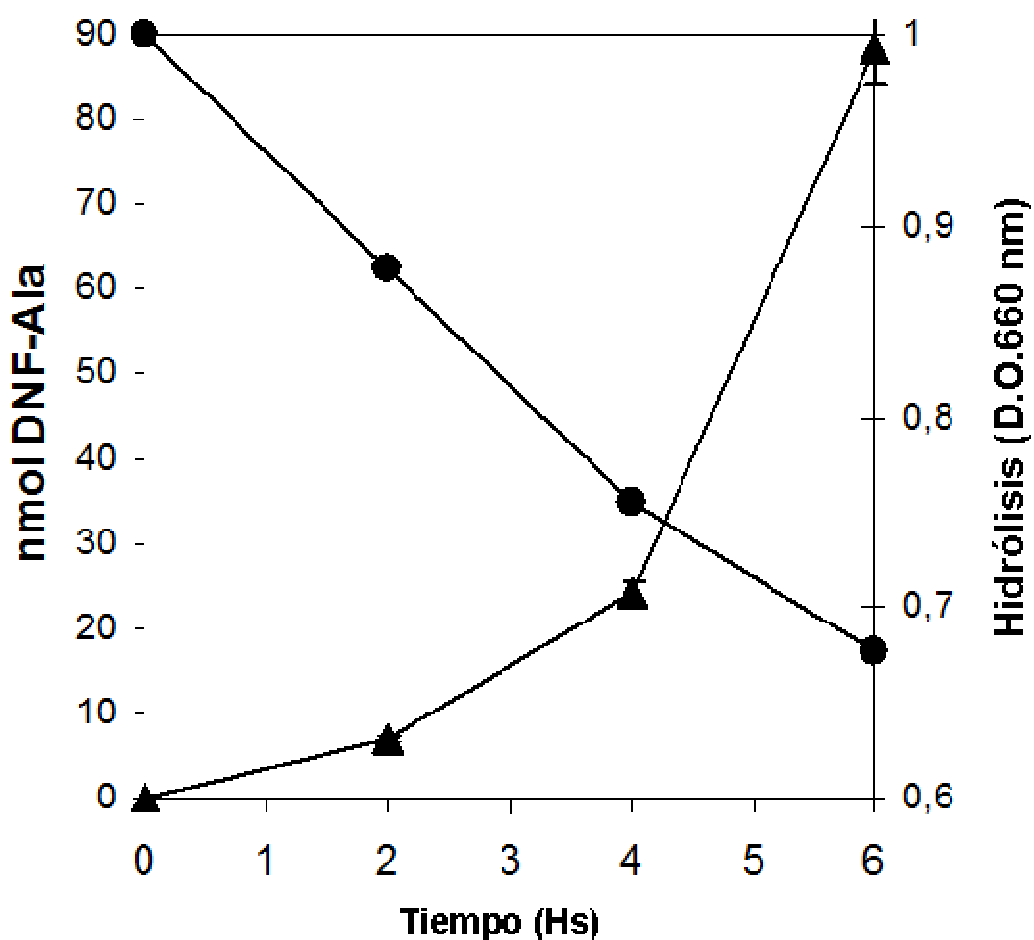


Figura 31: Correlación entre la lisis de la pared de *S. Newport* y el incremento en aminoácidos marcados

Para determinar cuales eran los aminoácidos que se liberaban en esta reacción, se corrió una TLC con aminoácidos patrones (Figura 32) la cual muestra un claro aumento del aminoácido alanina.

Estos resultados muestran que la nueva actividad lítica estaría actuando sobre la cadena de aminoácidos en el peptidoglicano de *Salmonella Newport*, La actividad sería análoga a una enzima endopeptidasa, en la cual la S-layer tendría su blanco de acción en las alaninas presentes en dichas cadenas.

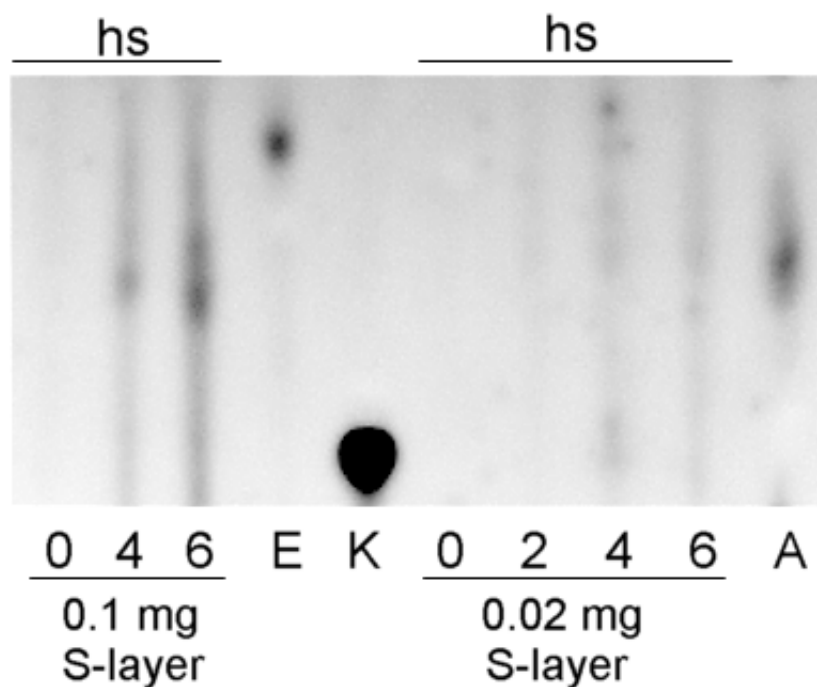


Figura 32: Análisis por TLC de la hidrólisis de pared, se utilizaron S-layer en dos concentraciones diferentes en función del tiempo. Los aminoácidos marcados con DNF son E: Glu, K: Lys, A: Ala

Análisis de secuencia de la proteína S-layer

La secuencia completa de la proteína S-layer fue amplificada en una reacción de PCR y clonada, para luego ser secuenciada, para el consiguiente el análisis de dicha secuencia. El fragmento C-terminal de la S-layer se analizó con el programa *BlastP*, dando como resultado homología con otras enzimas de tipo hidrolítica de especies relacionadas, (Figura 33). Este resultado nos llevó a sub-clonar dicho fragmento en un plásmido de expresión en *Bacillus subtilis* y en *E. coli* para que corroborar la actividad previamente descrita se encuentra en esta porción de la proteína.

Sujeto 1_N-acetylmuramidase (<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM)	
SlAa 1	MHNAYYYDKDAKRVGTDGVK-RYNGVGLPNTTTTNGKTYYGVEVNO<AVDKYINAA 56 MHNAY YD ++ K V++ TTI GKTY+ VEN + YIA
Sjt 1	282 MHNAYVYDNGTKIKGKMFKLNEEEDVKMISTYGTIKGKTYRVGEN----EYIAG 346
SlAa 57	N DGTKRTLKHNAYVYASSKKRANKVVLKKGVEWTTYGASYTFKNGQKYYIGDNTDKTY 116 NIDGT+ LK N+YVY R N+ KKE V TYG+ T NG+<YY+IG +Y
Sjt 1	347 NIDGTLKFLKRNSVYNGYGNRDNLSLKRKKNEQVATYGAAVLHNGKYYRIG--IRQY 402
SlAa 117	VKVANF 122 +K ANF
Sjt 1	403 IKKANF
Sujeto 2 N-acetylmuramidase (<i>Lactobacillus helveticus</i> DSM 20075)	
SlAa 1	MHNAYYYDKDAKRV-----G TDSVKRYNSVSLPNTTTTNGKTYYGVEVNGKAV 49 MHNAY YD <++ G+ + Y T TI KTY+VEN
Sjt 2	313 MHNAYVYDAGKKIKGKMYKISDEEGSKLIATYG-----TKTIKKTYYRVGEN---- 361
SlAa 50	D<YINAANIDGKRTLKHNAYVYASSKKRANKVVLKKGVEWTTYGASYTFKNGQKYYKIG 109 +YIA NIDGT R LKINAYVY R N+ KK V TYG+ NG+<YY+IG
Sjt 2	362 -EYIAGNIDGTLRFLKHNTYVYNGYGNRDNLSLKRKKNEQVATYGAVKLHNGKYYRIG 416
SlAa 110	DNTDKTYVKVANF 122 + Y+K+NF
Sjt 2	420 ---IRQYIKKSNF
Sujeto 3 N-acetylmuramidase (<i>Lactobacillus utunensis</i> DSM 16047)	
SlAa 1	MHNAYYYDKDAKRV----G TDSVKRYNSVSLPNTTTTNGKTYYGVEVNGKAVCKY MHNAY Y-K+ <RV G+ K++ T TI GKTY -VE+ +Y
Sjt 3	290 MHNAYVYNKEGKRVLKGIKIFKVNKKEGFKLIDTYG---T TIKGKTYRVGEN- --EY
SlAa 53	INAANIDGKRTLKHNAYVYASSKKRANKVVLKKGVEWTTYGASYTFKNGQKYYKIGDNT 1 I A N+ DGT R LKHN+YVY KR + + +KG V TYG+ NG++ YY++G +
Sjt 3	341 IAAGNVDGTLRFLKHNSVYVYNGYGNRDNLSLKRKKNEQVATYGAVKLHNGKYYRIG 398
SlAa 113	D<TYVKVANF 122 Y+K+NF
Sjt 3	369 --QYIKKSNF 406
Sujeto 4 LytA proteína N-acetylmuramoyl L-alanina amidasa- (<i>Lactobacillus crispatus</i> MIV 3A US)	
SlAa 1	MHNAYYYDKDAKRV-----G TDSVKRYNSVSLPNTTTTNGKTYYGVEVNGKAV 49 MHNAY YD+ +K++ G + Y T TI GKTY +VEN
Sjt 4	281 MHNAYVYDQNGKLLKGGMYKTSDENGKWAINTY----TKTIKKTYYRVGEN---- 339
SlAa 50	D<YINAANIDGKRTLKHNAYVYASSKKRANKVVLKKGVEWTTYGASYTFKNGQKYYKIG 109 +YIA NIDG+ R L< NAYVY R N+ KK +TYG ++T NG +<YYK+G
Sjt 4	340 -CYIAAGNIDGTLRFLKHNSVYVYNGYGNRDNLSLKRKKNEQVATYGAVKLHNGKYYRIG 397
SlAa 110	DNTDKTYVKVANF 122 + YVK+NF
Sjt 4	398 ---IRQYVKKSNF 407
Sujeto 5 lysin (<i>Lactobacillus utunensis</i> DSM 16047)	
SlAa 1	MHNAYYYDKDAKRVGTDGVKRYNEVSLPNTTTTNGKTYYGVEVNGKAVDKYINAA NID M AY Y+K +R + S Y ++ +TT+NGKT +V+ D+Y+ A+N+
Sjt 5	311 MKKAYVYKKGEE-QSGSYAAVTRITYYGSTITRLDNGKTAIKVGD----DRYVMA8NVL 364
SlAa 60	GKRTLKHNAYVYASSKKRANKVVLKKGVEWTTYGASYTFKNGQKYYKIGDNTDKTYVKV 119 G R++HNAY+Y + +RAN VL+KG V TYG+ NG+ YY+IG YVKV
Sjt 5	365 GNSRVIRHNAVYVHAGRRANVVRVLRKGTVPKTYGSRFHI-NGKSYRIGKG--LYVKV 420
SlAa 120	ANF 122 ANF
Sjt 5	421 ANF 423

Figure 33: Homología de la secuencia primaria del fragmento C-terminal de la proteína S-layer con otras enzimas líticas, analizadas por *Blastp*

Expresión heteróloga de la proteína S-layer en *E. coli* JM109 y *Bacillus subtilis* 168

Para realizar el clonado del fragmento C-terminal de la proteína S-layer se diseñaron *primers* según la base de datos de nucleótidos secuenciados para la proteína S-layer A de *Lb. acidophilus* (Accession number X89375) los cuales se utilizaron para amplificar la porción del gen por PCR.

Se obtuvo un amplicón de 968 pb el cual fue clonado en el Vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y luego secuenciado; luego este fragmento se subclonó en el plásmido pHCMC05, el cual posee un promotor P_{spac} inducible por IPTG, Este se uso para transformar *Bacillus subtilis* 168 y *E.coli* JM 109.

El plásmido introducido en la *E.coli* JM109 mostró tener una alta inestabilidad, acompañado con un descenso en el crecimiento de las bacterias transformadas. En particular luego del agregado del inductor IPTG (Figura 34). Esto puede ser debido a un efecto letal del fragmento de la proteína que se deseaba expresar, asociado con la actividad que se esta describiendo en este capítulo.

Fue por esto que se decidió realizar la expresión heteróloga en *Bacillus subtilis* 168

Para la expresión heteróloga en este sistema bacteriano de la proteínas S-layer, las células fueron inducidas con 0.5 mM IPTG. El análisis de la expresión se realizo por zymograma y Western blot a distintos tiempos de inducción, luego de los cuales se confirmó tanto la expresión como la actividad lítica. (Figura 35)

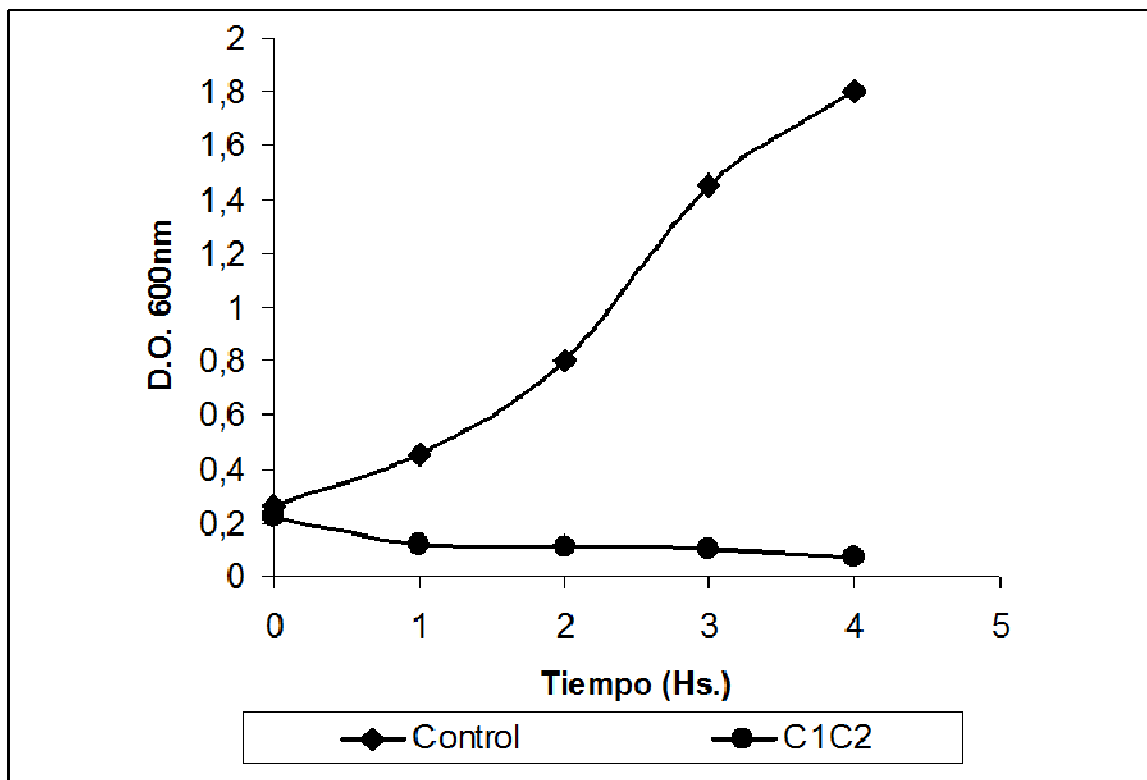


Figura 34: Curva de crecimiento de las *E.coli* JM109 transformadas con el plásmido pHCMC05 vacío y con el pHCMC05C1C2

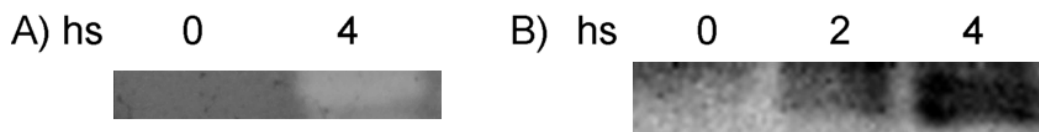


Figura 35: Expresión heteróloga

A) Zymograma del fragmento C-terminal el cual muestra una actividad lítica sobre la pared celular de *Salmonella* Newport

B) Western blot anti S-layer

Ambos en función del tiempo luego del agregado del inductor (IPTG 0.5mM)

La actividad de la proteína S-layer como una murein hidrolasa descrita aquí, puede explicar la dificultad de expresar esta proteína por otros autores (Boot *et al* 1993 1996), ya que la estructura del péptidoglicano

de *E. coli*, bacteria utilizada como huésped de expresión, resulto ser sustrato de la actividad lítica que hemos descrito.

La actividad murein hidrolasa que contiene la S-layer de *Lb. acidophilus* le confiere a este *lactobacillus* un arma de gran importancia para triunfar sobre sus competidores y sobrevivir.

La hidrólisis de la pared celular, puede prevenir la adhesión de microorganismos patógenos al epitelio intestinal, de hecho el *Lactobacillus acidophilus* ya es considerado probiótico, ya que esta descrito que excluye por competencia al lugar de adhesión a varios microorganismos patógenos. La presencia de la proteína S-layer posiblemente ayude a los *Lactobacillus* a triunfar en esta lucha, lo cual seria una característica mas que explicaría sus propiedades probióticas.

**RESULTADOS Capítulo 4:
“Efecto sinérgico de la
proteína S-layer con
nisina”**

Efecto sinérgico entre el antibiótico nisina y la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*

Los conservantes naturales que tengan acción contra bacterias Gram positivas y Gram negativas son de gran interés en la industria alimentaria. La nisina, es un pequeño péptido producido por *Lactococcus lactis* spp. *Lactis*, el cual tiene las características de una bacteriocina, también tiene un status GRAS (Generally Regarded as Safe; US 21CFR170.30-Food Additives) y es el único antibiótico autorizado para consumo alimenticio por la FDA (Food and Drug Administration) (Cleveland).

El mecanismo de acción antimicrobiano de la nisina se basa en la unión de este pequeño péptido a la membrana celular mediante interacción iónica de su porción C-terminal, luego de esto se produce la formación de poros que facilitan la penetración de la nisina. Finalmente ocurre una interrupción de la fuerza motriz de protones, y a la pérdida de material celular llevando a la lisis de la bacteria. La nisina también tiene un efecto contra Gram positivas en el cual remueve el lípido II que se encuentra en el sitio de división celular (septum) lo cual bloquea la síntesis de pared celular (Hasper .2006 Hyde 2006).

La eficacia de la nisina contra bacterias Gram negativas es mucho menor que lo reportado en Gram positivas, esto se debe a que la nisina carece de la habilidad de penetrar la membrana externa presente en microorganismos Gram negativos, esto los protege que el antimicrobiano acceda a la membrana interna y allí tener su efecto. Sin embargo la combinación de la nisina con otras moléculas, como la lactoferrina, ácido láctico o la monolaurina, tienen un efecto sinérgico que inhibe el crecimiento de ciertas especies de Gram negativas como *Escherichia coli* O157:H7 (Murdoc 2007, Tokarsky 2008).

La nisina actúa en concentraciones muy bajas, en el rango de nanomolar, y no tiene efecto tóxico contra humanos, lo que la coloca

en la posición de ser la única aceptado mundialmente para la conservación de alimentos.

En los ítems previos de esta tesis he descrito la función enzimática lítica que caracteriza a la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, la cual tiene un efecto de endo peptidasa contra la pared celular de *Salmonella enterica* serovar Newport (Prado Acosta 2008), también observamos que este efecto lítico no se producía en bacterias Gram positivas patógenas de alimentos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, fue por esto que nos preguntamos si esta proteína podía tener un efecto sinérgico con este antimicrobiano.

Este efecto permitiría bajar las concentraciones de nisina utilizadas para contrarlar el crecimiento bacteriano. La S-layer podría aumentar la eficacia de este antibacteriano contra Gram positivos y Gram negativos.

Efecto sinérgico contra Gram negativas

Anteriormente he descrito la actividad murein hidrolasa de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sobre la pared de la especie Gram negativa *Salmonella* Newport, también está descrito que dicha especie tiene una alta tolerancia a los efectos de la nisina, siendo su concentración inhibitoria mínima de 5000 IU/ml, esta concentración es de diez veces más que la utilizada contra bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus*.

Fue por esto que decidimos probar la combinación de S-layer con nisina como un nuevo tipo de control del crecimiento bacteriano.

En concentraciones de la mitad de la CIM de nisina no hubo efecto en el crecimiento, pero cuando esta fue combinada con la s-layer hubo un claro efecto de inhibición en el crecimiento. (Figura 36)

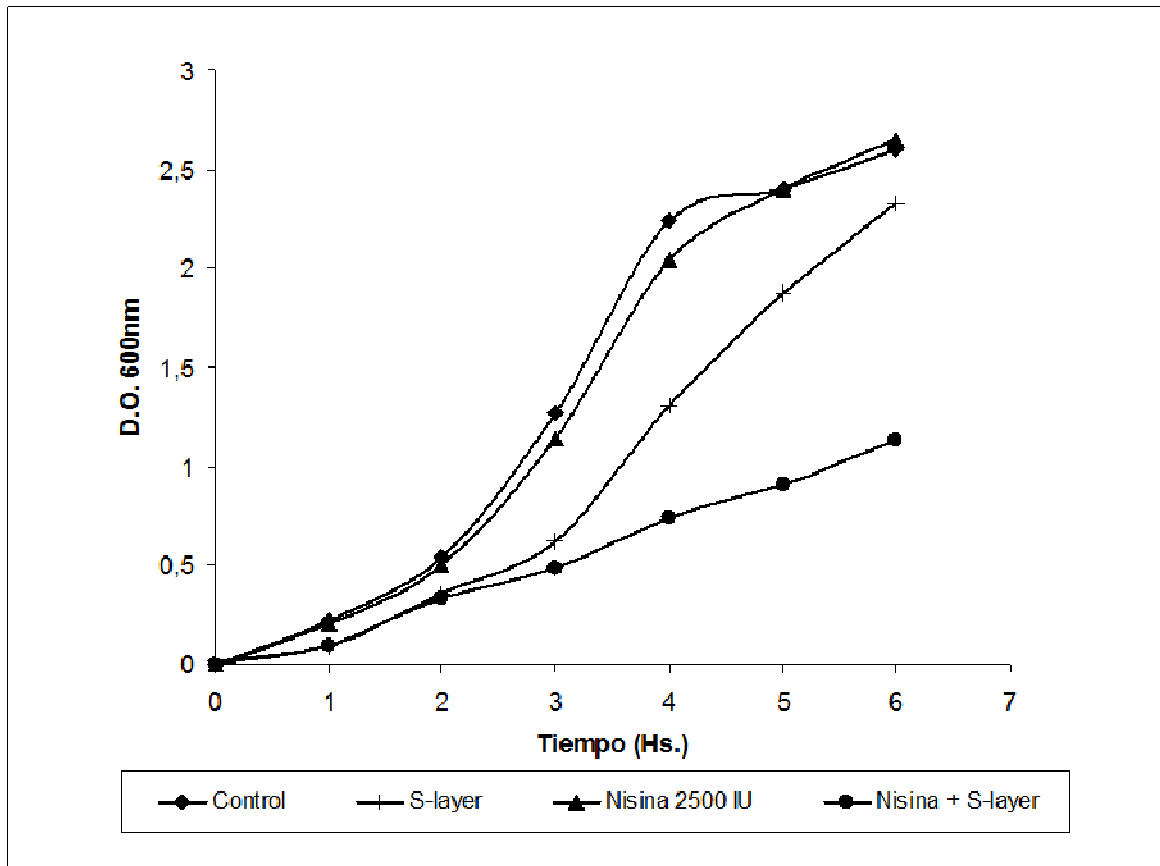


Figura 36: Efecto de la nisina, de la S-layer y de la combinación de ambas sobre *Salmonella* Newport

A pesar que anteriormente hemos descrito que en sistema de buffer se observa una clara lisis de células enteras de *Salmonella* con el agregado de S-layer, este efecto no se observó cuando se incubó las células en crecimiento exponencial en un medio de alto contenido nutritivo en medio rico como es el LB. La integridad de la proteína S-layer fue verificada por Western blot (Figura 37), mostrando que la proteína se mantiene estable luego de 8 horas de incubación con células enteras de *Salmonella*. Estos experimentos nos llevaron a especular que las células *Salmonella* en activa división podrían liberar al medio un inhibidor de la S-layer, protegiéndose así de la actividad murein hidrolasa de la proteína, también podría liberarse algún inhibidor de la nisina. Otra posibilidad es que la velocidad de división de la *Salmonella* sea mayor a la lisis provocada por la S-layer por lo cual es imposible notar la

lisis, tanto por seguimiento en los cambios de densidad óptica, como en el recuento de células viables.

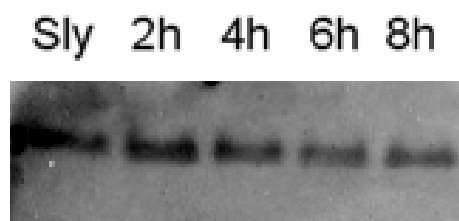


Figura 37: Western blot de la proteínas S-layer luego de la incubación en presencia de células enteras de *Salmonella Newport enterica*.

Efecto sinérgico contra Gram positivas

A pesar de no ver efecto lítico de la S-layer sobre bacterias Gram positivas nos preguntamos si el mismo resultado sinérgico que se obtuvo en *Salmonella*, podría repetirse en bacterias Gram positivas.

Para esto escogimos dos patógenos alimenticios cuyo control de crecimiento es de gran importancia para la industria de alimentos. Los elegidos fueron *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de nisina fueron calculadas para ambas cepas (Tabla 1), los resultados calculados fueron coherentes con los resultados esperados. A partir de estos se utilizó la mitad de la CIM para los siguientes experimentos

Cepa	CIM
<i>Bacillus cereus</i>	550 IU/ ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	310 IU/ ml

Tabla 1: Concentración Inhibitoria Mínima calculada para cada especie

Efecto en *Bacillus cereus*

Para investigar el efecto sinérgico se efectuaron experimentos de crecimiento similares al que se realizó para *Salmonella*.

Aquí no se observó efecto alguno en el crecimiento cuando la S-layer fue empleada sola. Cuando se utilizó solamente la nisina a la mitad de la CIM, se observó un retraso en la velocidad de crecimiento, pero un efecto drástico se observó cuando ambas fueron usadas en combinación (Figura 38). El agregado de ambas a un cultivo en crecimiento en un medio rico en nutrientes inhibió completamente el crecimiento de la cepa de *Bacillus cereus*

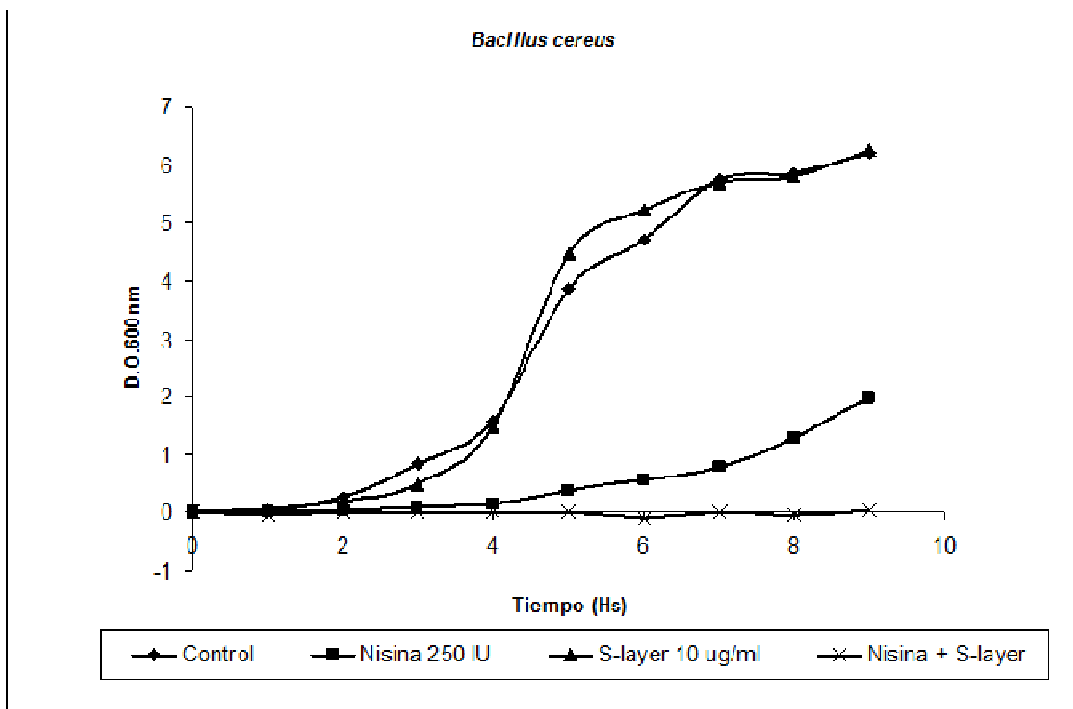
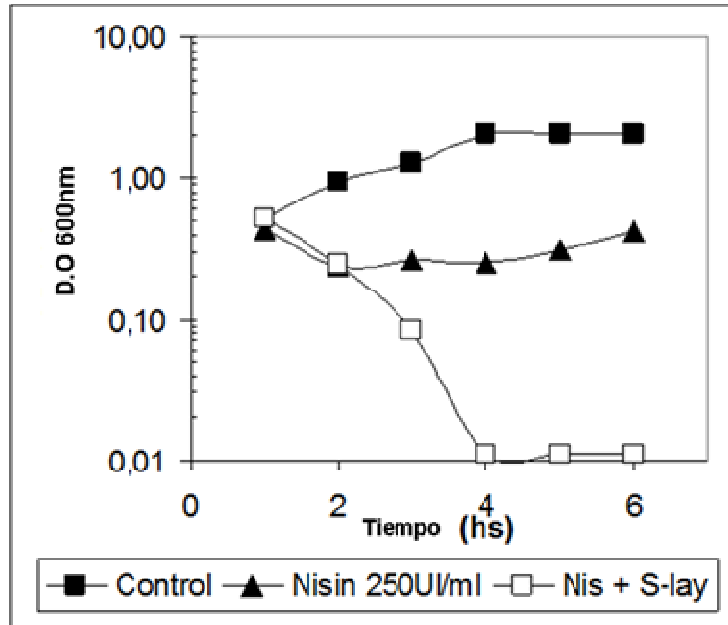


Figura 38: Efecto de la S-layer, nisina o ambas en el crecimiento de *Bacillus cereus*

Para seguir caracterizando este efecto entre el antimicrobiano y la proteína S-layer proveniente del *Lactobacillus* sobre *Bacillus cereus* se siguió la densidad óptica de células viables así como también se efectuó un recuento de colonias. Se observa en la Figura 39 que ocurre

un efecto lítico casi inmediato en la presencia de ambos compuestos incubados con *Bacillus cereus*. En la Figura 39A, se observa que el descenso en la densidad óptica es drástico hasta llegar a la lisis total del contenido bacteriano. El mismo resultado se observa en el recuento de células viables de la Figura 39B

A



B

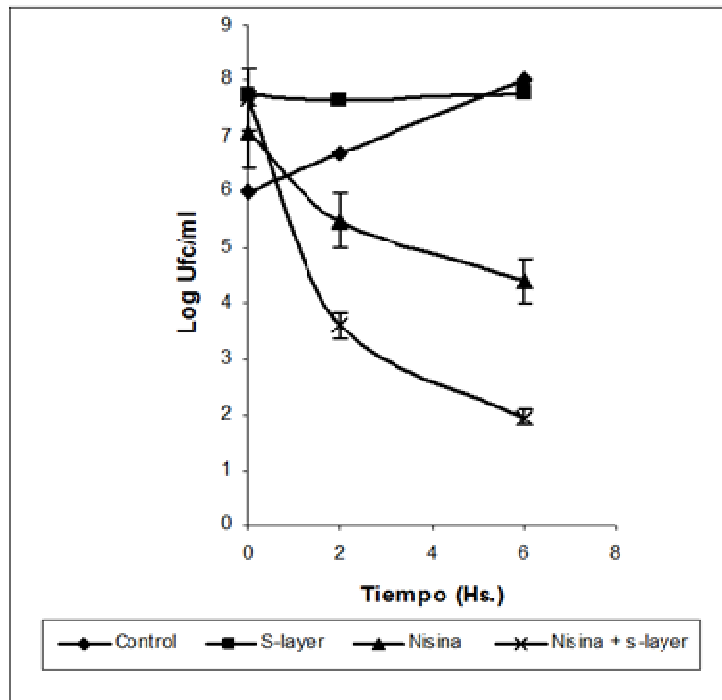


Figura 39: A: Seguimiento del crecimiento de *Bacillus cereus* por densidad óptica luego del agregado de los compuestos
B: recuento de células viables de *Bacillus cereus*

El efecto sinérgico que tiene los dos compuesto es claro en células en activa división de *Bacillus cereus*, también se observó que este efecto es casi inmediato. Con la ayuda de la S-layer se logro bajar hasta más de un 50% la concentración inhibitoria minima del antibiótico.

Las enfermedades mas comunes que son transmitidas por este *Bacillus* son en general intoxicaciones con vómitos, los cuales son causados por la ingestión de una toxina producida por este microorganismo llamada cereulida y que es preformada en el alimento. También puede causar una infección diarreica por la ingestión de células/ esporas bacterianas que producen enterotoxinas en el intestino delgado.

Debido a esto son de una gran preocupación en la industria alimentaria, el efecto sinérgico descrito podría ser usado como una nueva arma contra este patógeno

Efecto en *Staphylococcus aureus*

Para comprobar el efecto en otro microorganismo se realizaron experimentos similares a los descritos anteriormente, pero esta vez con *stapylococcus aureus*.

La acción conjunta de la proteína S-layer con la nisina también es eficaz contra *S. aureus*, se eligió esta bacteria debido a que la presencia de esta en animales tiene como consecuencia la contaminación de los alimentos, principalmente de leche obtenida de animales infectados. La toxina producida por *S. aureus*, es una toxina resistente a la temperatura. Los síntomas mas comunes asociados a la infección con *staphilos* son náusea, vómito, cólico abdominal y postración.

Cuando se monitoreó el crecimiento en un medio rico (BHI) se observó un claro descenso en el crecimiento cuando ambos compuestos se encontraban juntos (Figura 40); el mismo efecto que en *Bacillus cereus*.

Al igual que en el caso anterior se utilizó la mitad de la CIM calculada para realizar todos los experimentos.

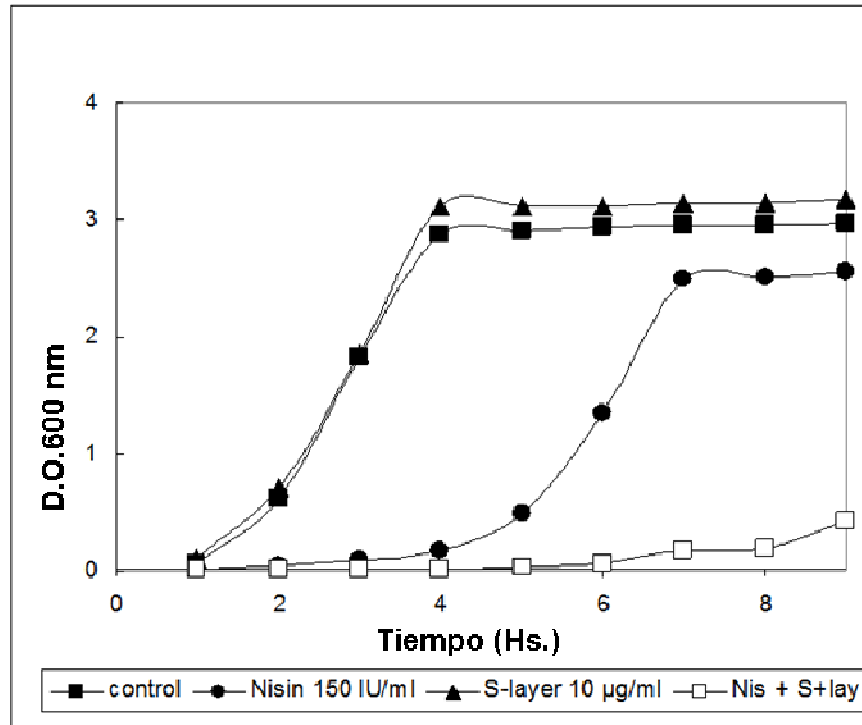
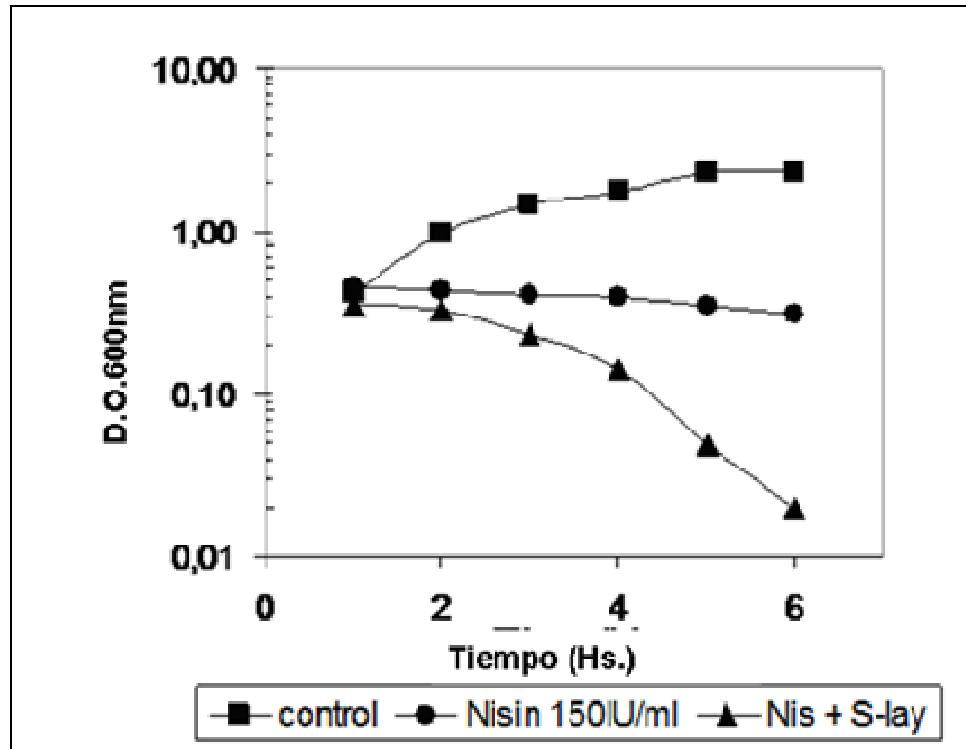


Figura 40: Crecimiento de *Staphylococcus aureus* luego del agregado de los diferentes compuestos

Cuando se verificó si el efecto de ambos compuestos era bacteriolítico se observó un periodo de atraso hasta la lisis total del cultivo, esto se observó tanto en el seguimiento por densidad óptica como en el recuento de células viables. (Figuras 41 A y B respectivamente)

A



B

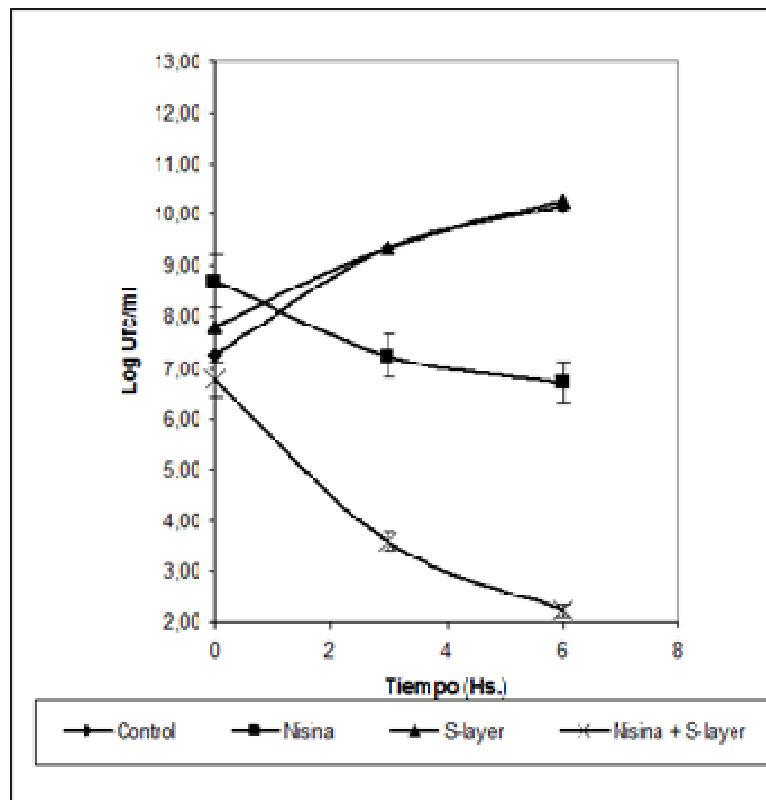


Figura 41: A: Seguimiento del crecimiento de por densidad óptica luego del agregado de los compuestos

B: recuento de células viables de *S. aureus*

Este periodo de retraso que se observó solo en esta especie en particular, esto fue atribuido a la característica de este microorganismo de formar agregados de células en forma de racimos, esto podría retrasar el efecto de la actividad murein hidrolasa de la S-layer. Para verificar esto se tomaron fotos con microscopio de las células a distintos tiempos, lo que se observó fue que durante el periodo de retardo de la lisis las células se encuentran agregadas. Pasadas dos horas, las células se encuentran completamente desagregadas, una vez alcanzada esta etapa los dos compuesto logran alcanzar el efecto descrito (Figura 42)

Mecanismo de acción de la S-layer en el efecto sinérgico con nisina

Sabemos que el mecanismo de acción de la Nisina esta basado en la desarticulación de la fuerza protón motriz en la membrana bacteriana a la cual se une. Para verificar que el efecto sinérgico que ejerce la proteína S-layer de alguna forma esta relacionado con la disipación de la fuerza protón motriz (FPM) causada por la nisina, se remplazó a la nisina por un desacoplante de la FPM. Se utilizó el carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) y se realizaron los experimentos de crecimientos de forma equivalente a los anteriores. Los resultados se muestran en la Tabla 2, donde se observa un efecto similar entre Nisina y CCCP.

También se realizaron curvas de crecimiento con nisina y proteína S-layer inactivada. Esto se realizó para comprobar si el efecto que me encuentro describiendo esta relacionado con la actividad murein hidrolasa que describí en el capítulo dos. El resultado mostró que la S-layer inactivada es incapaz de inhibir el crecimiento bacteriano (Tabla 2) esto confirma la importancia de la actividad hidrolítica en el efecto con nisina, mas aun cuando la nisina y la S-layer actuando por separado muestran una inhibición del 22% o del 0% respectivamente, mientras que juntas la inhibición llega hasta un 90%.

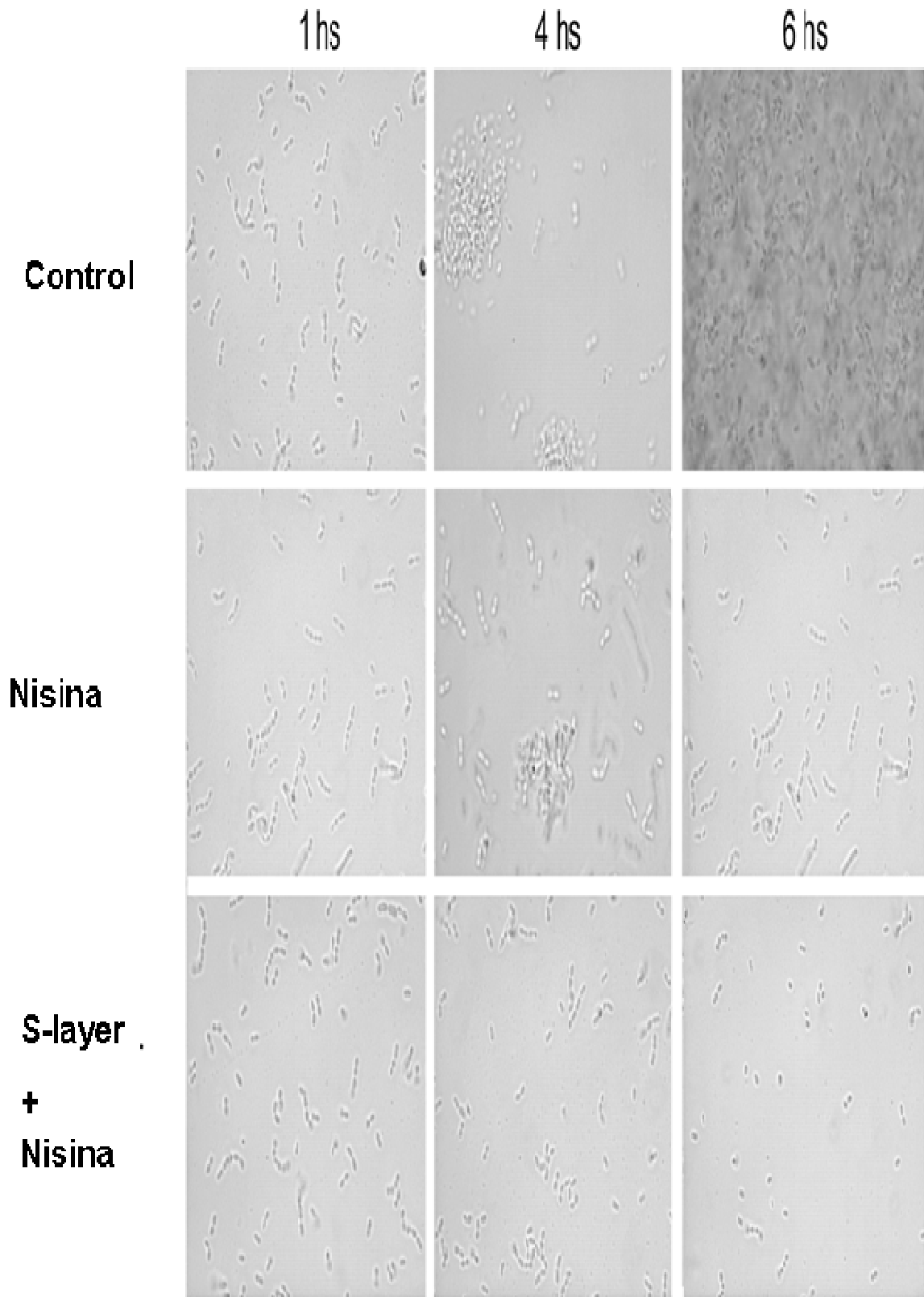


Figura 42: Observación microscópica de cultivos celulares tratados con los diferentes compuestos (Olympus BX51 microscope, 1000X).

Condición de Crecimiento ^a	DO _{600nm} Final	μ (h ⁻¹)	% inhibición ^c
Control	2.6	0.48 ± 0.02	0
Nisin 150 IU/ml	2.2	0.37 ± 0.01	22
S-layer 10 µg/ml	2.6	0.49 ± 0.02	0
Nisin 150 IU/ml + S-layer 10 µg/ml	0.7	0.05 ± 0.01	89
S-layer heat inactivated ^b	2.8	0.53 ± 0.02	<< 0
S-layer heat inact. + Nisin 150 IU/ml	2.5	0.42 ± 0.02	12
CCCP 50 µM	0.9	0.11 ± 0.01	77
CCCP 50 µM + S-layer 10 µg/ml	0.4	0.04 ± 0.01	92
CCCP 25 µM	1.2	0.21 ± 0.01	56
CCCP 25 µM + S-layer 10 µg/ml	0.6	0.11 ± 0.01	77

Tabla 2: Efecto sinérgicos de distintos compuestos

^a Cultivos de *Staphylococcus aureus* fueron crecidos como se describió en los experimentos anteriores y a los cuales se le agregó los distintos compuestos en las concentraciones indicadas. Las curvas de crecimiento dieron los datos presentes en la tabla, tanto la DO final a 600nm y la velocidad de crecimiento μ (h⁻¹).

^b La proteína inactivada se obtuvo calentando la S-layer a 60°C por 2 horas

^c PEI porcentaje de inhibición se realizó calculando la relación entre el control y los distintos tratamientos.

Para continuar caracterizando el mecanismo de acción realizamos algunos controles, por un lado se realizó un zymograma de la proteína S-layer inactivada por calor (Figura 43 carril 3), en este se observó que la proteína pierde totalmente su actividad hidrolítica sobre la pared bacteriana, pero en los análisis por Western y SDS-PAGE no se mostraron cambios, este resultado corrobora la alta estabilidad de la proteína.

Por otro lado se corrieron proteínas S-layer que fueron puestas en contacto con Nisina antes y después de la purificación de las mismas (Figura 43, carriles 2 y 4). Esto se hizo para descartar que la Nisina y la proteína formasen algún tipo de complejo, o bien que la Nisina cambie la conformación de la proteína y sea por esto que ocurra el efecto de sinergismo. Se observó tanto en el Western como en el zymograma que ninguno de los tratamientos afecta la movilidad electroforética de la proteína ni la actividad murein hidrolasa.

Descartamos entonces la posibilidad de que la Nisina esta ejerciendo algún efecto sobre la S-layer, y que el efecto de sinergismo se debe a la actividad murein hidrolasa que posee esta proteína.

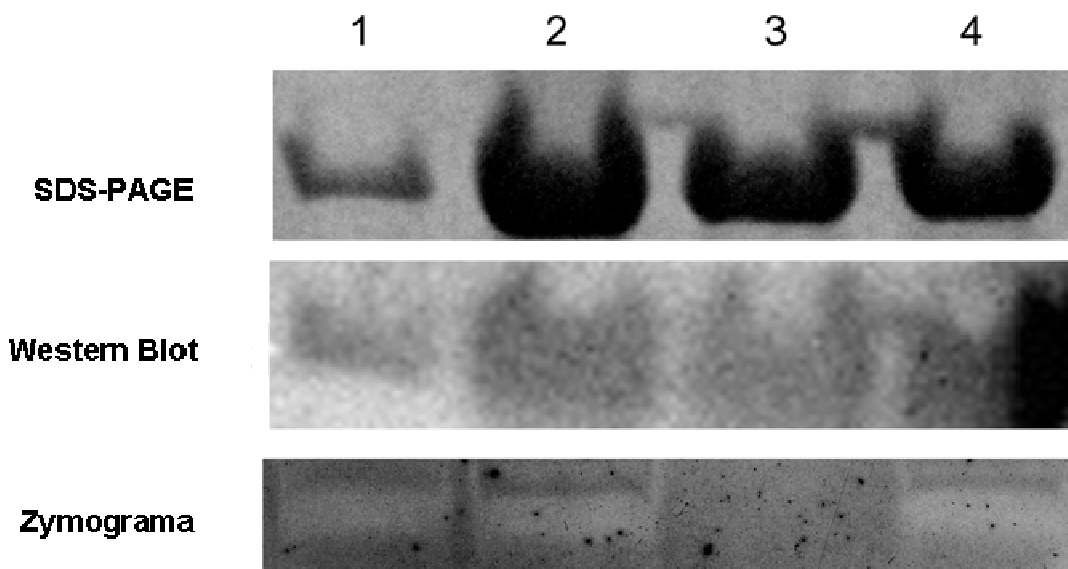


Figura 43: Controles sobre el mecanismo de acción de la proteína S-layer para esto se realizó un Western Blot un SDS-PAGE y un Zymograma, en el carril 1 se sembró la proteína S-layer control purificada con cloruro de litio. En el carril 2 se incubó a *Lb acidophilus* con Nisina por 1 hora y luego se purificó la proteína. En el carril 3 se sembró la proteína inactivada por calor. En el carril 4 se purificó la proteína S-layer y luego se la incubó con la Nisina por 1 hora

La aparición de resistencia a antibiótico en diferentes especies bacterianas debido a la administración de estos en casos clínicos, veterinarios y de ganadería llevaron a la reducción de la eficacia de estos, lo que hizo necesario la búsqueda de alternativas para el control del crecimiento bacteriano no deseado.

Es por esto que se buscan compuestos que puedan auxiliar la emergencia a estas resistencias, la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* tiene todas las características buscadas para esta tarea, ya que las hidrolasas de la pared bacteriana son candidatos muy promisorios,

Otra ventaja de la utilización de *Lb. acidophilus* es que esta cepa posee características probióticas, sumado a que en su pared se encuentre la S-layer la cual posee todas las características descritas.

En nuestros experimentos hemos encontrado un resultado de suma importancia, en primer lugar la combinación de compuestos inhibe el crecimiento microbiano, y en segundo lugar, y quizás de mayor importancia, la combinación también es capaz de lisar las células en cultivos pre-crecidos, eliminando así los patógenos Gram positivos.

Esta combinación, parece tener todas las características para proveer nuevo y eficaz agente anti bacteriano.

DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

En este trabajo he caracterizado en parte a la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* distinguiendo un dominio C-terminal con actividad murolítica sobre paredes bacterianas lo que provee a este microorganismo de una nueva función biológica.

Este trabajo aporta conocimientos básicos y de importante aplicación en cuanto a las propiedades de esta bacteria relacionadas con la presencia de esta particular envoltura y sus propiedades probióticas.

Estructura, dominios y actividad enzimática de la proteína S-layer

La proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee dos dominios (Smit *et al*, 2001), el N-terminal el cual abarca aproximadamente dos tercios de la proteína total y el resto pertenece al C-terminal. En la Figura 44 se muestra un esquema de la organización de la proteína nombrada.

En la proteína S. layer de *Lactobacillus acidophilus* no se encuentran motivos SLH, los cuales en otras especies sirven de anclado a la pared, es por esto que se propone que la interacción entre la proteína y la pared celular esta mediada por los aminoácidos básicos que cargan a la proteína positivamente y las cargas negativas de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la pared celular (Schaffer *et al*, 2005).

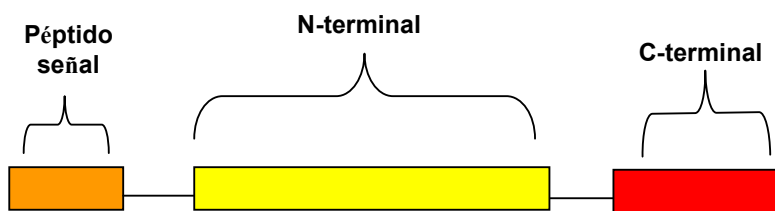


Figura 44: Estructura de los dominios de la proteína S-layer

Esta descrito entonces que la región N-terminal es la responsable de la unión a las envolturas, mientras que la C-terminal esta encargada del auto-ensamblado entre proteínas y es el que se encuentra en el lado externo a la bacteria.

En esta proteína S-layer hemos hallado una nueva actividad no antes descrita. Esta novedosa actividad se basa en la capacidad endopeptidasa de la S-layer. Esta actividad le permite romper la ramas de aminoácidos que unen al esqueleto de azúcares en el peptidoglicano de la bacteria blanco. Esta actividad, murein hidrolasa, solo fue descrita para otra S-layer en *Bacillus anthracis* (Ahn *et al*, 2006). Las enzimas del tipo hidrolasas de murein o peptidoglicano componen una gran familia la cual tienen una diversidad de roles dentro de la célula procariota.

Estas enzimas pueden ser clasificadas según su mecanismo de acción en 4 categorías (Borysowsky *et al*, 2006 ; Loessner *et al*, 2005):

- Muramidases de acción similar a la lisozima, las cuales rompen el enlace que une a los azúcares N-acetil-glicosamina y N-acetil-murámico.
- Trasglicosilasas líticas, las cuales atacan el mismo enlace que las del ítem anterior pero provocan, además una transferencia molecular de un residuo O-murámico.
- N-acetilmuramyl-L-alanina-amidasa, la cual ataca la unión entre el residuo N-acetil-murámico y la alanina
- Peptidasas, las cuales atacan las uniones entre las cadenas de aminoácidos.

Las enzimas mencionadas están relacionadas con la separación de células hijas, cambios en el peptidoglicano, autólisis, formación de esporas y lisis inducida por antibióticos. Sin embargo también son de gran importancia en la respuesta adaptativa a diferentes condiciones ambientales (Palomino *et al*.2009).

La actividad descrita se encontró en el dominio C-terminal de la proteína. No es curioso que este dominio sea el que posee la actividad ya que es el que se encuentra en contacto con la parte exterior de la bacteria. En la Figura 45 se muestra un esquema de la estructura de la proteína y de su disposición sobre la pared celular. La formación de

arreglos regulares sobre la pared puede explicarse por una oligomerización de la proteína a través de los dominios N-terminales. La oligomerización de dominios, tanto de dominios iguales como de dominios opuestos, se da por la secuencia de aminoácidos y las interacciones entre cargas de estos.

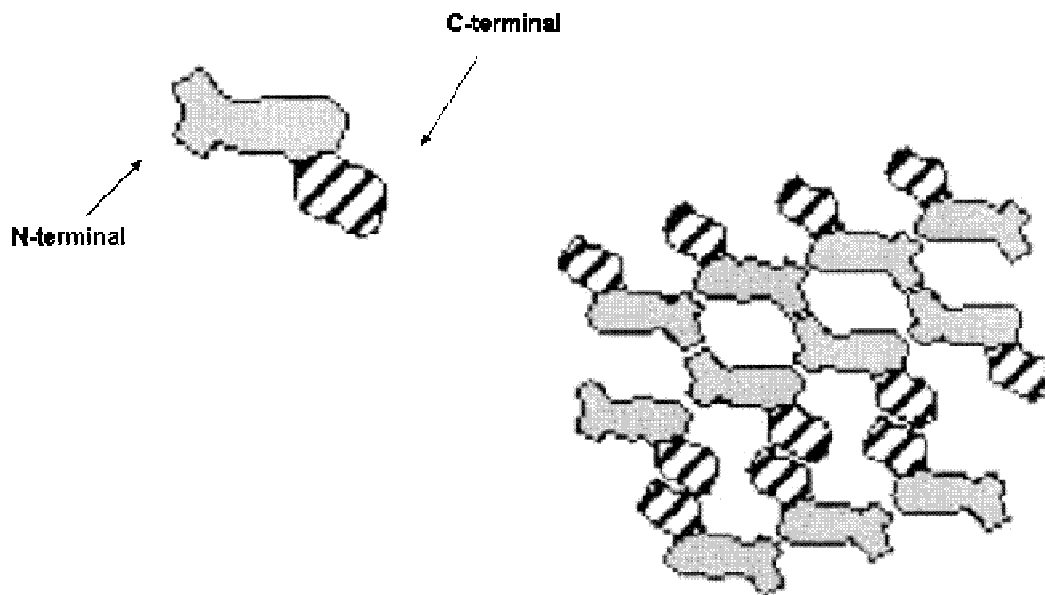


Figura 45: Modelo de la organización estructural de la proteína S-layer, donde se muestran los dos sub-dominios y la interacción entre proteínas para formar el arreglo final que poseen en la pared celular de *Lactobacillus acidophilus*

Cuando se realizaron los estudios de secuencia se pudo comprobar que el dominio C-terminal se encuentra conservado en especies de *Lactobacillus* relacionadas, como *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus crispatus*. Si bien aún no se ha probado que las proteínas S-layer de estas bacterias posean la misma actividad que la descrita en este trabajo, en vista de la extensa homología encontrada, sería importante evaluar si poseen una actividad murein hidrolasa.

Sinergismo con nisina

Las proteínas S-layer son sintetizadas en el citoplasma bacteriano para luego anclarse en la pared celular de las mismas. Estas claramente deben tener un sistema por el cual sean capaces de atravesar la pared bacteriana y la actividad murein hidrolasa puede ser esencial en este proceso. Durante los experimentos hechos en esta tesis comprobamos que la S-layer no posee actividad sobre si misma. Pero si pudimos comprobar que puede actuar sinérgicamente con un antimicrobiano.

En este trabajo se utilizo la nisina, la cual tuvo un efecto sinérgico con la actividad murein hidrolasa de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*.

La nisina es un péptido catiónico cuyo mecanismo de acción se basa en la formación de poros, que lleva a la dispersión del potencial de membrana y el flujo del contenido citoplasmático hacia el espacio extra celular. La nisina actúa sinérgicamente con diferente compuestos en particular con la S-layer de *Lb. acidophilus*. Sin embargo pese a que esta bacteria sintetiza compuestos parecidos a nisina, no se observa lisis sobre ella misma indicando la necesidad de otro factor que sea capaz de interrumpir la fuerza motriz de protones, para que la S-layer pueda llevar a cabo la acción de lisis y es el rol que tendría la nisina.

Este fenómeno de complementación entre una actividad murein hidrolasa y un elemento de dispersión de la fuerza protón motriz se encuentra bien descrito en bacteriófagos, donde estos tienen un sistema llamado holina-lisina (Nascimento, *et al* 2008). En este sistema la holina crea agujeros desde dentro de la célula bacteriana, permitiendo que las lisinas del fago alcancen el peptidoglicano para producir la lisis, permitiendo la liberación de bacteriófagos (Figura 46). Estos eventos se dan si y solo si ocurre una disipación no especifica de iones, que es causada por la proteína holina del fago, pero esta disipación también puede ser producida por un péptido como la nisina.

Si bien este mecanismo está descrito para que funcione desde dentro de la célula bacteriana hacia fuera, el grupo de Stepnaya describe la acción de una endopeptidasa de un bacteriófago que actúa en forma análoga a las anteriores, pero esta tiene su mecanismo desde fuera de la bacteria hacia adentro (Mikoulinskaia *et al*, 2009). La S-layer mostró homología con esta proteína cuando se las alineó con el programa *ClustalW*.



Figura 46: Modelo de la interacción del modelo Holina-Lisina que se propone como análogo al patrón que tendría el efecto sinérgico la nisina con la proteína S-layer

En el caso del efecto que tienen la S-layer más la nisina, para que la nisina pueda actuar de forma más efectiva, la nisina estaría actuando de manera análoga a la holina generando la disrupción de la fuerza protón motriz en la pared bacteriana blanco, esto ayuda a que la S-layer genere poros en el peptidoglicano y por consiguiente la lisis.

Es por esto que las bacterias Gram positivas son insensibles a la S-layer, ya que para la disipación del gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática es necesaria un efecto sinérgico con la nisina, pero no es suficiente para que la bacteria sea sensible a la S-layer.

Surge así la preguntas sobre la posibilidad que tiene *Lb. acidophilus* de utilizar este sistema para exportar su propia S-layer. Esta bacteria es una

productora de bacteriocinas (Barefoot *et al*, 1983) y entre los antibacterianos que esta produce se encuentra la lactacina. La expresión de este antibacteriano es regulado por la presencia de otras bacterias en su medio ambiente, (Barefoot *et al*, 1994). También se produce un aumento del antimicrobiano cuando la cepa La-5 de *Lactobacillus acidophilus* sensa la presencia de otras bacterias a su alrededor (Tabasco *et al*, 2009).

La producción de estas bacteriocinas podría estar involucrada en la localización de la proteína en la pared, utilizando un sistema similar al de la holina-lisina que poseen los bacteriofagos y que utilizan para salir de la bacteria.

No obstante el modelo que se propone aquí debería estar altamente regulado, recordemos que el conjunto de la proteína S-layer representa hasta un 25% de la proteína total de la célula. Si esto no fuese así, la bacteria correría el riesgo de explotar debido al desbalance osmótico provocado por los poros generados por la misma proteína.

También surge como cuestión a analizar el origen de los genes de la S-layer, ya que estos podrían tener origen en algún profago que se insertó en el cromosoma bacteriano y que sirvió como ventajoso. Con frecuencia las Holinas son codificadas por genomas de bacteriófagos, pero también pueden encontrarse en genomas bacterianos, de hecho se encontró en *Lb. acidophilus* NCFM (Kleerebezem *et al*, 2010). Es bueno recalcar que en el caso de la S-layer se verifica la localización de la actividad enzimática endopeptidasa en el dominio C-terminal, mientras que en bacteriófagos esta actividad se encuentra en el N-terminal (Fischetti *et al*, 2008).

Regulación y expresión de la proteína durante el estrés osmótico

En *Lactobacillus acidophilus* se encuentran dos genes de proteína S-layer, el *slpA* el cual se transcribe activamente y un gen silencioso el *slpB*, el cual se encuentra en orientación opuesta al A. El gen *slpB* solo se

19 del capítulo 2 de resultados, el tamaño mas alargado y filamentoso de la célula conlleva una mayor superficie de pared, también se observó que la proteína S-layer se encuentra mas suelta en la pared de células crecidas en alta sal.

Todo esto se vio acompañado con una sobre-expresión del gen de la proteína S-layer: se observó que en un medio con 0,7 M de NaCl, el gen estaba inducido hasta 60 veces mas que en el control. Esto se debe en primer lugar a que la bacteria necesita a esta proteína para poder sobrellevar el estrés que le produce el medio, también la célula tiene un mayor superficie de pared, por lo cual debe sintetizar mas proteína y por último esta se encuentra mas suelta por lo que se pierde mas al medio, otra razón para sobre-expresarla.

Por otro lado se vio que la presencia de la proteína S-layer es fundamental para que la célula pueda crecer en un medio con alta sal, ya que sin esta la bacteria no era capaz de propagarse (ver resultado Capítulo 2).

Podría estar sucediendo en este caso de estrés que en lugar de estar traduciéndose un solo gen de la proteína estén haciéndolo los dos, y a esto se deba el aumento de expresión de la misma. Se describe en microorganismo como *Bacillus anthracis* (Kern *et al*, 2010) que según las condiciones del medio se expresan diferentes S-layers. Esto podría estar ocurriendo en el caso de *Lactobacillus acidophilus*, el estrés osmótico podría estar generando el re-arreglo del ADN o activación de un promotor críptico que llevaría a la expresión del gen de la proteína SlpB. También notamos que, si bien ambas proteínas son prácticamente iguales, las mayores diferencias se encuentran en el dominio N-terminal, este como dijimos anteriormente, esta involucrado en el anclaje a la pared celular, una diferencia en estos podría llevar a que la proteína S-layer SlpB este menos sujeta a la pared, lo cual explicaría el resultado en el cual hallamos mayor cantidad de proteína en el medio cuando las bacterias crecen en alta concentración salina.

En cuanto al promotor de los genes de S-layer, se reportan dos potenciales promotores, ambos poseen regiones ricas en A y T en las posiciones -10 y - 35 y solo el primer promotor esta activo. No se sabe todavía en que condiciones el segundo promotor se pone en actividad, pero la respuesta a estrés podría ser una posibilidad. Tampoco se descarta el uso de factores Sigma alternativos como elemento de control, si bien esto aún no ha sido explorado en profundidad en lactobacilos.

Estas evidencias demuestran que la proteína S-layer esta involucrada en muchos factores de gran importancia para la célula: en la adhesión al hospedador y el mantenimiento de la estructura de la bacteria. En nuestro trabajo también pudimos comprobar que esta involucrada a una tolerancia al estrés y esta relacionada con la competencia con otras bacteria de su hábitat.

Debido a la importancia que esta proteína posee es lógico que sea tan dificultoso obtener una mutante nula, no solo en la especie *Lactobacillus acidophilus* sino también en muchas otras especies y genero que poseen esta clase de proteínas.

Aspectos de potencial aplicación

Lactobacillus acidophilus es la bacteria dominante en el intestino delgado, donde se hace la mayor parte de la digestión, y es considerado probiótico. El termino probiótico significa "a favor de la vida". Estas bacterias son muy necesarias a la hora de mantener la salud intestinal y general, ya que constituyen la primera línea de defensa de nuestro cuerpo contra los microorganismos potencialmente dañinos que se ingieren.

Entre las propiedades que los probióticos poseen se encuentran la mejora de la digestión, al colaborar en la producción de enzimas digestivas. La flora intestinal afecta el funcionamiento del sistema inmunológico, el metabolismo del colesterol, y esta relacionada con la

prevención de la carcinogénesis y el envejecimiento por lo tanto un aporte de probióticos beneficia toda la salud general del individuo, ya que garantizan el equilibrio de la misma.

Durante su metabolismo produce ácido láctico y ácido acético los cuales crean una alteración del pH que funciona como un antiséptico del sistema digestivo y al mismo tiempo minimiza la proliferación de organismos dañinos, al competir por nutrientes.

Por otro lado la presencia de S-layer le permite el alojamiento y la adhesión a las paredes intestinales (Xu *et al*, 2009).

La eficacia de ambas propiedades le permite desplazar la flora patógena por competencia por los sitios de adhesión. Por lo tanto durante un tratamiento con antibióticos son importantes para mantener una “buena flora” y es eventualmente necesario administrarlas como refuerzo.

Lactobacillus acidophilus también tiene otras características que le dan las propiedades probióticas, tales como inducir el funcionamiento del sistema inmunológico y esta relacionada con el metabolismo del colesterol (Younghoon *et al*, 2008) y la prevención del cáncer (Konstantinov *et al*, 2008). Todas tienen que ver con la mera presencia de la bacteria en la flora intestinal. Cabe pensar entonces que estos beneficios pueden estar también relacionados con la presencia de la proteína S-layer, ya que esta es la primera barrera de interacción entre la bacteria y las células del intestino en el cual se alojan.

El tracto gastro-intestinal determina la co-existencia de diferentes tipos de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas; ambas deben sobrevivir a alto stress osmótico, gradientes de pH, condiciones anaerobias y variabilidad nutricional, todos estos factores generan una competencia para sobrevivir en el mismo nicho ecológico.

La presencia de S-layer con una propiedad de murein hidrolasa que le permite hidrolizar la pared de ciertos patógenos, le confiere a esta bacteria un instrumento que le permitiría sobrevivir en una competencia con *Salmonella*. El hecho de ver aumentada la producción y la

secreción al medio de S-layer durante un estrés debería aumentar su competitividad ya sea por el aumento de la adhesión y por el efecto de la S-layer como agente inhibitorio de sus competidores.

Por otro lado tanto *Salmonella* como *Escherichia coli* y otras bacterias Gram negativas relacionadas, son patógenas del hombre y se alojan en el intestino, el cual es el nicho de *Lactobacillus acidophilus*. En el capítulo 3 de resultados se mostró la sensibilidad de la pared de estas bacterias a la actividad enzimática presente en la S-layer.

Esta propiedad hidrolítica contra las células de bacterias patógenas podría ser agregada a la lista de propiedades por las cuales este *Lactobacillus* es considerado probiótico y sería una de las razones por la cual tiene la característica de oponerse al asentamiento de flora patógena en el intestino humano.

Esta actividad se encontró en la porción carboxi-terminal de la proteína que estamos describiendo, esto sería coherente, ya que la porción amino-terminal es la que se encuentra comprometida al anclaje a pared, dejando expuesta la otra parte de la proteína al medio externo permitiéndole interactuar con el ambiente que rodea a la célula. Fue justamente esta porción la que mostró gran homología con otras lisinas y endolisinas del género *Lactobacillus*, en especial una de ellas llamó nuestra atención. La proteína S-layer posee homología con la proteína Lyt A de *Lactobacillus crispatus*, esta proteína es una N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa, enzima encargada de catalizar la reacción química que cliva la unión entre los residuos N-acetylmuramoyl y residuos L-aminoácido presentes en algunas paredes celulares bacterianas. En la figura 32 del capítulo 3 de resultados vemos un aumento en la concentración de alaninas libres. Este resultado es coherente con la homología encontrada con LytA, sin embargo hay una diferencia, ya que mientras LytA cliva entre el azúcar y la alanina, la S-layer no deja extremos reductores libres en los azúcares, pero sí estaría cortando entre las alaninas presentes en las ramas de aminoácidos presentes en el peptidoglicano.

En la figura 48 propongo un modelo de lo que podría estar ocurriendo cuando *Lactobacillus* y *Salmonella* se encuentran juntos, tanto en experimentos de co-cultivo, como en un nicho ambiental compartido. Aprovechando la propiedad murein hidrolasa de la proteína, el segundo paso fue pensar una manera de poder aplicar esta propiedad de una con mayor eficiencia.

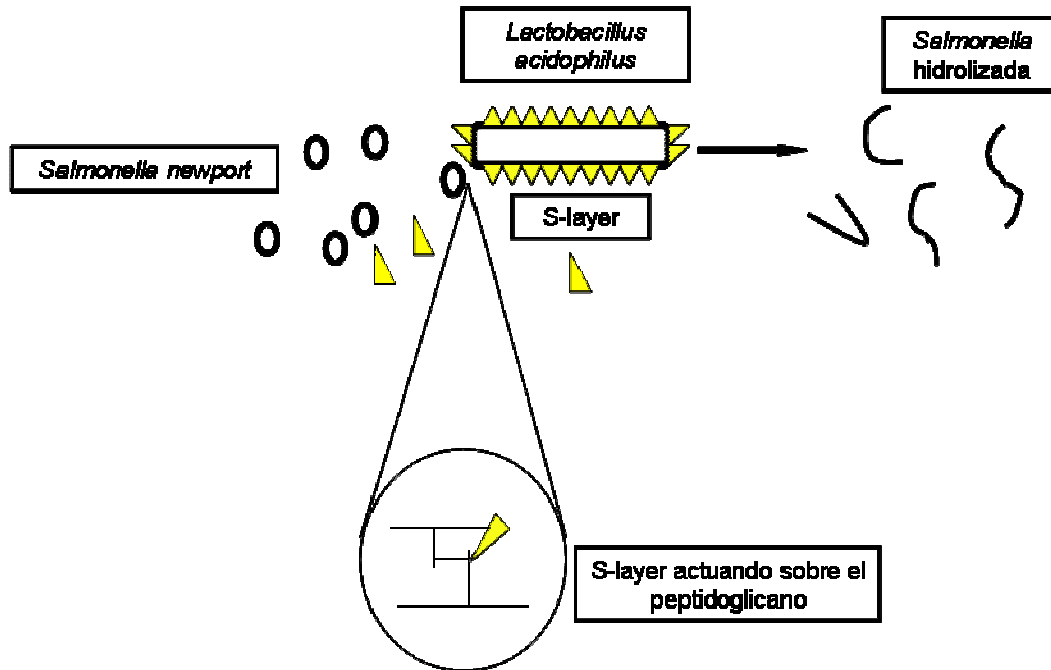


Figura 48: Esquema de el mecanismo de acción de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* sobre la pared del *Salmonella Newport*

Una de las metas en la industria alimentaria es mantener los alimentos libres de bacterias patógenas que pudiesen causar enfermedades en especial al ser humano. Con este objetivo fue que probamos la actividad murein hidrolasa en bacterias tales como *Salmonella*, en la que tuvimos un resultado positivo.

Pero hubo microorganismos que no dieron positivo en las zymogramas, estas bacterias pertenecían al genero Gram positivas, tales como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*. Fue por esto que se pensó en una estrategia para ampliar la capacidad de la S-layer a bacterias Gram positivas. La nisina es una potente bacteriocina producida por

Lactococcus lactis que tiene un amplio espectro de actividad sobre varias especies Gram positivas, pero es de poca efectividad frente a Gram negativas. Como se pudo observar esta combinación resulto eficiente.

Viendo el resultado sobre las Gram positivas se realizó un ensayo con nisina y S-layer sobre *Salmonella*. Este microorganismo de por si presenta resistencia al efecto antimicrobiano de la nisina, pero a su vez es sensible al efecto que tiene la S-layer en su pared. Nuevamente la combinación fue exitosa, pero no se consiguió una lisis total del cultivo bacteriano, solo se logro retrasar el crecimiento de *Salmonella*. Esta disminución en la lisis solo se vio en células en activo crecimiento, en un medio rico: Se pensó entonces, que el frenado de la lisis podría deberse a la liberación de inhibidores de la nisina, o bien a la presencia de las hidrolasas endógenas necesarias para la división activa de la pared de *Salmonella* que inhibirían la actividad murein hidrolasa de la S-layer.

La exitosa combinación de la proteína S-layer y la nisina tiene amplias ventajas, una de estas y quizás la más importante es disminuir la dosis necesaria de nisina. No olvidemos que las cepas probióticas deseadas, que se encuentran en los alimentos, también son sensibles a esta bacteriocina. Bajar la dosis de nisina en los alimentos genera una mejora en el desarrollo de estas cepas bacterianas logrando el efecto probiótico deseado.

Otras ventajas adicionales son el efecto de lisis total en las bacterias Gram positivas blanco, y el hecho de que la proteína es producida por *Lactobacillus acidophilus*, el cual es flora normal del intestino de animales y humanos.

Todas estas características ofrecen una potencial solución a la creciente problemática que representa la aparición de resistencias a antibióticos que se genera debido al uso indebido de estos. La presencia del antibiótico aumenta la aparición de bacterias que pueden transmitir los nuevos genes de resistencia a través de transferencia horizontal (entre individuos) por intercambio de plásmidos. Si

una bacteria porta varios genes de resistencia, se le denomina multi-resistente o, informalmente, superbacteria. Uno de los microorganismos que genera más resistencia a antibióticos es *Staphylococcus aureus*, generando cepas denominadas MRS (*Staphylococcus Multi Resistentes*) (Kruszewska 2004).

Con esta problemática planteada, la combinación de una proteína proveniente de un organismo de status GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro), surge como una solución alternativa al uso de antibióticos en la clínica, pero también en casos veterinaria y ganadería animal.

Con todos estos resultados hemos podido adjudicarle a la proteína S-layer una importancia biológica para la propia bacteria, así como también una posible aplicación en diferentes industrias alimentarias de interés económico.

Las conclusiones más significativas de esta Tesis fueron:

- La proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* tanto en cultivos o purificada posee una actividad lítica sobre la pared de bacterias patógenas esencialmente Gram negativas.

- La proteína S-layer en combinación con el antimicrobiano nisina tiene un efecto sinérgico que limita el crecimiento y genera lisis de bacterias patógenas tanto Gram positivas como Gram negativas.

- La proteína S-layer es expresada en mayor cantidad en un ambiente de estrés osmótico

- La proteína S-layer es fundamental para que la bacteria crezca en condiciones de estrés osmótico

BIBLIOGRAFÍA

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ahn JS, Chandramohan L, Liou LE, Bayles KW. (2006) Characterization of CidR-mediated regulation in *Bacillus anthracis* reveals a previously undetected role of S-layer proteins as murein hydrolases. *Mol Microbiol.*;62(4):1158-69.
- Altermann, E., W. M. Russell, M.A.Azcarate-Peril, R. Barrangou, B.L.Buck, O. McAuliffe, N. Souther, A. Dobsen, T. Doung, M. Callanan, S. Lick, A. Hamrick, R. Cano, and T.R. Klaenhammer. (2005) Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 102:3906-3912.
- Antikainen J, Anton L, Sillanpää J, Korhonen TK. (2002) Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Mol Microbiol.* 46:381-94
- Avall-Jääskeläinen S, Hynönen U, Ilk N, Pum D, Sleytr UB, Palva A.(2008) Identification and characterization of domains responsible for selfassembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiol* Oct 1;8:165
- Avall-Jaaskelainen S. & A. Palva (2005). *Lactobacillus* surface layers and their applications *FEMS Microbiology Reviews* 29: 511–529 Banci L. (2003). Molecular dynamics simulations of metalloproteins. *Curr Opin Chem Biol* 7(4):524
- Axelsson, L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects* (Salminen, S. and von Wright, A., Eds.), pp. 1–72. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Barefoot, S.F., Chen, Y., Hughes, T.A., Bodine, A.B., Shearer, M.Y., Hughes, M.D., 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3522–3528.
- Barefoot, S.F., Klaenhammer, T.R., 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 1808–1815.
- Blaser, M.J., Wang, E., Tummuru, M.K., Washburn, R., Fuimoto, S. and Labigne, A. (1994) High frequency S-layer protein variation in *Campylobacter fetus* revealed by *sapA* mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 14, 521–532.
- Blaser, M.J. and Pei, Z. (1993) Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections: critical role of high-molecular-weight S-layer proteins in virulence. *J. Infect. Dis.* 167, 372–377.
- Boot, H.J., Kolen, C.P. & Pouwels, P.H. (1995) Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus*

acidophilus ATCC 4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species J. Bacteriol. 177, 7222-7230

Boot, H.J. and Pouwels, P.H. (1996) Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Mol. Microbiol. 21, 1117–1123.

Bowditch R D, Baumann P. & Yousten AA (1989), Cloning and Sequencing of the Gene Encoding a 125-Kilodalton Surface-Layer Protein from *Bacillus sphaericus* 2362 and of a Related Cryptic Gene. J Bacteriol, 171, 4178-4188

Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Górski A (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Exp Biol Med (Maywood):366-77. Review.

Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Kiriukhin MY, Debabov DV, Neuhaus FC, Hamilton IR. 2000 Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. J Bacteriol. Nov;182(21):6055-65.

Brechtel, E., M. Matuschek, A. Hellberg, E. M. Egelseer, R. Schmid, and H. Bahl. 1999. Cell wall of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1: isolation of its components and attachment of the xylanase XynA. Arch. Microbiol. 171:159–165.

Bron P.A, Molenaar D., de Vos W.M. and Kleerebezem (2006) DNA micro-array-based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum* M. Journal of Applied Microbiology 100 728–738

Csonka L.N. & Hanson A.D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: Genetics and Physiology. Ann. Rev. Microbiol. 45:569-606.

Crutz-Le Coq AM, Zagorec M. (2008) Vectors for lactobacilli and other Gram-positive bacteria based on the minimal replicon of pRV500 from *Lactobacillus sakei* Plasmid 60: 212–220

Delcour J. T. Ferain, M Deghorain, E. Palumbo y P Hols, 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 76:159-84. Review.

Deuerling, E, Mogk A, Richter C, Purucker M & Schumann W. (1997) The *ftsH* gene of *Bacillus subtilis* is involved in major cellular processes as sporulation, stress adaptation and secretion Mol Microbiol, 23: 921-933

Ehretsmann, C.P., Carpousis, A.J. and Krisch, H.M. (1992) mRNA degradation in prokaryotes. FASEB J. 6, 3186–3192.

Ferreira LC, Ferreira RC. & Schumann W. (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. An Acad Bras Cienc. 77,113-24

Fischetti VA.(2008) Bacteriophage lysins as effective antibacterials Curr Opin Microbiol;11(5):393-400.

- Foster, S.J. & Popham, D.L. (2001) Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. In *Bacillus subtilis* and its Relatives: from Genes to Cells. pp. 21–41.
- Fouet A., S. Mesnage, E. Tosi-Couture, P. Gounon & M. Mock (1999) *Bacillus anthracis* surface: capsule and S-layer. *J Appl Microbiol*, 87, 251–255
- Giaouris E, Briandet R, Meyrand M, Courtin P, Chapot-Chartier MP. (2008) Variations in the degree of D-Alanylation of teichoic acids in *Lactococcus lactis* alter resistance to cationic antimicrobials but have no effect on bacterial surface hydrophobicity and charge. *Appl Environ Microbiol*.74(15):4764-7
- Grangette C, Muller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M. & Mercenier A. (2004) Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Vaccine* 20, 2913–2920
- Gratia, A. (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. *C. R. Soc. Biol.* 93, 1040.1041
- Golowczyc GL, MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Int J Food Microbiol*. 118:264-73.
- Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, Mercenier A, Daniel C, Fioramonti J, Tlaskolova H, Kozakova H, Israelsen H, Madsen S, Vrang A, Hols P, Delcour J, Bron P, Kleerebezem M, & Wells J. (2004) Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol*. 56,1-64.
- Hols P, Ferain T, Garmyn D, Bernard D, & Delcour J. (1994) Use of Homologous Expression-Secretion Signals and Vector-Free Stable Chromosomal Integration in Engineering of *Lactobacillus plantarum* for α -Amylase and Levanase Expression *Appl Environ Microbiol* 60,1401-1413
- Höper, D., Bernhardt, J. & Hecker, M. (2006). Salt stress adaptation of *Bacillus subtilis*: a physiological proteomics approach. *Proteomics* 6, 1550-62
- Horton, R.M. (1997). In vitro recombination and mutagenesis of DNA. SOEing together tailor-made genes *Methods Mol Biol* 67,141-9.
- Jenkins D.E, S.A. Chaisson, & A. Martin. (1990). Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 172:2779-2781
- Jordan S, Hutchings MI, Mascher T. (2008) Cell envelope stress response in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. Jan;32(1):107-46
- Kahala, M., Savijoki, K. and Palva, A. (1997) In vivo expression of the *Lactobacillus brevis* S-layer gene. *J. Bacteriol*. 179, 284–286.

- Kandler, O. and Weiss, N. (1986) Regular, non-sporing Gram positive rods. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.), pp. 1208–1234. Williams and Wilking, Baltimore, USA.
- Kakikawa, M., Yokoi, K.J., Kimoto, H., Nakano, M., Kawasaki, K., Taketo, A. And K. Kodaira. 2002. Molecular analysis of the lysis protein Lys encoded by *Lactobacillus plantarum* phage ϕ 1e. *Gene*. 299:227– 234
- Kim YH, Han KS, Oh S, You S. & Kim SH., (2005) Optimization of technical conditions for the transformation of *Lactobacillus acidophilus* strains by electroporation. *J Appl Microbiol*. 99:167-74.
- Kern J, Schneewind O. (2010) BslA, the S-layer adhesin of *B. anthracis*, is a virulence factor for anthrax pathogenesis. *Mol Microbiol*. ;75(2):324-32.
- Klaenhammer, T.R., E. Altermann, E. Pfeiler, B.L. Buck, T. Duong, Y.J. Goh, R. Tallon, S. O'Flaherty, R. Barrangou, and M.A. Azcarate-Peril. (2008) Functional Genomics of Probiotic Lactobacilli. *J. Clinical Gastroenterology*.
- Klaenhammer, T.R., M. Andrea. Azcarate-Peril, E. Altermann, and R. Barrangou. 2007. Influence of the dairy environment on gene expression and substrate utilization in lactic acid bacteria. *J. Nutrition*. 137(3):748S-750S.
- Klaenhammer, T.R. Probiotics and Prebiotics. 2007. In Doyle, Beuchat, and Montville (eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd edition. ASM Press, Washington, DC, pp 891-907.
- Klaenhammer, T.R., Pfeiler, E. and Duong, T. 2007. Genomics and Proteomics of Food-Borne Microorganisms. In Doyle, Beuchat, and Montville (eds.). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 3rd edition. ASM Press, Washington, DC, pp 935-951.
- Kiriukhin MY, Neuhaus FC. (2001) D-alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation. *J Bacteriol*. Mar;183(6):2051-8.
- Koch S, Oberson G, Eugster-Meier E, Meile L, Lacroix C. (2007) Osmotic stress induced by salt increases cell yield, autolytic activity, and survival of lyophilization of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Int J Food Microbiol*. Jun 10;117(1):36-42.
- Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Buijns SC, Singh SK, Valence F, Molle D, Lortal S, Altermann E, Klaenhammer TR, van Kooyk Y. (2008) S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(49):19474-
- Koprivnjak T, Mlakar V, Swanson L, Fournier B, Peschel A, Weiss JP. (2006) Cation-induced transcriptional regulation of the *dlt* operon of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. May;188(10):3622-30.

Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Siezen RJ, Bron PA (2010) The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiol Rev* 34 199–230

Kruszewska, D (2004) Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 648–653.

Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.

Landt O, Grunert HP & Hahn U. (1990). A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Gene.* 96:125-8.

Leloup L, Ehrlich SD, Zagorec M & Morel-Deville F (1997) Single crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl Environ Microbiol* 63,2117-23

Leloup, L., Ehrlich, S.D., Zagorec, M. & Morel-Deville, F. (1997). Single cross over integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2117-2123

Lin MY, Harlander S. & Savaiano D. (1996) Construction of an integrative food-grade cloning vector for *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45,484-9

Liu M, González JE, Willis LB, Walker GC. (1998) A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Appl Environ Microbiol.* ;64(11):4600-2.

López C., Heras H., Ruzal S.M., Sanchez-Rivas C. & Rivas E. (1998). Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium *Current Microbiol* 36, 55-61

López C.S., Alice A., Heras H., Rivas E. & Sánchez-Rivas C. (2006) Role of anionic phospholipids in the adaptation to high salinity in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* 152,605–616.

López C.S., Heras H., Garda H., Ruzal S.M., Sánchez-Rivas C. & Rivas E. (2000). Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Inter. J Food Microbiol.* 55,137-142

Lopez CS, Alice AF, Heras H, Rivas EA & Sanchez-Rivas C. (2006) Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology.* 152:605-16.

Luckevich M D & Beveridge T J. (1989) Characterization of a Dynamic S-Layer on *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* 171, 6656-6667

Loessner MJ.(2005). Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr Opin Microbiol.* 480-7. Review.

Lysenko E, Ogura T & Cutting SM. (1997). Characterization of the *ftsH* gene of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 143: 971-978

Machado MC, López CS, Heras H, Rivas EA. (2004) Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane. *Arch Biochem Biophys.* 1;422(1):61-70.

Mascher, T., Hachmann, A.B. & Helmann, J.D. (2007). Regulatory Overlap and Functional Redundancy among *Bacillus subtilis* Extracytoplasmic Function σ Factors *J. Bacteriol.* 189, 6919–6927.

Masuda, K. and Kawata, T. (1983) Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 145–150.

Masuda, K. and Kawata, T. (1981) Characterization of a regular array in the wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to the other wall components. *J. Gen. Microbiol.* 124, 81–90.

Matuschek, M., K. Sahm, A. Zibat, and H. Bahl. 1996. Characterization of genes from *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 that encode two glycosyl hydrolases with conserved S-layer-like domains. *Mol. Gen. Genet.* 252:493–496.

Mercenier A. & Chassy BM. (1988) Strategies for the development of bacterial transformation systems. *Biochimie.* 70, 503-17.

Messner, P. and Sleytr, U.B. (1992) Crystalline bacterial cell surface layers. *Adv. Microbial. Physiol.* 33, 213–275.

Mesnage S, Mweber-Levy M, Haustant M, Mock M. & Fouet A. (1999) Cell Surface-Exposed Tetanus Toxin Fragment C Produced by Recombinant *Bacillus anthracis* Protects against Tetanus Toxin. *Infection and Immunity* 67, 4847–4850

Mesnage S, Tosi-Couture E & Fouet A (2000) Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase *Mol Microbiol* 31, 927–936

Mesnage, S., E. Tosi-Couture, M. Mock, P. Gounon, and A. Fouet. 1997. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. *Mol. Microbiol.* 23:1147–1155.

Mignot T, Mesnage S, Couture-Tosi E, Mock M & Fouet A (2002) Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis* *Molecular Microbiology* 43, 1615–1627

Mikoulinikaia GV, Odinkova IV, Zimin AA, Lysanskaya VY, Feofanov SA, Stepnaya OA. (2009). Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *FEBS J*276(24):7329-42. Epub .

Minnig K, Lazarevic V, Soldo B, Mauël C. 2005 Analysis of teichoic acid biosynthesis regulation reveals that the extracytoplasmic function sigma factor sigmaM is induced by phosphate depletion in *Bacillus subtilis* W23. *Microbiology*. Sep;151(Pt 9):3041-9.

Mota RM, Moreira JL, Souza MR, Horta MF, Teixeira SM, Neumann E, Nicoli JR, Nunes AC. (2006) Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. *BMC Biotechnol.* 5;6:2.

Nascimento JG, Guerreiro-Pereira MC, Costa SF, São-José C, Santos MA. (2008) Nisin-triggered activity of Lys44, the secreted endolysin from *Oenococcus oeni* phage fOg44. *J Bacteriol.*;190(1):457-61.

Navarre, W.W. and Schneewind, O. (1999) Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174-229.

Neuhaus FC, Baddiley J. . 2003 A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria *Microbiol Mol Biol Rev*Dec;67(4):686-723.

Nguyen, H.D., Nguyen, Q.A., Ferreira, R.C., Ferreira, L.C., Tran, L.T. and W. Schumann W. 2005. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability *Plasmid.* 54:241-248

Perea Vélez M, Verhoeven TL, Draing C, Von Aulock S, Pfitzenmaier M, Geyer A, Lambrichts I, Grangette C, Pot B, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. (2007) Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol.* Jun;73(11):3595-604

Pérez-Arellano I, Zúñiga M. & Pérez-Martínez G (2001) Construction of Compatible Wide-Host-Range Shuttle Vectors for Lactic Acid Bacteria and *Escherichia coli* *Plasmid* 46, 106-116

Peters, J., Nitsch, M., Kuhlmoorgen, B., Golbik, R., Lupas, A., Kellermann, J., Engelhardt, H., Pfander, J.-P., Müller, S., Goldie, K., Engel, A., Stetter, K.-O., Baumeister, W., 1995. Tetrabrachion: a filamentous archaeobacterial surface protein assembly of unusual structure and extreme stability. *J. Mol. Biol.* 245, 385-401.

Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Volker, U. & Hecker, M. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183, 5617-31

- Piuri M. & Hatfull GF (2006) A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells. *Mol Microbiol.* 62(6):1569-85.
- Piuri M., Sanchez-Rivas C. & Ruzal S.M. (2005) Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei* *J Appl Microbiol* 98, 84-95
- Piuri M., Sanchez-Rivas C. & S.M. Ruzal. (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes. *J Appl Microbiol* 95, 372-379
- Platteeuw C, Simons G. & de Vos WM (1994) Use of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase (*gusA*) gene as a reporter gene for analyzing promoters in lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.*60:587-93.
- Pollmann K. & S. Matys. (2007). Construction of an S-layer protein exhibiting modified self-assembling properties and enhanced metal binding capacities. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:1079–1085
- Pollmann K., J. Raff, M. Schnorpfeil, G. Radeva & S. Selenska-Pobel. (2005) Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion. *Microbiology*, 151, 2961–2973
- Poolman B, spitzer JJ. & JM Wood (2004). Bacterial osmosensing: role of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *BBA* 1666:88-104.
- Pouwels, P.H. and Leunissen, J.A.M. (1994) Divergence in codon usage of *Lactobacillus* species. *Nucl. Acids Res.* 22, 929–936.
- Pouwels P H., Leer RJ., Shaw M, Heijne den Bak, Glashouwer MJ, Tielen FD, Smit E, Martinez B, Jore J. & Conway PL (1998). Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int J Food Microbiol.* 41,155-67.
- Rensing C. & Grass G. (2003) *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment *FEMS Microbiol Rev* 27:197-213
- Prado-Acosta Mariano, Allievi Mariana C., Palomino María Mercedes, Sanchez Rivas Carmen and Ruzal Sandra M. (2009) The S-layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and nisin have a synergistic inhibition effect against food-borne bacteria (*Appl Environ Microbio* in press)
- Prado-Acosta M, Palomino MM, Allievi MC, Sanchez Rivas C and SM Ruzal (2008) Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Environ Microbiol.* 2008 vol 74:7824-7827
- Rastall, R.A., G.R. Gibson, H.S. Gill, F. Guarner, T. R. Klaenhammer, B. Pot, G. Reid, I.R. Rowland, M.E. Sanders. (2005) Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications.

Rey D. A., A. Pühler & J. Kalinowski.(2003). The putative transcriptional repressor McbR. Member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. J. Bacteriol. 103: 51-65.

Sabet M, Lee, S.-W Nauman R. K., Sims T & H.-S. Um. (2003). The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus* Microbiology (2003), 149, 3617–3627

Sa'ra, M. and Sleytr, U.B. (1996) Biotechnology and biomimetics with crystalline bacterial cell surface layers (S-layers). Micron 27, 141–156.

Sa'ra, M. and Sleytr, U.B. (2000) S-layer proteins. J. Bacteriol. 182, 859–868.

Schar-Zammaretti P, Dillmann ML, D'Amico N, Affolter M. & Ubbink J (2005) Influence of Fermentation Medium Composition on Physicochemical Surface Properties of *Lactobacillus acidophilus*. Appl and Environ Microbiol 71, 8165–8173

Smith, S.H. and Murray, G. (1990) The structure and associations of the double S layer on the cell wall of *Aquaspirillum sinuosum*. Can. J. Microbiol. 36, 327–335.

Schäffer, C. and Messner, P. (2001) Glycobiology of surface layer proteins. Biochimie 83, 591–599.

Schäffer, C., Wugeditsch, T., Neuninger, C. and Messner, P. (1996) Are S-layer glycoproteins and lipopolysaccharides related? Microb. Drug Resist. 2, 17–23.

Schäffer, C. and Messner, P. (2004) Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology. Glycobiology 14, 31R–42R.

Scheaffers D. J., L. Jones y J. Errington , (2004). Several distinct localization patterns for penicillin binding protein in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol 51(3): 749-764

Scheppler L, Vogel M, Zuercher A W., Zuercher M, Germondb JE, Miescher SM. & Stadler B M. (2002) Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. Infect Immun. 72, 2731-7.

Seegers JFML (2002) Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. Trends Biotechnol 20: 508-515.

Sergey R. Konstantinov, Hauke Smidt, Willem M. de Vos, Sven C.M. Bruijns, Satwinder Kaur Singh, Florence Valence, Daniel Molle, Sylvie Lortal, Eric Altermann, Todd R. Klaenhammer and Yvette van Kooyk (2008) S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cells and T-cells functions. PNAS 105:19474-19479.

Serror P, Sasaki T, Ehrlich D. & Maguin E. (2002) Eletrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* with various plasmids. Appl Environ Microbiol.;68:46–52.

Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH. (2001) The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J Mol Biol* 305:245-57.

Smit E, Jager D, Martinez B, Tielen FJ, Pouwels PH. (2002) Structural and functional analysis of the S-layer protein crystallisation domain of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: evidence for protein-protein interaction of two subdomains. *J Mol Biol.* 324:953-64.

Sleytr, U.B. and Messner, P. (1983) Crystalline surface layers on bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37, 311–339.

Sleytr, U.B. and Beveridge, T.J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends Microbiol.* 7, 253–260.

Sleytr, U.B. (1997) Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 5–12.

Sleytr UB. & Beveridge T J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends In Microbiology* 7, 253-260

Sleytr UB. & Sara M.(1997) "Bacterial and archaeal S-layer proteins: structure-function relationships and their biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* 15,20-6.

Sleytr, U.B., Sa'ra, M., Pum, D. and Schuster, B. (2001) Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Prog. Surf. Sci.* 68, 231–278.

Steil, L., Hoffmann, T., Budde, I., Völker, U. & Bremer, E. (2003). Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol* 185, 6358-6370.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 1– 29.

Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena T 2009. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *Int J Food Microbiol.* ;132(2-3):109-16.

Tam le, T., Antelmann, H., Eymann, C., Albrecht, D., Bernhardt, J. & Hecker, M. (2006). Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics* 6(16):4565-85.

Tsuboi, A., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. (1982) Reassembly invitro of hexagonal surface arrays in a protein-producing bacterium *Bacillus brevis* 47. *J. Bacteriol.* 151, 1485–1497.

Thomas, S.R. and Trust, T.J. (1995) Tyrosine phosphorylation of the tetragonal paracrystalline array of *Aeromonas hydrophila*: molecular cloning and high-level expression of the S-layer protein gene. *J. Mol. Biol.* 245, 568–581.

Thomason L, Court DL, Bubunenko M, Costantino N, Wilson H, Datta S, Oppenheim A (2007) Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination. Current Protocols in Molecular Biology 2007 Apr;Chapter 1:Unit 1.16

Tuohy, M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. and Gibson, G.R. (2003) Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8, 692–700.

Ventura, M., Jankovic, I., Walker, D.C., Pridmore, R.D. and Zink, R. (2002) Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6172–6181.

Vollenkle C, Weigert S, Ilk N, Egelseer E, Weber V, Loth F, Falkenhagen D, Sleytr UB. & Sara M. (2004). Construction of a functional S-layer fusion protein comprising an immunoglobulin G-binding domain for development of specific adsorbents for extracorporeal blood purification. Appl Environ Microbiol. 70, 1514-21.

Vreeland RH, Anderson R & Murray RGE. (1984). Cell wall and phospholipid composition and their contribution to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. J Bacteriol 160: 879-883

Wach, A. (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. Yeast 12:259–265.

Wang Q., Lin T., Johnson J.E. & M.G. Finn (2002) Natural Supramolecular Building Blocks: Cysteine-Added Mutants of Cowpea Mosaic Virus. Chemistry & Biology, 9, 813–819

Weidenmaier C, Peschel A. 2008 Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. Nat Rev Microbiol. Apr;6(4):276-87.

Whatmore AM, Chudek JA. & Reed RH (1990) The effects of osmotic upshock on the intracellular solute pools of *Bacillus subtilis*. J Gen Microbiol 136: 2527-2535.

Wood JM (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. MMBR 63: 230-262

Wood JM. (2006). Osmosensing by bacteria. Science STKE. (357):pe43 Review

H. Xu, H.S. Jeong, H.Y. Lee and J. Ahn (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains Letters in Applied Microbiology . 49 (4) 434-442

Yamamoto H, Miyake Y, Hisaoka M, Kurosawa S, Sekiguchi J. (2008) The major and minor wall teichoic acids prevent the sidewall localization of vegetative DL-endopeptidase LytF in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. Oct;70(2):297-310.

Younghoon KIM, Jin Young WHANG, Kwang Youn WHANG, Sejong OH, Sae Hun KIM (2008) Characterization of the Cholesterol-Reducing Activity in a Cell-Free

Supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (6), 1483–1490, 2008