

Tesis Doctoral

Modificaciones en la envoltura de Lactobacillus casei durante el crecimiento bajo estrés osmótico

Palomino, María Mercedes

2011

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:

Palomino, María Mercedes. (2011). Modificaciones en la envoltura de Lactobacillus casei durante el crecimiento bajo estrés osmótico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Palomino, María Mercedes. "Modificaciones en la envoltura de Lactobacillus casei durante el crecimiento bajo estrés osmótico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

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

Modificaciones en la envoltura de *Lactobacillus casei* durante el crecimiento bajo estrés osmótico

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

María Mercedes Palomino

Director de Tesis: Sandra M. Ruzal
Consejero de Estudios: Julia Pettinari

Lugar de Trabajo: Laboratorio de estrés osmótico de Bacterias Gram
positivas. Dto. Química Biológica FCEN-UBA

Buenos Aires, marzo de 2011

Esta tesis doctoral fue realizada en el marco de dos becas internas doctorales otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), dirigida por la Dra. Sandra M. Ruzal

Algunos resultados presentados en esta tesis forman parte del siguiente artículo:

New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt.
Palomino MM, Allievi MC, Prado-Acosta M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM.
J Microbiol Methods. **2010** 83(2):164-7

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mi Directora de Tesis Sandra Ruzal, por todos estos años de enseñanza, por su presencia absoluta e incondicional. Por esa fuerza avasalladora que día a día nos demuestra en su trabajo y es un ejemplo a seguir.

A Carmen, por haberme alojado todos estos años en su laboratorio y por los innumerables consejos y sugerencias que han servido para que esta tesis pueda llevarse a cabo.

A mis compañeros de Laboratorio, a Mariano (que pronto nos deja y lo voy a extrañar) por tantos años de mesada compartidos, creciendo juntos, compartiendo alegrías y frustraciones.

A Marianita, mi “hermana de mesada”, por compartir el día a día, por llevarnos tan bien, por estar siempre dispuesta a escuchar los resultados y darme siempre una mano en los experimentos. Gracias Marian porque sin tu ayuda muchos de estos experimentos no me hubiesen salido.

A Mariana Piuri, por su valiosísima presencia aún desde la distancia. A las chicas de la nueva generación: Paula, Estefi, Euge.

A Pato Bustos y Flor Sabbione dos seres encantadores que pasaron por el labo y supieron dejar huellas imborrables en mí.

A los vecinos de Toxicología, por tantos reactivos prestados. A las chicas de Viro por tanta buena onda, y siempre bien dispuestas a la hora de una consulta y pedido de algún reactivo.

A los chicos de genética bacteriana: Ale, Laura, Jime, Pablo, Manuel, Marie M., Carlita, Paulita, Marie C., Manuela, Gonzalo, José, por los innumerables buenos momentos, porque con ustedes las “mesitas” cobran otro significado. A todos, gracias por estar siempre dispuestos a tender una mano. Gracias Paulita por tu ayuda en los ensayos de Biofilm.

A Marie Catone, por esas “vueltas al perro” de charlas profundas, por compartir la pasión por el baile, por ser mi amiga y compañera de milongas y salseras. A Costi y Paula Bologna, porque son dos personas maravillosas, gracias Pau por tus consejos de cómo escribir una tesis.

A mi familia, padres y hermanos por su amor y ese apoyo incondicional. Esta tesis es para ustedes.

A los chicos de ecología/deportes (Emiliano, Majo, Nacho) por esos momentos de catarsis y terapia grupal. A Gigi y Facu, dos amigos de fierro. A Maxi Sosa porque de una u otra manera siempre está presente.

Resumen

Este trabajo de Tesis se estructura en seis capítulos que tienen como objetivos estudiar los cambios a nivel de envoltura de *Lactobacillus casei* BL23, una bacteria Gram positiva, a través del análisis bioquímico y genético, cuando las células son sometidas a estrés osmótico empleando alta concentración de NaCl.

Se verificó una diferencia en la sensibilidad a la lisis enzimática en la condición de crecimiento en alta sal (N), y se muestra que dos factores contribuyen a este efecto dado por una mayor permeabilidad de la enzima facilitando su acceso a su sustrato, asociado con un menor nivel de polímeros aniónicos (WTA y LTA) y una diferencia en los niveles de D-alanilación de estos y una disminución en el grado de entrecruzamiento del PG en las paredes de las células asociado a una actividad diferencial de HMW y LMW PBP.

El estudio genético avala los resultados bioquímicos que demostraron una disminución tanto en el contenido de polímeros aniónicos como en el grado de D-alanilación de los mismos. La expresión génica de los genes responsables de la D-alanilación de los ácidos teicoicos (*dltA* y *dltC*) demostró una disminución de la actividad transcripcional durante el crecimiento en alta sal. La expresión del gen de síntesis de LTA (*yfnI*) también marcó una disminución durante el crecimiento en esta condición.

Los cambios en el contenido como así también en el nivel de sustitución por ésteres de D-Alanina de ácidos teicoicos durante el crecimiento en estrés osmótico conducen a efectos pleiotrópicos que incluyen:

- 1) Mayor sensibilidad frente a antimicrobianos de naturaleza catiónica (Nisina) y glicopéptidos con blanco de acción la pared celular (Vancomicina)
- 2) Mayor capacidad de formación de Biofilm sobre superficies artificiales
- 3) Aumento en el pegado o “binding” de cationes bivalentes

La construcción y análisis de una mutante *dltA* que muestra una disminuida capacidad de crecimiento en alta sal, confirma la sospecha del rol de la D-alanilación en la capacidad de respuesta frente al estrés osmótico.

De los resultados obtenidos se desprende una aplicación, un nuevo método para la electroporación de las especies de *Lactobacillus* que consiste esencialmente en el debilitamiento de la pared celular a partir del crecimiento en condiciones de alta sal.

Con este nuevo método se obtienen mayores eficiencias comparadas con los métodos convencionales de electroporación y puede ser extensivo a otras especies del género *Lactobacillus* que muestren una fragilización de la pared como consecuencia del estrés osmótico.

Palabras Claves: *Lactobacillus casei*, pared celular, ácidos teicoicos, estrés osmótico.

Abstract

Changes in the envelope of *Lactobacillus casei* during growth under osmotic stress

The aim of this thesis was to study the changes of envelope of *Lactobacillus casei* BL23, a Gram positive bacteria, through biochemical and genetic analysis, when cells are subjected to osmotic stress using high concentration of NaCl.

It shows difference in susceptibility to enzymatic lysis when growth was carried in high salt condition (N). Two factors contribute to this effect, first an increased permeability of the enzyme by facilitating access to its substrate. It is associated with a lower level of anionic polymers (WTA and LTA) and a difference in the level of D-alanilation of these ones and secondly a decrease in the degree of PG cross-linking in cell walls associated with differential activity of HMW and LMW PBP.

The genetic study supports biochemical results that showed a decrease in the content of LTA and the level of D-alanilation.

Gene expression studies of genes for D-Alanilation of teichoic acids (*dltA* and *dltC*) showed a decrease in the transcriptional activity during growth in high salt. *yfnI* (LTA synthesis) showed a decreased as well in this condition.

The changes in content as well as the level of D-Alanine substitution in teichoic acid during growth in high salt condition leads to pleiotropic effects including:

- 1) Increased sensitivity to cationic antimicrobials (nisin) and glycopeptides with target action the cell wall (vancomycin)
- 2) Increased capacity of biofilm formation on artificial surfaces
- 3) Increased binding of divalent cations

The construction and analysis of a *dltA* mutant showing a decreased ability to grow in high salt, confirmed the important role of the D-alanilation in the stress osmotic response.

An application was suggested from the results. A new method for electroporation of *Lactobacillus* species based on the cell wall weakening resulting from growth in high salt media. The new method showed higher efficiencies compared with conventional methods of electroporation and could be extended to other species of *Lactobacillus* with a cell wall weakening as a result of osmotic stress.

Keywords: *Lactobacillus casei*, cell wall, teichoic acids, osmotic stress.

	Pag.
Indice.....	7
Resumen.....	4
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	11
Introducción.....	13
Bacterias lácticas.....	13
<i>Lactobacillus</i>	14
<i>Lactobacillus casei</i>	15
Aplicaciones biotecnológicas de Bacterias Lácticas.....	16
Probióticos.....	16
Cultivos iniciadores.....	20
Envoltura Bacteriana.....	22
Membrana plasmática.....	23
Pared celular.....	24
Peptidoglicano.....	24
Proteínas PBP (Penicillin Binding Proteins).....	26
Polímeros asociados a la pared celular: ácidos teicoicos.....	27
Estructura de los WTA y LTA.....	28
Rol de los Ácidos teicoicos en la fisiología bacteriana.....	30
Rol de los D-Alanil ésteres de TA.....	31
D-Alanil ésteres de TA y binding de cationes.....	32
D-Alanil Ésteres de TA y autolisinas.....	32
Síntesis de los D-Alanil LTA.....	33
Síntesis de ácidos teicoicos.....	36
La respuesta a estrés osmótico en Bacterias Gram Positivas.....	38
La respuesta a estrés osmótico en Bacterias Ácido Lácticas.....	40
Estrés osmótico y envolturas.....	41
Objetivos.....	43
Materiales y Métodos.....	44
Cepa en estudio.....	44
Cepas y plásmidos utilizados.....	44
Ensayos Bioquímicos.....	45
Purificación de paredes.....	45
Ensayo de sensibilidad a Mutanolisina de células enteras y paredes.....	46
Preparación de Proteínas de Membrana.....	46

Ensayo de marcación de PBP.....	47
Análisis Bioquímico de ácidos teicoicos (WTA y LTA).....	47
Obtención de WTA.....	47
Determinación de Fósforo en WTA.....	48
Determinación de D-Alanina en WTA.....	48
Corrida Electroforética de WTA.....	49
Obtención de LTA.....	50
Determinación de Fósforo en LTA.....	50
Determinación de D-Alanina en LTA.....	50
Determinación de Glicerol en LTA.....	51
Corrida Electroforética de LTA.....	
Sensibilidad a Nisina y Vancomicina.....	51
Ensayo de Formación de Biofilm.....	52
Ensayo de absorción de Cu ⁺⁺	52
Técnicas Moleculares.....	53
Extracción de ADN de <i>Lactobacillus</i>	53
Extracción de ARN de <i>Lactobacillus</i>	54
Oligonucleótidos empleados como cebadores.....	55
RT-PCR Semicuantitativa.....	55
Obtención y Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	56
Obtención y Transformación de células competentes de <i>Lacobacillus</i> por electroporación.....	56
Método descrito por Chassy y Flickinger.....	56
Método desarrollado en esta tesis.....	57
Protocolos de Electroporación.....	57
Aislamiento de ADN plasmídico.....	58
Estrategias para la construcción de la mutante <i>dlt</i>	58
Apéndice de Medios de Cultivos.....	64

Resultados.....	66
Capítulo I: Modificaciones del peptidoglicano de <i>Lactobacillus casei</i> en la osmoadaptación	66
Sensibilidad a Mutanolisina.....	66
Análisis estructural del peptidoglicano por HPLC.....	69
Detección y perfil de saturación de Penicillin Binding Proteins (PBP)....	73
Conclusión Capítulo I.....	77
Capítulo II: Modificación en la D-Alanilación de los ácidos teicoicos durante la osmoadaptación de <i>Lactobacillus casei</i> BL23	78
Estudio Bioquímico de WTA.....	78
Estudio bioquímico de ácidos lipoteicoicos (LTA).....	80
Conclusión Capítulo II.....	85
Capítulo III: Estudio de la expresión genética de los genes responsables de la síntesis de LTA (<i>yfnI</i>) y de la D-alanilación de ácidos teicoicos (operón <i>dlt</i>) en <i>Lactobacillus casei</i> BL23.....	86
Estudio de la expresión de <i>yfnI</i> por RT-PCR semicuantitativa.....	86
Estudio de la expresión de <i>dltA</i> y <i>dltC</i> por RT-PCR semicuantitativa.....	90
Conclusión Capítulo III.....	94
Capítulo IV: Alteración de los ácidos teicoicos bajo estrés osmótico: correlación con la sensibilidad a agentes antibacterianos, formación de biofilms y binding de cationes bivalentes.....	95
Correlación con la sensibilidad a agentes antibacterianos.....	96
Formación de Biofilm <i>in vitro</i>	97
Binding de cationes bivalentes.....	100
Conclusión Capítulo IV.....	102
Capítulo V: Optimización del método de electroporación en <i>Lactobacillus</i> mediante el crecimiento en alta sal.....	103
Conclusión Capítulo V.....	110
Capítulo VI: Construcción de una mutante <i>dlt</i> de <i>Lactobacillus casei</i>	111
Estrategia 1: Mutagénesis por recombinación homóloga e inserción plasmídica.....	111
Estrategia 2: Inserción de un cassette de antibiótico en el gen blanco.....	112
Estrategia para aumentar la capacidad recombinogénica de <i>Lactobacillus casei</i>	117

Caracterización de una mutante de <i>Lactobacillus casei</i> para el gen <i>dltA</i>	119
Caracterización genotípica.....	119
Caracterización fenotípica.....	120
Estudio de osmorresistencia de <i>dltA</i>	120
Estudio de la sensibilidad a agentes antibacterianos de <i>dltA</i>	121
Morfología celular.....	122
Conclusión Capítulo VI.....	123
Discusión y Perspectivas.....	124
Bibliografía.....	138

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

µg	microgramo
A	absorbancia
ADN	ácido desoxirribonucleico
ApR	resistencia a ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
BAL	bacterias del ácido láctico
BSA	proteína albúmina de suero bovino
C	condición control de crecimiento
CIM	concentración inhibitoria mínima
CmR	resistencia a cloranfenicol
D-Ala	D-alanina
DO	densidad óptica
E	eluido
ErmR	resistencia a eritromicina
FACE	electroforesis de carbohidratos asistida por fluorescencia (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)
G	N-acetilglucosamina
M	N-acetilmurámico
kDa	kilodalton
Gli-P	glicerolgofato
HMW	alto peso molecular (high molecular weight)
HPLC	cromatografía líquida de alta performance (high-performance liquid chromatography)
LMW	bajo peso molecular (low molecular weight)
LTA	ácidos lipoteicoicos
N	condición de crecimiento en alta sal
ND	no determinado
ng	nanogramo

P	fósforo
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBP	penicillin binding proteins
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PenG	penicilina G
PG	peptidoglicano
ppm	partes por millón
Rf	relación de frente
TA	ácidos teicoicos
ufc	unidades formadoras de colonias
UV	radiación ultravioleta
WTA	ácidos teicoicos de pared

1- Bacterias lácticas

Desde hace mucho tiempo los hombres han aprovechado la capacidad de las bacterias lácticas de producir ácido láctico a partir de sustratos fermentables como un método de preservación de alimentos. La consecuente disminución del pH impide el crecimiento de la flora acompañante que puede alterar los productos o resultar patógena para el hombre.

Desde los comienzos de la microbiología, los procesos de fermentación en los que participaban bacterias lácticas adquirieron gran relevancia. Fue Lister en 1873 quien aisló a partir de la leche el primer cultivo bacteriano puro que denominó *Bacterium lactis*, hoy *Lactococcus lactis*, tratando de determinar qué microorganismos participaban en las fermentaciones lácteas.

Aunque durante mucho tiempo los procesos de producción de alimentos se realizaron en forma empírica, actualmente han adquirido un alto desarrollo tecnológico en el que prima mantener la calidad y constancia de un producto. Este desarrollo tecnológico fue posible en parte por la acumulación de conocimientos de la biología de las bacterias lácticas.

Las características comunes a los géneros incluidos en la definición de bacterias lácticas (dada su capacidad de producir ácido láctico) son: microorganismos gram positivos, no esporoformadores, inmóviles, anaerobios aerotolerantes, que carecen de catalasa. Su metabolismo es estrictamente fermentativo y presentan altos requerimientos nutricionales. Algunos solo producen ácido láctico como producto principal de la fermentación de carbohidratos (homofermentativos) o una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (heterofermentativos) (Kandler, 1983).

Esta amplia descripción comprende tanto a cocos (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*), como a bacilos (*Lactobacillus* y *Carnobacterium*).

Existen evidencias genéticas, principalmente sobre la base de la comparación de las secuencias de ARNr 16S, (Stackebrand *et al*, 1988) que la agrupación bajo el término bacterias lácticas, definido bajo las características fisiológicas mencionadas anteriormente, concuerda con la relación real a nivel filogenético. También se pueden agrupar dentro de la subrama *Clostridium* que incluye organismos con un contenido G+C en el ADN inferior al

50% y quedaría excluido del grupo el género *Bifidobacterium* que se adscribe a la rama de *Actinomycetes* con un porcentaje de G+C superior al 50%.

Las especies más empleadas en los procesos fermentativos para la producción de alimentos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* pudiéndose encontrar fácilmente en productos cárnicos, vegetales, lácteos, frutas, bebidas, pero estos microorganismos son también habitantes del tracto respiratorio, intestinal y genital del hombre y otros animales.

2- *Lactobacillus*

El género *Lactobacillus* es muy heterogéneo y presenta una gran variabilidad en el porcentaje de G+C del ADN (del 32 al 54%).

Kandler (1983) dividió al género en tres grupos, siendo la base fisiológica el elemento tenido en cuenta para esta clasificación donde se analizan la presencia o ausencia de las enzimas fructosa 1-6 difosfato aldolasa y fosfocetolasa, enzimas clave en el metabolismo homo o heterofermentativo de las hexosas y pentosas respectivamente.

- Grupo I: homofermentativos estrictos: fermentan las hexosas por la vía glucolítica produciendo dos moles de ácido láctico por mol de glucosa. No utilizan pentosas ni gluconato. Poseen la enzima fructosa 1-6 difosfato aldolasa y no la fosfocetolasa. Ejemplos: *L. helveticus*, *L. acidophilus*, y *L. delbrueckii*.
- Grupo II: heterofermentativos facultativos: fermentan hexosas, utilizan gluconato y pentosas con producción de ácido láctico y acético. Presentan actividad 1-6 difosfato aldolasa y fosfocetolasa pero ésta última es inducible por pentosas. Ejemplos: *L. casei* y *L. plantarum*.
- Grupo III: heterofermentativos estrictos: fermentan hexosas con formación de ácido láctico, ácido acético (o etanol) y dióxido de carbono en cantidades equimolares. Utilizan las pentosas por la vía del ácido 6-fosfogluconico con producción de ácido láctico y acético. Ejemplos: *L. reuteri* y *L. fermentum*.

Cabe aclarar que esta es una clasificación artificial ya que las relaciones dentro de cada grupo no concuerdan con parentescos naturales resultantes de análisis filogenéticos de las secuencias de ARNr (Collins *et al*, 1991).

3- *Lactobacillus casei*

L. casei es una especie presente en hábitats variados: tracto intestinal y boca, y participa en la elaboración de productos vegetales fermentados, carnes y productos lácteos, incluyendo leches fermentadas, yogurt, quesos y productos más recientes como Yakult[®] o Actimel[®].

Además de las propiedades organolépticas que su metabolismo proporciona a los productos, muchos autores sostienen el valor de ciertas cepas como probióticos, que poseen la capacidad de regular la actividad de la flora intestinal actuando en la prevención y cura de casos de diarrea y modulando el sistema inmune (Sanders, 1993). *L. casei* puede atravesar el estómago tolerando el bajo pH para colonizar luego el intestino (Greene y Klaenhammer, 1994).

L. casei es una especie que ha sido sometida actualmente a numerosos cambios de nomenclatura. Estudios de hibridación ADN: ADN demostraron que la cepa tipo *L. casei* BL23, empleada en este trabajo, cepa derivada de *L. casei* ATCC 393 curada del plásmido pLZ15⁻ (Acevedo Félix y Pérez Martínez 2003) presentaba un bajo nivel de similitud con el resto de las cepas de *L. casei* (Collins *et al*, 1989), por tanto, el resto de las cepas fueron agrupadas en nuevas especies: *L. paracasei* y *L. rhamnosus*.

En julio de 2008 se ha dado a conocer la secuencia completa del genoma de *Lactobacillus casei* BL23, enmarcado en el proyecto FM 177140.1 y se encuentra disponible en la base de datos del sitio NCBI. (Mazé *et al*, 2010).

4-Aplicaciones biotecnológicas de Bacterias Lácticas

4.1-Probióticos

En estas últimas décadas se le ha otorgado un preponderante interés al uso de BAL (Bacterias del Ácido Láctico) como probióticos en el marco de los alimentos funcionales. Se considera alimento funcional como aquel que “está suficientemente demostrado que actúa de forma beneficiosa sobre una o más funciones del cuerpo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad” (Diplock *et al*, 1999). En los recientes años, ha surgido un interés renovado en el uso de microorganismos en alimentos debido a su aporte en el sabor y aroma, pero principalmente por sus aspectos beneficiosos en la restauración de la salud y tratamiento de enfermedades. Así, la OMS redefinió en 2002 el concepto de probióticos como “aquellos microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren algún efecto benéfico en la salud del hospedador”.

Los principales microorganismos utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo característico de cepa y no de especie.

Las cepas usadas como probióticos pertenecen a las siguientes especies:

Lactobacilos	Bifidobacterias	Otras BAL	No BAL
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>		<i>E. coli</i> <i>cepa nisslle</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. crispatus</i>	<i>B. adolescentis</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. plantarum</i>			

Fuente: Salminen y Ouwehand (2002)

En los países desarrollados, los alimentos probióticos constituyen el 60-70% del mercado total de alimentos funcionales. La expansión del mercado de estos productos ha aumentado el interés de los consumidores en agregar estos alimentos a la dieta dado el rol que cumplen en el mantenimiento y mejora de la salud.

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

- a) los alimentos fermentados convencionales a los que se les adicionan probióticos y que se consumen principalmente con fines nutritivos (yogures, leche, quesos, etc.);
- b) las leches cultivadas y fermentadas (Actimel, SancorBio), quesos probióticos (Bioqueso Ilolay Vita) utilizados básicamente como vehículos de bacterias probióticas, y
- c) los suplementos dietéticos o preparaciones farmacéuticas liofilizadas (Sanz *et al*, 2003).

El agregado de bacterias probióticas para la elaboración de alimentos funcionales depende por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación (cultivos starters), lo que permite obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales, y por otro lado de los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimento funcional es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las bacterias se encuentran: el pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación), la concentración final de azúcares y sales (aumento de la presión osmótica), el oxígeno disuelto (especialmente para bífidobacterias por tener un metabolismo anaeróbico obligado), las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo, las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto. En este contexto, el queso fresco probiótico de industria nacional Bioqueso IlolayVita se ha desarrollado como un vehículo adecuado para cultivos probióticos. Contiene *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis* (fermentos lácticos) y *B.bifidum*, *L. acidophilus* y *L. paracasei* (bacterias probióticas). El mismo garantiza una adecuada viabilidad de las bacterias durante su período de conservación hasta el consumo y la matriz de la caseína protege a las células de la acción de los jugos digestivos.

Los microorganismos para ser considerados probióticos deben reunir las siguientes características:

- Las cepas utilizadas como probióticos deben tener una historia de no ser patógenas, especialmente para personas inmunocomprometidas, no estar asociadas con enfermedades como endocarditis infecciosa y/o trastornos gastrointestinales.
- No ser sensible a las enzimas proteolíticas.
- Ser capaces de sobrevivir a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Deben ser estables frente a ácidos y bilis, y no conjugarse con las sales biliares.
- Tener capacidad para adherirse a las superficies epiteliales.
- Sobrevivir en el ecosistema intestinal.
- Ser capaces de producir componentes antimicrobianos.
- Deben permanecer vivas y estables durante su empleo.
- Deben tener un mecanismo específico de adhesión al intestino humano.
- Deben ser capaces de un crecimiento rápido en las condiciones del ciego.
- Deben ser capaces de inmunoestimulación pero sin efectos proinflamatorios.

Los mecanismos de acción pueden ser de distintos tipos: un mecanismo directo con producción de sustancias antibacterianas o bien otro indirecto, a través de la estimulación de la respuesta inmune.

Los cambios que se puedan producir en la composición de la microflora van a depender asimismo del número crítico de microorganismos del probiótico (carga bacteriana).

Según estudios realizados por Vanderhoof, (1998) el mecanismo de prevenir la acción de los patógenos puede realizarse de los siguientes modos:

I) descenso del pH intestinal por debajo del nivel que toleran los patógenos.

II) efecto competitivo por nutrientes y por la ocupación de los lugares de colonización.

III) capacidad de secreción por parte de los lactobacilos y bacterias bífidas de los antibióticos naturales que pueden tener un amplio espectro de actividad como lactocinas, helveticinas, lactacinas, curvacinas y bifidocinas.

Beneficios de los probióticos en el sistema inmune:

A principios de la década pasada se señaló la influencia de los Probióticos sobre la respuesta inmune. Es esencial que las BAL vivas sobrevivan después de atravesar el tracto gastrointestinal, para poder expresar así sus propiedades inmunomoduladoras (Marteau *et al*, 1997). En este sentido, se ha observado que ciertas cepas de BAL actúan sobre las reacciones de hipersensibilidad retardada, producción de anticuerpos, activación funcional de macrófagos (Perdigón *et al*, 1995); se ha podido demostrar además que algunas son capaces de prevenir infecciones entéricas, así como de ejercer una acción antitumoral al inhibir agentes químicos carcinogénicos (Nadathur *et al*, 1995). Con frecuencia se han citado en la bibliografía ciertas propiedades inmunomoduladoras de las BAL, aunque sigue sin comprenderse con exactitud cuales son los mecanismos implicados. (Galdeano *et al*, 2007).

Numerosos son los efectos benéficos adjudicados al consumo de probióticos y leches fermentadas, sin embargo, debemos diferenciar y tener bien en claro cuales son los efectos de índole terapéutica de aquellos preventivos. A continuación se enumeran los efectos benéficos asociados al consumo de probióticos.

Acción Preventiva	Acción Terapéutica
Prevención de eczemas atópicos	Disminución de síntomas de intolerancia a lactosa
Prevención de diferentes tipos de diarrea	
Prevención de enfermedad inflamatoria intestinal	Modulación del tránsito intestinal
Prevención de infecciones entéricas	Disminución de hipertensión arterial
Prevención de infecciones nasofaríngeas	Disminución de niveles de colesterol
Prevención de enfermedades autoinmunes	
Prevención de enterocolitis necrotizante	
Prevención de infección por <i>H. pylori</i>	
Prevención de cáncer (colon, mamas)	
Prevención de caries	
Prevención de infecciones dérmicas	
Prevención de diabetes	

4.2-Cultivos iniciadores

A diferencia de lo que ocurre en la fabricación de productos artesanales, en la industria los cultivos iniciadores o “starters” conteniendo uno o más microorganismos son empleados para mantener la calidad organoléptica e higiénica de los productos. Los cultivos iniciadores son producidos comercialmente por numerosas industrias y laboratorios y aseguran la reproducibilidad y estandarización de los procesos.

Los avances en las técnicas de ADN recombinante en el campo de las bacterias lácticas han permitido la construcción de cepas con características mejoradas o añadidas que permiten una mayor calidad, variedad y valor nutricional a los productos, así como una mejora en los procesos de producción industrial.

Las bacterias lácticas (y entre ellas los *Lactobacillus*) son excelentes candidatos para la ingeniería metabólica pues su utilización para el consumo humano es de larga data y son normalmente consumidos por el público en alimentos fermentados. Esto implica la calificación GRAS (“generally recognized as safe”) que otorga la Food and Drug Administration (USA) y el Código Alimentario Nacional y que debe presentar cualquier producto para consumo.

En la actualidad las BAL son utilizadas como cultivos starters en la fermentación de un amplio espectro de alimentos: alimentos de origen vegetal como es la elaboración de verduras y frutos en salmuera, alimentos cárnicos como es la elaboración de chacinados y embutidos y en la producción de alimentos lácteos.

Varias propiedades metabólicas de las bacterias lácticas tienen un impacto directo o indirecto en procesos como el desarrollo de sabor y aroma y maduración de productos lácteos (como quesos y yogurts). La degradación de las caseínas presentes en la leche juega un rol crucial en el desarrollo de estos procesos: mientras que ciertos péptidos contribuyen a la formación del sabor, otros péptidos son indeseables por producir un sabor amargo, no deseado.

Sin embargo, a la hora de estudiar el metabolismo de estos microorganismos, con el fin del mejoramiento de los mismos, no se tiene en cuenta el microambiente en que se produce el alimento fermentado.

El agregado de sal, con el objeto de preservar alimentos, es una técnica empleada desde la antigüedad, y en muchos alimentos las fermentaciones ocurren en un ambiente con una alta concentración de solutos. Así mismo, el proceso de maduración en quesos de pasta dura ocurre luego del salado momento en el que la participación de las bacterias lácticas en la determinación del sabor y el aroma del producto es fundamental.

Frente a esta problemática es que el objetivo principal de esta tesis ha sido el estudio de las modificaciones fisiológicas de *Lactobacillus casei* durante el crecimiento en alta sal y principalmente relacionándolo con las modificaciones que ocurren a nivel de envolturas.

5-Envoltura Bacteriana

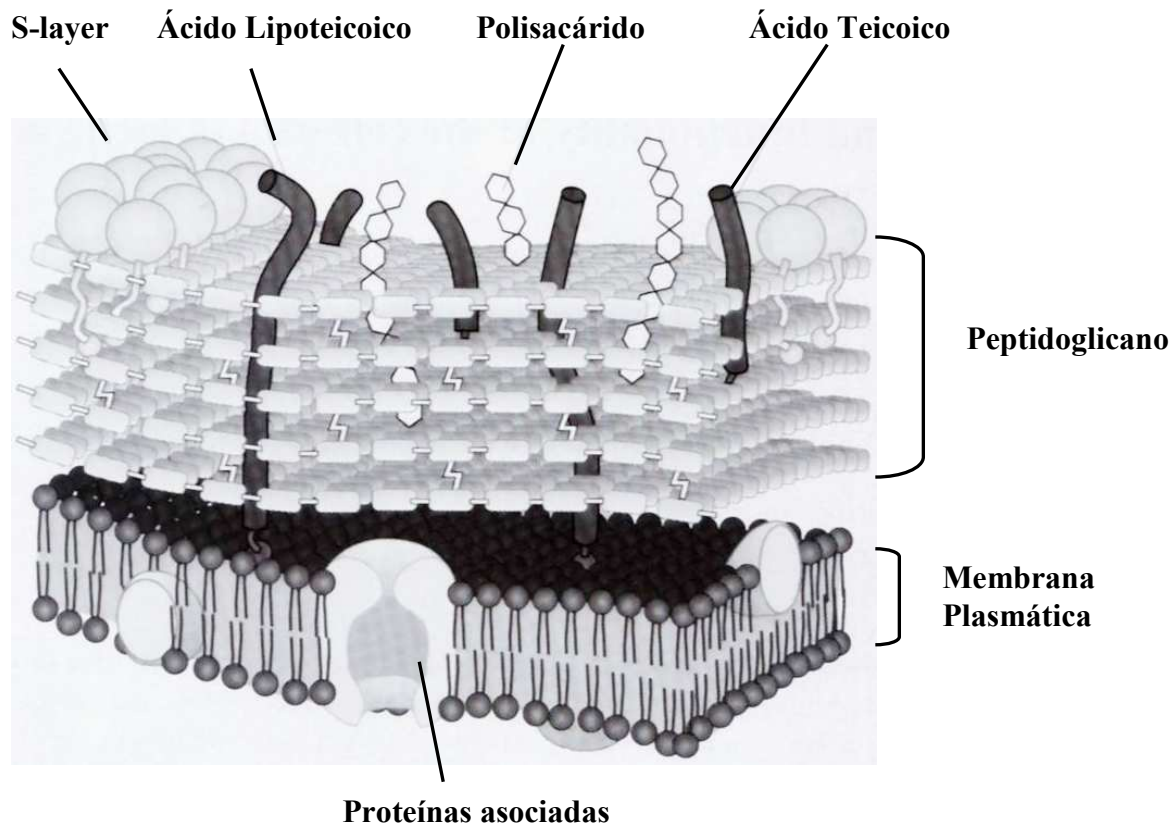
La envoltura celular de las bacterias Gram positivas consiste en una estructura multilaminar en la cual se encuentran esencialmente la membrana plasmática y la pared celular.

La biogénesis de las envolturas es uno de los procesos biológicos fundamentales durante el crecimiento de los microorganismos, no obstante se sabe muy poco acerca de los mecanismos involucrados. A pesar de ello, es evidente que el ensamblaje de los componentes de las envolturas se produce sobre un templado provisto tanto por los lípidos y las proteínas de la membrana plasmática como por el peptidoglicano de la pared. Por lo tanto el ensamblaje de la envoltura celular no se lleva a cabo debido a una formación *de novo*, sino a la extensión a partir de la inserción de diversos componentes sobre un molde preexistente en la célula.

Las envolturas bacterianas son el primer sensor ambiental de la célula. Tienen un rol muy importante en el mantenimiento de la forma, integridad y supervivencia. En bacterias Gram positivas las envolturas están compuestas por las siguientes estructuras desde el intracelular hacia el medio exterior: una membrana celular, una gruesa pared de peptidoglicano y polímeros asociados (ácidos teicoicos y lipoteicoicos), y en algunas especies aparecen envolturas adicionales como S-layer, cápsulas y EPS.

En la Figura 1 se muestra un esquema general de la envoltura celular de una bacteria Gram positiva.

Figura 1: Esquema general de la envoltura de Gram Positivas



5.1 Membrana plasmática

La primer envoltura que rodea la bacteria conforma la membrana citoplasmática y está constituida por una doble capa de fosfolípidos enfrentados, entre los cuales se asocian proteínas que juegan roles estructurales, de sensores o de funciones metabólicas.

Las membranas son responsables de alrededor del 30% o más del peso celular. Contienen entre 60 y 70% de proteínas, entre 30 a 40% de lípidos y pequeñas cantidades de hidratos de carbono. Entre los constituyentes principales de los fosfolípidos se encuentran las fosfatidilinetanolaminas (75%), el fosfatidilglicerol (20%) y los glicolípidos; los esteroides por lo general están ausentes. Los glicolípidos incluyen diglicosildiglicéridos, hallados principalmente en las membranas de bacterias Gram positivas, las que también contienen ácidos lipoteicoicos (ver más adelante).

Diversas actividades enzimáticas se asocian con las proteínas de membrana, sistemas de transporte a través de la membrana plasmática, citocromos bacterianos y sistema de fosforilación oxidativa (en aquellas bacterias que los poseen) y varios sistemas de síntesis de polímeros. Hasta un 90% de los ribosomas pueden aislarse como un agregado ADN-polirribosoma-membrana, indicando que los procesos de síntesis y exportación o translocación de proteínas requieren de cierta coordinación.

5.2 Pared celular

El componente mayoritario de la pared celular de las bacterias Gram positivas es el peptidoglicano, aunque también contiene proteínas, ácidos teicoicos y lipoteicoicos y también puede presentar ácidos teicurónicos y polisacáridos.

5.2.1 Peptidoglicano

El componente rígido de la pared celular consiste en una única macromolécula gigante, constituida por una red de uniones cruzadas de peptidoglicano. El componente glicano está constituido por dos aminoazúcares. Estos se presentan como residuos alternados, con enlaces β 1-4 de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) y ácido N-acetil-D-murámico (MurNAc). Las cadenas varían desde 10 hasta 170 unidades de disacárido. Las unidades de glicano y péptidos se unen a través del grupo carboxilo del ácido láctico del MurNAc al aminoácido terminal de un tetrapéptido. Los glicotetrapéptidos están unidos entre sí por las unidades tetrapeptídicas, que forman un marco continuo. La característica constante del compuesto tetrapeptídico es la presencia de D-Alanina, la que siempre es la unidad de relación entre las cadenas de peptidoglicano.

El compuesto peptídico que se une al ácido murámico en muchas bacterias es el tetrapéptido L-Ala-D-iso-Glu-meso DAP (o L-Lis)-D-Ala. Las uniones cruzadas entre las dos cadenas de peptidoglicano se pueden establecer de manera directa o a través de un puente peptídico interpuesto. *Escherichia coli* y las demás bacterias Gram negativas establecen las uniones de manera directa, mientras que *Staphylococcus aureus* y otras bacterias Gram positivas, como los *Lactobacillus*, realizan sus uniones a través de un puente peptídico interpuesto que puede

estar constituido por uno o muchos residuos aminoacídicos. Las uniones cruzadas directas de *E. coli*, se pueden producir a través de D-Ala-DAP o DAP-DAP, mientras que en los organismos Gram positivos se producen a través de un puente cruzado D-Ala - (aminoácido)_n-L-Lis.

La estructura primaria del peptidoglicano en *Lactobacillus casei* pertenece al subgrupo A4 (Schleifer y Kandler 1972) con la estructura monomérica común GlcNAc–MurNAc–L-Ala–g-DGlu–L-Lis–D-Ala, con una asparagina asociada al grupo amino de la Lisina siendo este aminoácido el puente entre los tetrapéptidos (figura 2).

En *L. casei* el 59% del peptidoglicano se encuentra O-acetilado (en el N-acetil murámico), similar al 60% encontrado en *L. acidophilus* (Billot-Klein *et al*, 1997). Aunque el rol fisiológico de la O-acetilación no está claro, se ha sugerido que serviría para proteger a las cadenas de peptidoglicano de la actividad hidrolítica de autolisinas tipo muramidasa (que hidrolizan los enlaces O-glicosídicos entre los aminoazúcares del peptidoglicano).

Figura 2: Peptidoglicano de *Lactobacillus casei*

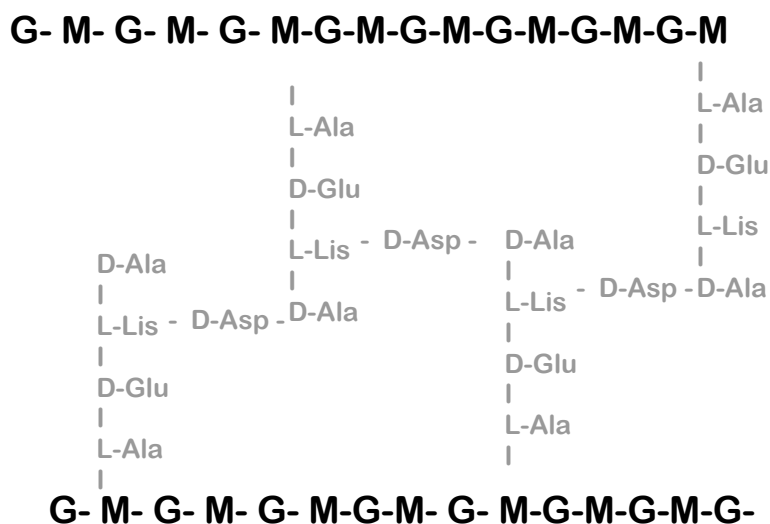


Figura 2. Esquema representativo del peptidoglicano de *L. casei*. Las cadenas de glicanos alternantes de GlcNAc y MurNAc se simbolizan con G-M, entrecruzados con el tetrapéptido y el aminoácido puente.

5.2.2 Proteínas PBP (Penicillin Binding Proteins)

La polimerización y el entrecruzamiento o “cross-linking” del PG están mediados por las proteínas de unión a penicilina o PBP (Penicillin Binding Proteins), llamadas así porque tienen una alta afinidad y son inhibidas por la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos (Ghuysen 1991) Las PBP se encuentran unidas a membrana, y se clasifican de acuerdo a la similitud de secuencia en tres grupos:

Clase A: son PBP de alto peso molecular, bifuncionales, pues cuentan con un dominio N terminal de transglicosidasa y un dominio C terminal de transpeptidasa.

Clase B: son PBP de alto peso molecular, con un dominio de transpeptidasa y un dominio N terminal de función aun desconocida. Las de esta clase cumplen un rol esencial en la septación y en el mantenimiento de la forma celular.

Y finalmente las PBP de bajo peso molecular con actividad de D,D o D,L carboxipeptidasa o endopeptidasa, cuya función más importante sería la de regular el número de entrecruzamientos entre cadenas de glicanos adyacentes.

La mayoría de las especies de las bacterias gram positivas poseen múltiples PBP para cada clase dando cuenta de la redundancia funcional de estas enzimas y de su esencialidad. El análisis de la secuencia genómica de *Bacillus subtilis* dio a conocer 16 genes codificantes de PBP, cuatro de la clase A, seis de la clase B y seis de PBP de bajo peso molecular.

Un vasto estudio se ha realizado sobre las PBP de *Bacillus subtilis* a fin de revelar sus funciones específicas en la biosíntesis de peptidoglicano, en el mantenimiento de la morfología celular, la elongación y septación celular, esporulación y germinación.

Aunque la enzimología de las PBP haya sido estudiada extensamente en muchas bacterias (Ghuysen 1991; Popham y Young 2003), existe una información limitada sobre las funciones in vivo de estas proteínas en *Lactobacillus casei*.

Poco se conoce sobre las modificaciones que sufren las PBP por alta sal y sus consecuencias sobre las envolturas celulares. En un estudio sobre la modificación de la pared celular bajo estrés osmótico en *Lactobacillus casei* realizado en el laboratorio donde se hizo esta tesis, se ha evidenciado una diferencia en la concentración y afinidad de algunas PBP cuando las células fueron precrecidas en un medio hipersalino. Este hecho fue a su vez correlacionado con una disminución en el entrecruzamiento del PG en ese microorganismo (Piuri *et al*, 2005).

6. Polímeros asociados a la pared celular: ácidos teicoicos

La pared celular de las bacterias gram positivas constituye una multifacética malla con un rol muy importante en el mantenimiento de la forma, integridad y supervivencia bacteriana. Dentro del ensamble macromolecular del peptidoglicano se hallan los ácidos teicoicos (TA). Los TA representan entre el 35-50% del peso seco de la pared celular.

Los TA están compuestos por ácidos teicoicos de pared (WTA) y ácidos lipoteicoicos (LTA). Los primeros se asocian covalentemente al peptidoglicano mientras que los LTA tienen carácter macroanfífilo, pues se hallan insertos en la membrana plasmática por un ancla glicolipídica. Ambos polímeros conforman largas cadenas cargadas negativamente de poliglicerolfosfatos, siendo el principal sustituyente, en bacterias del género *Lactobacillus*, el ester de D-Alanina. El grado de sustitución modula la carga neta aniónica de los TAs. Figura 3.

Junto con el peptidoglicano, los WTA y LTA constituyen una malla polianiónica que provee funciones relacionadas no sólo con la elasticidad, porosidad y mantenimiento de un medio iónico apropiado sino también con el tráfico de iones, nutrientes, proteínas y antibióticos.

Figura 3: Polímeros de pared, ácidos teicoicos.

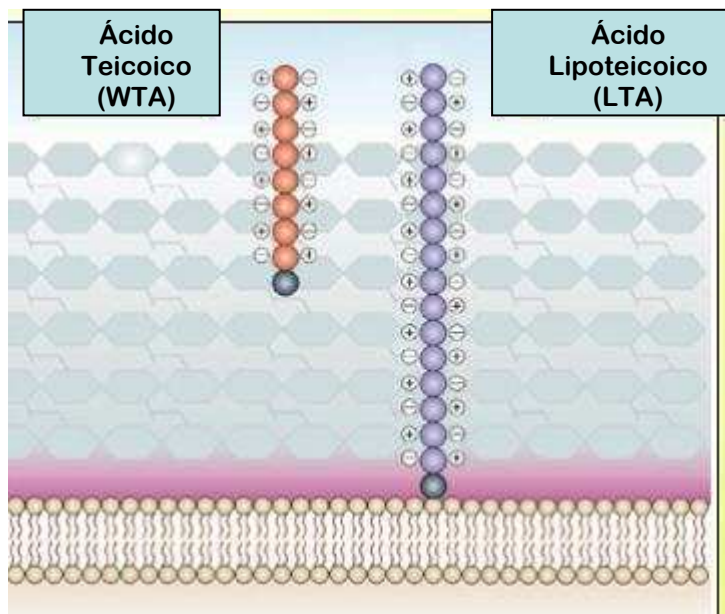


Figura 3: Esquema representativo de TA de pared. Los WTA se encuentran unidos covalentemente al PG. Los LTA se hallan unidos a membrana mediante un ancla glicolipídica.

6.1-Estructura de los WTA y LTA

Existe una amplia diversidad estructural de los WTA en las bacterias gram positivas. La diversidad está dada por la presencia y naturaleza de los sustituyentes glicosídicos, los ésteres de D-Alanina y el número y naturaleza de las unidades repetitivas del monómero.

Los monómeros están unidos por uniones fosfodiésteres para formar largas cadenas lineales que constituyen el 35 a 50% de la pared celular. Dos ejemplos son 1,3-glicerol-fosfato (Gli-P) y 1,5 D-ribitol-fosfato (Rbo-P). Los WTA están asociados al PG por medio de la unidad de enlace $(\text{Gli-P})_2$ o ${}_3\text{ManNAc}(\beta 1-4)\text{GlcNAc-P}$.

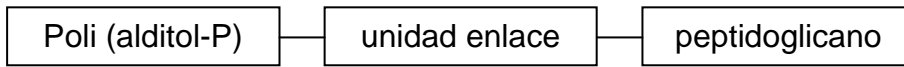
En *Lactobacillus* los WTA están generalmente compuestos de poliglicerolfosfatos, con excepción de muchas cepas de la especie *L. plantarum* que posee poliribitolfosfato.(Tomita *et al*, 2009).

Los LTA, originalmente llamados ácidos teicoicos de membrana son moléculas macroanfílicas compuestas de Poli(Gli-P), asociados al C6 del grupo glucosilo del ancla glicolípida. En los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Streptococcus* el glicolípido es $\text{Glc}(\beta 1-6)\text{Glc}(\beta 1-3)(\text{gentiobiosyl})\text{diacil-glicerol}$.

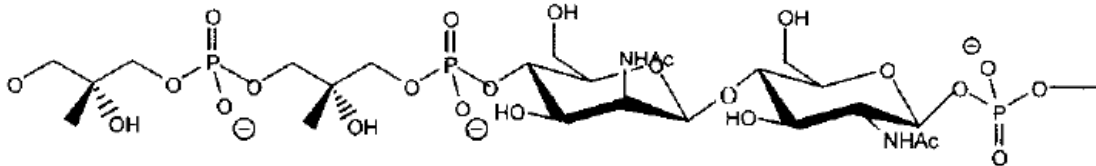
En cuanto a los LTA en el género *Lactobacillus* se podría decir que la diversidad es menor en cuanto a la naturaleza del polímero ya que sólo se han aislado poliglicerolfosfatos con D-alanil como único sustituyente.

Se ha analizado por resonancia magnética nuclear la estructura de los LTA de cuatro cepas de *Lactobacillus*: *L. plantarum* WCFS1, *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* 100-23 y *L. delbrueckii ssp. lactis* ATCC 15808 (Palumbo *et al*, 2006; Perea Velez *et al*, 2007), hallándose una diferencia en el largo de las cadenas: 20-22 residuos de glicerolfosfatos en *L. plantarum* y *L. reuteri*, 33 y 50 residuos en *L. delbrueckii* y *L. rhamnosus* respectivamente. El grado de sustitución con D-Alanina varía también entre estas cepas: 42% D-Ala:Gli-P en *L. plantarum*, 74% D-Ala:Gli-P en *L. rhamnosus*, 76% en *L. reuteri* y 24% en *L. delbrueckii*.

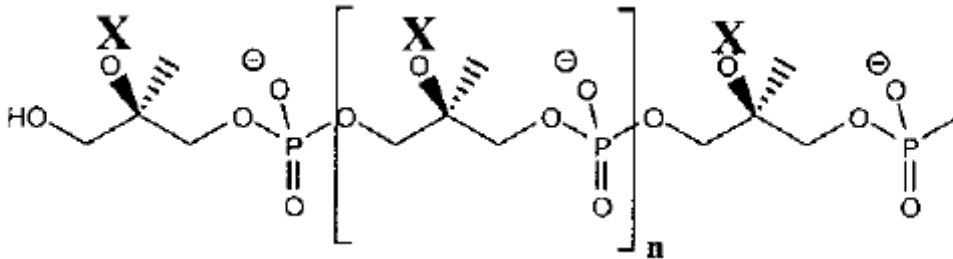
Ácidos Teicoicos (WTA)



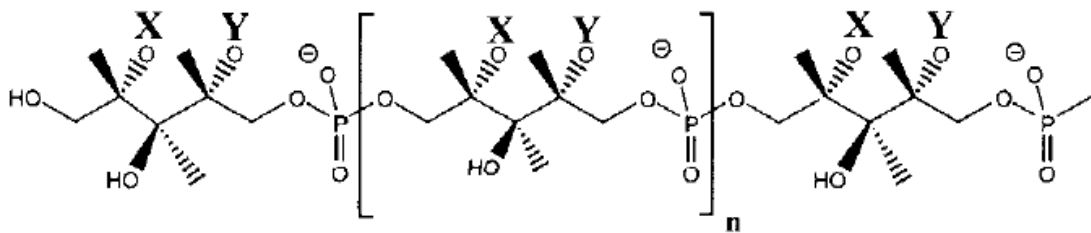
A. Unidad de enlace



B. Poli (Gli-P)



Poli (Rbo-P)

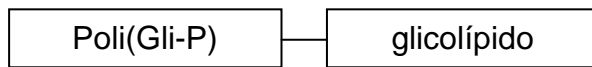


C. Sustituyentes

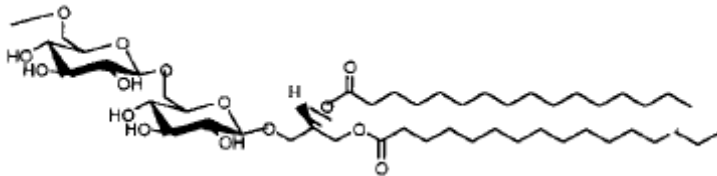
Poli (Gro-P) (X)
D-Alanil-
 α -Glucosil-
H-

Poli (Rbo-P) (X)
D-Alanil-
H-
Poli (Rbo-P) (Y)
 α -GlcNHAc-
 β -GlcNHAc-

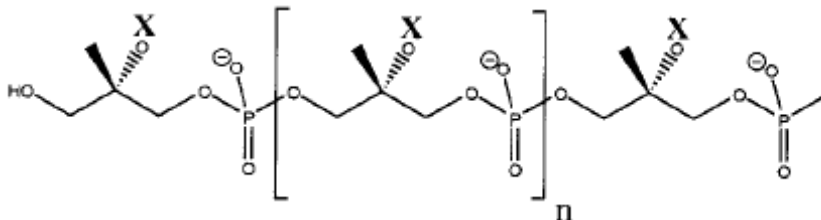
Ácidos Lipoteicoicos (LTA)



A. Ancla glicolipídica



B. Poli (Gli-P)



C. Sustituyentes (X)

H- α -GlcNAc-
 D-alanil α -Gal-

6.2-Rol de los Ácidos Teicoicos en la fisiología bacteriana

La presencia universal de los ácidos teicoicos en la pared de las bacterias gram positivas ha dado lugar a numerosos estudios que dilucidaron importantes roles de estas moléculas en lo que respecta a la función, integridad y recambio o “turn-over” de la pared celular.

En primer lugar, los ácidos teicoicos conforman la capa más externa, es por esto que se les adjudica un rol protector de la envoltura celular de las gram positivas. Dicho rol protector puede ser indirecto, cuando los teicoicos están unidos a proteínas S-layer como en *B. anthracis* y *L. acidophilus*, o asociados a ácidos micólicos como en *Mycobacterium*. O pueden ofrecer una protección directa, haciendo de barrera para obstruir poros y cavidades

entre las cadenas de peptidoglicano o modificando las propiedades fisicoquímicas de la pared para impedir el pasaje de bacteriocinas, antibióticos, agentes surfactantes y fagos.

Se ha demostrado en *S. aureus* que la alteración de la estructura o contenido de los ácidos teicoicos condujeron a un incremento en la sensibilidad frente a péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica y antibióticos. (Peschel *et al*, 1999, Peschel y Sahl 2006 , Peschel *et al*, 2000). Además, se ha visto que son los ácidos teicoicos los responsables de otorgar resistencia frente a hidrolasas de pared como la Lisozima al ofrecer un impedimento estérico para la unión de ésta y su blanco: peptidoglicano. (Bera *et al*, 2007).

La naturaleza hidrofílica de la parte más superficial de los ácidos teicoicos tiene un fuerte impacto en las propiedades fisicoquímicas de la envoltura bacteriana. Así, mutantes de *S. aureus* que contenían ácidos teicoicos alterados mostraban una reducción en la formación de biofilm y virulencia atenuada en *in vivo* (Fedtkle *et al*, 2007, Gross *et al*, 2001, Collins *et al*, 2002).

Por su naturaleza de zwitterion los ácidos teicoicos tienen un rol importante en determinar un microambiente iónico favorable para la célula (Heptinstall *et al*, 1970). Están implicados en mantener el gradiente de protones a través de la membrana plasmática, crucial para el metabolismo energético de la célula. (Calamita *et al*, 2001). Los ácidos teicoicos tienen una particular afinidad por los cationes bivalentes y se ha propuesto que proveen un mecanismo de almacenamiento para iones Mg^{++} . (Heptinstall *et al*, 1970).

Las bacterias pueden regular el nivel de sustitución por ésteres de D-Alanina en los ácidos teicoicos, variando consecuentemente la carga neta aniónica de los mismos. El operón *dltABCD*, es el responsable de la D-alanilación de los ácidos teicoicos (Neuhaus *et al*, 1996).

6.2.1-Rol de los D-Alanil ésteres de TA

Se han propuesto tres funciones fundamentales de los D-alanil-ésteres de TA:

- (i) mantener la homeostasis catiónica,
- (ii) modular la actividad de las autolisinas y
- (iii) definir las propiedades electromecánicas de la pared celular.

Además, se han descrito funciones adicionales en lo que respecta a adhesión, formación de biofilm, tolerancia ácida, coagregación, plegado de proteínas, resistencia a antibióticos, sensibilidad a UV y virulencia.

6.2.1.1-D-Alanil ésteres de TA y pegado (“binding”) de cationes

Los TA tienen un rol importante en mantener la homeostasis de cationes en bacterias gram positivas proveyendo una reserva de iones en la pared celular requeridos para las actividades enzimáticas. Además el gradiente de iones podría mitigar los cambios de presión osmótica entre el interior y exterior de la célula. La cantidad de cationes unidos a los TA es modulada por el grado de D-alanilación, que introduce cargas positivas en estos polímeros. Baddiley y colaboradores (1973) observaron que los residuos de D-Ala tenían un marcado efecto en la asociación de cationes bivalentes como el Mg^{++} y Ca^{++} en los TA de *B. licheniformis* y *L. plantarum*. Por medio de estudios de espectroscopia de rayos X demostraron que cuando los ésteres de D-Ala estaban presentes los cationes se unían de un modo monodentado que se traduce en una débil interacción iónica. En ausencia de estos ésteres, ocurre una unión bidentada entre dos uniones aniónicas fosfodiéster lo que refleja una interacción iónica fuerte. Experimentos en los que se han removido los ésteres de D-Ala en WTA de *S. aureus* dieron como resultado un incremento en la cantidad de Mg^{++} unido a la pared, concluyendo que el aumento en la capacidad de pegado es consecuencia de la disminución en el contenido de ésteres de D-Ala (Lambert *et al*, 1975).

6.2.1.2-D-Alanil Ésteres de TA y autolisinas

El efecto inhibitorio de los LTA sobre las autolisinas (hidrolasas de peptidoglicano) ha sido ampliamente descrito en la bibliografía. Se ha visto cómo el grado de D-alanilación en particular es importante. Un LTA no sustituido y un LTA sustituido representan las formas activa e inactiva respectivamente para la inhibición de autólisis. (Fischer *et al*, 1982). La unión de las autolisinas, la mayoría de ellas de naturaleza catiónica, a los ácidos teicoicos es considerado un mecanismo de control que reduce su actividad. Así, mutantes de *S. aureus dlt*, que presentan mayor carga negativa en sus ácidos teicoicos muestran una reducción de la actividad autolítica respecto de la cepa salvaje. (Peschel *et al*, 2000).

Sin embargo, se ha encontrado evidencias en que la ausencia de los ésteres de D-Alanina en los ácidos teicoicos producían un efecto inverso, Wecke y colaboradores (1997) demostraron en cepas de *Bacillus subtilis dlt* un incremento en la actividad autolítica. Estos autores cuestionaron las primeras hipótesis sobre el efecto inhibitorio de los LTA sobre las autolisinas

y argumentaron que las cargas negativas de los LTA y WTA servirían *in vivo* para fijar las autolisinas catiónicas dentro del complejo membrana- pared por interacción electrostática.

7-Síntesis de los D-Alanil LTA

En *Lactobacillus casei* la síntesis de los D-Alanil-LTA requiere de cuatro proteínas codificadas por el operón *dltABCD*. La importancia de los ésteres de D-Alanina en las especies de *Lactobacillus* y en otros géneros gram positivos con bajo contenido G+C queda evidenciado por la presencia de este operón altamente conservado. (Figura 4)

Figura 4: Operón *dlt* en bacterias gram positivas

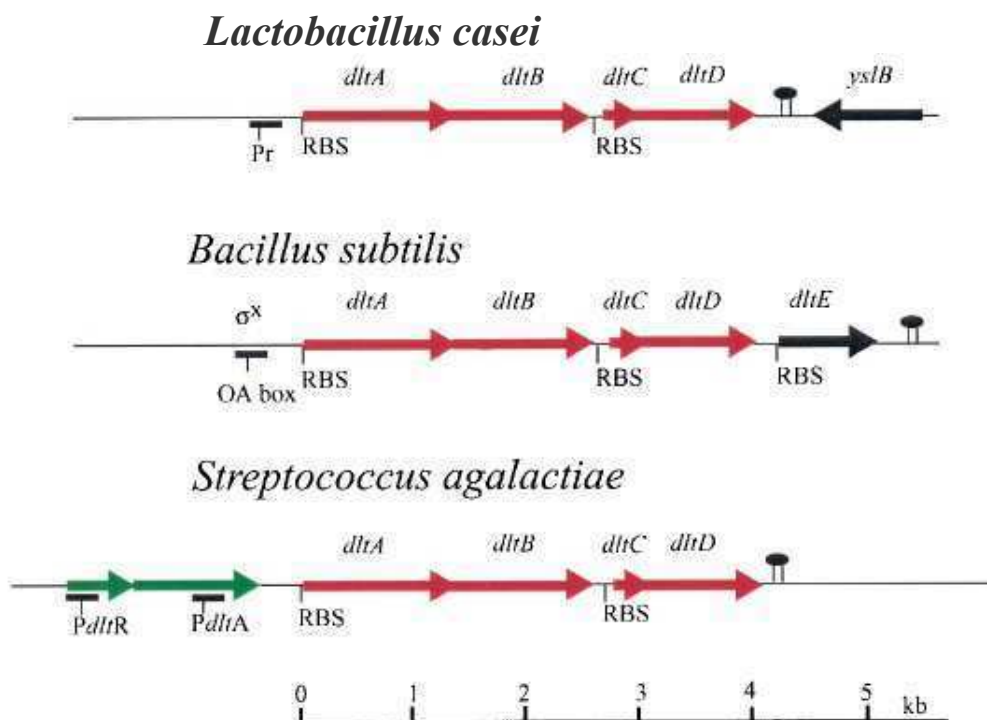
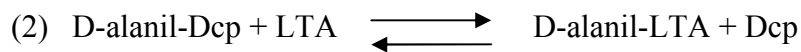
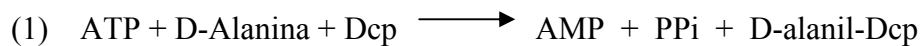


Figura 4: Comparación entre los operones *dlt* de *Lactobacillus casei* BL23, *Bacillus subtilis* 168 y *Streptococcus agalactiae*.

En rojo se muestran los genes comunes a todos los operones *dlt*. Los genes en verde en *S.agalactiae* corresponde a un sistema regulatorio de dos componentes. Los genes en negro no son requeridos para la D-alanilación. RBS: Sitio de unión al Ribosoma.

El primer gen del operón, *dltA* codifica para una D-alanil carrier proteína ligasa (Dcl), de 56-kDa, la cual activa la D-Alanina con gasto de ATP. El gen *dltC* codifica para una D-alanil carrier proteína (Dcp) de unos 8.8-kDa. Además de las proteínas Dcl (*dltA*) y Dcp (*dltC*), el operón contiene dos genes adicionales *dltB* y *dltD* que codifican una proteína transmembrana (DltB) involucrada en el pasaje del complejo activado D-Alanil-Dcp y una proteína de membrana (DltD) que facilita la unión de Dcp y Dcl para la ligación de Dcp con D-Alanina. Entonces, la incorporación de D-Alanina en los LTA es llevada a cabo en dos pasos:



En esta secuencia, el complejo D-alanil-Dcp provee el enlace fundamental entre la proteína ligasa (Dcl) y la D-alanilación de los LTA. La transferencia de la D-Alanina a partir de este intermediario requiere que su aceptor, los LTA, se encuentren asociados a membrana.

Figura 5.

Figura 5: Modelo de D-alanilación de los LTA

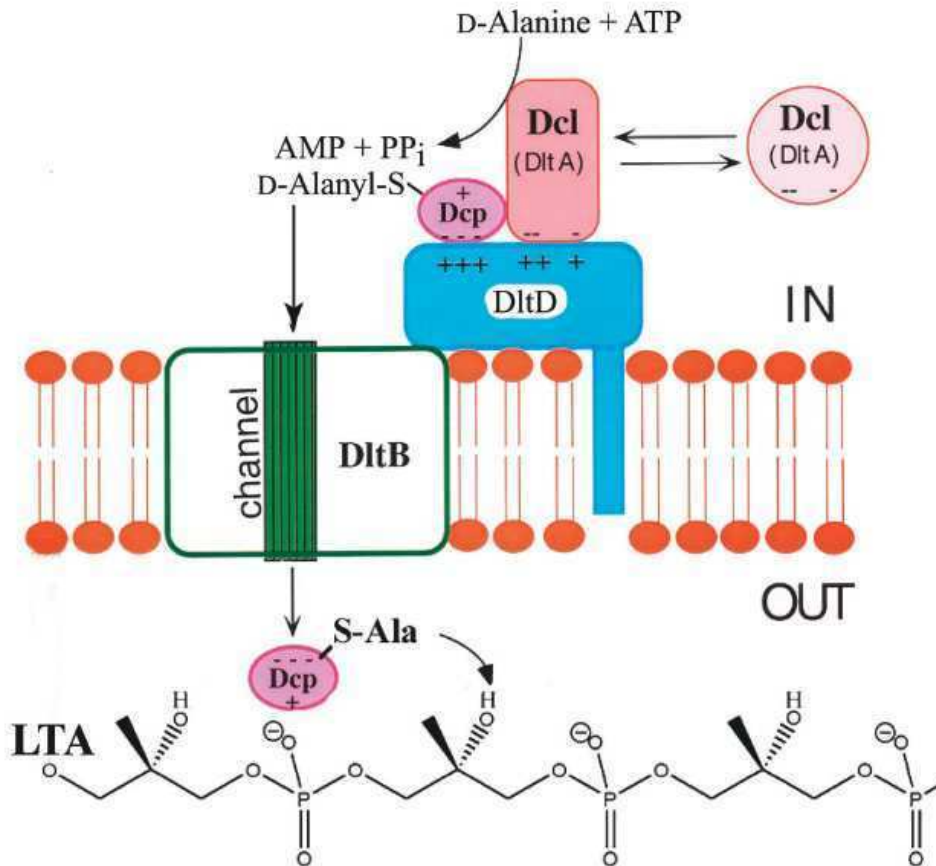


Figura 5: Modelo para la incorporación de los ésteres de D-alanina en los LTA asociados a membrana. DltD provee los sitios de unión para la aproximación de Dcp y DltA en la cara interna de la membrana. DltB forma un canal para la secreción del complejo D-alanil-Dcp hacia el lado externo de la membrana donde ocurriría la D-alanilación. (esquema extraído de Neuhaus y Baddiley, 2003)

A pesar de existir caminos biosintéticos diferentes para los WTA y LTA, los D-alanil ésteres de WTA son derivados de los D-alanil LTA. Esto es consistente con la presencia de un único operón que codifica la maquinaria para la incorporación de la D-alanina.

Con excepción de los D-alanil ésteres, los WTA y LTA son ensamblados por diferentes vías.

8-Síntesis de ácidos teicoicos

La envoltura celular de las bacterias gram positivas con bajo contenido G+C contiene moléculas polianiónicas que pueden ser categorizadas en relación a su anclaje: WTA covalentemente asociados e intercalados en el peptidoglicano y LTA asociados a membrana por un ancla glicolipídica. En ambos casos, el polímero consta de una cadena de poliglicerolfosfatos aunque la unidad repetitiva de Glicerol-P en ambos polímeros deriva de distintas fuentes. Los WTA contienen sn-glicerol 3-Fosfato derivado de CDP-glicerol mientras que los LTA contienen sn-glicerol-1-Fosfato derivado de fosfatidilglicerol. Dado los diferentes orígenes de las unidades de Glicerol-P las cadenas no son estereoisoméricamente idénticas, por lo tanto los LTA no pueden ser considerados precursores de los WTA. (Fischer, 1988; Neuhaus y Baddiley, 2003)

Numerosos estudios se han realizado con el fin de desentrañar las bases bioquímicas y genéticas para la síntesis de WTA, particularmente a través de los estudios en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Neuhaus y Baddiley, 2003; Falconer y Brown, 2009; Swoboda *et al*, 2010). Sin embargo en los últimos años se han arrojado importantes conocimientos sobre el proceso de biosíntesis de los LTA, y es sobre ellos a los que dedicaremos esta sección, especialmente gracias a la labor de Angelika Gründling. En primer lugar se identificaron los genes para la biosíntesis y translocación del ancla glicolipídica, YpfP que sintetiza el ancla glicolipídica diglucosildiacilglicerol de los LTA en *S.aureus* (Gründling y Schneewind, 2007a). Más aún, identificaron la enzima LtaS en *B. subtilis* y *S. aureus* necesaria para la síntesis de la cadena de poliglicerolfosfato de los LTA. (Gründling y Schneewind, 2007b; Rahman *et al*, 2009). Curiosamente mientras que en *S. aureus* existe un solo locus para la LtaS, se identificaron cuatro putativas LtaS en el genoma de *B. subtilis*. El análisis de otros genomas de gram positivos también indicaron una aparente redundancia de genes de *ltaS*, incluyendo especies de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Listeria* (Rahman *et al*, 2009; Webb *et al*, 2009; Wörmann *et al*, 2011).

Actualmente se plantea una dicotomía para explicar la biosíntesis de los LTA. Se cuestiona si la polimerización del poliglicerolfosfato procede directamente sobre el ancla glicolipídica aceptora o si se lleva a cabo usando el fosfatidilglicerol como molécula carrier antes de transferir el polímero naciente al ancla glicolipídica.

Ambos modelos están representados en la figura 6. En el primer modelo (figura 6A) la primera unidad de glicerolfosfato es transferida al ancla glicolipídica por una LTA primasa

(LtaP) a diferencia de las reacciones de elongación procesivas catalizadas por la LtaS para generar el poliglicerolfosfato.

En el segundo modelo (figura 6B) se plantea la polimerización del poliglicerolfosfato sobre el fosfatidilglicerol y sugiere la necesidad de una actividad LTA transferasa para mover la cadena de poliglicerolfosfato de su lípido carrier al ancla glicolípida.

Figura 6: Biosíntesis de LTA

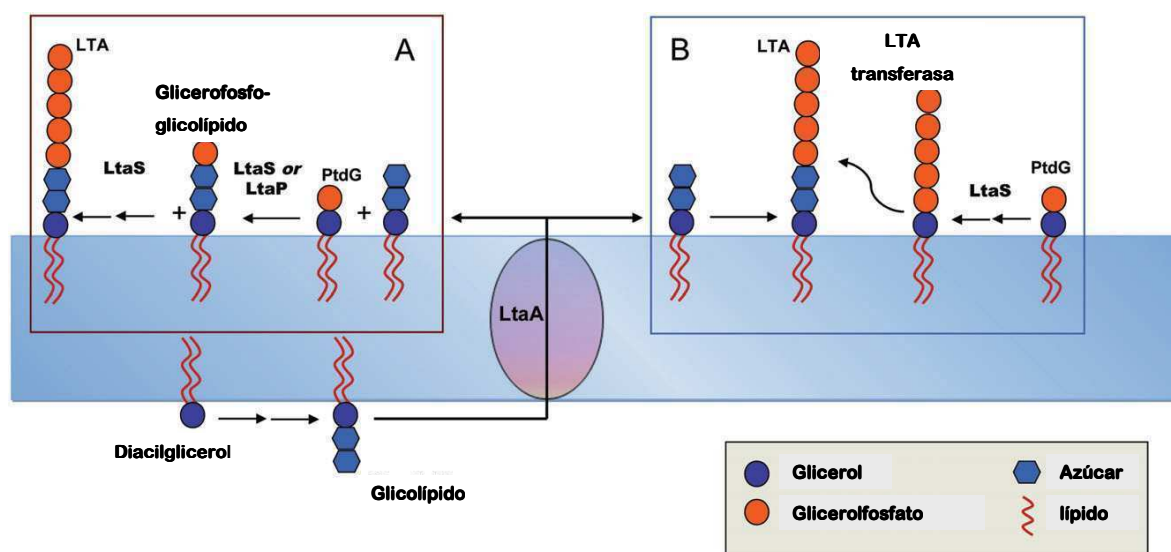


Figura 6. Biosíntesis de LTA. En A y B se representan los dos modelos propuestos para la síntesis de LTA. Esquema adaptado de Iain Sutcliffe 2011.

9-La respuesta a estrés osmótico en Bacterias Gram Positivas

En su hábitat natural, los microorganismos son frecuentemente expuestos a variaciones de la presión osmótica del medio ambiente. La membrana plasmática de las bacterias es permeable al agua pero constituye una barrera eficaz contra el pasaje de la mayoría de los solutos del medio y los metabolitos presentes en el citoplasma. Un cambio en la osmolaridad del medio ambiente podría comprometer las funciones celulares y metabólicas del microorganismo.

Un aumento brusco de la osmolaridad del medio externo, provoca un rápido eflujo de agua hacia el exterior de la célula, que en consecuencia provoca una disminución de la presión de turgencia, una variación de la concentración citoplasmática de solutos y un cambio del volumen celular (plasmólisis, en los casos extremos). A la inversa, un choque hipotónico provoca la entrada de agua en la célula, un aumento del volumen celular y de la presión de turgencia y eventualmente la lisis celular. Los dos tipos de variaciones osmóticas resultan deletéreas para las bacterias.

Para mantener la presión de turgencia dentro de los rangos específicos de viabilidad celular y evitar los efectos de plasmólisis y lisis los microorganismos ajustan la concentración de osmolitos intracelulares.

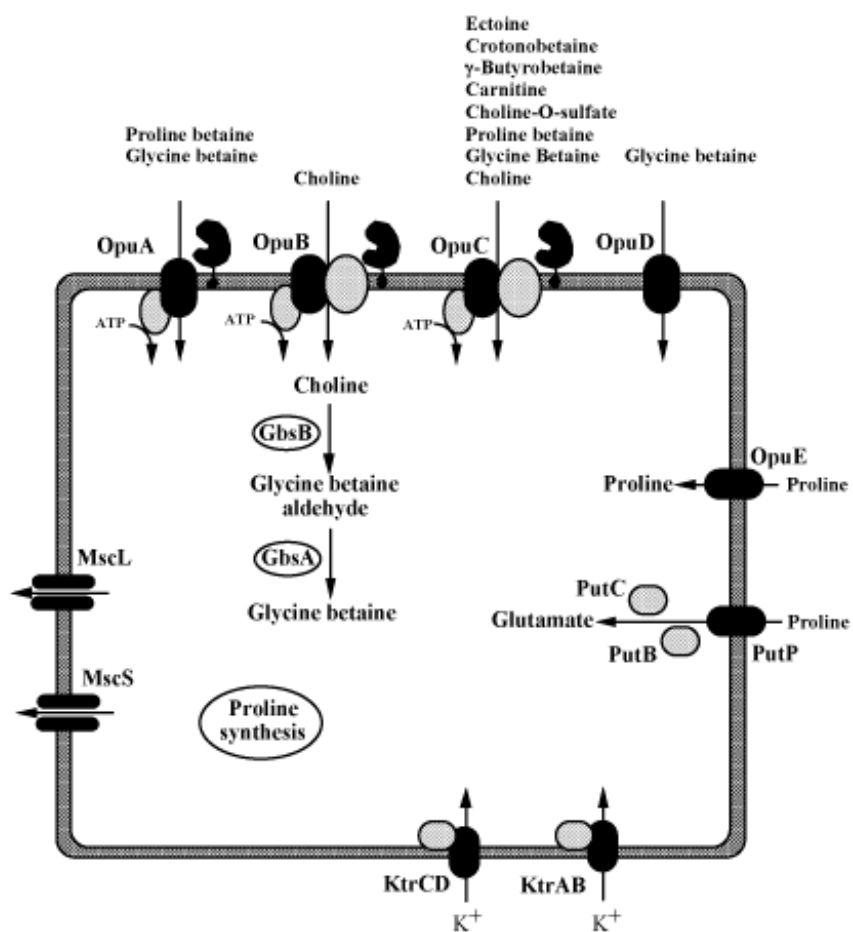
Los organismos generalmente responden al estrés osmótico (condiciones hiperormóticas) incrementando la concentración de un número limitado de solutos, osmolitos especiales no tóxicos o “compatibles”. La acumulación de estos osmolitos puede deberse mediante dos mecanismos: un sistema de transporte activo y la síntesis *de novo* (figura 7). Algunos solutos compatibles pueden aliviar el efecto inhibitorio de la alta osmolaridad cuando se hallan presentes en el medio de cultivo, sugiriendo que su acumulación se deba al transporte y no a la síntesis *de novo* y son denominados OSMOPROTECTORES.

Los principales solutos descritos hasta el momento en bacterias son: (Csonka y Hanson, 1991)

- Iones: K^+ .
- Aminoácidos: glutamato, glutamina, prolina, t-aminobutirato y alanina.
- Derivados de aminoácidos : ectoína, prolinbetaína
- Pequeños péptidos: N-acetilglutaminilglutamin-amida

- Disacáridos: trehalosa, sacarosa.
- Polioles: glicerol.
- Aminas cuaternarias: glicin betaína, carnitina.

Figura 7: Acumulación de los principales osmolitos en respuesta al estrés osmótico en bacterias gram positivas



9.1-La respuesta a estrés osmótico en Bacterias Ácido Lácticas

Como es sabido, las BAL constituyen un grupo heterogéneo de bacterias que ha sido tradicionalmente utilizado en la producción de alimentos fermentados. La industrialización de este tipo de alimentos ha otorgado una significativa importancia económica a estos microorganismos debido al rol que desempeñan en la calidad organoléptica e higiénica del producto. Para llevar a cabo la bio-transformación del producto es necesario que estas cepas resistan las condiciones adversas durante el proceso industrial, (desde el cultivo starter hasta condiciones de almacenamiento del producto).

Sin embargo las bacterias no sólo se presentan ante los cambios ambientales potencialmente estresantes en los procesos industriales, sino también en su hábitat natural donde la capacidad de responder rápidamente al estrés es esencial para la supervivencia.

Las BAL como otras bacterias gram positivas, evolucionaron mecanismos de sensado y resistencia de estrés que le permiten tolerar los cambios ambientales. La respuesta a estrés depende de la expresión coordinada de genes que pueden alterar diferentes procesos celulares: división celular, metabolismo del ADN, composición de la membrana, transporte, actividad proteolítica, etc., pero que de una forma concertada mejoran la tolerancia frente al estrés.

En sus variadas aplicaciones en la industria alimenticia, las BAL pueden ser expuestas a estrés osmótico debido al agregado de importantes cantidades de sal y/o azúcar a los productos.

A diferencia de las bacterias entéricas y *Bacillus subtilis*, las BAL tienen una limitación en la síntesis de osmolitos compatibles (Poolman *et al*, 1998), siendo la principal estrategia de osmotolerancia el ingreso activo de tales compuestos del medio de cultivo.

Se ha observado que las altas concentraciones de sales (KCl y NaCl) inhiben el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus lactis* mucho más que cantidades equimolares de sacarosa y lactosa, esto es porque estos azúcares solo imponen un estrés osmótico (y no de iones Na^+ tóxicos) transientes dado que las concentraciones internas y externas son rápidamente equilibradas por el ingreso de los mismos.

A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, donde la rápida acumulación de K^+ constituye la primer respuesta al estrés hiperosmótico, *L. plantarum* no acumula K^+ ni Na^+ .

Glassker y colaboradores (1998) determinaron los solutos osmocompatibles de *L. plantarum* cuando éste fue crecido en presencia de KCl 0.8M, resultando los aminoácidos glutamato y

prolina los principales osmoprotectores. Cuando éste fue incubado en presencia de la amina cuaternaria glicin betaína, este osmolito fue preferencialmente acumulado por sobre los aminoácidos.

También se ha observado que la presencia de di y tri péptidos aumentan la osmotolerancia de *L. casei* cuando estos fueron agregados en un medio químicamente definido (CDM). Mediante el estudio del sistema proteolítico se demostró que en alta osmolaridad la proteasa asociada a pared (PrtP) y PepX (X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidasa) aumentaron su actividad y fueron desreprimidas en presencia de péptidos. Estos resultados demostraron una nueva estrategia de osmorresistencia de *L. casei* llevada a cabo por una función proteolítica para acumular un pool de aminoácidos y pequeños péptidos como moléculas osmoprotectoras. (Piuri *et al*, 2003)

9.2- Estrés osmótico y envolturas

Las bacterias gram-positivas tienen mayor osmotolerancia. Esta puede estar dada por la composición lipídica de su membrana como por la de su pared (espesor, composición).

La envoltura bacteriana constituye la primera barrera en detectar los cambios ambientales.

Se ha puesto central atención al estudio de la envoltura bacteriana (pared y membrana) debido al papel que cumple en la contención celular frente a la presión de turgencia, en el tránsito de osmolitos y en la contención de osmoprotectores (Poolman *et al*, 2002).

Se han realizado numerosos trabajos que han permitido caracterizar los cambios en la composición de envolturas que surgen de la adaptación a alta sal en bacterias gram positivas. Una de las líneas de investigación del laboratorio donde se ha realizado la presente tesis es precisamente el estudio de las modificaciones a nivel de envolturas en respuesta a estrés osmótico en diferentes especies de bacterias gram-positivas.

En *Bacillus subtilis*, una bacteria esporulante gram-positiva, cuyo hábitat natural es el suelo y por lo tanto sometida a drásticas variaciones ambientales como humedad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y osmolaridad, se han observado cambios en la composición de fosfolípidos y en los ácidos grasos en su membrana cuando es crecido en alta sal. La cardiolipina (CL), el fosfatidilglicerol y un glicolípido (diglucosildiglicérido), están involucrados en los cambios de composición que se producen a causa del estrés osmótico. (López *et al*, 1998, 2000). El fosfatidilglicerol es el fosfolípido predominante en la membrana

de la cepa salvaje. Gran parte del mismo se metaboliza a CL y glicerol cuando las bacterias son crecidas en condiciones de hiperosmolaridad. Esto sugiere que frente a estrés osmótico, la CL actuaría como regulador del intercambio de iones a nivel de la membrana. Mutantes de síntesis de CL muestran una menor adaptabilidad al estrés osmótico, condición en que aumenta el nivel de fosfatidilglicerol, indicando que aunque con menor eficiencia este fosfolípido podría contrarrestar el estrés salino (López *et al*, 2006). En cuanto a los ácidos grasos, se observa un aumento en la relación saturados/ lineales así como del insaturado 18-1 (ω -9)I. (López *et al*, 1998).

Se han observado también una sensibilidad diferencial hacia la acción de efectores que actúan a nivel de la pared bacteriana o de la membrana plasmática como antibióticos e infección por fagos (ϕ 29 y ϕ 105).

Por otro lado se observó que para la adaptación a la hiperosmolaridad, ocurren modificaciones de la pared celular que requieren de la actividad hidrolasa de una Penicillin Binding Protein de bajo peso molecular, la proteína PBP 4*. Esta proteína, codificada por el gen *pbpE*, sería necesaria para aumentar el recambio (turn-over) de la pared con la finalidad de remodelarla hacia una estructura osmocompatible. La endopeptidasa PBP 4* se encuentra notablemente aumentada a nivel transcripcional y traduccional en alta sal. Estas modificaciones llevarían a aumentar la permeabilidad de solutos osmocompatibles y la provisión de péptidos (Palomino *et al*, 2009).

En *Lacobacillus casei* BL23 se han estudiado las modificaciones a nivel de pared cuando es crecido en condiciones de hiperosmolaridad. Se ha observado un incremento en la lisis frente a mutanolisina tanto en células enteras como en paredes purificadas. Se ha visto también una mayor susceptibilidad a antibióticos con blanco de acción en la pared celular. Para estudiar con mayor profundidad las alteraciones de la pared celular a un nivel estructural se realizó un análisis de muropéptidos del peptidoglicano revelando un menor grado de entrecruzamiento. Esta disminución en el entrecruzamiento del peptidoglicano estuvo acompañada con una disminución en la expresión de algunas PBP (Penicilling Binding Proteins) (Piuri *et al*, 2005). Por otro lado en esta cepa de *L. casei*, más del 87% de los lípidos polares son glicolípidos, mientras el 12% son fosfolípidos. Estos glicolípidos presentan una gran variación durante el crecimiento en alta sal. En cuanto a los ácidos grasos, durante el crecimiento en alta sal, aumenta la relación de saturados/insaturados (como en *B. subtilis*) y se forma un ácido graso cíclico (cyc C19:0) (Machado *et al*, 2004)

En *Lactococcus lactis* también ha sido descrito el cambio en la composición de los ácidos grasos de la membrana luego del crecimiento en alta osmolaridad (Guillot *et al*, 2000).

10- Objetivos

Este trabajo de tesis tiene como objetivo estudiar los cambios a nivel de envoltura de *Lactobacillus casei* BL23 cuando las células son sometidas a estrés osmótico.

Se estudiarán los cambios producidos en el peptidoglicano (análisis de muropéptidos y grado de entrecruzamiento) y su relación con la expresión de proteínas PBP.

Nos hemos focalizado en el estudio de los ácidos teicoicos (WTA y LTA) por ser estos componentes la primera barrera de la envoltura en confrontar los cambios ambientales. Se evaluarán las modificaciones que sufren estos polímeros durante la osmoadaptación desde un aspecto bioquímico y genético teniendo en cuenta el nivel de expresión de los mismos como también el nivel de D-alanilación. Se estudiará si los cambios producidos en estos polímeros como consecuencia del estrés osmótico alteran la funcionalidad de los mismos respecto a la sensibilidad frente a agentes antimicrobianos (Nisina, Vancomicina), en la formación de biofilms y en el binding de cationes bivalentes. Se evaluará la construcción de una mutante *dltA* a fin de establecer la esencialidad de la función y en caso de conseguirla se verificará el fenotipo resultante y su relación con la respuesta osmoadaptativa.

Se verificará si la fragilidad generada en las envolturas por el crecimiento en alta sal puede ser aplicado como metodología para mejorar el procedimiento de electrotransformación de estas bacterias.

Cepa en estudio

La cepa en estudio en el presente trabajo de Tesis es *Lactobacillus casei* BL23, curada del plásmido pLZ15, y conservada a -20°C con 15% de glicerol (v/v).

Lactobacillus casei BL23 se propaga en medio MRS (Condición control de crecimiento, considerada isoosmótica, que se abrevia con la letra C) y en MRS N (MRS conteniendo NaCl en una concentración de 0.8M, condición de alta osmolaridad o alta sal que se abrevia con la letra N).

Cepas y plásmidos y utilizados.

Cepas	Genotipo relevante	Origen
<i>Lactobacillus casei</i> BL23	Curada del plásmido pLZ15 que codifica un sistema lactosa permeasa/ β galactosidasa	IATA
<i>Lactobacillus delbrueckii lactis</i> LKT		CERELA
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	Con plásmido endógeno	IATA
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356		CERELA
<i>Lactobacillus paracasei</i> ATCC27092 y ATCC27139		INLAIN-UNL
<i>Lactococcus lactis</i> MG1363	pG ⁺ Host9	INRA
<i>Escherichia coli</i> KW1	<i>metB strA purB(aad-uid-man) hsr hsm⁺ gusA⁻</i>	
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17(rk-, mk+), supE44, relA1, $\Delta(lac-proAB)/F'$ [<i>traD36, proAB⁺, lacI^f, lacZΔM15</i>]</i>	

Plásmido /Hospedador (origen)	Características relevantes (tamaño,marcador,modo de replicación rango de hospedador)
pIL253/ <i>L. casei</i>	4.8 kb Em ^R Replicación Theta
pG ⁺ Host9/ <i>L. lactis</i> ⁴	3.75 kb Em ^R Circulo rodante
pNZ273/ <i>E.coli</i> KW1	4.66 kb Cm ^R Circulo rodante
pGK13 / <i>E.coli</i> JM109	4.96 kb Cm ^R , Em ^R Circulo rodante Amplio rango de huesped
pRV610/ <i>E.coli</i> JM109	5.17 kb Em ^R , Ap ^R Replicación Theta
pRV613/ <i>E.coli</i> JM109	8.69 kb Em ^R Ap ^R Replicación Theta
pRV620/ <i>E.coli</i> JM109	5.6 kb Cm ^R Ap ^R Replicación Theta

Ensayos Bioquímicos

Purificación de paredes

Se realizaron cultivos de 500ml y 1000 ml de fase estacionaria de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS y MRS N (N= 0.8M NaCl) respectivamente. Luego de 16 hs. de incubación las células fueron cosechadas por centrifugación y lavadas con agua destilada estéril. Los pellets celulares fueron resuspendidos en SDS 4% y calentados por 30 minutos a 100°C. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó una centrifugación a 1500x g por 5 minutos para eliminar restos celulares y células no lisadas. El sobrenadante resultante se centrifugó a 18000x g por 20 minutos y se realizaron 4 lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de detergente. Los pellets de pared fueron resuspendidos en buffer Fosfato de Potasio 0.1 M pH 6.8 y tratados con 30µg/ml de DNasa y 5µg/ml de RNasa. De esta

forma se hidroliza el ADN y ARN que puede quedar adherido a la pared y dar por ende resultados erróneos en las determinaciones de fósforo. Al cabo de 2 horas de incubación a 37°C, las paredes fueron precipitadas y resuspendidas en buffer Tris HCl pH 7.5 100mM, MgCl₂ 10mM e incubadas con Tripsina 0.5 mg/ml a 37°C toda la noche. Para purificar las paredes de las proteinasas se las hirvió en SDS 2% por 15 minutos. El tratamiento con tripsina y SDS remueve las proteínas y los ácidos lipoteicoicos.

Las paredes purificadas son finalmente liofilizadas para luego estimar el rendimiento.

Ensayo de sensibilidad a Mutanolisina de células enteras y paredes

Células enteras y fracciones de pared celular purificadas con tratamiento de SDS de las condiciones C y N fueron ensayadas para estudiar la sensibilidad a lisis por mutanolisina. Tanto las células como las paredes fueron resuspendidas en buffer Tris HCl 100 mM pH 8.5 hasta alcanzar una DO 550nm de aproximadamente una unidad.

A cada resuspendido se adicionó Mutanolisina en una concentración final de 25U/ml y se incubaron a 37°C. Se siguió la cinética de la lisis midiendo la densidad óptica a 550nm a distintos tiempos. Los resultados fueron expresados como la DO relativa a la DO inicial en función del tiempo.

Preparación de proteínas de membranas

Se realizaron cultivos de 500ml y 800 ml de fase estacionaria de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS y MRS N (N= 0.8M NaCl) respectivamente. Las células fueron cosechadas y liofilizadas para calcular el peso seco.

Los liofilizados fueron resuspendidos en buffer citrato de sodio 0.1M pH 4.7 y desintegrados con sonicador, realizando 5 pulsos de 30 segundos cada uno con bolitas de vidrio. Se agregó un volumen de n-butanol y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 13000x g por 20 minutos se recuperó la fase acuosa la cual fue liofilizada.

Luego cada liofilizado fue resuspendido en buffer citrato de sodio 0.1M pH 4.7 y 1mM del inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y dializado contra buffer citrato de sodio 20 mM pH 4.7 por 10 hs. Posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas de los extractos mediante el método de Bradford (reactivo de Bio-Rad).

Ensayo de marcación de PBP

La concentración de proteínas de cada muestra de membrana fue determinada usando el método de Bradford (reactivo de Bio-Rad) en una calibración con el estándar BSA. La detección de las PBP se efectuó utilizando el reactivo fluorescente BOCILLIN FL, el cual es comunmente usado en ensayos de binding (Zhao *et al*, 1999).

Las mezclas de reacción (20µl) conteniendo 20µg de preparación de membranas y 30µM del reactivo BOCILLIN FL fueron incubadas a 35°C por 30 minutos y posteriormente desnaturalizadas con 1% de SDS-Loading buffer a 100°C por 3 minutos.

Luego de la marcación, las muestras fueron corridas en un SDS-PAGE 10% a 100V por 2 horas.

Para visualizar las PBP marcadas, los geles se escanearon usando el equipo analizador de imágenes Fuji CCD LAS 1000 y software Image Gauge 3.122 (FujiFilm, Japón). Seguidamente los mismos geles fueron teñidos con una solución de Coomassie Blue para visualizar todas las proteínas de membrana y vueltos escanear.

Para el ensayo de saturación con Penicilina G, las mezclas de reacción, conteniendo 50 µg de preparación de membranas y diferentes concentraciones del antibiótico (0, 2, 10 y 20 µg/ml) fueron incubadas a 35°C por 30 minutos. Luego se les agregó BOCILLIM FL (30uM) y otra vez fueron incubadas por 30 minutos. Finalmente fueron desnaturalizadas y sometidas a electroforesis tal como fue descripto anteriormente.

Análisis bioquímico de ácidos teicoicos: WTA y LTA

Obtención de WTA (ácidos teicoicos asociados a pared celular)

La extracción de WTA se realizó a partir de paredes purificadas en las dos condiciones de crecimiento C y N.

Una fracción conocida de pared fue incubada con TCA (ácido tricloroacético) 5% por 5 hs a 60°C. Luego de la incubación se centrifuga a 18000xg por 15 min para bajar las paredes desprovistas de WTA y el sobrenadante es recuperado y liofilizado para su posterior análisis.

Determinación de Fósforo en WTA

A partir de los WTA obtenidos por hidrólisis ácida se realizó la determinación de Fósforo según Chen *et al* 1956. Brevemente, 0.5ml de muestra de WTA es mezclada con 0.5 ml de reactivo C (preparado del siguiente modo: Ácido Sulfúrico 6N: H₂O dest: Molibdato de Amonio 2.5%: Ácido Ascórbico 10% [1:2:1:1]), se incuba a 37°C por 2 hs y se mide la absorbancia a 820nm. Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de Fósforo (0, 0.1, 0.2, 0.5, y 1 µg) a partir de una solución de Fosfato de Sodio 150 µM para luego extrapolar en ella la concentración de Fósforo presente en las distintas muestras de WTA .

Determinación de D-Alanina en WTA:

Según la reacción enzimática descrita en Oguri *et al*, 2007. Esta reacción colorimétrica se basa en la oxidación de la D-Alanina en ácido pirúvico por la enzima D-aminoácido oxidasa. En presencia del compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazina el ácido pirúvico se derivatiza en un compuesto cromogénico que absorbe a 445 nm.

Las distintas fracciones de WTA fueron resuspendidas en 600µl de buffer Tris-HCl 0.2M pH 8.2 e incubadas con 100 µl de la enzima D-aminoácido oxidasa 10U/ml a 37°C por 30 minutos. Luego se agregan 70 µl de de 2,4-dinitrofenilhidrazina 1mM disuelto en Ácido Clorhídrico 1M y se incuba a 37°C por 10 minutos más. Se frena la reacción con el agregado de 300 µl de NaOH 1.5M y se mide la absorbancia a 445 nm. Se realiza una curva de calibración con concentraciones conocidas de D-Alanina, (0, 5, 10, 20 y 40 µg) para luego extrapolar en ella la concentración de D-Alanina presente en las distintas muestras de WTA.

Corrida electroforética de WTA

Los WTA obtenidos por hidrólisis ácida fueron analizados en una electroforesis en gel de poliacrilamida y visualizados posteriormente usando el colorante Alcian Blue y tinción de Plata. (Wolters *et al*, 1990).

Preparación del gel: El gel fue preparado con 15% p/v poliacrilamida (29:1 acrilamida bisacrilamida), persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) en buffer Tris Borato 0.1M pH 8.2.

Preparación de las muestras: antes del sembrado de las muestra, se les determinó la concentración de fósforo para normalizarlas a una misma concentración: 2 ng P.

Los WTA fueron resuspendidos en buffer Tris Borato 0.1M pH 8.2 conteniendo 10 % de glicerol para incrementar la densidad de las muestra. En un pocillo adyacente se coloca el colorante azul de bromofenol como indicador del avance de la corrida.

La corrida se realiza en frío a 32V/cm hasta que el indicador llegue hasta abajo del gel.

Revelado: Los WTA fueron visualizados con la tinción de Alcian Blue-Plata de Min y Cowman descrita en Wolters *et al* 1990.

Finalizada la corrida, se coloca el gel en una solución acuosa de Alcian Blue 1mg/ml por 30 minutos con agitación suave. Se remueve la solución y se hacen lavados con abundante agua destilada pudiéndolo dejar toda la noche. Luego de la remoción del colorante se coloca el gel en una solución de Dicromato de Potasio 3.4 mM, Ácido Acético 3.2 mM por 10 minutos. Se lava varias veces con agua destilada y se coloca el gel en agitación en 12 mM de Nitrato de Plata bajo iluminación (30cm de una lámpara de 100W incandescente) por 25 min. Se aspira la solución, se hacen lavados rápidos con agua. Para visualizar la imagen se siguen tres tratamientos con Carbonato de Sodio 0.28 M y Formaldehído 6mM.

- I) Se incuba el gel en esta solución hasta oscurecerse.
- II) Se hace un baño rápido con nueva solución.
- III) Se deja el gel en solución hasta que la imagen se intensifique y se saca en el momento en que comienza a oscurecer el background.

Por último se pone el gel en 0.1 M de Ácido Acético para finalizar el progreso de la reacción y se fotografía el gel.

Obtención de LTA (ácidos lipoteicoicos asociados a membrana celular)

Los LTA fueron aislados realizando una extracción con n-butanol y posterior cromatografía de interacción hidrofóbica como describe Morath *et al* 2001. Se realizaron cultivos de 500ml y 800 ml de fase estacionaria de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS y MRS N (N= 0.8M NaCl) respectivamente. Las células fueron cosechadas y liofilizadas para calcular el peso seco.

Los liofilizados fueron resuspendidos en buffer Citrato de Sodio 0.1M pH 4.7 y desintegrados con sonicador. Se agregó un volumen de n-butanol y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de centrifugar a 13000x g por 20 minutos se recuperó la fase acuosa la cual fue evaporada y dializada contra 20mM de Citrato de Sodio pH 4.7 a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una cuantificación de proteínas de los extractos mediante el método de Bradford (reactivo de Bio-Rad) y se ajustaron las muestras a una concentración de 0.088mg/ml de proteínas. Se liofilizaron y se resuspendieron en 1ml de 15% de n-propanol equilibrado con 0.1M de Citrato de Sodio pH 4.7.

Los LTA se purificaron por cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando una columna de Octil-Sefarosa. La columna fue eluida con un gradiente discontinuo de n-propanol (20% de n-propanol, 35% n-propanol, 45 % n-propanol, 55% n-propanol y 60% n-propanol equilibrado con 0.1M de Citrato de Sodio pH 4.7).

Se mide la cantidad de Fósforo por el método de Chen de cada eluido para determinar la fracción enriquecida con LTA.

Determinación de Fósforo en LTA

Se realiza por el método de Chen *et al* 1956, descripto más arriba.

Determinación de D-Alanina en LTA

Se realiza por el método de Oguri *et al* 2007, descripto más arriba.

Determinación de Glicerol en LTA:

Para la determinación de glicerolfosfato (Gli-P), una fracción de LTA fue sometida a hidrólisis ácida con HCl 4M 4hs a 110°C, luego de la evaporación del ácido y neutralización de la muestra se procede a realizar la cinética enzimática a 340 nm en la mezcla de reacción 100mM de Nad^+ , 100mM de DTT, 5U de la enzima GPDH y 100mM de buffer glicina pH 9. A partir de las cinéticas con concentraciones patrones de glicerol 1- Fosfato, se cuantifica el glicerolfosfato presente en las muestras de LTA y se informa por mg de Peso Seco celular.

Corrida electroforética de LTA

El análisis de los LTA por electroforesis en geles de poliacrilamida fue adaptado del protocolo descrito por Pelkonen *et al* 1998. La corrida se realizó en geles de gradiente de 20 a 30 % de poliacrilamida en buffer Tris Borato EDTA (TBE 1X: 0.089 M Tris base, 0.089 M Ácido Bórico, y 0.002 M EDTA [pH 8.3]). Los geles son preelectroforeados a 10V/cm por una hora en frío.

Las muestras liofilizadas de LTA fueron resuspendidas en TBE 1X con 1/10 de volumen de glicerol 87% para incrementar la densidad. Se determina la concentración de fósforo en las muestras para normalizar a 5ng. Se hace correr azul de bromofenol en una calle separada de los LTA para seguir el avance de la corrida electroforética.

Los LTA fueron corridos a 20V/cm por 5hs a 4°C. La visualización de los LTA se realiza por la técnica de tinción de Alcian Blue-Plata de Min y Cowman anteriormente descripta.

Sensibilidad a Nisina y Vancomicina: Se realizaron cultivos de 3 ml en MRS y MRS N (N= 0.8M NaCl) a los cuales se añadió concentraciones crecientes de Nisina (Sigma): 0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/ml}$ o vancomicina: 0, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/ml}$. Tales cultivos fueron inoculados con una dilución 1/40 de un precultivo ON de *Lactobacillus casei* BL23. Luego de una incubación de 24 hs a 37°C se midieron las DO 600nm y se normalizaron a su correspondiente cero de antibiótico. Se calculó el porcentaje de sobrevivencia en la concentración inhibitoria mínima (CIM) para las condiciones ensayadas.

Ensayo de formación de Biofilms: este ensayo se realizó empleando distintos medios de cultivo: MRS, TSB (Tryptic Soy Broth), TSBm (Tryptic Soy Broth modificado) y MRS FB(MRS Fermentation Broth) cuyas composiciones se detallan en el apéndice. Los medios TSB, TSBm y MRS FB fueron suplementados con 0.2% de glucosa.

El ensayo fue realizado en tres condiciones de osmolaridad: en medio control, en medio con 0.5M de NaCl y medio con 0.8M NaCl.

Se adicionó 200 µl de cada medio en pocillos de microplacas de 96 wells de polistireno (Greiner Labortechnik, Frickenhauser, Alemania). A cada pocillo se inoculó 5 ul de un cultivo ON de *Lactobacillus casei* BL23 cuya DO600nm fue ajustada a 0.2. Luego de una incubación a 37°C por 48 hs en condiciones anaerobias se detecta la formación de biofilm de la siguiente manera: se retira el sobrenadante de los pocillos y el biofilm es teñido con 200 µl de cristal violeta 0.1% (p/v) en isopropanol-metanol-PBS (1:1:18[v/v]). Se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y se hacen dos lavados con agua destilada adicionando 200 µl por pocillo para remover el exceso de colorante no fijado en las células adheridas. Después de secar a temperatura ambiente se remueve el colorante con 200 µl de etanol 90%.

Se mide la absorbancia a 590 nm de la solución con lector de placas de ELISA.

Se realizaron tres experimentos independientes de cada condición analizada, cada una con seis réplicas. Adicionalmente, siempre se incluyó medio estéril para ser usado como blanco.

Ensayo de absorción de Cu⁺⁺

Los ensayos de absorción de Cu⁺⁺ se realizaron sobre células enteras de *Lactobacillus casei* BL23 y sobre extractos de paredes obtenidos por lisis alcalina a partir de cultivos en las dos condiciones de crecimiento, C y N (N=0.8M).

En la extracción de paredes por lisis alcalina los pellets celulares fueron resuspendidos en 3 ml de KOH 0.6 M y autoclavados a 0.5 atm por 5 minutos, se realizó luego un enfriado rápido en hielo y se neutralizó con 8 ml de HCl 2N. Se centrifugó a 2000 xg para bajar restos celulares y el sobrenadante (paredes celulares) se centrifugó a 18000 xg por 20 minutos, se hacen 3 lavados con H₂O con agua destilada y el pellet resultante de pared se resuspende finalmente en H₂O miliQ.

Cuando fue necesario, se realizó la remoción de los alanil ésteres mediante la suspensión de las paredes purificadas en 10 mM de Tris HCl a pH 9 por 3 horas a 37°C (Lambert *et al*,

1975). Para su posterior análisis las paredes fueron separadas por centrifugación y lavadas dos veces con H₂O miliQ.

Distintas DO celulares y de paredes fueron resuspendidas en H₂O miliQ con una concentración de Cu⁺⁺(CuSO₄ · 5H₂O Sigma grado analítico) inicial de 100 ppm en un volumen final de 1ml en condiciones óptimas de pH y temperatura (pH 5 y 25°C)(Allievi *et al*, 2010). Luego de alcanzado el equilibrio, las células y las paredes fueron removidas por centrifugación (20000x g). Se determina el metal no absorbido en el sobrenadante por el método de BCA (ácido bicinconínico) (Brenner *et al*, 1995). La cantidad de metal absorbido se determina como la diferencia entre (*C_i-C_f*), donde *C_i* y *C_f* corresponden a las concentraciones inicial y en el equilibrio de Cu⁺⁺ en la solución expresada en ppm, siendo la *C_i* de Cu⁺⁺ siempre de 100 ppm. Los resultados mostrados en los gráficos corresponden a los valores promedios de ppm absorbidas con sus DS de tres experimentos independientes.

Técnicas Moleculares

Extracción de ADN de *Lactobacillus*:

Se recogieron por centrifugación las células de 10 ml de un cultivo overnight 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 SDS o 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 volúmenes de etanol absoluto o 0,6 volúmenes de isopropanol (dependiendo del volumen final alcanzado) a -20 °C al menos 1 hora. En algunos casos luego de colocado el etanol el ADN se recuperó empleando una varilla de vidrio, se dejó secar bien y la varilla se dejó toda la noche a 4 °C en agua o buffer TE (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM). De esta manera se obtiene el ADN menos fragmentado y libre de sales.

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

Extracción de ARN de *Lactobacillus*

La extracción de ARN total de *Lactobacillus casei* BL23 crecido en condición control y N se realizó según el protocolo de “fenol caliente” (Piuri *et al* 2003). Se resuspendió el pellet bacteriano de 10 ml de cultivo en 500 µl de Tris 50mM EDTA 2 mM pH 8, Acetato de Amonio 0,2 M pH 4 (La solución resultante tiene pH 7).

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.

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.

Para los ensayos de RT-PCR a una alícuota de ARN (aproximadamente 25 µg) se le agregaron 5 µl de DNAsa (1U/µl) (Promega) y se incubó 30 min a 37 °C.

La DNAsa se inactivó calentando durante 15 min a 65 °C.

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

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

Oligonucleótidos empleados como cebadores:

Nombre	Secuencia
dltA1	5`- GCCCAACCGAAACGACTGTG - 3`
dltA2	5`- GTACCCGCTGACACTTGATTGC - 3`
dltC1	5`- GAGGTAATTCATCATGGCAGACG-3`
dltC2	5`-GCCAAAGGATCTTCCCGATCG-3`.
yfn11	5`-GCCCCGTTATCTTGACGAAGC-3`
yfn12	5`-ATGTGAATCATAAATGGTACTCG-3`
ARN16s1	5`- GCGAAGGCGGCTGTCTGG – 3`
ARN16s2	5`- GGC ACTGAAGGGCGGAAACC –3`

RT-PCR semicuantitativa

Para la transcripción reversa se emplearon 3 µg de ARN de cada muestra. El ADNc fue sintetizado empleando 25 pmoles de los cebadores reversos específicos, dltA2, dltC2 y ARNr16s2. El ARN y los cebadores se calentaron a 95°C durante 10 min (para eliminar las posibles estructuras secundarias del ARN), se colocaron inmediatamente en hielo 2 min y se incubaron con 100U de M-MLV transcriptasa reversa (Ambion) durante 1 hora a 42 °C y por último 10 min a 92 °C.

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 18 y 24 ciclos usando una cantidad fija de ADNc de *dltA* y *yfnI*, de 15 y 21 para *dltC* y de 7 a 21 ciclos para ARNr16s.

Las condiciones de amplificación fueron: el número de ciclos máximo para *dltA* fue, 24 ciclos secuenciales a 95°C por 1 min , 54°C por 1 min y 72°C 1min. Para *dltC* y ARNr16s fueron de 21 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C 1min y 72°C 1min.

Para cada ciclo de amplificación elegido, se corren en un gel de agarosa 1% 10ul de las diluciones tal cual, 1/3 y 1/9 de los productos de *dltA* y ARN 16s. Y diluciones tal cual, 1/5 y 1/25 para *dltC*. Las bandas se visualizan con bromuro de etidio 1ug/ml.

El análisis densitométrico se realizó empleando el Fuji LAS 1000 y el programa Image Gauge 3.122

Obtención y transformación de células competentes de *Escherichia coli*.

Las células competentes de *Escherichia coli* se prepararon tal como describe Hanahan (1983) con una alta eficiencia de transformación.

Brevemente: un cultivo de 16hs. fue diluído 1/60 en medio LB y crecido durante 3-4 hs.. Luego fue centrifugado 10 min. a 10.000rpm a 4°C y el pellet resuspendido en solución TfbI fría y mantenido en hielo durante 5 min. Posteriormente las células fueron centrifugadas al igual que en el paso anterior y el pellet resuspendido en 1ml de TfbII. Se alicuotaron las células de a 50µl y fueron conservadas hasta su uso a -70°C.

Para la transformación se tomaron 50 µl de células competentes y se les agregó de 5-10 µl del plásmido (1µg/µl) de interés. Se dejó 30 min. en hielo, se realizó un choque térmico de 90-120 segundos a 42°C y se colocó en hielo durante 2 min.. Las células se diluyeron en 500µl de LB líquido y se incubaron 1 hora a 37°C con agitación. Posteriormente se hicieron diluciones en LB y se sembraron en placas de selección con el antibiótico correspondiente según el plásmido Ampicilina 100µg/µl, Eritromicina 300ul/ul.

Obtención y transformación de células competentes de *Lactobacillus* por electroporación.

Se ensayaron varios métodos:

a) El método descrito por Chassy y Flickinger

A partir de un cultivo de 16 hs. de *Lactobacillus*, se realizó una dilución 1/10 en MRS, 1% glicina y se incubó a 37°C 1 hora. Las células se cultivaron hasta una DO₆₀₀ entre 0,4 y 0,6.

El cultivo se enfrió en hielo 15 min, se centrifugó a 4 °C y se lavó dos veces con buffer fosfato potásico 5 mM pH 7,4 con MgCl₂ 5mM a 0 °C.

Tras los lavados las células se resuspendieron en 0,5 ml de PEB (“phosphate electroporation buffer”) [0,3 M sacarosa; 1 mM MgCl₂; buffer fosfato potásico 5 mM pH 7,4] y se repartieron de a 50 microlitros en tubos eppendorf y fueron conservadas hasta su uso a -70°C.

A 50 μ l de células se le añadió el ADN plasmídico en no más de 5 microlitros (0,05 -4 microgramos) y se electroporaron en cubetas de 0,2 cm. de distancia en las siguientes condiciones: 25 microF, 1250 V (6250 V/cm) y 100 Ohms. Las células se resuspendieron en MRS (1ml volumen final) se incubaron 1 hora a 37°C y se sembraron en placas de MRS con Cloranfenicol 5 μ g/ μ l o Eritromicina 5 μ g/ μ l.

b) Método desarrollado en esta tesis

Preparación de células electrocompetentes:

Cultivos de 100 ml de MRS N (N= NaCl 0.9M) fueron inoculados con 1ml de un precultivo de *Lactobacillus* e incubados a 37°C en condiciones anaeróbicas por 18 hs. La DO₆₀₀ alcanzada fue entre 2-2.5. Las células fueron cosechadas en frío e inmediatamente se realizaron varios lavados con agua destilada estéril fría. Finalmente las células fueron resuspendidas en 1ml de agua destilada estéril y se prepararon alícuotas de 50ul para electroporar en el momento o preservar a -70°C.

Protocolos de electroporación:

Se ensayaron dos métodos de electroporación cuyos parámetros eléctricos se detallan en la Tabla 1. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador Gene Pulser (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) con cubetas de 0.2 cm. de espesor. 50 μ l de células fueron mezcladas con 5 μ l de plásmido (en una concentración de 20-100 μ g/ml) y se dejaron reposar en frío por unos minutos. Luego de la electroporación se agregó 0.95ml de MRS caldo y se realizó la recuperación fenotípica a 37°C por 3 hs. 100 μ l de una dilución 1/5 fue inoculada en placas de MRS ágar con los antibióticos correspondientes Cloranfenicol (Cm 5 μ g/ml) o Eritromicina (Erm 5 μ g/ml). Luego de 48-72 hs de incubación se realiza el recuento de transformantes y se informan las eficiencias de transformación como el número de UFC por microgramo de DNA plasmídico.

Tabla 1: Optimización de la electroporación. Comparación entre los parámetros eléctricos de dos métodos de electroporación ensayados

Parámetros Eléctricos	Protocolos	
	M1	M2
Voltaje aplicado (KV)	2	2.5
Resistencia (R in Ω)	400	200
Capacitancia (C in μ F)	25	25
Fuerza Eléctrica (V/cm)	10000	12500
Constante RC (τ in msec)	10	5

Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de *Escherichia coli* se aisló por el método de lisis alcalina según se describe en Sambrook *et al*, 1989. La extracción de plásmidos de *Lactobacillus* se realizó siguiendo el mismo protocolo pero con una incubación previa a la lisis con Lisozima 5mg/ml durante 1 hora a 37°C. En el caso de *L. acidophilus* los clones seleccionados fueron incubados en MRS N (N=0.7M NaCl) y lavados tres veces con EDTA 50mM antes de realizar la extracción plasmídica. Los plásmidos se analizaron en geles de agarosa 1% y visualizados con tinción de Bromuro de etidio 1 μ g/ml.

Estrategias para la construcción de la mutante *dlt*

Oligonucleótidos usados como cebadores:

Nombre	Secuencia
dltA1 dltA2	5' - TTGATTTATCTCTACGGCTACAGCGG - 3' 5' - CATTAATGATTTACCTCTGCAATCA - 3'
Rev1KanF Fw2KanR	5' - CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGCTATGGGTATCAATCGGA-3' 5-CCGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGGGTCTCAAGGAAGGCGTTGTG-3'.
CompRev1KanF CompFw2KanR	5' - TCCGATTGATACCCATAGCCAGCGAACCATTTGAGGTGATAGG - 3' 5' - CACAACGCCTTCCTTGAGACCCGATACAAATTCCTCGTAGGCGCTCGG -3'

Estrategia 1: Clonado de un fragmento del gen *dltA* en el vector pRV300.

Los primers *dltA1* y *dltA2* fueron utilizados para amplificar un fragmento del gen *dltA* del operón *dltABCD* a partir de la secuencia de *Lactobacillus casei* BL23. El fragmento amplificado de 1500 pb fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor y con la mezcla se transformaron células competentes de *E. coli* JM109. Las células se plaquearon en medio LB con ampicilina 100µg/ml, 40µl de IPTG y 15µl de X-gal. Se seleccionó un clon positivo que contenía el plásmido recombinante con el inserto de *dltA*. La presencia del inserto se corroboró por PCR utilizando los primers *dltA1* y *dltA2*. El plásmido fue digerido con la enzima EcoRI para liberar el fragmento. Este mismo fue subclonado en pRV300 el cual fue previamente digerido con EcoRI. La ligación se realizó con Ligasa T4 (promega) 16 hs a 15°C y la mezcla fue usada para transformar *E. coli* JM109, plaqueando con ampicilina, IPTG y X-gal para visualizar colonias blancas y azules. Se seleccionó un clon positivo y se corroboró por PCR y por restricción. El plásmido recombinante se amplificó y se purificó usando Qiagen kit 100 y se usó para transformar *Lactobacillus casei* BL23 por electroporación por el método desarrollado en esta tesis. Luego de la electroporación las células se plaquearon en medio MRS con Eritromicina 5 µg/ml. El plásmido pRV300 no posee un origen de replicación para Gram+ por lo tanto solo podrán crecer en eritromicina aquellos clones en los que se produjo la inserción del plásmido en el cromosoma de *L. casei* por recombinación homóloga a través del gen *dltA*, provocando la interrupción del mismo.

Estrategia 2: Inserción de un cassette de antibiótico en el gen target.

En esta estrategia se llevó a cabo la técnica LFH-PCR o “long flanking homology PCR” (Wach, 1996), para la cual se diseñaron una serie de primers con complementariedad de secuencias que permitieron amplificar un fragmento de ADN a medida con un cassette de resistencia a antibiótico flanqueado a ambos lados por secuencias del gen que se quiere mutagenizar. En la Figura 8 se muestra un esquema de la estrategia empleada.

En primer lugar, se realizaron reacciones de PCR para amplificar los fragmentos *dltA* izq, *dltA* der y el cassette de resistencia a kanamicina. Para la amplificación del fragmento *dltA* izq se usaron los primers *dltA1*- Rev1KanF. Para la amplificación del fragmento *dltA* der se usaron los primers Fw2KanR –*dltA2*. Y para la amplificación del cassette de kanamicina se

usaron los primers CompRevKanF-CompFw2KanR. Las condiciones de ciclado fueron : 95°C por 10 min, y 30 ciclos secuenciales de 95°C 1 min, 50°C 1min, 72°C 1min 30 seg., y finalmente una extensión a 72° por 10min.

Una vez obtenidos los tres fragmentos por PCR, estos fueron purificados usando Gen Elute Kit Extraction (Sigma) y usados como templados en la reacción de LFH-PCR.

Reacción LFH-PCR:

Mezcla de reacción

17ul H₂O

10ul Buffer 5X

2.5ul Mg⁺⁺ 50mM

0.4ul dNTP

0.3ul Go Taq Polimerasa

10ul cassette de Kanamicina

5ul dltA izq

5ul dltA der

Condiciones de ciclado:

95°C por 10 min. 20ciclos secuenciales de 94°C 30seg, 50 °C 30 seg , 72°C 4min. En estas condiciones se consigue que los tres fragmentos se apareen por sus extremos complementarios y se genere una única molécula lineal flanqueado con los dos fragmentos de *dltA*. Luego de estos 20 ciclos secuenciales se adicionan los primers dltA1 y dltA2. Se completa el ciclado con 25 ciclos secuenciales más de 94°C 30seg, 50 °C 30 seg , 72°C 4min. Y se finaliza con un ciclo de extensión a 72° por 15 min. De esta manera se amplifica por PCR el cassette de kanamicina flanqueado con los dos fragmentos de *dltA*.(fragmento tripartito)

Con el objetivo de clonar el fragmento tripartito en el pRV300, para ser usado éste como vector para interrumpir el operón por inserción del marcador de selección de kanamicina, se recurrió a la técnica Recombineering en *E.coli*. Ver esquema de la Figura 9.

Esta técnica involucra a la cepa DY331 que posee un profago lambda defectivo portador de los genes de recombinación (*exo*, *bet* y *gam*) bajo el control de un represor del ciclo lítico del fago termosensible (cI). Esta técnica permite generar moléculas recombinantes *in vivo* sin necesidad de técnicas moleculares de corte y religado.

El vector conteniendo la secuencia target es transferido a células electrocompetentes DY331 previamente inducidas a 42°C 15 min como se describe en Piuri & Hatfull 2006. Para generar la inserción se diseñan productos de PCR que presenten 50-100 pb de homología entre sí de modo de producir la integración. Esos productos de PCR desnaturalizados por 10 min a 95°C y enfriados rápidamente son utilizados para co-electroporar con el vector que incluye la secuencia blanco donde se quiere producir la integración del fragmento lineal de PCR. Se deben rastrear suficientes clones para lograr obtener la construcción deseada.

Recombineering en *E.coli*.

Se usaron 50 ul de células competentes de *Escherichia coli* DY331 para co-electroporar el fragmento tripartito y el plásmido recombinante pRV300 dltA_{1500pb}. Antes de electroporar, el fragmento tripartito fue desnaturalizado por 10 min a 95 °C y enfriado rápidamente. Las condiciones de electroporación fueron 2.5 kV, 25 µF y 200 Ohms. Luego del pulso, se realiza la recuperación a 30°C por 3hs y se plaquea en medio LB ampicilina 100ug/ml kanamicina 100ug/ml. Los clones positivos son corroborados por restricción. De esta manera se obtuvo el plásmido pRV300 conteniendo el fragmento tripartito que se usará para electroporar *Lactobacillus casei* BL23.

Figura 8: Esquema de la técnica LFH-PCR

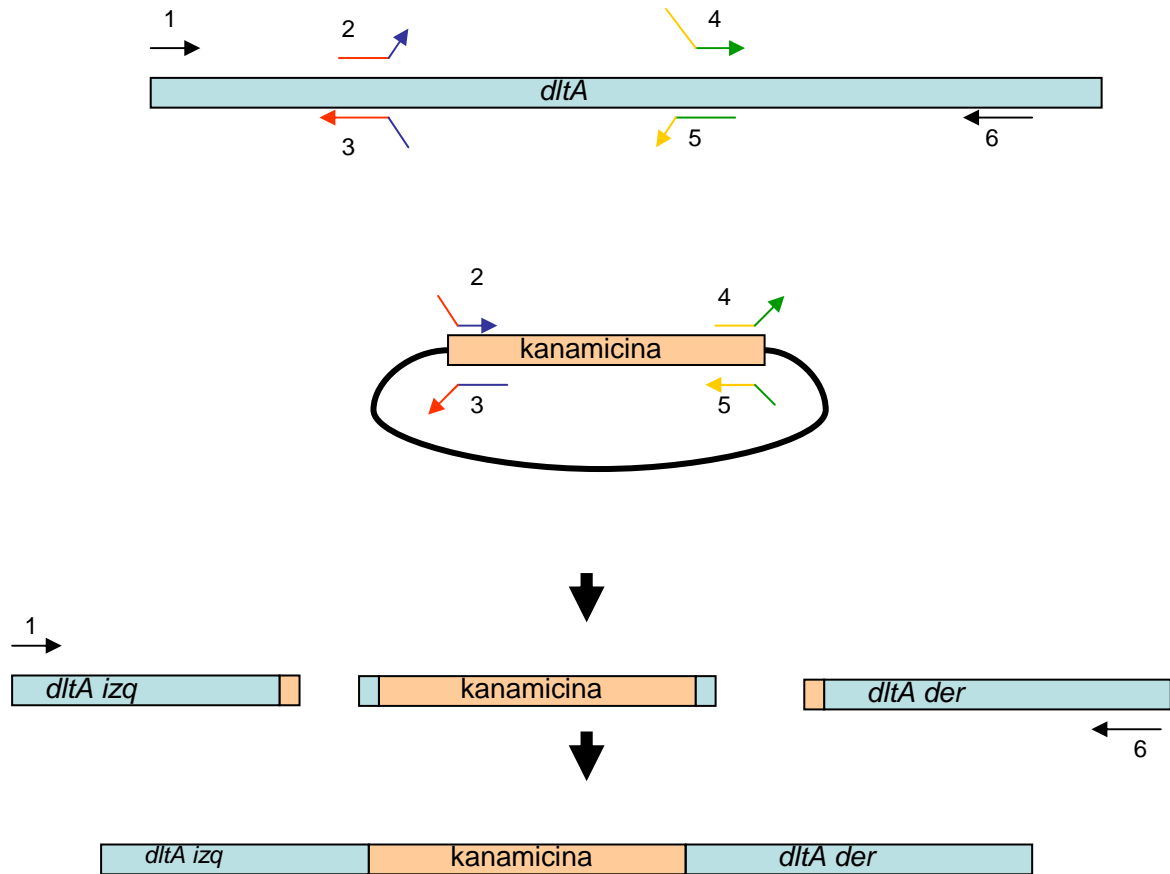


Figura 8: Técnica LFH-PCR. El extremo 5' del gen que se quiere mutagenizar (*dltA*) es amplificado con los primers 1 y 3 para generar el fragmento *dltA izq*. El extremo 3' del gen *dltA* es amplificado con los primers 4 y 6 generando el fragmento *dltA der*. El gen marcador de resistencia (*kanamicina*) es amplificado con los primers 2 y 5. Los tres productos son luego usados como templados en una reacción de "overlapping" con los primers 1 y 6. Los primers 2 y 3 y primers 4 y 5 respectivamente son complementarios entre sí.

Figura 9: Esquema del Recombineering en *E.coli*

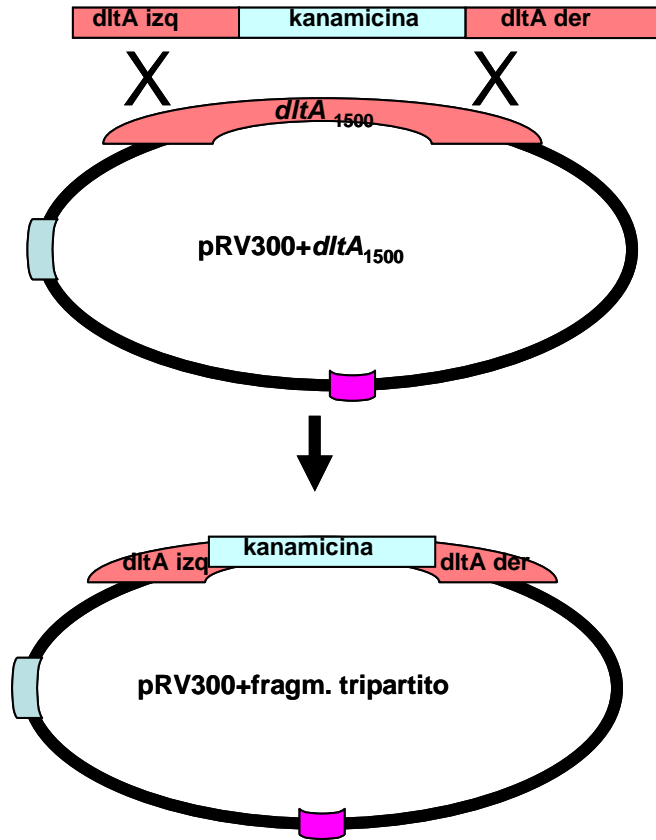


Figura 9: Recombineering en *E.coli*. El fragmento tripartito generado por LFH-PCR es co-electroporado con pRV300+dltA₁₅₀₀ en células de *E. coli* DY331. En estas células ocurre las recombinaciones por homología de secuencias (marcadas con X), y se obtiene el plásmido recombinante pRV300+fragm. tripartito.

Apéndice

Medios de cultivo

MRS

Polipeptona	10 g/l
Extracto de carne	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Tween 80	1.08 g/l
Fosfato de Dipotasio	2 g/l
Acetato de Sodio	5 g/l
Citrato de Amonio	2 g/l
Sulfato de Magnesio	0.2 g/l
Sulfato de Manganeso	0.05 g/l
pH 6.4±0.2	

TSB

Digesto pancreático de caseína	17 g/l
Peptona de Soja	3 g/l
Cloruro de Sodio	5 g/l
Fosfato de Dipotasio	2.5 g/l
Dextrosa	2.5 g/l

TSBm

TSB	15 g/l
Bacto Peptona	20 g/l

MRS FB

Peptona	10 g/l
Extracto de Lavadura	4 g/l
Acetato de Sodio	5 g/l
Citrato de Triamonio	2 g/l
Sulfato de Magnesio	0.2 g/l
Sulfato de Manganeso	0.05 g/l
Rojo clorofenol	0.04 g/l
pH= 6.4±0.2	

Medio LB caldo

Peptona de Caseína	10 g/l
Extracto de Levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l
pH = 7	

TfbI

Acetato de Potasio	0.03 M
Cloruro de Manganeso	0.05 M
Cloruri de Potasio	0.1 M
Cloruro de Calcio	0.01 M
Glicerol	15%

TfbII

MOPS	0.02 M
Cloruro de Calcio	0.075 M
Cloruro de Potasio	0.01M
Glicerol	15%

Capítulo I

Modificaciones del peptidoglicano de *Lactobacillus casei* en la osmoadaptación

Las envolturas en *Lactobacillus casei* están constituidas por una serie de capas, que de adentro hacia fuera son, una membrana celular, una gruesa pared formada por cadenas de peptidoglicano (PG) entrecruzadas y extensamente modificada por cadenas de polímeros secundarios aniónicos como son los ácidos teicoicos, asociados a pared (WTA) y los ácidos lipoteicoicos (LTA) anclados a la membrana. Los *Lactobacillus* son naturalmente resistentes a la lisis por lisozima u otras enzimas que hidrolizan la pared. Esta característica es beneficiosa a la hora de seleccionar una cepa que será empleada como probiótico. Por el contrario, la lisis es importante durante la maduración de quesos (para permitir la liberación de las peptidasas intracelulares) y también durante el desarrollo de vectores de expresión que deben liberar su contenido en el momento adecuado. Por lo tanto el estudio de las modificaciones de las envolturas de este microorganismo por alta sal es de suma importancia ya que facilitar la lisis de una bacteria que normalmente es resistente podría tener importantes implicancias en su uso a nivel tecnológico para el desarrollo de “starters” y probióticos. En los últimos años se han buscado y ensayado numerosos métodos tendientes a favorecer la lisis de estos microorganismos.

Es por esto que en esta primera parte de la tesis continuaremos con el estudio iniciado en el laboratorio (Piuri *et al*, 2003, 2005) de un componente de las envolturas celulares, la pared celular, en particular el peptidoglicano (PG), centrándonos en las modificaciones que éste sufre por alta sal.

I.1 Sensibilidad a Mutanolisina

La mutanolisina es una enzima muramidasa que hidroliza la unión acetilmuramil 1,4-acetilglucosamina en las cadenas glicosídicas del peptidoglicano.

A fin de estudiar las modificaciones de pared de *L. casei* frente al estrés osmótico, se analizó la sensibilidad a la mutanolisina tanto en células enteras como en paredes purificadas.

El tratamiento de células enteras y fracciones de pared purificadas con mutanolisina puede ser seguido mediante la lisis que se correlaciona con un descenso en la absorbancia a 550nm. En células enteras este descenso conduce a la lisis de la bacteria.

En la figura 10 se muestra la cinética de lisis a mutanolisina de células enteras precrecidas en medio MRS control y MRS N (N=0.8M NaCl). Puede verse que las células provenientes del crecimiento en alta sal muestran una marcada sensibilidad a la lisis frente a la muramidasa respecto de las células de medio control.

Figura 10: Sensibilidad de células enteras a Mutanolisina

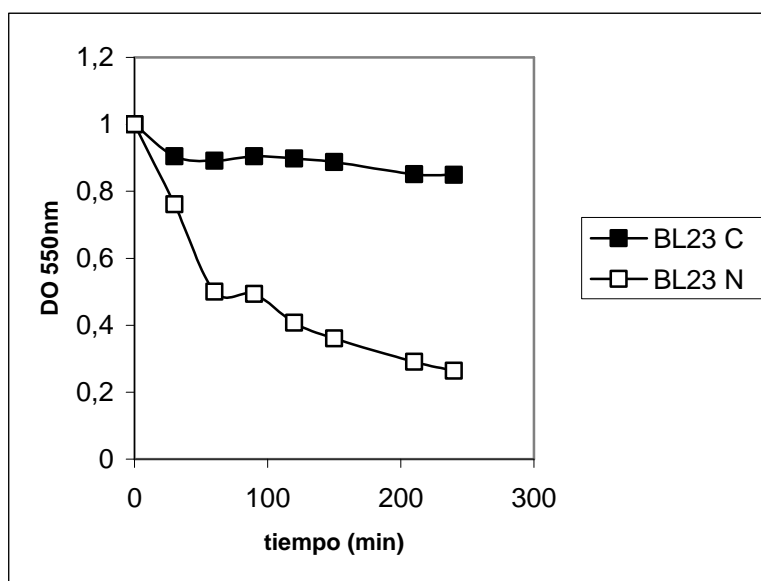


Figura 10: Células enteras de *Lactobacillus casei* BL23 precrecidas en condición C y N fueron sometidas a hidrólisis con 25U/ml de mutanolisina. La cinética de lisis fue seguida midiendo la DO 550nm a distintos tiempos y se grafica DO relativa vs. tiempo de hidrólisis

A fin de correlacionar esta lisis directamente a modificaciones del PG, paredes purificadas fueron obtenidas y sometidas al mismo ensayo.

En la figura 11 se muestra la cinética de lisis de paredes purificadas de células precrecidas en medio MRS control y MRS N (N=0.8M NaCl). Se observa que las paredes de la condición N resultan más sensibles a la lisis que las paredes de la condición C.

En ambos casos la velocidad de lisis de las paredes es mayor a la de las células enteras: en 80 minutos se hidroliza el 80% mientras que en células enteras en ese mismo tiempo solo se hidroliza el 45%. Sin embargo existen diferencias de sensibilidad entre las paredes provenientes de C y N.

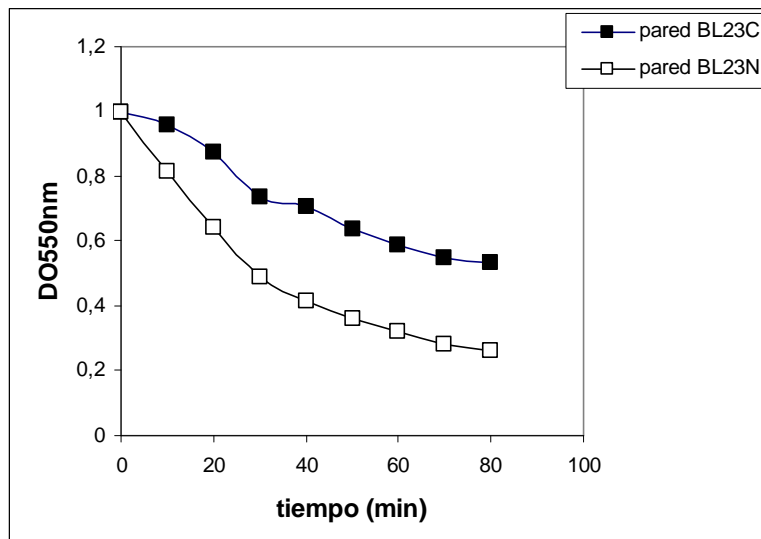
Figura 11: Sensibilidad de paredes purificadas a mutanolisina.

Figura 11: Paredes purificadas de *Lactobacillus casei* BL23 precrecido en condición C y N fueron sometidas a hidrólisis con 25U/ml de mutanolisina. La cinética de lisis fue seguida midiendo la DO 550nm a distintos tiempos y se grafica DO relativa vs. tiempo de hidrólisis

Por otro lado existen aun diferencias importantes en el efecto de lisis cuando se comparan células enteras con paredes purificadas. En la tabla 1 se observan los niveles de hidrólisis comparativos tomados a tiempo de 80 minutos para los ensayos de células y a 20 minutos para el ensayo de paredes purificadas.

Tabla 1: Niveles de hidrólisis comparativa

	% Lisis en C	% Lisis en N	Lisis N/C
Células Enteras	10	50	5
Paredes Purificadas	10	40	4

Tabla1: Porcentajes de hidrólisis comparativos de células enteras y paredes purificadas de las condiciones C y N a 80 y 20 minutos respectivamente .

La diferencia en la sensibilidad entre células enteras y paredes purificadas puede deberse a una menor permeabilidad de la enzima dificultando su acceso a su sustrato, asociado al hecho de que *in vivo* permanecen polímeros cargados (WTA y LTA) que pueden repeler la entrada de la enzima y que se pierden en los sucesivos pasos de purificación de las paredes. El porcentaje de hidrólisis es 5 veces mayor en células crecidas en alta sal, esto puede ser adjudicado a los cambios en el contenido de los polímeros asociados a pared (ver capítulo II) dejando un peptidoglicano más expuesto y accesible a la mutanolisina.

Sin embargo, cuando estudiamos la sensibilidad de paredes purificadas provenientes de ambas condiciones de crecimiento frente a esta hidrolasa, continuamos observando una cinética diferencial de lisis, lo que podría estar indicando diferencias existentes en la estructura intrínseca del peptidoglicano.

I.2 Análisis estructural del peptidoglicano por HPLC

Dadas las diferencias encontradas en cuanto a la sensibilidad diferencial a mutanolisina de las paredes purificadas, quisimos realizar un estudio a nivel estructural del peptidoglicano. Para ello los productos de hidrólisis con mutanolisina de las paredes obtenidas de la condición control y alta sal se sometieron a una Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para analizar diferencias en el perfil de los muropéptidos obtenidos de paredes de la condición N y C de crecimiento. Este resultado fue posible gracias a la colaboración establecida con el Dr. Stéphane Mesnage del LRMA, París.

En un cromatograma de HPLC diferenciamos los distintos picos de muropéptidos eluidos de la columna a distintos tiempos de retención. Las especies monoméricas, constituidas por el disacárido N-acetilglucosamina-N acetilmurámico (G-M) en sus formas dipéptido, tripéptido y tetrapéptido según sea la cadena del péptido que acompaña al disacárido, presentan menores tiempos de retención. Luego eluyen las especies diméricas constituidas por dos disacáridos entrecruzados o “crosslinkeados” por dos péptidos. Con mayor tiempo de retención tenemos las especies triméricas y oligoméricas formadas por tres o más unidades del disacárido entrecruzadas por tres o más péptidos.

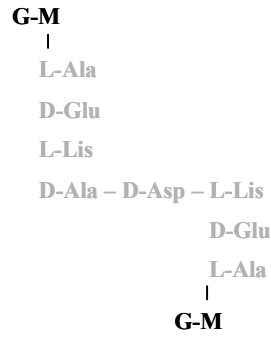
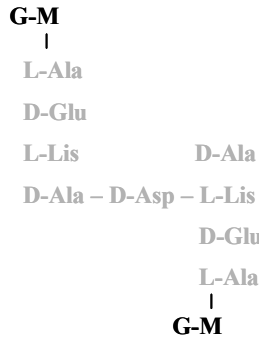
A continuación, se grafica a modo de ejemplo, algunas de las distintas especies muropépticas que se analizaron por HPLC. Figura 12

Figura 12: Especies muropépticas analizadas por HPLC

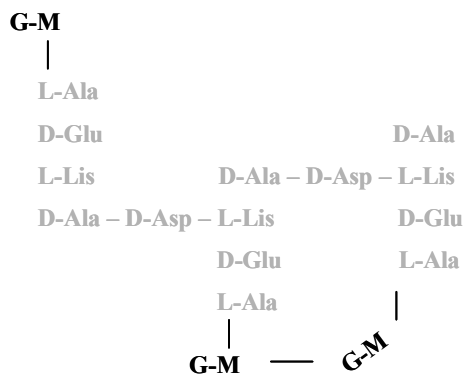
Monómeros



Dímeros



Trímeros



Oligómeros

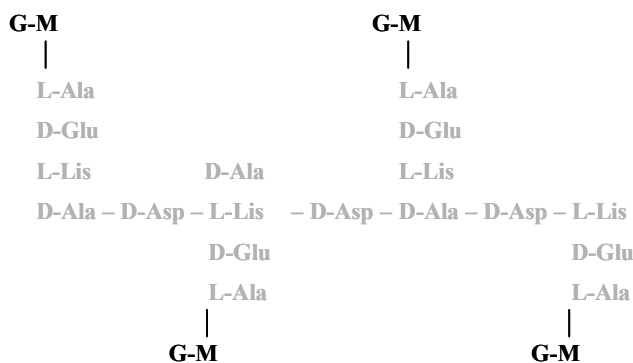


Figura 12: Ejemplos de distintas especies muropépticas que pueden ser analizadas por HPLC luego de la hidrólisis por Mutanolisina.

G-M es el disacárido N-acetilglucosamina-N acetilmurámico.

L-Ala: L-Alanina; D-Glu: D-Glutámico; L-Lis: L-Lisina; D-Ala: D-Alanina; D-Asp: D-Asparagina

En la figura 13 se observan los cromatogramas del peptidoglicano de células precrecidas en condición C y N.

Por comparación con datos bibliográficos (Billot Klein *et al*, 1997) en los que se han obtenido la identidad de los picos por Espectrometría de Masa después de la purificación de los mismos por HPLC, podemos deducir que los picos 10 y 12 del peptidoglicano de condición control corresponden a las especies diméricas tetra-tetra más abundantes siendo el pico 12 la especie O-acetilada.

Si comparamos los cromatogramas de las paredes en las dos condiciones estudiadas, podemos observar un aumento relativo de las especies monoméricas en la condición N y se observa una disminución del pico correspondiente a la especie dimérica tetra-tetra. Por otro lado, se observa una disminución en el número de picos e intensidad de los mismos de las especies diméricas, triméricas y oligoméricas en la condición N.

El análisis de muropéptidos está íntimamente relacionado con el grado de entrecruzamiento (crosslinking) del peptidoglicano. El estudio por HPLC nos permite inferir cuán entrecruzado se encuentran los peptidoglicanos estudiados. Un peptidoglicano hidrolizado enriquecido en especies diméricas, triméricas y oligoméricas de muropéptidos presentaría un mayor grado de entrecruzamiento que otro enriquecido por especies monoméricas. El peptidoglicano de la condición N demostró tener mayor representatividad en las especies monoméricas. Dada la diferencia estructural de los peptidoglicanos de ambas condiciones podemos inferir un menor grado de entrecruzamiento en el peptidoglicano de las células de alta sal.

Figura 13: Análisis estructural del peptidoglicano por HPLC

Figura 13A: Cromatograma de peptidoglicano de condición C de crecimiento

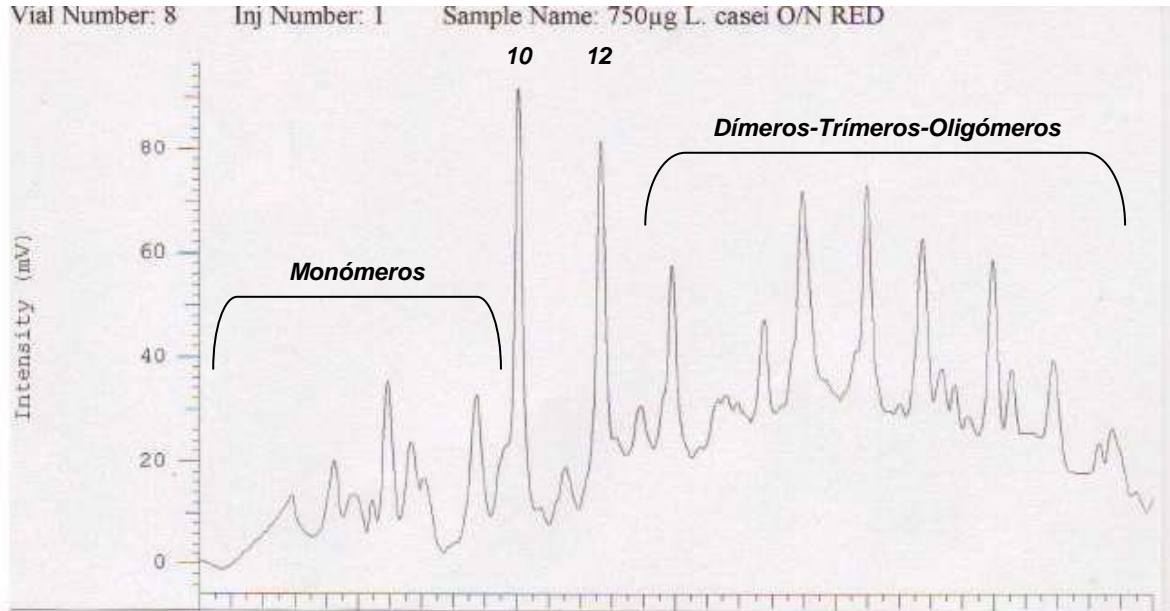
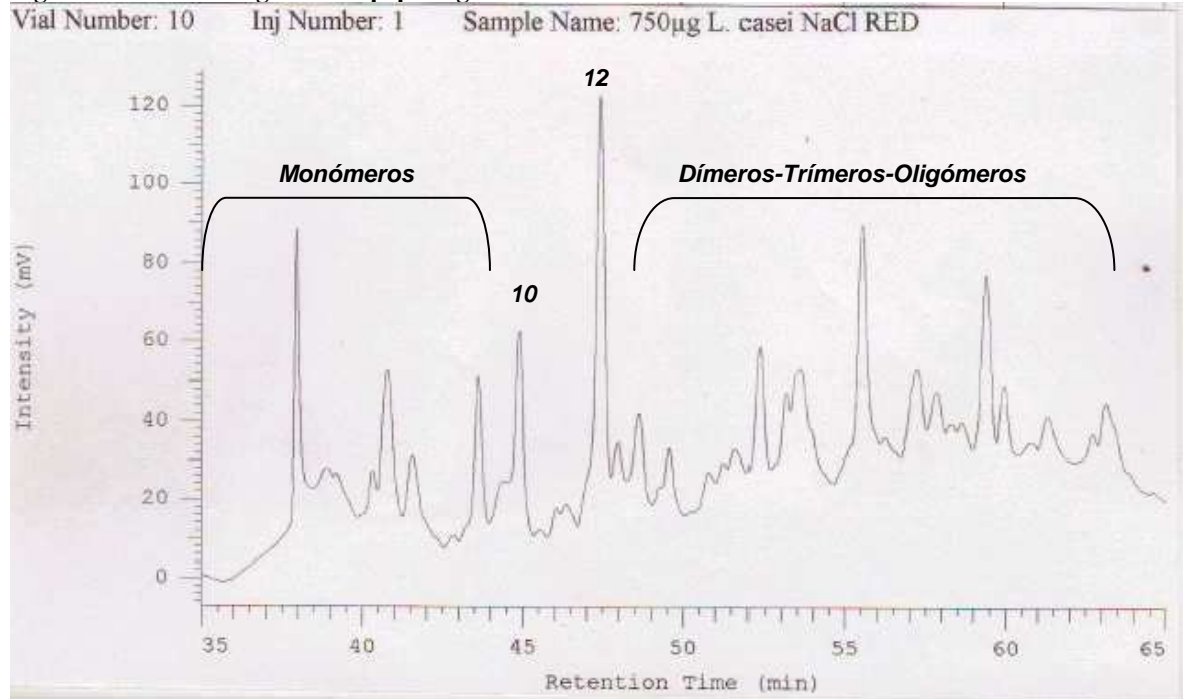


Figura 13B: Cromatograma de peptidoglicano de condición N de crecimiento



Gentileza del Dr. Stéphane Mesnage del LRMA, París

El análisis de muropéptidos realizado por HPLC coincide con los resultados obtenidos por la técnica FACE (Electroforesis de Carbohidratos Asistida por Fluorescencia en Piuri *et al* 2005). Por HPLC se corrobora una alteración en la estructura de los muropéptidos en las paredes de células crecidas bajo estrés osmótico, donde se observa un incremento en la cantidad de especies monoméricas y una reducción de las especies diméricas, triméricas y oligoméricas. Este resultado es coherente con una disminución en el grado de entrecruzamiento en las paredes de las células de la condición N. Dado que la accesibilidad de las paredes a la mutanolisina es mayor cuando el entrecruzamiento de las cadenas es menor.

I.3 Detección y perfil de saturación de Penicillin Binding Proteins (PBP)

La polimerización y el entrecruzamiento del peptidoglicano están mediados por las proteínas de unión a Penicilina o PBP (del inglés, Penicillin Binding Proteins) que se encuentran unidas a la membrana celular. Las PBP se clasifican en PBP de alto peso molecular (HMW), que agrupa a las de clase A: bifuncionales, pues cuentan con un dominio N terminal de transglicosidasa y un dominio C terminal de transpeptidasa y a las de clase B, con un dominio de transpeptidasa y un dominio N terminal de función aun desconocida. Y PBP de bajo peso molecular (LMW) con actividad de D,D o D,L carboxipeptidasa o endopeptidasa, cuya función más importante sería la de regular el número de cross-linking entre cadenas de glicanos adyacentes.

Dado que hemos encontrado diferencias en el grado de entrecruzamiento en el peptidoglicano proveniente de la condición N, quisimos analizar si esta diferencia se correlacionaba con una alteración en el perfil de PBP de *Lactobacillus casei*.

Para ello se analizaron las proteínas de membrana (extraídas con butanol) de células crecidas en condición control y en condición de alta sal. Para la detección de las PBP se usó el fluoróforo Bocillin FL, análogo molecular de la Penicilina G.

En la Figura 14 se observa la afinidad diferencial que presentan PBP extraídas de membranas para Bocillin FL. En el fluorograma fueron detectadas dos PBP de Pesos Moleculares de 40 y 46 kDa que mostraron diferencias de intensidad entre ambas condiciones. Por otro lado, cuando se secuenció por MALDI TOF la banda de 46 kDa se correspondió con una D-Ala D-Ala carboxipeptidasa con una clara actividad diferencial entre las dos condiciones.

Este resultado estaría de acuerdo con el incremento de la fracción monomérica observada del análisis de peptidoglicano en la condición N que mostraba una disminución en su entrecruzamiento, este hecho estaría correlacionado con un aumento en la expresión o afinidad por su sustrato de las PBP de bajo peso molecular (PBP4a, PBP4b y PBP5) con actividad carboxipeptidasa y endopeptidasa cuya función más importante sería la de modular el entrecruzamiento entre cadenas de glicanos adyacentes.

El análisis de las PBP de alto peso molecular (HMW) que fueron clasificadas de acuerdo a su peso molecular en kDa: 114 (PBP 1), 95, 89 (PBP 2 a, b), muestra en la figura 15, un menor número de PBP reveladas en N, donde no fue detectada la PBP 2a de 95 kDa. Este resultado estaría de acuerdo con la disminución del grado de entrecruzamiento del PG que describimos más arriba como consecuencia de un descenso en la expresión o actividad de las PBP de alto peso molecular con actividad de transpeptidasa como sería la PBP 2a que no fue revelada en membranas de la condición N.

Además, en membranas de la condición N puede verse que las PBP de bajo peso molecular: PBP 4a, PBP 4b y PBP 5 (66, 62 y 50 kDa respectivamente) presentan mayor afinidad por el fluoróforo en comparación con las de la condición control (en función de la intensidad de fluorescencia).

Las modificaciones que observamos en el peptidoglicano durante la adaptación a alta sal indican que existe una reorganización activa de la arquitectura de las envolturas con un rol fundamental de las PBP.

Figura 14: Ensayo de detección de PBP

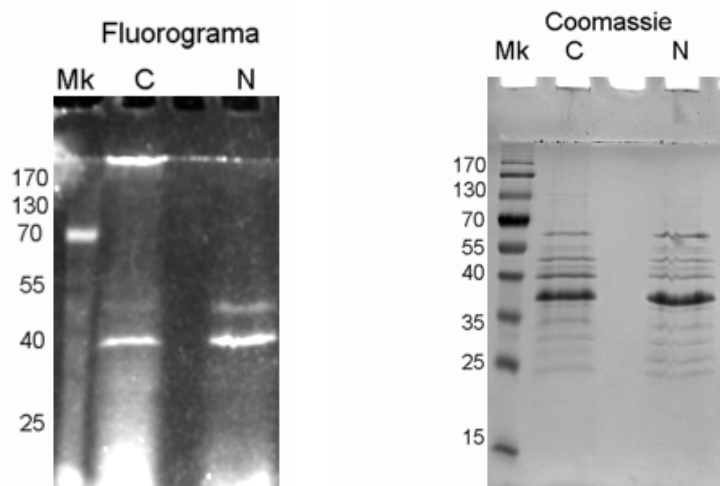


Figura 14: 20ug de proteínas extraídas de membranas de las condiciones C y N fueron reveladas con Bocillin FL. Se muestra el Coomassie Blue (Derecha) y el Fluorograma (Izquierda). Los marcadores de Peso Molecular son señalados con números.

Figura 15: Ensayo de detección y perfil de saturación de PBP

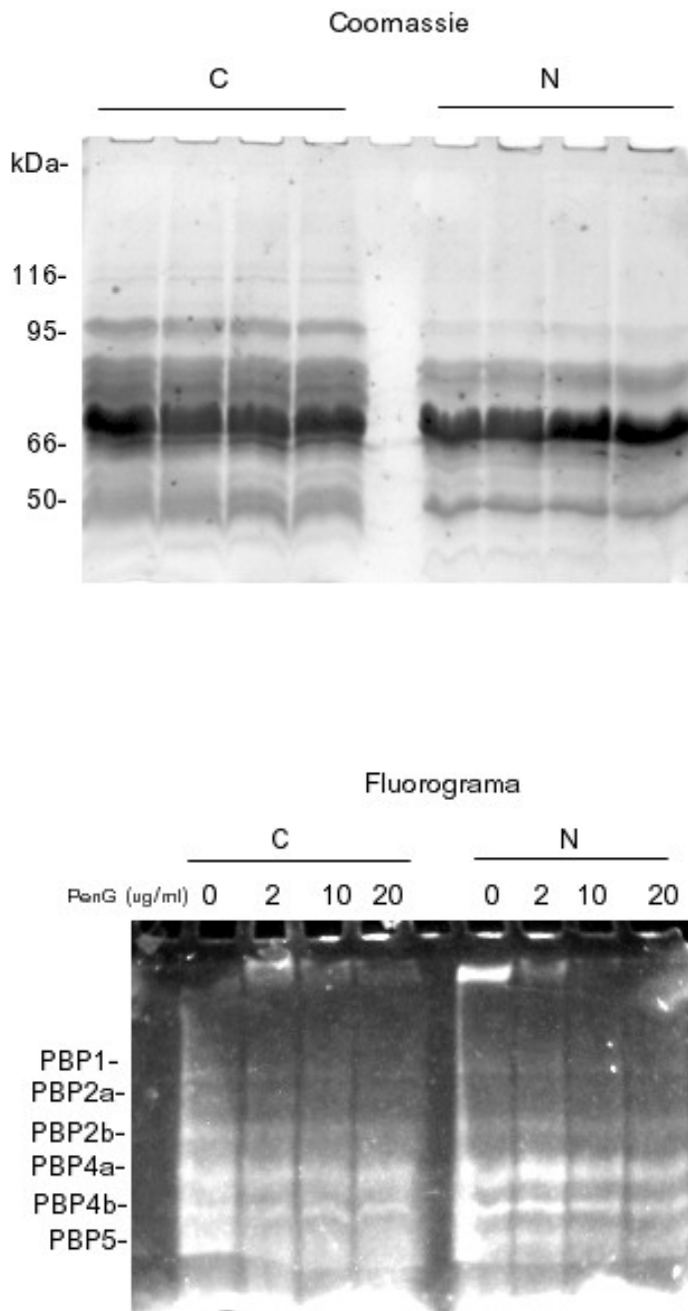


Figura 15: Ensayo de saturación con concentraciones crecientes de PenG y 50ug de proteínas extraídas de membranas de las condiciones C y N. Se muestra el Coomassie Blue (Superior) y el Fluorograma (Inferior) Los marcadores de Peso Molecular son señalados con números.

Conclusión Capítulo I

Dos factores contribuyen a una diferencia en la sensibilidad a la lisis enzimática en la condición N.

- 1) mayor permeabilidad de la enzima facilitando su acceso a su sustrato, asociado con el nivel de polímeros aniónicos (WTA y LTA) como se verá más adelante
- 2) disminución en el grado de entrecruzamiento del PG en las paredes de las células asociado a una actividad diferencial de PBP tanto de alto peso molecular (HMW) como de bajo peso molecular (LMW).

Capítulo II

Modificación en la D-Alanilación de los ácidos teicoicos durante la osmoadaptación de *Lactobacillus casei* BL23

Las envolturas bacterianas tienen un rol muy importante en el mantenimiento de la forma, integridad y supervivencia de las especies. En ellas se encuentran asociados tanto los elementos de comunicación entre el medio externo y el citoplasma, como los sensores de las variaciones ambientales. Los ácidos teicoicos (WTA y LTA) constituyen entre el 35-50% de del peso seco de la pared y en la especie en estudio *Lactobacillus casei* se clasifican en ácidos teicoicos de pared (WTA), asociados covalentemente al PG y ácidos lipoteicoicos (LTA) unidos a membrana por un ancla glicolipídica. Ambos polímeros conforman largas cadenas cargadas negativamente de poli-glicerolfosfato siendo el principal sustituyente el éster de D-Alanina. Junto con el peptidoglicano los WTA y LTA componen una malla polianiónica que provee funciones relacionadas con la elasticidad, porosidad y mantenimiento de un medio iónico apropiado. La incorporación de los ésteres de D-Alanina a los ácidos teicoicos requiere de cuatro proteínas codificadas por el operón *dltABCD*. La sustitución con D-Alanina está directamente relacionada con las propiedades iónicas y función de estos polímeros. Su función es mantener por un lado el ambiente iónico en particular secuestrando cationes divalentes y por otro el gradiente de pH para los procesos sintéticos asociados a membranas. Se han descrito modificaciones en los ácidos teicoicos que pueden afectar directamente la actividad de enzimas hidrolíticas de pared (Boyd *et al*, 2000, Koch *et al*, 2007). Esta podría ser una de las modificaciones que contribuirían a las diferencias líticas que mostramos en el capítulo I, lo que nos condujo a analizar bioquímicamente y genéticamente las modificaciones que sufren los ácidos teicoicos de esta bacteria por crecimiento en alta sal.

II.1 Estudio Bioquímico de WTA

Para determinar si existen diferencias en el grado de sustitución por ésteres de D-Alanina en los ácidos teicoicos cuando los lactobacilos son sometidos a estrés osmótico, realizamos con previa purificación de paredes una extracción de WTA.

En la purificación de paredes (Tabla 2) puede observarse una disminución del 50% en la recuperación de las mismas cuando las células provienen de la condición N respecto del control C.

Cuando los WTA fueron extraídos de las paredes purificadas de ambas condiciones pudo observarse una diferencia significativa en el contenido de los mismos. En este estudio los niveles de Fósforo medidos representan cuantitativamente el nivel de WTA como polímero de glicerol-P. En la Tabla 3 puede observarse una disminución cercana del 50 % del contenido de WTA en células crecidas en alta sal. Sin embargo el grado de D-Alanilación en esta condición se encuentra incrementado (2.4 veces mayor).

Tabla 2: Recuperación de pared celular

Condición	Peso Seco Celular (g)	Peso Seco Pared (mg)	Rendimiento (mg pared/g cel)	N/C
C	1.39	50	35.9	
N	2.23	42	18.8	0.52

Tabla 3: Análisis bioquímico de WTA

Condición	Contenido (nmol/mg pared)		Grado de D-Alanilación	N/C
	Fósforo	D-Alanina	D-Alanina/Fósforo	
C	0.948±0.15	0.125±0.06	0.132	
N	0.527±0.11	0.164±0.07	0.311	2.4

Dada la diferencia en el grado de D-alanilación presente en los WTA extraídos de la condición de alta sal quisimos corroborar el análisis bioquímico con un análisis electroforético.

Si los WTA efectivamente se encuentran mayormente “D-alanilados”, la presencia de estos ésteres contrarrestarían las cargas negativas de los grupos fosfatos y los WTA presentarían

una carga neta aniónica menor. En una corrida en condiciones nativas, las distintas especies de WTA que presenten diferencias en su carga neta mostrarán una movilidad relativa diferencial.

Los WTA extraídos de la condición de alta sal y la condición control fueron analizados en electroforesis de geles de poliacrilamida (PAGE) nativos y revelados según se describe en materiales y métodos.

Puede observarse en la figura 16 una diferencia en la movilidad relativa de los WTA. Los WTA de la condición N mostraron un retraso respecto de los extraídos de la condición control (Rf: 0,54 en N versus Rf: 0,64 en C) indicando una carga neta aniónica menor para WTA de la condición N. Este retraso estaría corroborando un aumento del grado de D-alanilación en los WTA extraídos de células sometidas a estrés salino.

Figura 16: Corrida electroforética de WTA

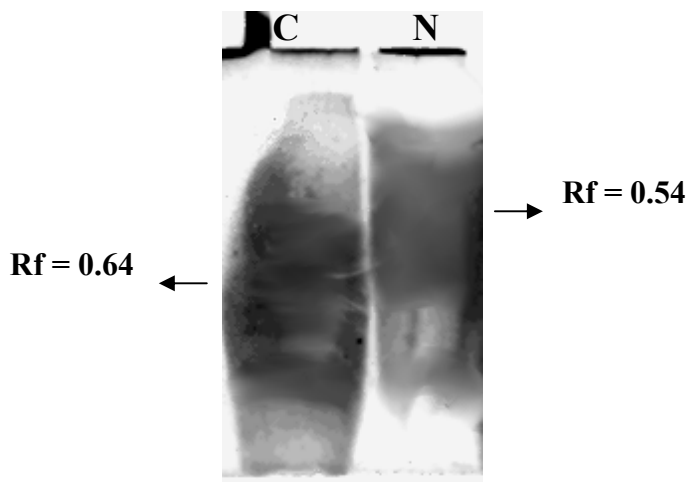


Figura 16: Perfil de la corrida de WTA. Las muestras de WTA fueron extraídas con TCA 5% por 5hs a 60°C. En ambas condiciones se analiza la misma masa normalizando a 2 ng de P en cada muestra. Rf: relación de frente

II.2 Estudio bioquímico de ácidos lipoteicoicos (LTA)

En la sección anterior dedicamos el análisis a los ácidos teicoicos (WTA) y observamos una alteración de los mismos cuando células de *Lactobacillus casei* son cultivadas en condición de alta sal. Se demostró que paredes provenientes de esta condición de crecimiento poseían un

menor contenido de WTA, estos WTA a su vez presentaban un aumento en el grado de sustituciones por D-Alanina.

En esta sección nos focalizaremos en el análisis de los ácidos lipoteicoicos (LTA). Estos polímeros compuestos de largas cadenas de poliglicerolfosfatos se hallan asociados a la membrana plasmática por un ancla glicolipídica, de modo tal que por su naturaleza anfifílica su extracción difiere de la de los WTA.

La obtención de LTA a partir de cultivos de *L. casei* BL23 crecidos en condición control y N (N= 0.8M NaCl) se ha realizado mediante una extracción con butanol seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica en columna de octil-sefarosa utilizando un gradiente discontinuo de n-propanol. (20-60% n-propanol).

En la figura 17 se muestra un enriquecimiento de LTA en las fracciones eluidas con 35 y 45% de n-propanol. La presencia de LTA se detecta por la cuantificación de Fósforo presente en cada eluido.

Figura 17: Purificación de LTA

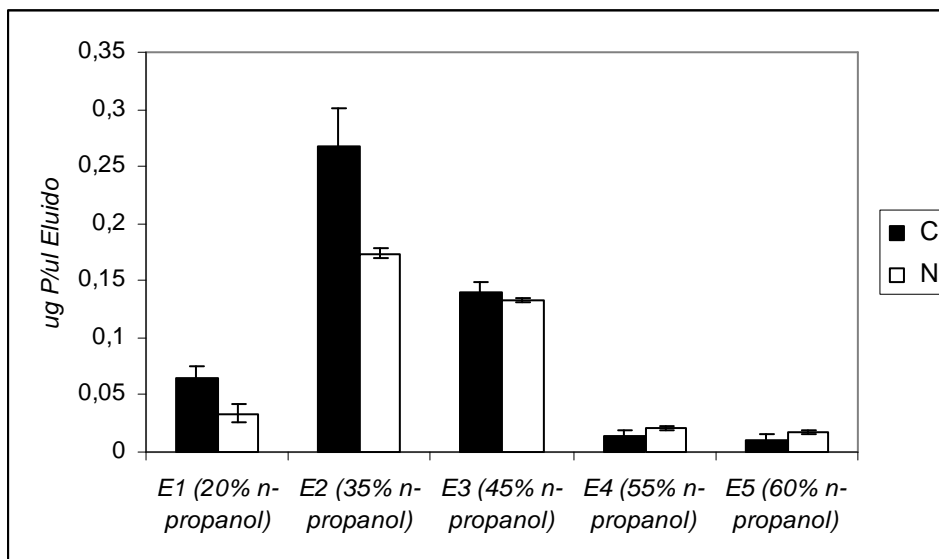


Figura 17: Purificación de LTA. Se mide la cantidad de P presente en cada fracción eluida de los LTA extraídos de ambas condiciones. E1-5 son fracciones recuperadas

Para corroborar la purificación de estos polímeros por la metodología empleada y asegurarnos del enriquecimiento de los mismos en las fracciones anteriormente señaladas, quisimos visualizar los LTA mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con las condiciones detalladas en materiales y métodos.

En la figura 18 se muestra la corrida de los distintos eluidos de la purificación de los LTA provenientes de ambas condiciones de cultivo. Puede observarse la presencia de LTA en los eluidos E2 y E3 correspondiendo a la máxima cantidad de Fósforo detectada.

Figura 18: PAGE de LTA

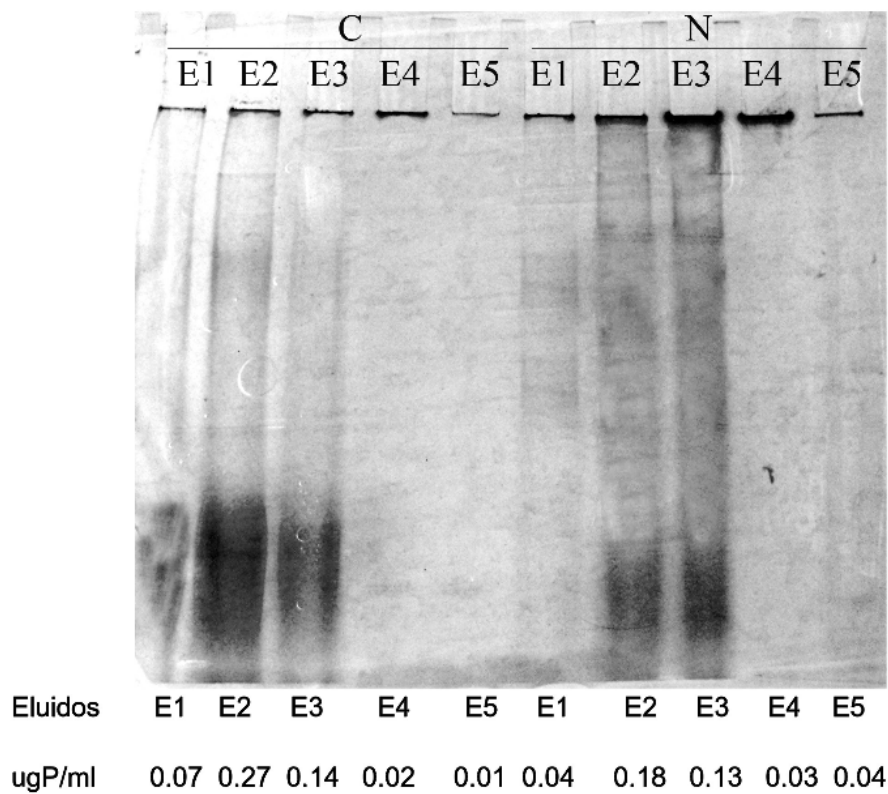


Figura 18: PAGE de LTA. Perfil de las fracciones eluidas de la columna de Octil-Sefarosa y determinación de P en cada eluido. E1-E5 son las fracciones recuperadas para cada condición.

Una vez obtenidos los LTA de ambas condiciones, se propuso realizar un análisis bioquímico para evidenciar diferencias tanto en el contenido como en el grado de D-alanilación de los mismos.

Como puede verse en la tabla 4, el contenido de LTA medido por la cantidad de Fósforo y Glicerolfosfato en las muestras, resultó ser de 2 veces menor en células crecidas en condición de alta sal. (0.14 vs. 0.074 μg para fósforo y 0.174 vs. 0.084 μg para Gli-P).

En cuanto al grado de D-Alanilación, estimado como la relación entre D-alanina/ Fósforo y D-alanina/Gli-P, se observa una disminución del 50% en los LTA de la condición N (Tabla 5).

Tabla 4: Análisis bioquímico de LTA

Condición	Contenido /mg Peso seco celular		
	Fósforo(μg)	Glicerol-P (μg)	D-alanina (μg)
C	0.14 \pm 0.02	0.174 \pm 0.008	0.06 \pm 0.005
N	0.074 \pm 0.008	0.084 \pm 0.004	0.016 \pm 0.001

Tabla 5: Grado de D-alanilación de LTA

Condición	Relación	
	D-alanina/Fósforo	D-alanina/Glicerol-P
C	0.43	0.34
N	0.22	0.19
N/C	0.51	0.55

Para corroborar el grado de sustituciones por D-Alanina en los LTA, se realizó una corrida electroforética de los mismos. Si efectivamente estos polímeros presentaran una diferencia significativa en su carga neta deberíamos hallar una diferencia en la movilidad relativa de éstos. En la figura 19 puede verse que los LTA de la condición N tienen una mayor migración que los de la condición C. Este adelanto en la corrida se debe a que en esta condición los polímeros presentan una carga neta aniónica mayor (presentan mayor carga negativa) dada por una disminución en los ésteres de D-Alanina.

Figura 19: PAGE de LTA

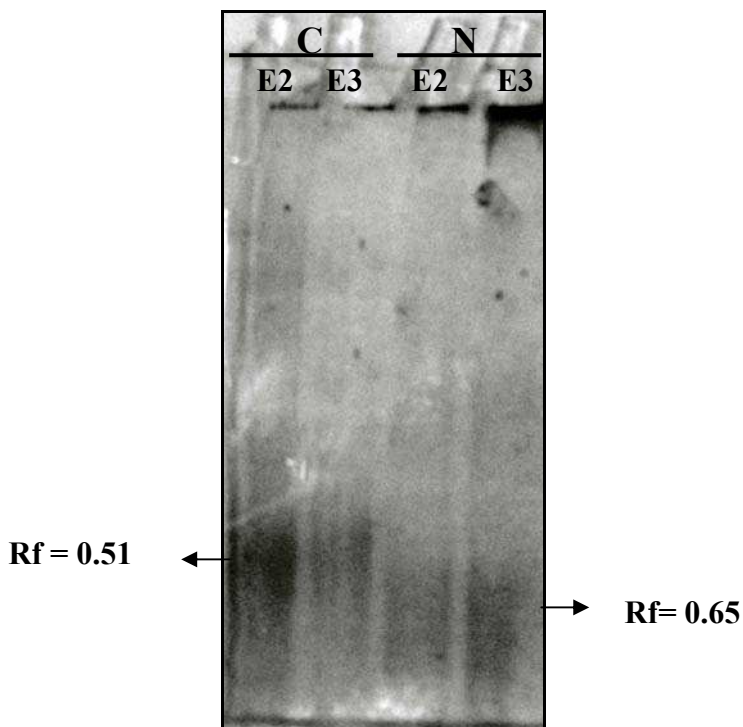


Figura 19: PAGE de LTA. En cada calle se sembró 5 ug de P de cada eluido enriquecido en LTA de ambas condiciones. Rf: relación de frente. A los costados de la figura se aclaran los valores de Rf para cada especie de LTA.

En el primer capítulo se han estudiado los cambios que ocurren a nivel de peptidoglicano, donde se ha observado que paredes provenientes de células crecidas en alta sal mostraban un menor grado de entrecruzamiento entre las cadenas de PG. Además de verse afectada la estructura del PG, se ve modificado el contenido del mismo, dato que queda evidenciado por los niveles de rendimiento de pared en ambas condiciones.

De estos resultados se desprende que durante el crecimiento en alta sal de *Lactobacillus casei*, no solo se modifican el contenido y entrecruzamiento de las cadenas de PG, también el de los ácidos teicoicos (WTA y LTA) y en particular la carga de estos por las diferencias en la D-alanilación. Esto nos condujo a tratar de identificar en este microorganismos los genes responsables de esta actividad.

Conclusión Capítulo II

El estudio bioquímico de los polímeros asociados a pared revela que en células sometidas a estrés salino mostraron:

- 1) Un menor contenido de ácidos teicoicos (WTA y LTA)
- 2) Se observa una diferencia en los niveles de D-alanilación de estos. Aumenta en WTA en alta sal y disminuye para LTA

Estos resultados junto a las diferencias estructurales del peptidoglicano explicarían un aumento en la permeabilidad de las enzimas hidrolíticas de pared.

Capítulo III

Estudio de la expresión genética de los genes responsables de la síntesis de LTA (*yfnI*) y de la D-alanilación de ácidos teicoicos (operón *dlt*) en *Lactobacillus casei* BL23

Del análisis bioquímico de los LTA realizado en el capítulo anterior, pudo observarse un descenso en el contenido de este polímero en las células crecidas en alta sal. El contenido de LTA medido por la cantidad de Fósforo y glicerolfosfato en las muestras, resultó ser 2 veces mayor en células crecidas en condición control. (0.14 vs. 0.074 μg para fósforo y 0.174 vs. 0.084 μg para Gli-P). (Tabla 4 –Capítulo II). A la luz de estos resultados, nos preguntamos si la disminución en el contenido de los LTA estaba asociada con una regulación a nivel transcripcional del gen responsable de la síntesis de estos polímeros.

III.1 Estudio de la expresión de *yfnI* por RT-PCR semicuantitativa

En *S. aureus* se ha descrito recientemente la sintetasa de LTA, LtaS (Grundling y Schneewind, 2007). A partir de los análisis de secuencias, utilizando la base de datos BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), se buscó la homología de esta función en especies del género *Lactobacillus*. Hallado el gen ortólogo en *Lactobacillus delbrueckii subs bulgaricus* se procedió a la búsqueda de la función en el genoma de *Lactobacillus casei* BL23.

A continuación se muestra el alineamiento de las secuencias del gen para la sintetasa de LTA de *Lactobacillus delbrueckii subs bulgaricus* y el genoma de *L. casei* BL23, (figura 20).

Figura 20: Alineamiento de secuencias de LTA sintetasa de *Lactobacillus delbrueckii subs bulgaricus* (en negrita) y el genoma de *Lactobacillus casei* BL 23 (en rojo)

El alineamiento mostró una homología del 67 % en el locus confinado entre las posiciones 905418 a 906361 del genoma de *L. casei*, donde mapea el locus *yfnI*, con hipotética función de fosfoglicerol transferasa.

A partir de la secuencia de *yfnI* se diseñaron los primers correspondientes para poder estudiar la expresión de este gen mediante RT-PCR semicuantitativa.

Se extrajo ARN total de células crecidas en condición control y en alta sal (N = 0.8M NaCl). Se usaron los primers correspondientes para generar los cDNA de *yfnI* y *ARNr 16S*, este último usado como gen normalizador.

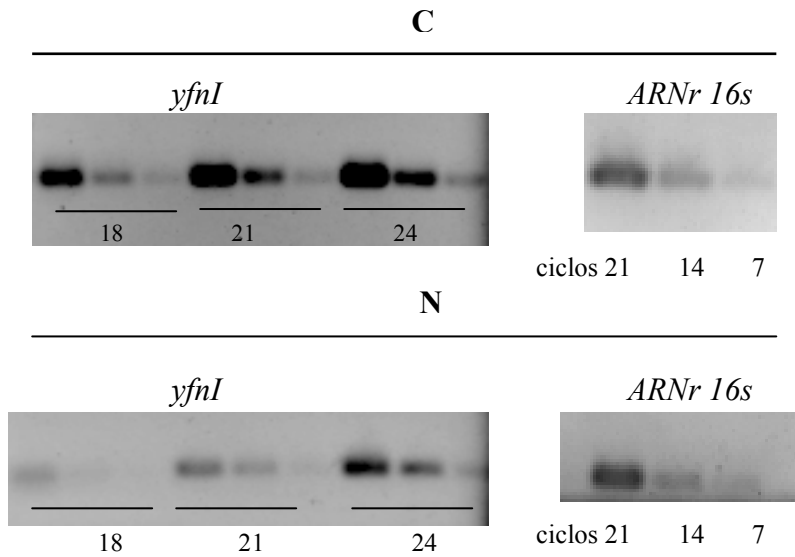
En las figuras 21A y 21B se muestran los resultados obtenidos del estudio de expresión por RT-PCR semicuantitativa.

Del estudio de la expresión genética del gen *yfnI*, responsable de la polimerización de los LTA, se pudo observar una disminución de la expresión cuando las células son sometidas a estrés osmótico.

Del análisis densitométrico, normalizado según las cantidades de ARNr 16S para cada condición, se desprende que para el gen *yfnI* la transcripción en condición control es de 2.62 veces mayor (lo que significa que en la condición N este gen estaría sólo un 38 % activo).

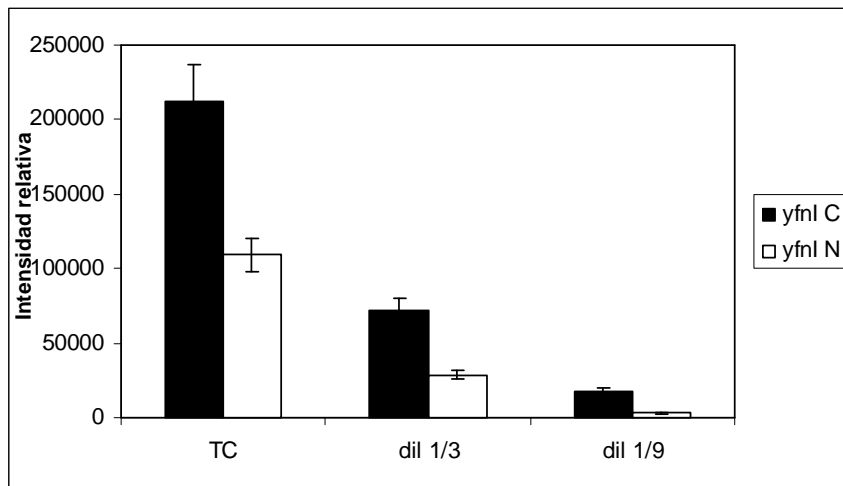
El apagado de este gen durante el crecimiento en alta sal concuerda con el resultado obtenido bioquímicamente por el cual se había observado una disminución en el contenido de los LTA en esta condición de crecimiento.

Figura 21A: Estudio de la expresión de *yfnI* por RT-PCR semicuantitativa



Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR. En *yfnI* se muestran los ciclos 18, 21 y 24 de amplificación respectivamente. Para cada ciclo se siembra la muestra no diluida y las diluciones , 1/3 y 1/9. Para el *ARNr 16S* se siembran las muestras no diluidas de los ciclos 21,14 y 7.

Figura 21 B: Cuantificación por densitometría



Densitometría de la RT-PCR expresada como niveles relativos de mensajeros de *yfnI* en cada condición para el ciclo 21 de amplificación. Las barras representan los valores promedios de dos experimentos independientes con sus DS.

Expresión *yfnI*:

$$\frac{yfnI\ C}{yfnI\ N} = 2.62 \pm 0.44$$

Muy poco se conoce sobre la regulación de la D-alanilación de los ácidos teicoicos en *Lactobacillus casei*.

En *Staphylococcus aureus* se ha visto que el grado de D-alanilación de los ácidos teicoicos varía dependiendo de factores ambientales. Se ha demostrado que un incremento en el pH (Macarthurd *et al*, 1984), en la temperatura (Hurst *et al*, 1975) y en la concentración de NaCl provocaba una disminución en el grado de D-alanilación de los teicoicos. Por ejemplo el grado de D-alanilación de los LTA de este microorganismo es de 0.77 mol D-Alanina/mol glicerolfosfato cuando es crecido en baja concentración salina (0.2% NaCl) y decrece a 0.3 mol D-Alanina/mol glicerolfosfato en un medio con alta concentración de sal (7.5 % NaCl) (Koch *et al*, 1985). Estas modificaciones por efectores de estrés estarían de acuerdo con lo observado en mi trabajo y reportado en el capítulo II.

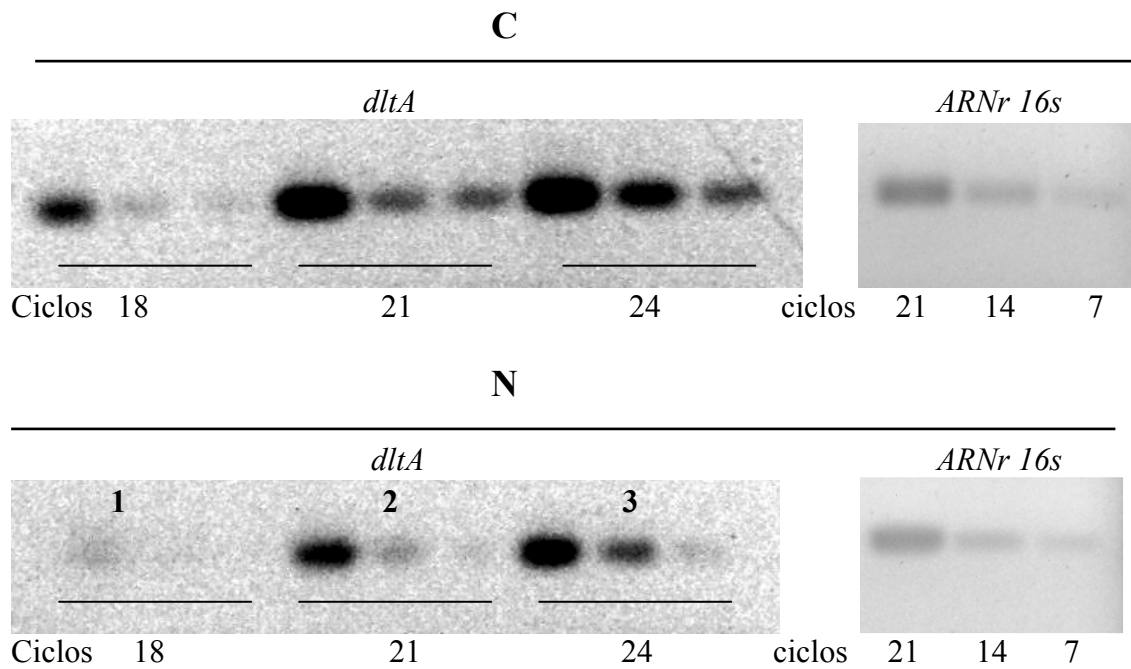
En los gram positivos con bajo contenido G+C, la D-alanilación de los ácidos teicoicos es llevada a cabo por las proteínas codificadas en el operón *dlt*. En *Lactobacillus casei* este operón cuenta con 4 genes (*dltABCD*) donde *dltA* codifica la D-alanil carrier proteína ligasa (Dcl), la cual activa D-alanina usando ATP. Con asistencia de la proteína DltD (*dltD*), este complejo activado es entregado a la D-alanina carrier proteína (Dcp) codificada por *dltC*. DltB (*dltB*) es una proteína transmembrana necesaria para el pasaje del complejo D-alanil-Dcp a través de la membrana plasmática donde se realiza la transferencia de la D-Alanina a la cadena de glicerolfosfato de los LTA. Los LTA esterificados con D-Alanina serían los precursores para la D-alanilación de los WTA.

III.2 Estudio de la expresión de *dltA* y *dltC* por RT-PCR semicuantitativa

En esta sección se estudiará si existen variaciones en la expresión de este operón a nivel transcripcional cuando los lactobacilos son crecidos en condición de alta salinidad.

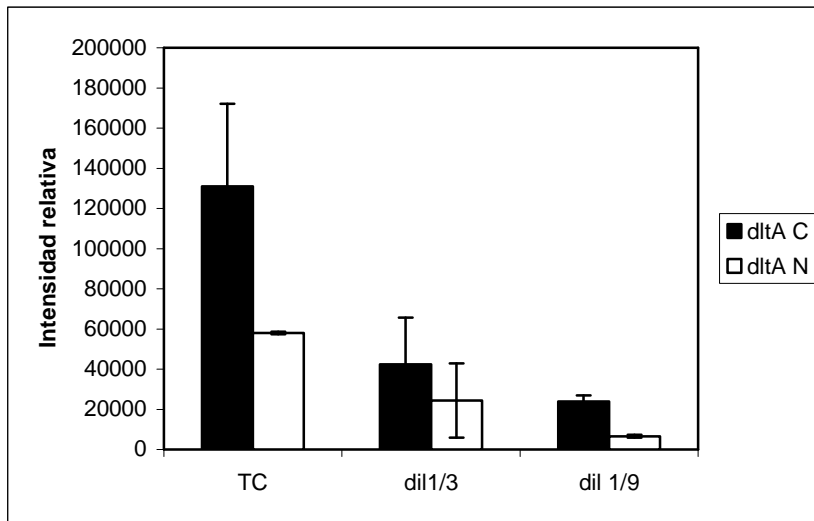
Para ello se ha usado la técnica de RT-PCR semicuantitativa para medir la expresión de dos genes del operón: *dltA* y *dltC*. Se extrajo ARN total de células crecidas en condición control y en alta osmolaridad (N = 0.8M NaCl). Se usaron los cebadores correspondientes para generar los cDNA de *dltA*, *dltC* y *ARNr 16s*, este último usado como gen normalizador.

Figura 22A: Estudio de la expresión de *dltA* por RT-PCR semicuantitativa



Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR. En *dltA* se muestran los ciclos 18, 21 y 24 de amplificación respectivamente. Para cada ciclo se siembra la muestra no diluida y dilución 1/3 y 1/9. Para el *ARNr 16S* se siembran las muestras no diluidas de los ciclos 21, 14 y 7.

Figura 22B: Cuantificación por densitometría

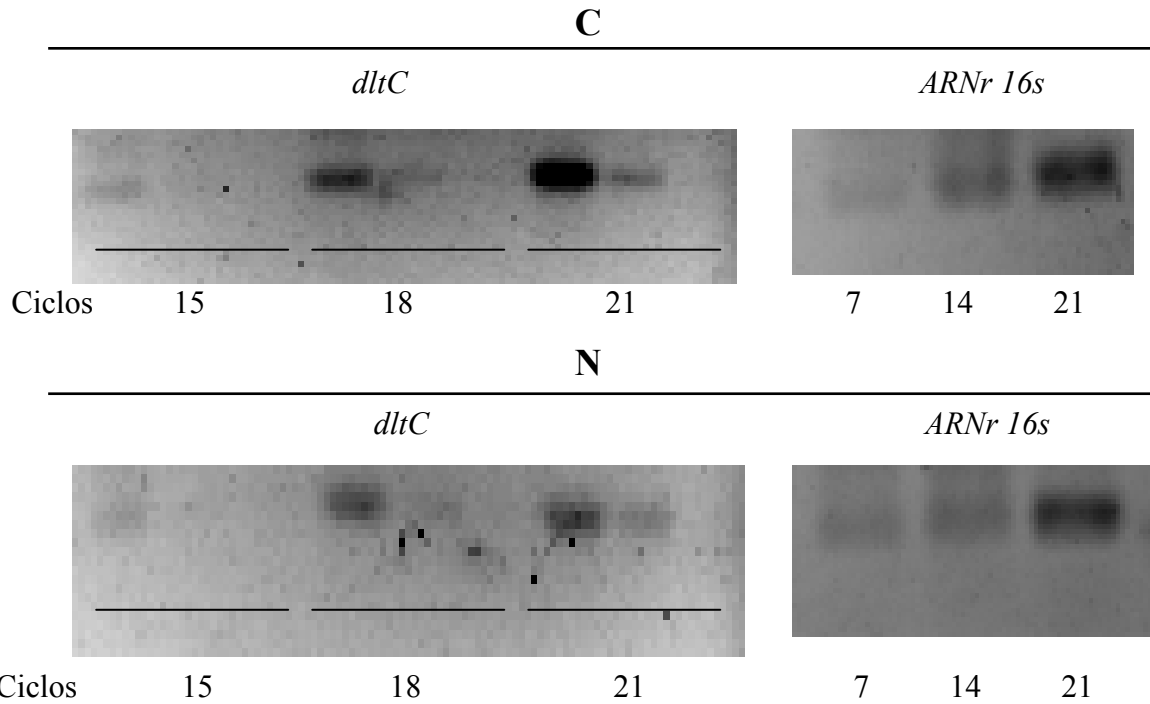


Densitometría de la RT-PCR expresada como niveles relativos de mensajeros de *dltA* en cada condición para el ciclo 21 de amplificación. Las barras representan los valores promedios de dos experimentos independientes con sus DS.

Expresión *dltA*:

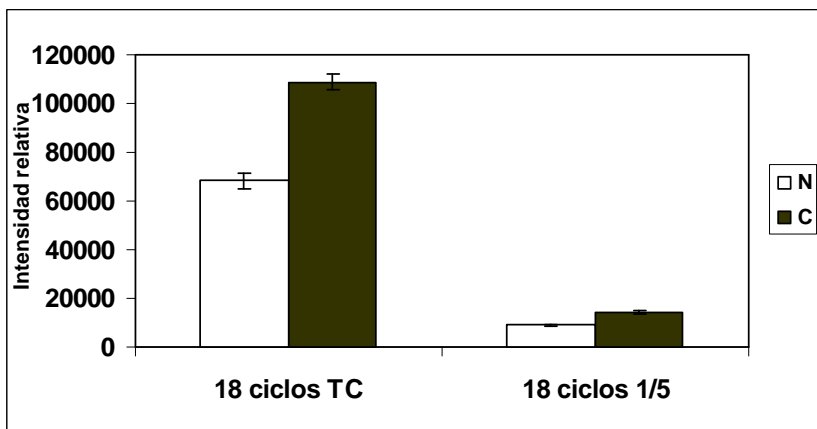
$$\frac{dltA C}{dltA N} = 2.18 \pm 0.3$$

Figura 23 A: Estudio de la expresión de *dltC* por RT-PCR semicuantitativa



Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR. En *dltC* se muestran los ciclos 15, 18 y 21 de amplificación respectivamente. Para cada ciclo se siembra la muestra no diluida y las diluciones 1/5 y 1/25. Para el *ARNr 16S* se siembran las muestras no diluidas de los ciclos 7, 14 y 21.

Figura 23 B: Cuantificación por densitometría



Densitometría de la RT-PCR expresada como niveles relativos de mensajeros de *dltC* en cada condición para el ciclo 18 de amplificación. Las barras representan los valores promedios de dos experimentos independientes con sus DS.

Expresión *dltC*:

$$\frac{dltC C}{dltC N} = 1.65 \pm 0.2$$

En cuanto a la expresión del operón *dlt* responsable de la D-alanilación, los resultados arrojados del estudio de RT-PCR semicuantitativa revelan que los dos genes del operón (*dltA* y *dltC*) se encuentran reprimidos a nivel transcripcional en la condición de crecimiento con alta sal. Del análisis densitométrico, normalizado según las cantidades de ARNr 16S para cada condición, se desprende que *dltA* está 2,18 veces más activo en C que en N. (lo que significa que en la condición N este gen se estaría activando solo un 45%). El gen *dltC* también se halla reprimido en la condición de alta sal. En condiciones normales de crecimiento muestra un aumento de 1.65 veces respecto de N (es decir que presenta una activación del 60% en N).

Este estudio de la expresión genética del operón *dlt* nos permitiría explicar la disminución en el grado de D-alanilación en los ácidos lipoteicoicos cuando las células son sometidas a estrés salino como consecuencia de la menor actividad transcripcional del operón.

Conclusión Capítulo III

El estudio de la expresión génica de los genes responsables de la D-alanilación de los ácidos teicoicos demostró una disminución de la actividad transcripcional de los mismos durante el crecimiento en alta sal.

El estudio de la expresión del gen de síntesis de LTA también marcó una disminución durante el crecimiento en esta condición.

Este estudio genético avala los resultados bioquímicos que demostraron una disminución tanto en el contenido de LTA como en el grado de D-alanilación de los mismos.

Sabiendo que los LTA esterificados con D-Alanina serían los precursores para la D-alanilación de los WTA, la diferencia en la sustitución de los polímeros puede relacionarse con una función de los mismos para eliminar el ión sodio en exceso manteniendo una carga negativa neta para ese fin más cercana a la membrana celular que hacia el extracelular. El balance de sustitución generaría un gradiente de cargas que favorecería la eliminación de cationes tóxicos como el sodio como se verá en el capítulo siguiente.

Capítulo IV

Alteración de los ácidos teicoicos bajo estrés osmótico: correlación con la sensibilidad a agentes antibacterianos, formación de biofilms y binding de cationes bivalentes.

Hemos observado en el capítulo II una alteración en los ácidos teicoicos de pared cuando las células son sometidas a estrés osmótico. Se ha visto un menor contenido tanto de WTA como de LTA como también un menor grado de D-alanilación de estos últimos. Estos resultados mostraron estar en acuerdo con la expresión transcripcional como muestra el capítulo III. Estas modificaciones traen como consecuencia una desestabilización en esa matriz polianiónica que conforman los ácidos teicoicos de pared.

Una disminución en los ésteres de D-Alanina en los LTA modificaría fuertemente la función de estos polímeros dado que la carga positiva de los grupos amino contrarrestan las cargas negativas de los grupos fosfatos.

Numerosos estudios han demostrado una correlación entre el contenido de los ésteres de D-Alanina con la capacidad de acción de péptidos catiónicos antimicrobianos, y antibióticos β -lactámicos o glicopéptidos. Por ejemplo, en los trabajos de Peschel *et al* (1999, 2000), se demostró que cepas de *S. aureus* y *S. xylosus dlt* (mutantes para la capacidad de D-alanilar) mostraron mayor sensibilidad a los péptidos catiónicos defensinas, protegrinas, magainina II y gallidermina. Este incremento en la sensibilidad a estos componentes catiónicos está asociada con el aumento en la carga neta polianiónica en la envoltura de la células *dlt* .

Los ácidos teicoicos tienen un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis catiónica requerida para la actividad enzimática. Asimismo el gradiente y movilidad de iones podría mitigar los cambios de presión osmótica entre el interior celular y el exterior. El pegado de cationes en estos polímeros puede ser modulado por el nivel de D-alanilación, donde un menor número de ésteres de D-Ala generaría un polímero con mayor número de cargas positivas.

En este capítulo se analizará si las alteraciones de los ácidos teicoicos generadas por el estrés osmótico repercuten en distintos aspectos de la fisiología bacteriana como son la resistencia a agentes antimicrobianos, la formación de biofilm sobre superficies artificiales y el pegado de cationes bivalentes.

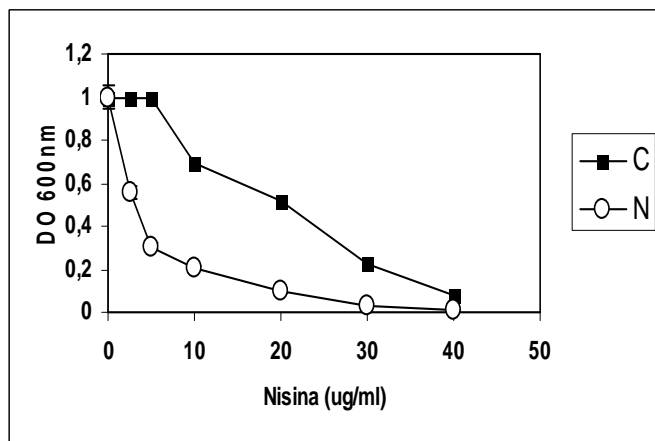
IV.1. Correlación con la sensibilidad a agentes antibacterianos

En esta parte de la tesis se estudiará cómo los cambios sufridos en la envoltura (contenido de teicoicos, grado de D-alanilación) durante la adaptación al estrés osmótico de células de *Lactobacillus casei* BL23 afectan la sensibilidad de estas células frente a diferentes antimicrobianos.

Para ello se eligió la Nisina, un antimicrobiano catiónico producido por *Lactococcus lactis*. En la figura 24 A se muestra la sensibilidad frente a Nisina de células crecidas en condición control y alta sal (N= 0.8M NaCl). En el panel B se exhiben las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM) en ambas condiciones de crecimiento (44.26 μ g/ml C vs. 14.77 μ g/ml N). Puede observarse un aumento de la sensibilidad frente a Nisina en las células crecidas en alta sal.

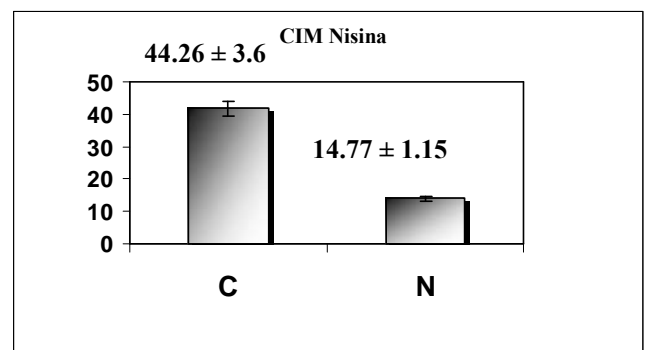
La Nisina actúa destruyendo la integridad de la membrana plasmática a través de la formación de poros disipando la fuerza protón motriz necesaria para el metabolismo celular. La mayor sensibilidad puede explicarse debido a una mayor accesibilidad de este péptido catiónico a la superficie bacteriana. Si asumimos que en la condición N el péptidoglicano se halla más laxo y desprovisto de teicoicos y a su vez los LTA presentan un menor grado de D-alanilación, (lo que significa que estos polímeros se encuentran más negativizados) estas nuevas condiciones permitirían una mayor eficiencia de entrada de estos péptidos. Esto se refleja en el aumento en la sensibilidad en N.

Figura 24A



Cultivos de *L. casei* BL23 en condiciones C y N crecidos con concentraciones de Nisina indicadas. Se normaliza cada punto de DO obtenida a su correspondiente cero de antibiótico.

Figura 24B

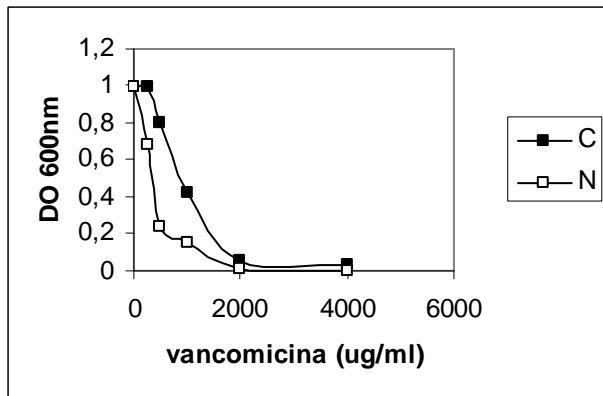


Concentraciones Inhibitorias Mínimas de Nisina para *L. casei* BL 23 crecido en condición control y alta osmolaridad.

También se ensayó la vancomicina. La vancomicina es un glicopéptido que se une al dipéptido D-Alanil-D-Alanina de los precursores del peptidoglicano bloqueando la reacción de transpeptidación. En las figuras 25 A y B puede observarse un aumento de la sensibilidad frente a este antibiótico en las células crecidas en alta sal, resultando las CIM de 1929 $\mu\text{g/ml}$ y 679 $\mu\text{g/ml}$ para la condición control y N de crecimiento respectivamente.

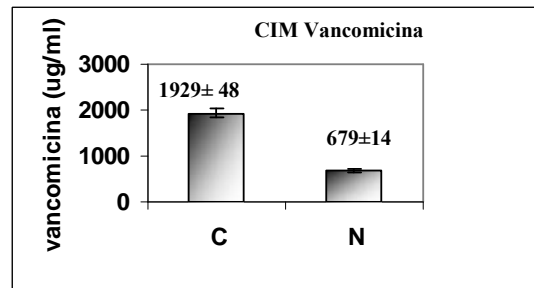
La variación en el contenido de los ácidos teicoicos durante el crecimiento en alta sal favorecería la permeabilidad de la vancomicina a su blanco de acción, la biosíntesis de pared celular.

Figura 25A



Cultivos de *L. casei* BL23 en condiciones C y N crecidos con concentraciones de Vancomicina indicadas. Se normaliza cada punto de DO obtenida a su correspondiente cero de antibiótico

Figura 25 B



Concentraciones Inhibitorias Mínimas de Vancomicina para *L. casei* BL 23 crecido en condición control y alta osmolaridad.

IV.2. Formación de Biofilm *in vitro*

Vistos los cambios que sufren los ácidos teicoicos de pared, tanto en su contenido como en el grado de sustitución en D-Alanina cuando las células son sometidas a estrés osmótico, quisimos ver si estos cambios tenían impacto en la adherencia de las células y formación de biofilm sobre superficies inertes.

En *Staphylococcus aureus* se ha demostrado que las sustituciones de D-Alanina en los ácidos teicoicos eran necesarias para la formación de biofilm. (Gross *et al*, 2001). Una cepa *dltA*⁻ mostraba deficiencias en la adherencia a superficies de plástico (polistireno) y vidrio. Estos resultados pueden ser explicados debido a un incremento de las cargas negativas en la

superficie bacteriana que provocan una repulsión electrostática conduciendo entonces a la pérdida de la capacidad de formar biofilm en estos microorganismos.

Para ver si *Lactobacillus casei* presentaba alteraciones en la capacidad de formar biofilm durante su crecimiento en alta sal, realizamos los ensayos en distintos medios de cultivo: MRS, TSB, TSBm y MRS FB. Estos tres últimos medios suplementados con 0.2% de glucosa.

En la Figura 26 puede observarse que la formación de biofilm varía según el medio de cultivo.

La menor formación de biofilm se obtuvo en el medio estándar MRS. Cuando se usó el medio MRS suplementado con 0.2% de glucosa (MRS FB) se observó un ligero incremento en la condición control y mayor aún en condición de alta osmolaridad. Cuando se usaron medios que difieren en composición respecto del medio MRS como son los medios TSB y TSBm (suplementados con 0.2% de glucosa), se observó la máxima formación de biofilm.

La formación de biofilm está influenciada por los componentes del medio de cultivo que pueden ejercer un efecto inhibitorio. El medio estándar MRS contiene el surfactante Tween 80 y cationes divalentes que afectan la adherencia. Por otro lado en este medio, la fuente de carbono se encuentra en exceso permitiendo un mayor crecimiento bacteriano y consecuentemente una más rápida acidificación, se sabe que el desarrollo de un biofilm maduro es inhibido a pH bajos. (Clemens *et al*, 1999).

Puede observarse que el crecimiento en alta sal estimuló la formación de biofilm. Resultando más favorables los medios TSB y TSBm. En la figura 27 se observa cualitativamente la tinción del biofilm con cristal violeta en los distintos medios y a distintas concentraciones de NaCl.

Se puede concluir que la capacidad de formar biofilm en *Lactobacillus casei* es fuertemente dependiente del medio de cultivo utilizado y de factores ambientales como es el estrés salino.

Figura 26: Formación de biofilm

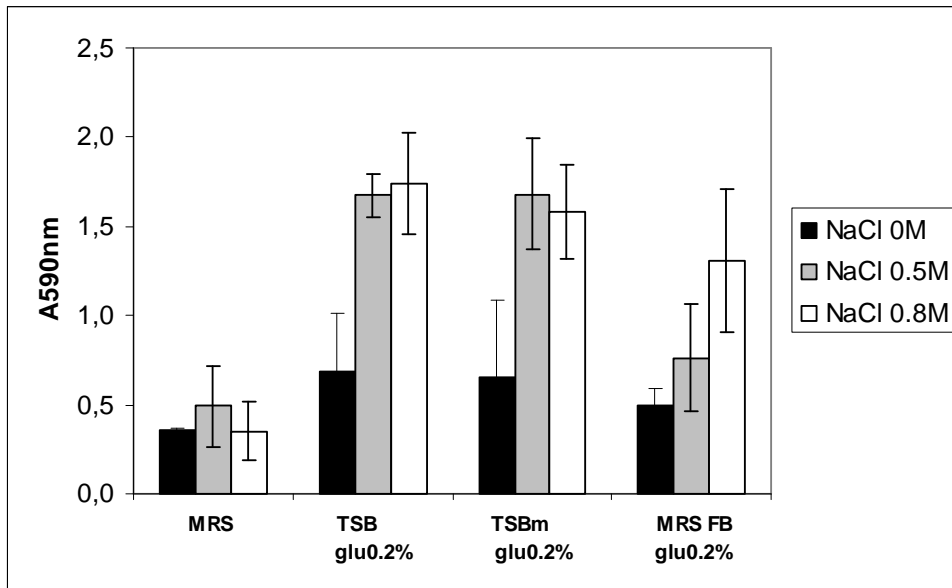


Figura 26: Comparación de la capacidad de formación de biofilm en distintos medios de crecimiento y para distintas condiciones de osmolaridad sobre superficie de polistireno. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

Figura 27: Formación de biofilm

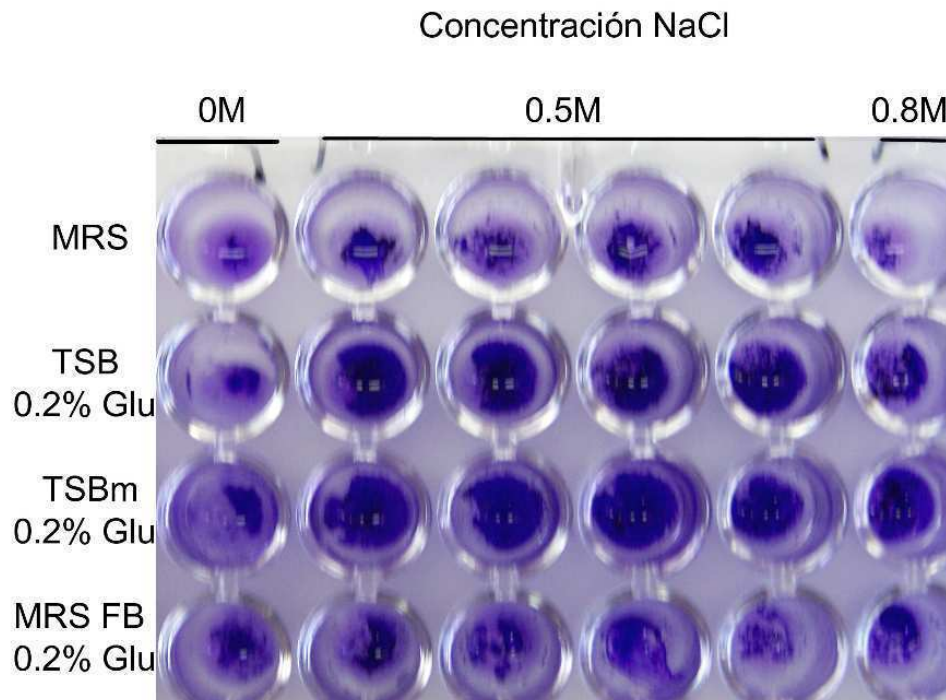


Figura 27: Formación de biofilm en placa de polistireno para las distintas condiciones de crecimiento. Se observa la tinción del biofilm con cristal violeta.

IV.3. Binding de cationes bivalentes

Se ha demostrado que los ácidos teicoicos participan del intercambio de iones entre las paredes de las bacterias Gram positivas y el medio externo, y por lo tanto, mantienen una alta concentración de iones bivalentes, particularmente Mg^{++} , en la región de la membrana celular. (Baddiley 1972; Archibald, 1974). La cantidad de ácidos teicoicos en las paredes de las bacterias claramente afecta la cantidad de Mg^{++} unido y las células pueden regular su contenido de acuerdo a la disponibilidad de Mg^{++} en el medio. Por ejemplo, en condiciones limitantes de Mg^{++} , células de *B. subtilis* aumentan el contenido de ácidos teicoicos a sus paredes, de modo de asegurar una fuente adecuada de Mg^{++} . (Meers y Tempest 1970). Sin embargo, la cantidad de Mg^{++} unido a las paredes es también influenciado por el contenido de los D-alanil ésteres de los ácidos teicoicos. Estudios de espectroscopia de rayos X realizados por Baddiley y colaboradores en 1973 demostraron que la presencia de residuos de D-Alanina puede afectar la forma en que se unen los iones Mg^{++} a la pared. La remoción de los D-alanil ésteres de los ácidos teicoicos de *S. aureus* resultó en un incremento de las cantidades de Mg^{++} unido a la pared, lo que concluye que ese aumento en la capacidad de binding es consecuencia de la disminución de los ésteres de D-Alanina. (Lambert *et al*, 1975).

Asumiendo los cambios que sufren los ácidos teicoicos, tanto en su contenido como en el grado de sustitución en D-alanina cuando células de *Lactobacillus casei* BL23 son sometidas a estrés osmótico, quisimos ver si estos cambios generaban un impacto en la absorción de cationes bivalentes. El catión bivalente modelo para realizar los ensayos de absorción ha sido el Cu^{++} dado que puede ser monitoreado fácilmente a través de una reacción colorimétrica y cuantificado por espectrofotometría.

En la figura 28 se muestra el gráfico de absorción de Cu^{++} para células enteras provenientes de las dos condiciones de crecimiento y a distintas DO. Puede observarse un descenso en la capacidad de absorción en las células de la condición N.

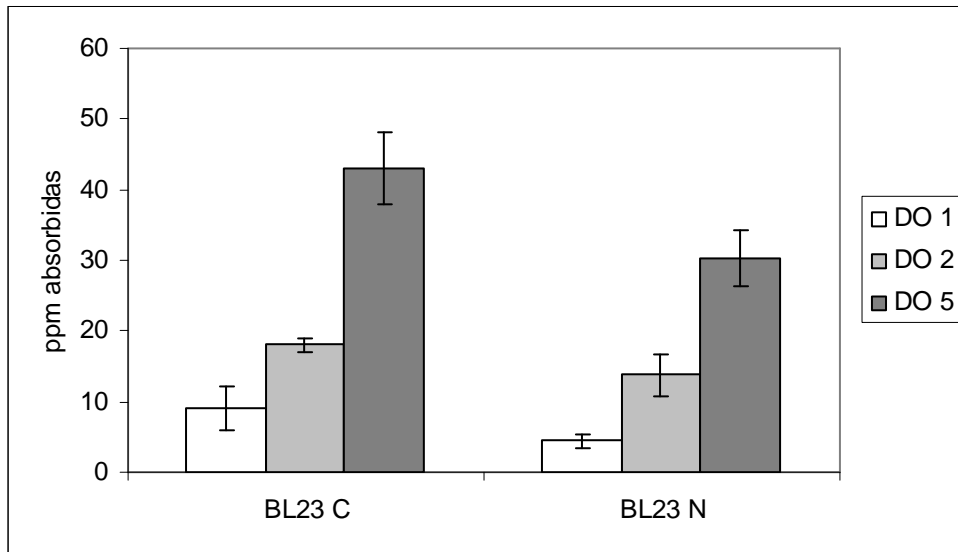
Figura 28: Absorción de Cu^{++} en células enteras

Figura 28: Distintas DO de células de BL23 de la condición control y N (N=0.8M) fueron incubadas por 16 hs con 100ppm de Cu^{++} . Los resultados representan los valores promedios de tres experimentos independientes con sus DS.

Con el objetivo de realizar el ensayo *in situ*, se purificaron paredes de BL23 de ambas condiciones de crecimiento. En el gráfico 29 puede observarse que las paredes de la condición N tienen mayor capacidad de binding a Cu^{++} . Este aumento puede estar provocado por el menor grado de D-alanilación de los ácidos teicoicos en dicha condición. Para corroborar esta hipótesis, mismas concentraciones de paredes fueron incubadas en Tris-HCl 10mM pH9 para remover los ésteres de D-Alanina. Luego de este tratamiento se realizó el ensayo de absorción a Cu^{++} dando como resultado una ganancia en la capacidad de unir Cu^{++} , siendo más significativa en las paredes de la condición control.

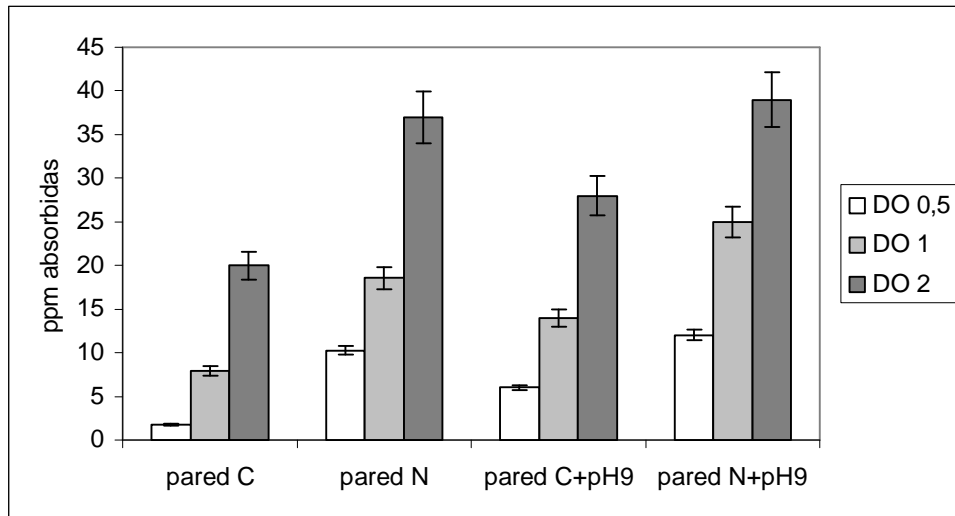
Figura 29: Absorción de Cu^{++} en paredes purificadas

Figura 29: Distintas DO de paredes purificadas de la condición control y N (N=0.8M) con y sin tratamiento de Tris HCl pH9 fueron incubadas por 16 hs con 100ppm de Cu^{++} . Los resultados representan los valores promedios de tres experimentos independientes con sus DS.

Si bien el ensayo realizado sobre las paredes estaría avalando una diferencia en la calidad de los ácidos teicoicos a nivel de cargas, el ensayo de células enteras indicó un resultado opuesto. Quizás el exceso de iones Na^+ presente en la condición de cultivo N quede asociado a los polímeros aniónicos e interfiera con el posterior ensayo de binding de Cu^{++} . Si en N los ácidos teicoicos presentan un menor grado de D-alanilación, expondrían mayor número de cargas negativas y por ende mayor atracción por los iones Na^+ .

Durante el proceso de purificación de las paredes y con los sucesivos lavados se disiparía el exceso de iones Na^+ , obteniendo resultados más significativos de la composición de la pared.

Conclusión Capítulo IV

Los cambios en el contenido como así también en el nivel de sustitución por D-Alanina de ácidos teicoicos durante el crecimiento en estrés osmótico conducen a efectos pleiotrópicos que incluyen:

- 4) Mayor sensibilidad frente a antimicrobianos de naturaleza catiónica (Nisina) y glicopéptidos con blanco de acción la pared celular (Vancomicina)
- 5) Mayor capacidad de formación de Biofilm sobre superficies artificiales
- 6) Modificación en la capacidad de pegado de cationes bivalentes. Efecto diferencial en células enteras respecto a paredes purificadas que estaría de acuerdo con una función postulada de los ácidos teicoicos para eliminar el ión sodio en exceso.

Capítulo V

Optimización del método de electroporación en *Lactobacillus* mediante el crecimiento en alta sal

La limitada transformabilidad de las especies de *Lactobacillus* se debe fundamentalmente a las características inherentes de su pared celular. La presencia de una gruesa capa de mureina las hace resistente a métodos de disrupción mecánica. Por otro lado se ha estudiado (Piuri *et al*, 2005) la alta resistencia a hidrolasas de pared, como lisozima y mutanolisina, que presentan las distintas especies de *Lactobacillus*.

Diversas técnicas se han llevado a cabo con el objetivo de mejorar la electrotransformabilidad de estos microorganismos. Pretratamientos con lisozima, glicina o penicilina permitieron reducir la alta resistencia debida a la pared celular y mejorar la eficiencia de electrotransformación en distintas cepas de este género (Aymerich *et al*, 1993; Chassy y Flickinger 1987; Mason *et al*, 2005; Thompson *et al*, 1996; Wei *et al*, 1995).

Hemos mostrado en los capítulos anteriores que las células de *Lactobacillus casei* BL23 crecidas en condiciones de alta osmolaridad presentan una notoria disminución de la resistencia a la lisis. También se ha reportado en *L. delbrueckii* subsp. *Lactis* (Koch *et al*, 2007) que el estrés osmótico inducido por una alta concentración salina provocaba un aumento en la actividad autolítica.

Teniendo en cuenta los estudios precedentes y estudios realizados en esta tesis sobre los cambios a nivel de envoltura en *Lactobacillus casei* bajo estrés osmótico, decidimos estudiar el efecto del crecimiento en esta condición sobre la electrotransformabilidad de este microorganismo y de otras especies de *Lactobacillus*.

La fragilización de la pared celular resultante del crecimiento en alta sal sería una ventaja para el método de introducir material genético empleando la electroporación como estrategia, que involucra la formación de poros por un pulso eléctrico en la membrana celular.

A partir de cultivos de *Lactobacillus casei* BL23 en MRS N (N = 0.9M NaCl) se prepararon las células electrocompetentes como se detalla en Materiales y Métodos. Se probaron dos métodos de electroporación con distintas combinaciones de parámetros eléctricos (voltaje, resistencia y capacitancia) Tabla 6.

Tabla 6: Optimización de la electroporación. Comparación entre los parámetros eléctricos de dos métodos de electroporación ensayados.

Parámetros Eléctricos	Protocolos	
	M1	M2
Voltaje aplicado (KV)	2	2.5
Resistencia (R in Ω)	400	200
Capacitancia (C in μF)	25	25
Fuerza Eléctrica (V/cm)	10000	12500
Constante RC (τ in msec)	10	5

Como muestra la tabla 7 las condiciones del método M2 de electroporación fueron las elegidas por arrojar las eficiencias más altas, superiores a 10^5 UFC/ μg ADN.

Dado que distintos factores pueden influir en la eficiencia de transformación, como son el tamaño, origen y replicación del plásmido, como también las características de las cepas usadas, se compararon las eficiencias usando distintos plásmidos que difieren en tamaño, marcador de selección, número de copias por célula y mecanismo de replicación. La tabla 7 muestra los resultados de eficiencias de electroporación con los diferentes plásmidos y parámetros analizados. No se observaron diferencias significativas entre las eficiencias con los distintos plásmidos. Los transformantes fueron analizados en su contenido plasmídico y se corroboró tanto su presencia como la ausencia de rearreglos. (Figura 31A-C)

El tamaño del plásmido también fue evaluado, distintos plásmidos derivados de pRV500 con diferentes tamaños (pRV610, pRV620 y pRV613) produjeron similares eficiencias.

También se analizaron las fuentes de extracción de los plásmidos dado que modificaciones en los sistemas de restricción pueden inhibir la transformación con ADN foráneo. Para esto, se extrajo el plásmido pNZ273 de un clon transformado de *Lactobacillus casei* y se usó para electroporar a la cepa libre de plásmidos. Se obtuvo una eficiencia de 6×10^5 transformantes/ μg de ADN, la misma que aquella obtenida cuando el plásmido fue aislado de *Escherichia coli*.

Tabla 7: Eficiencias de transformación en *Lactobacillus casei* BL23 con diferentes métodos de electroporación y para distintos plásmidos ensayados

Plásmido/ Hosp. (origen)	Características relevantes (tamaño, marcador de selección, modo replicación, rango de hosp.)	Protocolo de electroporación Eficiencias de Transformación ¹ UFC / μ g	
		M1	M2
pIL253/ <i>L. casei</i>	4.8 kb Em ^R Replicación Theta	$2.8 \pm 0.1 \cdot 10^4$	$1.2 \pm 0.1 \cdot 10^5$
pG ⁺ Host9/ <i>L. lactis</i> ²	3.75 kb Em ^R Círculo Rod.	ND	$6.0 \pm 0.1 \cdot 10^6$
pNZ273/ <i>E.coli</i> KW1	4.66 kb Cm ^R Círculo Rod.	$2.8 \pm 1.3 \cdot 10^3$	$5.7 \pm 0.4 \cdot 10^5$
pGK13 / <i>E.coli</i> JM109	4.96 kb Cm ^R , Em ^R Círculo Rod. Amplio rango Hosp	$1.3 \pm 0.1 \cdot 10^5$	$5.9 \pm 0.1 \cdot 10^5$
pRV610/ <i>E.coli</i> JM109	5.17 kb Em ^R , Ap ^R Replicación Theta	ND	$5.2 \pm 1.2 \cdot 10^5$
pRV613/ <i>E.coli</i> JM109	8.69 kb Em ^R Ap ^R Replicación Theta	ND	$1.43 \pm 0.1 \cdot 10^6$
pRV620/ <i>E.coli</i> JM109	5.6 kb Cm ^R Ap ^R Replicación Theta	ND	$1.8 \pm 0.1 \cdot 10^5$

¹ El número de transformantes/ug de ADN se informa como la media de tres ensayos independientes y su desvío estándar. ND no determinado.

²El recuento de transformantes se realiza después de una incubación a 30°C

Para determinar cuán eficiente es este nuevo procedimiento comparamos nuestros resultados con los obtenidos por otros métodos convencionales de electroporación. Para *L. casei* las eficiencias reportadas varían de 4.5×10^3 (Chassy y Flickinger 1987) a 2.0×10^4 (Mason *et al*,

2005) transformantes/ μg . Estos métodos aplicados en nuestro laboratorio condujeron a unas eficiencias de 10 veces menor comparada con la nueva metodología. Tabla 8

Tabla 8: Eficiencia de electroporación con distintos métodos ensayados

Plásmido/ Hospedador (origen)	Características Relevantes (tamaño, marcador de selección, modo replicación, rango de hospedador)	Protocolo de electroporación Eficiencia de transformación ¹ ufc / μg		
		M1	M2	LAB ²
pIL253/ <i>L. casei</i>	4.8 kb Em ^R Replicación Theta	$2.8 \pm 0.1 \cdot 10^4$	$1.2 \pm 0.1 \cdot 10^5$	$5,5 \pm 1,1 \cdot 10^4$
pNZ273/ <i>E. coli</i> KW1	4.66 kb Cm ^R Círculo Rodante	$2.8 \pm 1.3 \cdot 10^3$	$5.7 \pm 0.4 \cdot 10^5$	$1,7 \pm 0.2 \cdot 10^4$

¹La eficiencia de transformación se informa como la media del número de transformantes/ μg de ADN plasmídico de tres ensayos independientes y su desvío estándar.

²Eficiencias medidas con el método descrito por Chassy y Flickinger.

Se evaluó también el efecto de la concentración de plásmido en la electrotransformación. Para este propósito se ensayaron distintas concentraciones de plásmido pNZ273 para electroporar células frescas, es decir preparadas y utilizadas inmediatamente, y preservadas a -70°C .

Como se observa en la figura 30, existe una relación lineal del número de transformantes con la concentración de ADN plasmídico, resultando en un valor de eficiencia constante de 10^5 transformantes/ μg plásmido.

Figura 30: Efecto del incremento de la concentración de ADN en la electrotransformación

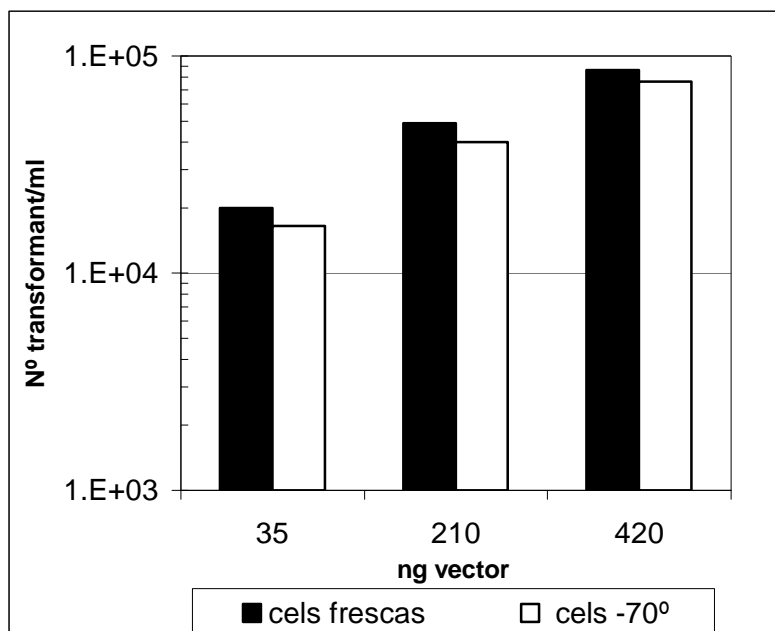


Figura 30: Efecto del incremento de la concentración de ADN en la electrotransformación. Células electrocompetentes frescas (barras negras) o almacenadas a -70°C (barras blancas) de *L. casei* fueron transformadas con distintas masas de plásmido pNZ273. Las ufc obtenidas en placas de cloranfenicol fueron contadas y reportadas para cada concentración de plásmido.

Se quiso verificar si las células electrocompetentes preparadas con esta metodología mantenían su transformabilidad al ser preservadas a -70°C por un tiempo determinado. Como puede verse en la tabla 9 y figura 30 se obtuvieron valores de eficiencias comparables cuando se usaron células frescas y células almacenadas a -70°C . Si bien el congelado de las células produjo una disminución de la viabilidad en un orden, no hubo pérdida o reducción significativa de la electrotransformabilidad.

Dado que no adicionamos crioprotector a la hora del almacenamiento en frío de las células competentes, pensamos que la presencia de solutos osmocompatibles acumulados durante el crecimiento en alta sal como glicin-betaína, aminoácidos, péptidos (Piuri *et al*, 2003) servirían como crioprotectores naturales.

Un factor importante de este nuevo procedimiento es la densidad celular, dado que cuando se partió de densidades menores a 10^{10} ufc/ml se obtuvieron bajas eficiencias de electroporación (para pNZ273 la eficiencia disminuyó a $4.7 \pm 0.1 \cdot 10^3$ y para pRV610 se obtuvo $2 \pm 0.1 \cdot 10^3$

Tabla 9: Efecto del almacenamiento en frío de las células en la electrotransformación

	Células transformadas inmediatamente	Células preservadas a -70°
	Recuento celular (ufc/ml)	
Viabiles totales	$1.8 \cdot 10^{12}$	$8.0 \cdot 10^{11}$
Viabiles post pulso	$2.0 \cdot 10^9$	$4.0 \cdot 10^9$
% de supervivencia	0.1 %	0.5 %
ng plásmido pNZ273	Eficiencia de transformación (ufc / μg)	
35	$5.7 \cdot 10^5$	$4.7 \cdot 10^5$
210	$2.3 \cdot 10^5$	$1.9 \cdot 10^5$
420	$2.0 \cdot 10^5$	$1.8 \cdot 10^5$

Células electrocompetentes de *L. casei* BL23 frescas y conservadas a -70°C fueron transformadas con distintas concentraciones de pNZ273. La eficiencia se calcula como el número de ufc/ug ADN plasmídico

Es sabido que la transformabilidad puede ser cepa y especie dependiente. Con el objetivo de verificar si esta nueva metodología podía ser extensiva a otras especies de *Lactobacillus*, se probó la técnica en *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. plantarum*, y dos cepas de *L. paracasei*. Como se muestra en la tabla 10, esta metodología también resultó eficiente en estas especies. Si bien la alta concentración de NaCl afecta en general a un gran número de especies, se tuvo que optimizar esta concentración para cada cepa ensayada de modo de obtener un crecimiento adecuado para llevar a cabo esta metodología. Mientras *L. delbrueckii* subsp. *lactis* y *L. plantarum* fueron crecidas en 0.9M de NaCl, las cepas de *L. paracasei* resultaron más osmosensibles y se necesitó una concentración menor de sal (0.7M).

Tabla 10: Transformabilidad en otras especies de *Lactobacillus*

Cepa	Plásmido	Eficiencia de transformación (ufc / μg) ¹		
		pNZ273	pRV610	pGK13
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LKT		ND	$1.4 \pm 0.1 \cdot 10^5$	$2.0 \pm 0.1 \cdot 10^5$
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917		$9.2 \pm 0.3 \cdot 10^5$	$2.6 \cdot 10^5$	ND
<i>Lact. paracasei</i> ATCC 27092		$3.3 \pm 0.2 \cdot 10^6$	ND	ND
<i>Lact. paracasei</i> ATCC 27139		$4.8 \pm 0.3 \cdot 10^6$	ND	ND
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356		ND	$1.4 \pm 0.2 \cdot 10^5$	$2.5 \pm 0.3 \cdot 10^4$

¹La eficiencia de transformación se informa como la media del número de transformantes/ μg de ADN plasmídico de tres ensayos independientes y su desvío estándar. Usando células frescas y el protocolo M2. ND: no determinado.

A veces la presencia de plásmidos en cepas de *Lactobacillus* pueden reducir la eficiencia de transformación, ya sea por incompatibilidad plasmídica o porque se generan rearrreglos. Esto fue verificado de dos maneras distintas: mediante el uso de una cepa que contiene plásmidos nativos (*L. plantarum* ATCC 14917), o bien retransformando por segunda vez una cepa con un plásmido distinto del primero. En el primer caso, *L. plantarum* ATCC 14917 contiene plásmidos endógenos y fue eficientemente transformada como muestra la tabla 10, indicando que la presencia de plásmidos nativos no interfiere negativamente en la transformación. En el segundo caso, se usaron dos plásmidos con sistemas de replicación diferentes (pNZ273 con sistema de círculo rodante y pRV613 con replicación Theta) para transformar *L. paracasei*.

Luego de ser transformado en primer lugar con pNZ273, se prepararon células electrocompetentes y retransformado con pRV613 obteniéndose una eficiencia de $4.2 \pm 0.2 \cdot 10^6$ (figura 31C) similar a la obtenida para el pNZ273 solo (tabla 10). Se pudo verificar que la presencia de plásmidos endógenos ya sea introducido o nativo no redujo la eficiencia de la transformación.

Figura 31: Análisis de transformantes. Extracción de plásmidos.

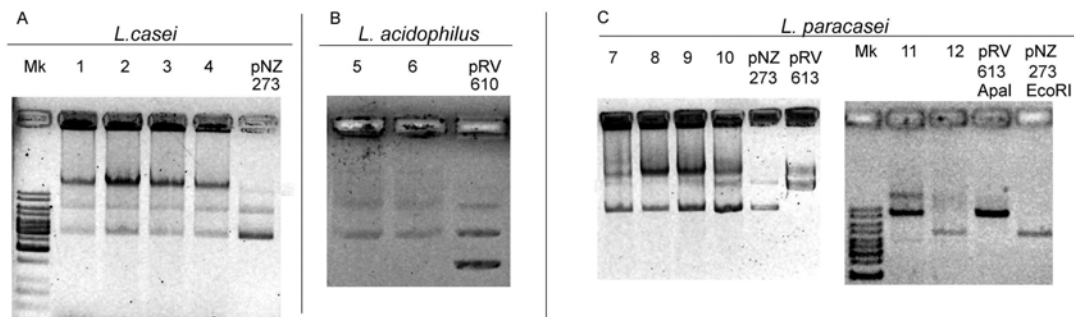


Figura 31: Transformantes de *L. casei* (panel A), *L. acidophilus* (panel B) o *L. paracasei* (panel C) fueron analizados por extracción plasmídica en geles de agarosa 1%. Los números indican diferentes clones aislados para cada especie. Como controles se corre el plásmido extraído de *E. coli*. El panel C muestra el doble transformante de *L. paracasei* con el análisis de restricción para ambos plásmidos. Líneas 11 y 12 son el mismo clon digerido con Apal (línea 11) y EcoRI (línea 12).

Conclusión Capítulo V

En este capítulo se ha descrito un nuevo método para la electroporación de las especies de *Lactobacillus* que consiste esencialmente en el debilitamiento de la pared celular a partir del crecimiento en condiciones de alta osmolaridad.

Con este nuevo método se obtienen mayores eficiencias comparadas con los métodos convencionales de electroporación y puede ser extensivo a otras especies del género *Lactobacillus* que muestren una fragilización de la pared como consecuencia del estrés osmótico.

Capítulo VI Construcción de una mutante *dlt* de *Lactobacillus casei*

En los capítulos anteriores hemos estudiado los cambios que sufre la envoltura cuando células de *Lactobacillus casei* son sometidas a estrés osmótico. Estos cambios involucran una disminución en la cantidad de ácidos teicoicos como también una modificación en el grado de sustitución de los ésteres de D-Alanina. Tales cambios modifican las propiedades fisicoquímicas de la envoltura bacteriana.

También se ha visto una modificación a nivel estructural del peptidoglicano asociado a una disminución del grado de entrecruzamiento.

En el Capítulo V se mostró como se ha generado una nueva metodología para optimizar la electrotransformación de estas células aprovechando los cambios a nivel de envoltura durante el crecimiento en alta sal de los *Lactobacillus*. Esto nos ha permitido mayor eficiencia de transferencia de material genético con fines de mutagénesis.

En este capítulo describiremos las distintas estrategias que se llevaron a cabo para construir una mutante del operón *dlt*.

VI.1 Estrategia 1: Mutagénesis por recombinación homóloga e inserción plasmídica

A partir de la secuencia del genoma de *Lactobacillus casei* BL23 disponible en Genebank, se generaron cebadores para amplificar por PCR un fragmento de 1500pb correspondiente al operón *dlt* del gen *dltA*. Este fragmento fue clonado en el vector PCR2.1-TOPO (Invitrogen) y amplificado en *Escherichia coli* JM109. Aprovechando los sitios múltiples de clonado del vector TOPO se subclonó el fragmento de *dltA* al vector pRV300 (Leloup *et al.* 1998), no replicativo en gram positivas, para generar mutaciones por recombinación homóloga e inserción en *Lactobacillus casei* BL23.

Se prepararon células electrocompetentes de *Lactobacillus casei* por crecimiento en alta sal como se describe en materiales y métodos y se electroporaron con pRV300+*dltA*. Por recombinación homóloga se esperaría la integración del vector (un solo evento de recombinación de tipo Campbell) y la consecuente mutación del gen de interés. Figura 32.

Figura 32: Mutagénesis por recombinación homóloga e inserción plasmídica

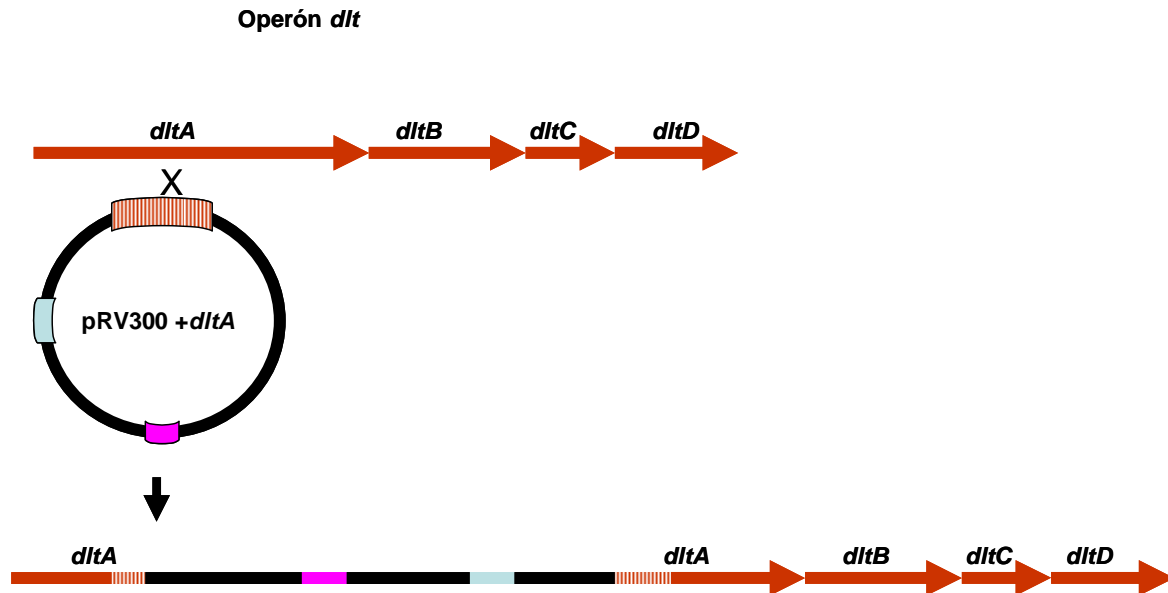


Figura 32: Esquema de recombinación homóloga e inserción plasmídica para generar una mutante *dlt*. El plásmido pRV300 lleva clonado un fragmento del gen *dltA*, lugar donde se espera que ocurra la recombinación. En celeste se representa el cassette de resistencia de *Erm* (selección en gram +) y en fucsia el cassette de *Amp* (selección en gram-). Abajo se esquematiza la reorganización de los genes del operón luego de ocurrir la inserción del plásmido.

VI.2 Estrategia 2: Inserción de un cassette de antibiótico en el gen blanco.

En esta estrategia se llevó a cabo la técnica LFH-PCR o “long flanking homology PCR” (Wach, 1996), en la cual se diseñan una serie de primers con complementariedad de secuencias que permitan amplificar un fragmento de ADN a medida que posea un cassette de resistencia a antibiótico flanqueado a ambos lados por secuencias del gen que se quiere mutagenizar. En la Figura 8 de Materiales y Métodos se muestra un esquema de la estrategia empleada.

Se recurrió a la técnica Recombineering en *E. coli* para obtener el vector recombinante deseado. Esta técnica involucra a la cepa DY331 que posee un profago lambda defectivo portador de los genes de recombinación (*exo*, *bet* y *gam*) bajo el control de un represor del ciclo lítico del fago termosensible (cI). Esta técnica permite generar moléculas recombinantes *in vivo* sin necesidad de técnicas moleculares de corte y religado.

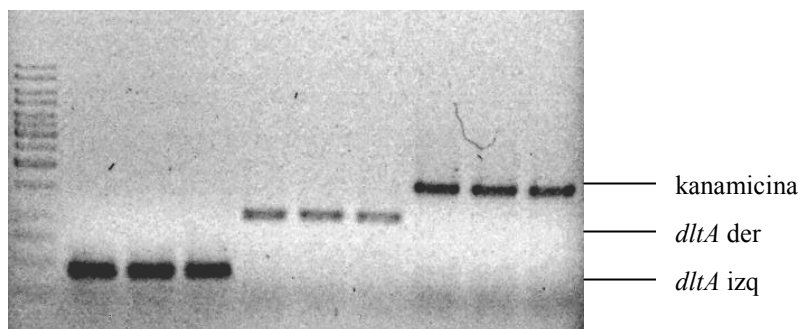
El vector conteniendo las secuencias target es transferido a células electrocompetentes DY331 previamente inducidas a 42°C 15 min como se describe en Piuri y Hatfull 2006. Para generar la inserción se diseñan productos de PCR que presenten 50-100 pb de homología entre sí de modo de producir la integración. Esos productos de PCR desnaturalizados por 10 min a 95°C y enfriados rápidamente son utilizados para co-electroporar con el vector que incluye la secuencia blanco donde se quiere producir la integración del fragmento lineal de PCR. Se deben rastrear suficientes clones para lograr obtener la construcción deseada. Una vez obtenida la construcción se electroporarán las células de *Lactobacillus* para conseguir la inserción del marcador de selección en el gen target a mutagenizar.

A continuación se detallan los pasos de esta estrategia:

1) Amplificación de los fragmentos *dltA* izq, kanamicina y *dltA* der.

En la Figura 33 se muestra la amplificación de *dltA* izq de 370pb, del cassette de kanamicina de 1500pb y de *dltA* der. de 940pb.

Figura 33: Amplificación de los fragmentos *dltA* izq, kanamicina y *dltA* der

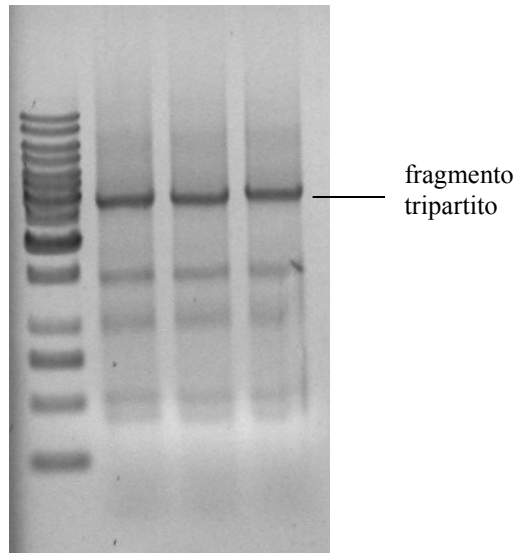


2) Generación por PCR del fragmento tripartito

Una vez obtenidos los tres fragmentos, estos se purifican y se usan como templado en la reacción de LFH-PCR con las condiciones de ciclado que se describen en materiales y métodos. En la

figura 34 se muestra la amplificación del fragmento tripartito de tamaño 2800pb. Las bandas que se observan más abajo corresponden a los tres fragmentos que se encuentran en exceso.

Figura 34: Amplificación del fragmento tripartito



3) Clonado de *dltA*₁₅₀₀ en pRV300

Los primers *dltA1* y *dltA2* fueron utilizados para amplificar un fragmento del gen *dltA* del operón *dlt* a partir de la secuencia de *Lactobacillus casei* BL23. El fragmento amplificado de 1500 pb fue clonado en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor y con la mezcla se transformaron células competentes de *E. coli* JM109. Las células se plaquearon en medio LB con ampicilina 100ug/ml, 40ul de IPTG y 15ul de X-gal. Se seleccionó un clon positivo que contenía el plásmido recombinante con el inserto *dltA*₁₅₀₀. La presencia del inserto se corroboró por PCR utilizando los primers *dltA1* y *dltA2*. El plásmido fue digerido con las enzimas *ApaI* y *SacI* para liberar el fragmento. Este mismo fue subclonado en pRV300 el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas. La ligación se realizó con Ligasa T4 (promega) 16 hs a 15°C y la mezcla fue usada para transformar *E. coli* JM109, plaqueando con ampicilina, IPTG y X-gal para visualizar colonias blancas y azules. Se seleccionó un clon positivo y se corroboró por PCR y por restricción. El plásmido recombinante se amplificó y se purificó usando Qiagen kit 100.

4) Recombinering en *E. coli* DY331.

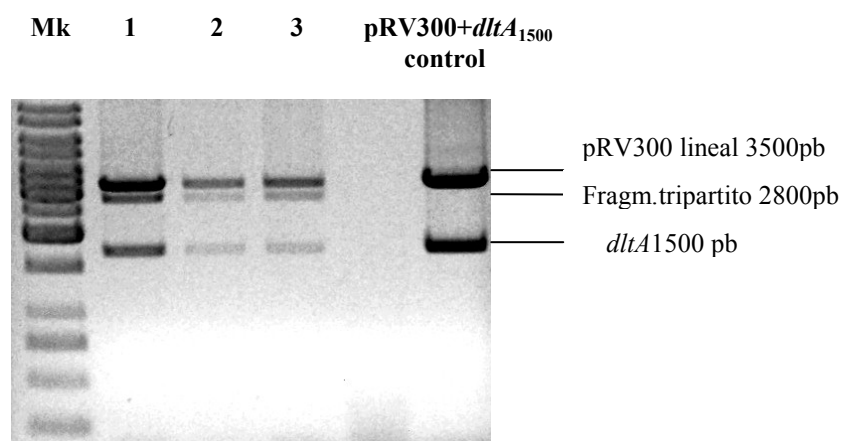
Obtenidos el fragmento tripartito y el pRV300+*dltA*₁₅₀₀, se co-electroporaron en células de *E.coli* DY331 para obtener por recombinación homóloga el vector pRV300 que contenga al fragmento tripartito. En la figura 9 de Materiales y Métodos se esquematiza la recombinación que ocurre *in vivo*.

5) Corroboración de los clones positivos

La corroboración de los clones positivos se realizó mediante análisis por enzimas de restricción. Cabe aclarar que aquellos clones en donde se haya producido el recombeneering esperado coexistirán los plásmidos pRV300+*dltA*₁₅₀₀ y pRV300+fragm.tripartito.

En la figura 35 se muestra el análisis de restricción de tres clones positivos, en los que los plásmidos extraídos fueron digeridos con las enzimas *Apa*I y *Sac*I. Claramente se ven las bandas correspondientes a pRV300 linealizado (3500pb), el fragmento tripartito (2800pb) y *dltA*₁₅₀₀ (1500pb)

Figura 35: Corroboración de los clones positivos por análisis de restricción

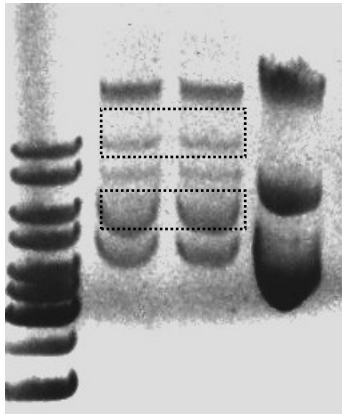


6) Extracción del plásmido pRV300+fragm tripartito

Dada la coexistencia de ambos plásmidos, para aislar el vector que lleva la construcción deseada se decidió purificarlo a partir de una corrida en gel de agarosa, en donde se recortaron

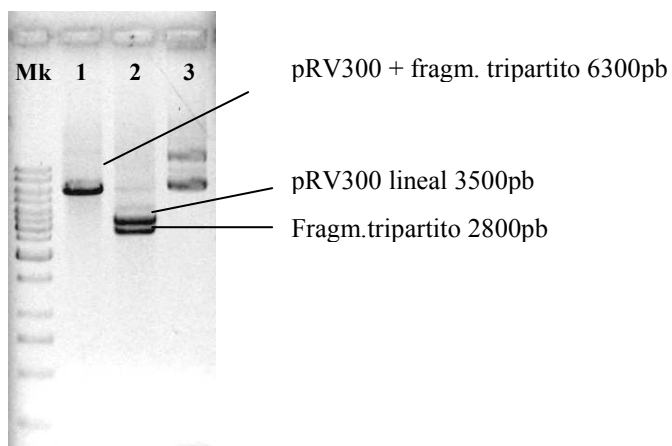
las bandas correspondientes a las isoformas CC (círculo cerrado) y CA (círculo abierto) del plásmido que lleva el fragmento tripartito. En la figura 36 se muestra el recorte de estas isoformas para dos clones positivos. Luego de la purificación, se corrobora el plásmido con la construcción deseada mediante restricción y PCR para verificar la presencia del cassette de kanamicina. Figuras 37 y 38.

Figura 36: Purificación del plásmido pRV300+fragm tripartito



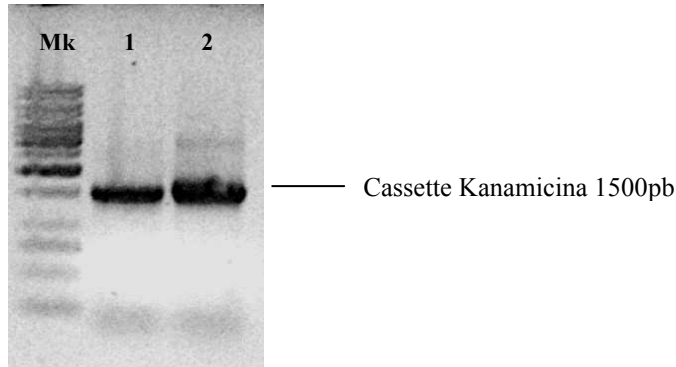
En líneas punteadas se muestra el recorte de las isoformas CC (superior) y CA (inferior) del plásmido pRV300+fragm tripartito

Figura 37: Corroboración del plásmido pRV300+fragm tripartito por análisis de restricción



Mk: Marcador de peso molecular.
1: Plásmido linealizado con ApaI
2: Plásmido linealizado con ApaI y SacI
3: Plásmido sin digerir

Figura 38: Corroboración del plásmido pRV300+fragm tripartito por PCR



Mk: Marcador de peso molecular.

1: producto de PCR usando como templado el plásmido pRV300+fragm tripartito

2: producto de PCR usando como templado el Plásmido p782 que contiene el cassette de kanamicina

VI.3: Estrategia para aumentar la capacidad recombinogénica de *Lactobacillus casei*

Dado que contamos con un método eficiente de electrotransformación, la ausencia de recombinantes obtenidos con las construcciones puede deberse a:

- la letalidad o bajo crecimiento de la mutante *dlt* deseada
- la baja recombinación homóloga para su obtención.

De acuerdo con nuestros resultados, la mutante *dlt* sería osmosensible con deficiencias en sus envolturas. Para paliar estas deficiencias se adicionó al medio de selección de los transformantes glicin-betaína (un osmoprotector) y $MgCl_2$, importante efector en el mantenimiento de las envolturas.

Por otro lado, existe la sospecha en la bibliografía consultada que los lactobacilos tienen una baja capacidad de inducir la recombinación homóloga. A fin de aumentarla se pensó efectuar las electroporaciones en presencia de un plásmido centinela tratado o no con radiación UV.

El daño generado por UV en el material genético acompañante provocaría la inducción de la respuesta SOS que involucra la activación de RecA (proteína que actúa en fenómenos de

recombinación genética) presente en el genoma de la cepa BL23 (Accession YP_001988726) De esta manera se favorecería el evento de recombinación homóloga en la generación de mutantes.

Se empleó el plásmido pNZ273 (Cm^R) como plásmido centinela de la construcción pRV300+*dltA* obtenida en la estrategia 1.

Se realizaron dos co-electroporaciones, irradiando y no irradiando el plásmido con UV y seleccionando en medio MRS+MgCl₂ 20mM+ glicin betaína 1% con distintos antibióticos. En la tabla 11 se muestra el número de UFC obtenido para cada condición.

Tabla 11: Co-electroporaciones con plásmido centinela

Medio de selección	Co-electroporaciones	
	pNZ273+pRV300 <i>dltA</i>	pNZ273 UV+pRV300 <i>dltA</i>
MRS+ MgCl ₂ +Glicin betaína+Cm	180	10
MRS+ MgCl ₂ +Glicin betaína+Erm	37	95

Tabla11: Los números en negrita indican el número de clones obtenidos en cada medio de selección luego de co-electroporar junto a pNZ273 irradiado con UV y no irradiado

Puede verse que en la co-electroporación con el plásmido irradiado se obtuvo una merma en el número de clones obtenidos con la selección para pNZ273 indicando un efectivo daño en el ADN. Mientras que el número de transformantes seleccionados con Erm resultó mayor presumiendo un posible aumento en los eventos de recombinación.

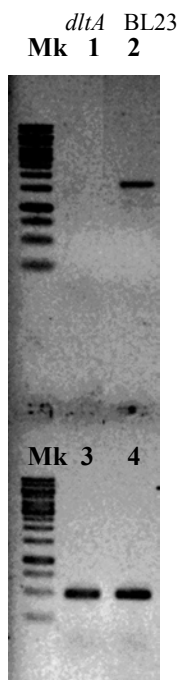
VI.4: Caracterización de una mutante de *Lactobacillus casei* para el gen *dltA*

VI.4.1: Caracterización genotípica

Se analizó el genotipo de varios clones recombinantes por PCR, usando el par de cebadores del inserto completo de *dltA*1500 y un par para amplificar un fragmento interno de 470 pb.

En la figura 39 se muestra el resultado del análisis por PCR de un clon candidato, en el cual se ha amplificado el fragmento interno pero no el fragmento de 1500pb, indicando una posible inserción del plásmido en el locus de *dltA*. Este resultado deberá ser corroborado con un ensayo de Southern Blot.

Figura 39: Análisis por PCR de la mutante *dltA*



Mk: Marcador de peso molecular.

1 y 2: ausencia y presencia de *dltA*1500 en la mutante y salvaje respectivamente

3 y 4: presencia del fragmento interno 470pb en mutante y salvaje respectivamente.

VI.4.2: Caracterización fenotípica

Estudio de osmorresistencia de *dltA*

De acuerdo a los resultados, una mutante para *dlt* mostraría un fenotipo osmosensible debido a modificaciones en su envoltura en particular por la deficiencia de D-alanilar los ácidos teicoicos.

En la figura 40 se muestra la osmotolerancia comparativa entre la cepa salvaje BL23 y la mutante *dltA* para distintas concentraciones de NaCl. En la tabla 12 se resumen los porcentajes de osmorresistencia para ambas cepas, quedando demostrado un claro descenso en la osmorresistencia de la cepa mutante respecto de la salvaje.

Figura 40: Osmorresistencia de *dltA*

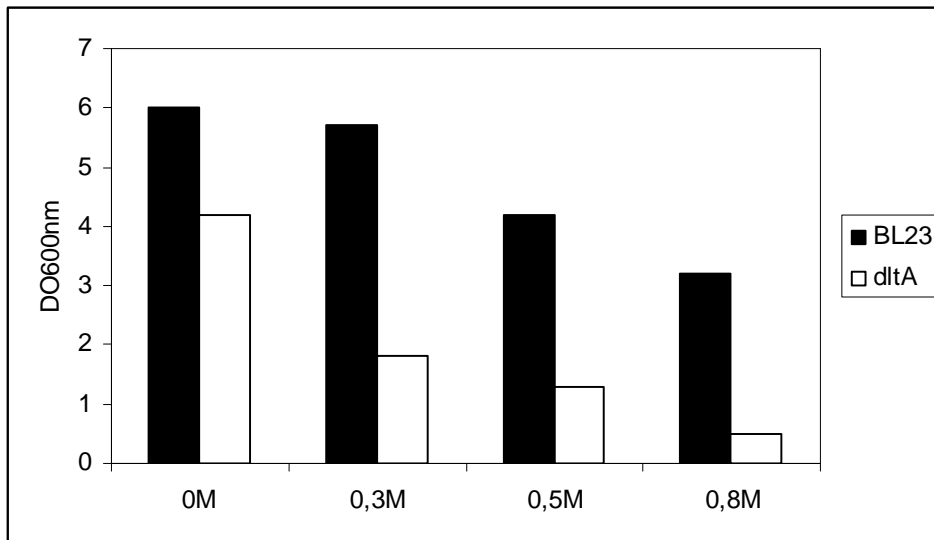


Figura 40: Osmorresistencia comparativa entre la cepa salvaje BL23y mutante *dltA* con concentraciones crecientes de NaCl (0, 0.3, 0.5 y 0.8 M)

Tabla 12: Osmorresistencia comparativa entre BL23 y *dltA*

Concentración NaCl (M)	% de Osmorresistencia	
	BL23	<i>dltA</i>
0.3	95	43
0.5	70	30
0.8	53	12

Tabla 12: Porcentajes de osmorresistencia de la cepa salvaje BL23 y mutante *dltA* a distintas concentraciones de NaCl.

Estudio de la sensibilidad a agentes antibacterianos de *dltA*

Una deficiencia en la D-alanilación de los ácidos teicoicos provocaría una fuerte modificación en las propiedades electroquímicas de estos polímeros. Numerosos estudios han demostrado una correlación entre el contenido de los ésteres de D-Alanina con la capacidad de acción de péptidos catiónicos antimicrobianos, y antibióticos β -lactámicos o glicopéptidos. En la tabla 13 se muestran las CIM para Nisina (péptido catiónico antimicrobiano) y Vancomicina (glicopéptido) correspondientes a la cepa salvaje BL23 y la mutante *dltA*. Puede observarse un aumento de la sensibilidad de la mutante frente a ambos antibióticos.

Tabla 13: Sensibilidad a agentes antibacterianos

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
	BL23	<i>dltA</i>
Nisina	44.26 \pm 3.6	21 \pm 2.3
Vancomicina	1929 \pm 48	883 \pm 36

Tabla 13: Concentraciones Inhibitorias Mínimas de los antibióticos indicados Para la cepa salvaje BL23 y la mutante *dltA*. Todas las CIM fueron tomadas después de 24 horas de incubación a 37°C

Morfología celular

Se han reportado diversas anomalías morfológicas debidas a distintas alteraciones de la envoltura celular. Una mutante de *dltD* de *Lactobacillus rhamnosus* GG mostró un incremento en el largo celular como también una formación del septo celular defectuosa (Perea Vélez *et al*, 2007). Por otra parte, se ha reportado una mutante de *LtaS* de *Bacillus subtilis* que forma largas cadenas y presenta un fenotipo espiralado. (Wörmann *et al*, 2011).

En la fotografía de la figura 41 se muestra una alteración de la morfología celular de la mutante *dltA*, denotando una pérdida de la forma bacilar y la adquisición de un fenotipo espiralado.

Figura 41: Fenotipo de la morfología celular

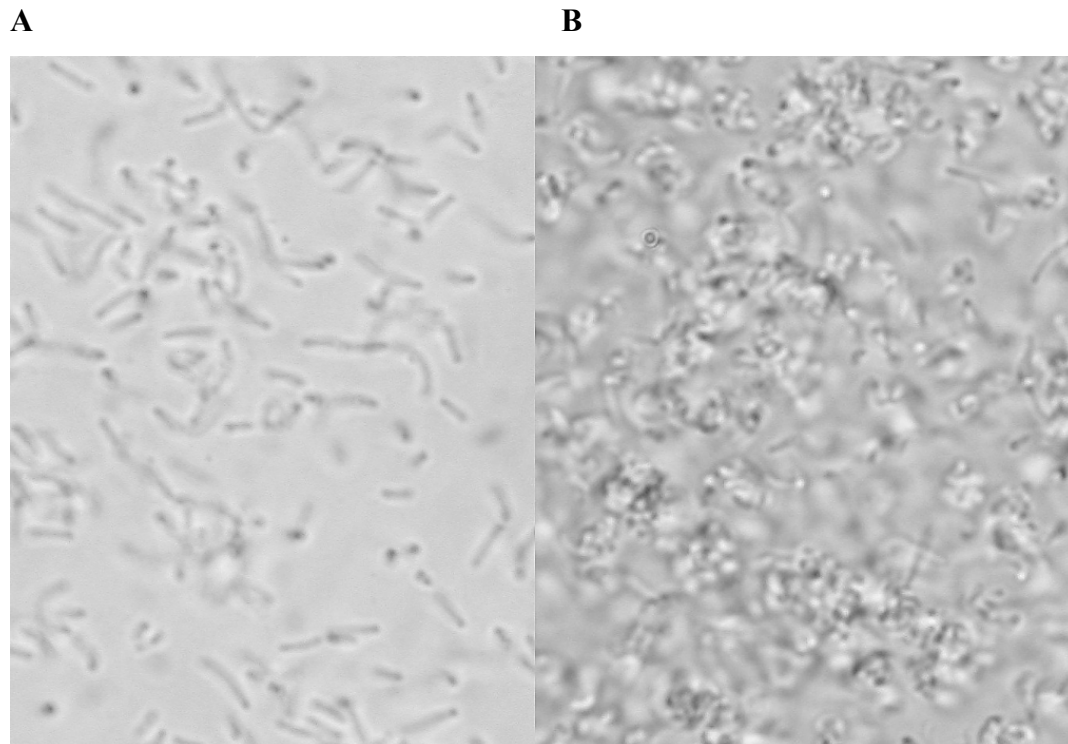


Figura 41: Fotografía de microscopía óptica 100X. En el panel A *Lactobacillus casei* cepa WT en B *Lactobacillus casei dltA*.

Conclusión Capítulo VI

Fue posible la construcción de una mutante *dltA* viable, involucrando que la función no es esencial.

El fenotipo resultante es más sensible frente a agentes antibacterianos y alta concentración salina.

La D-alanilación de los ácidos teicoicos cumpliría un rol importante en el mantenimiento de la forma celular bacilar.

Una de las principales diferencias entre los microorganismos gram negativos y gram positivos es la presencia o ausencia de una membrana externa. En los gram negativos, la membrana externa, de características polianiónica, protegería al organismo del medio ambiente. Además presentan un espacio periplásmico donde se retienen las enzimas extracitoplasmáticas requeridas para el crecimiento y degradación de la pared celular.

Los microorganismos gram positivos están desprovistos de una membrana externa y espacio periplásmico, sin embargo se caracterizan por poseer una gruesa pared de peptidoglicano, estructura que estabiliza la membrana celular y permite el anclaje de los polímeros polianiónicos de pared como son los ácidos teicoicos, los cuales juegan un rol importante en la integridad de la membrana. Estos polímeros cumplen importantes funciones en la permeabilidad celular, son mediadores de interacciones con el extracelular y junto con el peptidoglicano conforman el andamiaje de enzimas requeridas para el crecimiento y degradación de la pared celular.

Peptidoglicano (PG) y Proteínas de unión a Penicilina (PBP)

En el capítulo I de esta tesis se ha continuado con el estudio iniciado en el laboratorio (Piuri *et al* 2003, 2005) de un componente de las envolturas celulares, la pared celular, en particular el peptidoglicano (PG), centrándonos en las modificaciones que éste sufre por el crecimiento en alta sal.

La observación de una sensibilidad diferencial frente a una hidrolasa de pared como es la mutanolisina tanto en células enteras como en paredes purificadas provenientes de ambas condiciones de crecimiento, nos condujo a pensar que esta diferencia podía deberse a modificaciones en la estructura del peptidoglicano. Para ello se realizó un estudio a nivel estructural del peptidoglicano empleando una Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) para analizar de modo cualitativo diferencias en la composición de muropéptidos obtenidos de paredes de la condición N y C de crecimiento. Los perfiles cromatográficos revelaron una mayor abundancia de muropéptidos de naturaleza monomérica y un menor contenido de muropéptidos diméricos, triméricos y oligoméricos en el producto de la digestión enzimática del peptidoglicano de células crecidas en alta sal. Este perfil muropéptídico luego de la hidrólisis con mutanolizina, obtenido por HPLC coincide con el análisis de muropéptidos realizado por Piuri 2005, empleando la técnica FACE, fluorescent-assisted carbohydrate electrophoresis (Jackson 1994; Young 1996) que se basa en la misma

hidrólisis con mutanolisina seguida de una corrida en PAGE donde las distintas especies muuropeptídicas previamente marcadas con un fluoróforo ANTS, que les confiere carga neta negativa migran de acuerdo a su tamaño. Cabe aclarar que la interpretación de los resultados de los perfiles de HPLC realizado en esta tesis y que fuera cotejado con los resultados publicados de Billot-Klein 1997, tanto como el análisis por FACE constituyen dos métodos cualitativos para el estudio de muropéptidos. Ambos estudios se complementan y los perfiles obtenidos con cada uno de ellos avalan un peptidoglicano con un menor grado de entrecruzamiento o crosslinking. Sin embargo sería pertinente realizar un estudio más exhaustivo de las especies de muropéptidos obtenidas en ambas condiciones, empleando espectrometría de masa para aseverar con mayor confianza dicha conclusión.

La polimerización y el entrecruzamiento del peptidoglicano están mediados por las proteínas PBP (Penicillin Binding Proteins) que se encuentran unidas a membrana. Dado que hemos encontrado diferencias en el grado de entrecruzamiento en el peptidoglicano proveniente de la condición N, quisimos analizar si esta diferencia se correlacionaba con una alteración en el perfil de PBP de *Lactobacillus casei*.

En caso de existir una menor expresión de PBP de alto peso molecular, caracterizadas por poseer actividad bifuncional con un dominio de glicosiltransferasa y otro de transpeptidasa, esta traería como consecuencia una disminución en el entrecruzamiento del peptidoglicano. Por otro lado, una sobre-expresión de PBP de bajo peso molecular con función D,D-carboxipeptidasa y D,D endopeptidasa también causaría una disminución del entrecruzamiento.

El perfil de detección con Bocillin de PBP de la condición N comparado con el control, revela una deficiencia en la PBP 2a y sí una mayor abundancia de las PBP de bajo peso molecular. Esto no necesariamente se deba a un aumento en el número de moléculas, puede ser un aumento en la afinidad por el sustrato como ha sido descrito para la proteasa PrtP de *L. casei* (Piuri *et al* 2003). El estudio de las PBP en este microorganismo es continuación del iniciado por Piuri *et al*, 2005, y los resultados obtenidos se correlacionan con aquellos observados en otras especies. En *Bacillus subtilis* hemos observado que para la adaptación a la hiperosmolaridad eran necesarias modificaciones de la pared celular que requerían de la actividad hidrolasa de una Penicillin Binding Protein de bajo peso molecular, la proteína PBP 4*. Esta proteína, codificada por el gen *pbpE*, sería necesaria para aumentar el recambio (turn-over) de la pared con la finalidad de remodelarla hacia una estructura osmocompatible.

La endopeptidasa PBP 4* se encuentra notablemente aumentada a nivel transcripcional y traduccional en alta sal y una mutante en el gen *pbpE* la torna osmosensible. (Palomino *et al*, 2009). En *Enterococcus faecalis* se ha visto un aumento de la expresión de las PBP 1 y 4 en presencia de NaCl. Esta expresión diferencial fue asociada con cambios cuantitativos y cualitativos en el perfil de muropéptidos analizados por HPLC/MS, donde se ha podido detectar un aumento de especies monoméricas y entre ellas una disminución relativa de aquellos monómeros sustituidos con alanina, dando cuenta del aumento de la actividad carboxipeptidasa de la PBP4. (Mainardi *et al*, 1998).

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que durante el proceso de osmoadaptación en *Lactobacillus casei* se llevarían a cabo modificaciones en el peptidoglicano probablemente relacionados con la expresión o afinidad diferencial de sus PBP.

Ácidos Teicoicos (WTA y LTA)

Íntimamente asociados a la pared celular y siendo componentes abundantes de ésta, pues constituyen entre el 35-50% de su peso seco se encuentran los ácidos teicoicos: WTA asociados covalentemente al PG y LTA unidos a membrana por un ancla glicolipídica. Ambos polímeros conforman largas cadenas cargadas negativamente de poli-glicerolfosfato siendo el principal sustituyente el éster de D-Alanina. Estos polímeros conforman la estructura más externa de la envoltura bacteriana y son los primeros en sensar los cambios ambientales.

Estos polímeros fueron extraídos a partir de paredes purificadas de células crecidas en ambas condiciones. El menor rendimiento de paredes obtenidas de la condición N en relación a su control C indicaría un menor contenido tanto del PG como de estos polímeros en condición de alta osmolaridad. Por otro lado cuando se analizó el contenido de WTA y LTA, se observa una disminución cercana del 50 % del contenido de estos polímeros en células crecidas en alta sal (Tabla 4).

El contenido de D-alanil ésteres en los WTA y LTA es altamente variable. El grado de D-alanilación (calculado como la relación de D-Ala:P) en los LTA puede variar de ser no detectable a 0.88 (Fisher *et al.*, 1982,1988, 1990) . Los WTA tienen generalmente una menor relación que los LTA. Por ejemplo la relación de D-alanilación (WTA/LTA) en

Staphylococcus aureus, es 0.75 (MacArthur *et al*, 1984). En *S. aureus* una bacteria de alta tolerancia salina, se ha visto que el grado de D-alanilación de los ácidos teicoicos varía dependiendo de factores ambientales. Se ha demostrado que un incremento en el pH (MacArthur *et al.*, 1984), en la temperatura (Hurst *et al*, 1975) y en la concentración de NaCl provocaba una disminución en el grado de D-alanilación de los teicoicos. Por ejemplo el grado de D-alanilación de los LTA de este microorganismo es de 0.77 mol D-Alanina/mol glicerolfosfato cuando es crecido en baja concentración salina (0.2% NaCl) y decrece a 0.3 mol D-Alanina/mol glicerolfosfato en un medio con alta concentración de sal (7.5 % NaCl) (Koch *et al*, 1985). El efecto de NaCl sobre la D-alanilación es reversible lo que indica que las bacterias pueden responder a los cambios en el medio ambiente regulando la cantidad de ésteres de D-Ala en los ácidos teicoicos. (Koprivnjak *et al*, 2006).

En *B. subtilis* se han detectado variaciones de la relación entre 0.2 y 0.5 según el medio de cultivo utilizado (Perego *et al*, 1995). En este trabajo de tesis, hemos registrado en *Lactobacillus casei* BL23 crecido en condiciones normales, un menor grado de D-alanilación de los WTA frente a los LTA (D-ala/P WTA=0.132; D-ala/P LTA=0.43), siendo la relación de 0.31. En cultivos expuestos a un crecimiento en alta osmolaridad, el grado de D-alanilación de los LTA medido tanto en relación a fósforo como glicerolfosfato se ha visto disminuido (En condición C: D-Ala/P=0.43 D-Ala/GliP=0.34 ; en condición N: D-Ala/P=0.22 D-Ala/GliP=0.19).

Es importante comparar estos resultados con la observación de la micrografía electrónica de la pared celular de esta misma cepa (*Lactobacillus casei* BL23) crecida en condición control y en alta sal. [figura 42, extraída de Piuri *et al*, 2005]. En esa fotografía se observa una construcción diferencial de ambas envolturas: mientras que en la condición C se visualizan tres capas, en N solo se observan dos. En N la envoltura aparece de forma irregular con la capa de peptidoglicano aparentemente desprendida de la membrana plasmática lo que puede ser atribuido a un efecto de plasmólisis. Por otro lado es evidente la diferencia en la densidad de la capa de peptidoglicano entre ambas condiciones, resultando más compacta en la condición C. La mayor sensibilidad a lisis de la pared en N no permite deducir si además de una diferencia en el entrecruzamiento del PG, este forma una capa de menor grosor. En cuanto a la capa III observada en el cultivo control, esta se atribuye a la presencia de los polímeros asociados al PG (WTA y LTA) y es notable su ausencia en la condición N. Estas

observaciones concuerdan con las obtenidas en la presente Tesis. El ancla glicolípida de los LTA contribuiría al anclaje de la pared a la membrana efecto que se pierde como se observa en la figura 42 en la condición N como consecuencia de la disminución en LTA.

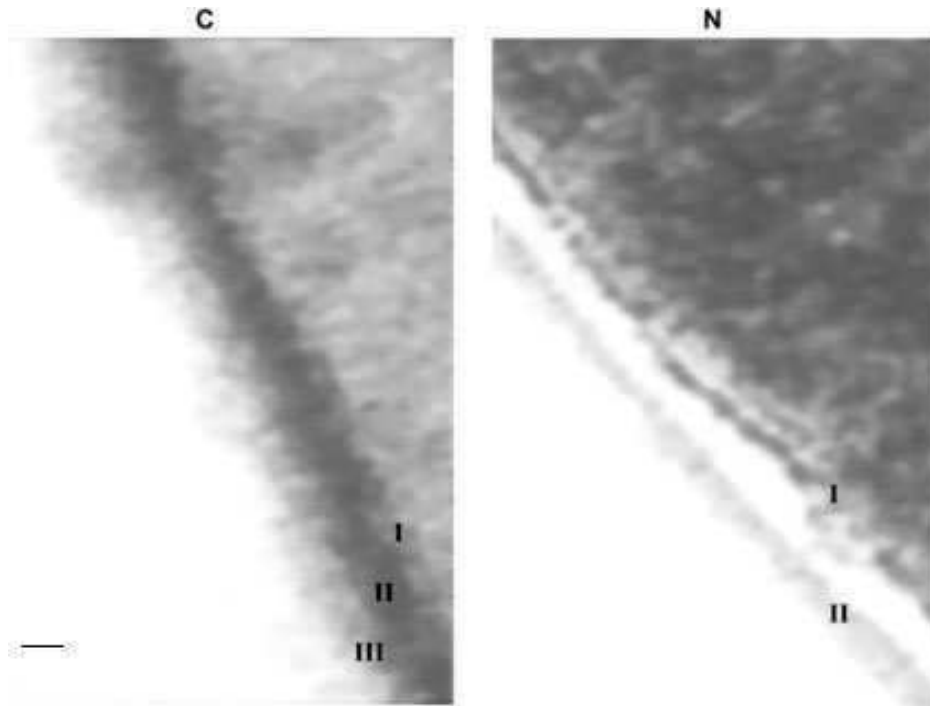


Figura 42: Micrografía Electrónica de transmisión de pared celular de células crecidas en condición control(C) y alta sal (N). Con números se indican las distintas capas, I: membrana plasmática, II: peptidoglicano y III: polímeros asociados al peptidoglicano.

Análisis transcripcional: Gen *yfnI* (LTA) y Operon *dltABCD*

Dada la disminución en el contenido de los LTA en la condición de alta sal se eligió el gen *yfnI*, por su alta homología con el gene *ltsA* de *S. aureus*, codificando para la sintetasa de LTAs, para realizar ensayos de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados muestran una reducción de la actividad transcripcional de *yfnI* en condición de alta sal lo que explicaría el menor contenido de LTA en esta condición.

El operón *dltABCD*, es el responsable de la D-alanilación de los ácidos teicoicos. La D-alanilación de los ácidos teicoicos podría estar modulada mediante la regulación de la abundancia o actividad de las proteínas codificadas por el operón *dlt*. Estudios *in vitro* han

demostrado una regulación de la actividad de la proteína Dcp (*dltC*), por NaCl, en donde a altas concentraciones de sal se vio inhibida la reacción de transacilación de la D-Alanina activada del complejo D-alanil-Dcp al grupo R-OH de los LTA y la hidrólisis de D-alanil-Dcp. Alternativamente, en la reacción reversa, la adición de NaCl inhibió la formación del complejo D-alanil-Dcp a partir de los LTA. (Kiriukhin y Neuhaus 2001).

La importancia de los ésteres de D-Alanina en las especies de *Lactobacillus* y en otros géneros gram positivos con bajo contenido G+C queda evidenciado por la presencia de este operón altamente conservado. De los ensayos de RT-PCR semicuantitativa se deduce que los genes *dltA* y *dltC* del operón se encuentran reprimidos en condición de alta osmolaridad, lo que estaría avalado por el bajo nivel de D-alanilación de los LTA.

Aunque se han caracterizado los operones *dlt* de numerosos microorganismos gram positivos, poco se sabe acerca de la regulación de su expresión.

En *Bacillus subtilis* existen siete factores sigma (σ^M σ^W σ^X σ^Y σ^Z σ^V σ^{Ylac}) que controlan colectivamente un gran número de funciones relacionadas con la homeostasis de la envoltura celular. (Helmann 2002) y se denominan factores σ extracitoplasmáticos. Particularmente σ^W es activado frente a antibióticos con blanco de acción en la pared, frente a shock alcalino y otros estreses que afectan la envoltura celular (Cao *et al*, 2002; Pietiäinen *et al*, 2005). σ^X controla varios genes involucrados en las modificaciones de la pared celular en lo que a variaciones de cargas respecta incluyendo el operón *dlt* (D-alanilación de ácidos teicoicos) y operón *pssA* (síntesis de fofolípidos) (Cao *et al* 2004, Huang y Helmann 1998). Por su parte, σ^M se induce por un gran número de estreses incluyendo el estrés osmótico, térmico, ácido, oxidativo y por agentes antimicrobianos. Los genes regulados por σ^M son importantes para la biosíntesis (*yfnI*) y modificación de la pared (operón *dlt*), determinación de la forma y división celular, sugiriendo que σ^M es un regulador importante en el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular bajo condiciones de estrés (Eiamphungporn y Helmann 2008). Tanto *yfnI* como el operón *dlt* son parte del regulon σ^{MWX} (Luo *et al*, 2010) controlados a su vez por los reguladores globales de la transcripción SpoOA y AbrB.

En *Streptococcus agalactiae* existe un sistema de dos componentes *dltRS*, que forma parte del operón *dlt* y que regula la expresión del mismo (Poyart *et al*, 2001).

En *S. aureus* se ha visto una represión del operón *dlt* con un aumento de la concentración de cationes mono y bivalentes. Su regulación transcripcional depende de un elemento regulatorio

en *cis* que mapea entre 325 y 171 pb río arriba del primer codón de *dltA* y que es parcialmente controlado por el sistema de dos componentes ArlSR. (Koprivnjak *et al*, 2006).

Actualmente he iniciado el estudio de la regulación del operón *dlt* de *Lactobacillus casei*. Ensayos preliminares de retraso en gel (Gel Shift-EMSA) empleando como sonda una región hipotética regulatoria río arriba del operón demostraron un bandeo diferencial entre la condición normal y condición de alta sal de crecimiento que podría sugerir la disociación de algún activador durante la condición de estrés. Proseguiremos con este estudio realizando ensayos de pesca de reguladores para revelar la identidad de estos hipotéticos reguladores.

La presencia de los ésteres de D-Alanina en los ácidos teicoicos contribuye fuertemente a la funcionalidad de los mismos debido a que los grupos aminos positivos de este aminoácido contrarrestan las cargas negativas de los grupos fosfatos de la cadena de poliglicerolfosfatos. Por un lado hemos observado una disminución del contenido de ácidos teicoicos de pared (WTA y LTA) cuando las células son sometidas a estrés osmótico. A su vez, el grado de D-alanilación de los LTA es también menor. Sin embargo nos encontramos con una discordancia en cuanto al grado de D-alanilación de los WTA, los que aparentemente estarían mayormente D-alanilados en la condición de alta sal. Teniendo en cuenta que los D-alanil LTA son precursores de los D-alanil ésteres de WTA, lo cual es consistente con la presencia de un único operón que codifica la maquinaria para la incorporación de la D-Alanina, y visto que dicho operón se encuentra parcialmente reprimido en alta sal, la mayor D-alanilación de los WTA en esta condición es consecuencia de una transferencia de grupos desde los LTA a los WTA. La diferencia en la sustitución de los polímeros puede relacionarse con una función de los mismos para eliminar el ión sodio en exceso manteniendo una carga negativa neta para ese fin más cercana a la membrana celular (LTA) que hacia el extracelular (WTA). El balance de sustitución generaría un gradiente de cargas que favorecería la eliminación de cationes tóxicos como el sodio. Esta hipótesis esta en acuerdo con los resultados observados en el capítulo IV donde se muestra la capacidad de pegado de cationes bivalentes a células enteras o paredes purificadas. Es necesario para confirmar esta hipótesis, establecer si la sustitución de cargas con iones sodio ocurre en los LTAs mediante ensayos de absorción atómica.

La otra posibilidad es que la bacteria requiera mantener un nivel de WTA-D-alanilado adecuado para asegurar la integridad de su envoltura y la viabilidad y que lo podría conseguir aumentando el flujo de D-Ala desde los LTA hacia WTA. En esta perspectiva será necesario

analizar la estructura y viabilidad de las mutantes de *dltA* así como el contenido y grado de D-alanilación de los WTA y LTA para obtener una respuesta.

Las variaciones de D-alanilación de los ácidos teicoicos, como en otras bacterias gram positivas, contribuyen a la supervivencia de esta bacteria frente al estrés osmótico. Sería relevante analizar si este mismo tipo de respuesta ocurre frente variaciones de pH, temperatura, acidez a fin de determinar qué constituye un estrés para esta bacteria cuyo hábitat es el intestino.

Propiedades de superficie y formación de biofilms

Como pudimos observar, los ácidos teicoicos definen las propiedades electroquímicas de la superficie celular y se postula que contribuyen a la homeostasis de cationes, al tráfico de iones, nutrientes, proteínas y antibióticos y que modulan la actividad de autolisinas.

En *Lactobacillus casei* hemos visto una sensibilidad diferencial frente a dos antimicrobianos: Nisina y Vancomicina (Figuras 24 y 25). La mayor sensibilidad en la condición de alta sal puede explicarse debido a una mayor accesibilidad de estos péptidos a la superficie bacteriana. Si asumimos que en la condición N el peptidoglicano tiene un menor contenido de ácidos teicoicos y a su vez los LTA presentan un menor grado de D-alanilación, (lo que significa que estos polímeros se encuentran con mayor carga negativa) podemos pensar en una mayor eficiencia de entrada de péptidos catiónicos, como lo es la nisina lo que se refleja en un aumento en su sensibilidad (Figura 24).

Vistos los cambios que sufren los ácidos teicoicos de pared, tanto en su contenido como en el grado de sustitución en D-Alanina cuando las células son sometidas a estrés osmótico, quisimos ver si estas modificaciones en las propiedades físicoquímicas de la superficie bacteriana tenían impacto en la adherencia de las células y formación de biofilm sobre superficies inertes.

En *Lactobacillus casei* se pudo observar que la formación de biofilm además de ser dependiente del medio de cultivo, resultando más favorables los medios TSB y TSBm, es estimulada en cultivos en alta sal (Figuras 26 y 27). La limitación de nutrientes y especialmente la baja disponibilidad de la principal fuente de carbono fermentable como en el caso de los medios TSB y TSBm suplementados con solo 0.2% de glucosa estimuló la formación de biofilm, consecuencia probable de un decrecimiento en la producción de ácido.

La mayor formación de biofilm obtenida en alta sal podría deberse a efectos indirectos provocados por la alteración que sufren los ácidos teicoicos y su influencia en el correcto ensamblado y actividad de proteínas de envolturas. En *Bacillus subtilis* la ausencia de la D-alanilación en los ácidos teicoicos provoca una alteración en el plegado de exoproteínas (Hyyrylainen *et al*, 2000), lo que conduciría a una modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular. Una mutante en el operón *dlt* de *Lactobacillus rhamnosus* GG mostró mayor formación de biofilm en superficie de polistireno especialmente en el medio TSBm y MRS sin glucosa, (Lebber *et al*, 2007), contrariamente a lo observado para la misma mutación en *Staphylococcus aureus* (Gross *et al*, 2001) y *Enterococcus faecalis* (Fabretti *et al*, 2006). Nuestros resultados indicarían que el aumento en la D-alanilación de los WTA hacia la superficie en la condición N, otorga las cargas positivas requeridas para favorecer la interacción electrostática con la superficie artificial. Queda por establecer el comportamiento de la mutante *dltA* en la formación de biofilm.

Podemos concluir a partir de nuestro análisis comparativo que la intrínseca capacidad de formación de biofilm en *Lactobacillus casei* es fuertemente dependiente del medio de cultivo y de factores ambientales como puede ser el estrés osmótico. Ya que el tracto gastrointestinal es el órgano blanco de las cepas probióticas, sería de gran importancia estudiar cómo afectan otros factores relacionados a este nicho como son el pH, sales biliares y mucinas a la formación de biofilm.

Propiedad superficial e intercambio iónico

Poco después del descubrimiento de los ácidos teicoicos, se ha sugerido que una de sus funciones claves era la unión de iones mono y bivalentes (Archibald *et al*, 1961; Heptinstall *et al*, 1970). Estos polímeros participan en el intercambio de iones entre la pared celular de bacterias gram positivas y el medio externo, manteniendo una alta concentración de iones bivalentes, particularmente Mg^{++} en la región de la membrana celular.

En los remotos trabajos de Heptinstall (1970), se ha demostrado que tanto el contenido como la arquitectura (grado de D-alanilación) de los mismos pueden afectar la cantidad de Mg^{++} unido a las paredes. Dadas las modificaciones observadas en los ácidos teicoicos de *Lactobacillus casei* en condición de alta sal asumimos que tales alteraciones provocarían un cambio en la capacidad de pegado o “binding” de cationes bivalentes. En paredes purificadas

observamos una mayor capacidad de binding de Cu^{++} en aquellas provenientes de la condición N, lo cual se condice con un menor número de ésteres de D-Alanina presentes en los ácidos teicoicos. Aunque células crecidas en alta sal contengan una menor cantidad de ácidos teicoicos que aquellas crecidas en condición control, la menor D-alanilación en N sea quizás, el factor más influyente en la captación del catión bivalente. Asimismo, la remoción de los ésteres de D-Alanina en las paredes purificadas trajo como consecuencia un aumento de la capacidad de binding de Cu^{++} demostrando que la variación de los mismos en los ácidos teicoicos afecta notablemente la capacidad de binding de cationes bivalentes de las envolturas bacterianas.

Por otro lado, también el PG tendría sitios de unión, como ser los grupos carboxilos de las D-Alaninas terminales de un peptidoglicano no entrecruzado (Doyle 1989). El menor grado de entrecruzamiento del peptidoglicano en las células crecidas en condición de alta sal estaría también contribuyendo al aumento en la capacidad de pegado de cationes.

Aplicaciones

Desde un punto de vista aplicado, los cultivos de *Lactobacillus* en alta sal podrían utilizarse para optimizar las extracciones de ADN y proteínas visto su mayor sensibilidad a lisis. En la industria alimenticia se podrían mejorar cepas starters, en particular en la fabricación de quesos (y chacinados), donde la sal es un elemento importante tanto de su maduración como de su conservación. Vistos los resultados de una lisis aumentada en alta sal, se podrían obtener cepas starters preadaptadas a esta condición para aumentar la sensibilidad a la lisis y la pronta liberación de enzimas hidrolíticas lo que reduciría los tiempos de elaboración y maduración de quesos.

La limitada transformabilidad de las especies de *Lactobacillus* se debe fundamentalmente a las características inherentes de su pared celular. La presencia de una gruesa capa de mureina las hace altamente resistentes a métodos de disrupción mecánica a hidrolasas de pared, como lisozima y mutanolisina (Piuri *et al*, 2005).

La mayoría de las publicaciones sobre mejoramiento de electrotransformabilidad de estos microorganismos han tenido como objetivo el debilitamiento de su pared ya sea

cultivándolos con lisozima, glicina o penicilina (Aukrust *et al*, 1995; Aymerich *et al*, 1993, Chassy y Flickinger 1987, Mason *et al*, 2005, Wei *et al*, 1995).

Teniendo en cuenta nuestros resultados sobre “fragilización” de la pared celular por estrés hiperosmótico, pusimos a punto un nuevo método para la electroporación aplicable a varias especies de *Lactobacillus*. Con este nuevo método se obtuvieron mejores eficiencias de transformación respecto de otros previamente descritos (Chassy y Flickinger 1987; Serror *et al*, 2002, Alegre *et al*, 2004), aplicable a varias especies del género *Lactobacillus* (*L. delbrueckii subesp. lactis*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* y dos cepas de *L. paracasei*).

Algunas especies del género *Lactobacillus*, como *L. acidophilus*, poseen una capa de la proteína S (S-layer), un componente adicional de la envoltura que la hace aún más refractaria a la permeabilidad de material genético. Sin embargo, la cepa ATCC 4356 crecida en condiciones de alta osmolaridad compatibles con su crecimiento, fue exitosamente transformada. El crecimiento en alta concentración de NaCl (0.7-0.9M) constituye un efector de estrés general y aplicable a un gran número de especies de *Lactobacillus*. Sin embargo la concentración de sal empleada para cada especie debe ser optimizada de modo tal que permita un crecimiento suficiente (una alta densidad celular) y un debilitamiento de la pared celular necesarios para lograr el éxito de la electrotransformabilidad. Así, mientras *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* fueron crecidos en 0.9M de NaCl, las cepas de *L. paracasei* resultaron más osmosensibles y fueron crecidas a 0.7M, condición en que se obtiene una eficiente fragilización de la pared, demostrada en las eficiencias de transformación de la tabla 10.

Además, se han ensayado especies que contienen o no plásmidos endógenos para investigar su posible efecto refractario a la instalación de otro plásmido y reducir la eficiencia de transformación, ya sea por incompatibilidad en sus mecanismos de replicación o por generación de rearreglos. Para estudiar esto se siguieron dos abordajes: para el primero se eligió una cepa de *L. plantarum* que contiene plásmidos nativos y para el segundo una cepa de *L. paracasei* secuencialmente transformada con plásmidos de diferentes sistemas de replicación (theta y círculo rodante) y diferentes marcadores de selección. Las eficiencias de transformación obtenidas para *L. plantarum* resultaron del orden de 10^5 transformantes/ μ g ADN, mayores a las reportadas en trabajos anteriores (Thompson y Collins 1996, Alegre *et al.*, 2004), indicando entonces que la presencia de plásmidos nativos no interfiere negativamente. En el segundo abordaje, una cepa de *L. paracasei* que había sido transformada

con pNZ273 fue retransformada con pRV613, obteniendo una eficiencia de $4.2 \pm 0.2 \cdot 10^6$ similar a la obtenida para el pNZ273 solo, corroborando la coexistencia de ambos plásmidos por análisis de restricción. Se pudo verificar que la presencia de plásmidos endógenos ya sea introducido o nativo no reduce la eficiencia de la transformación.

Una ventaja del método radica en que las células electrocompetentes pueden ser usadas inmediatamente a su preparación o bien almacenadas a -70°C para un posterior uso sin que se produzca una reducción significativa de la electrotransformabilidad. Esto podría deberse a la acumulación de solutos osmocompatibles como glicin betaína y péptidos durante el crecimiento en alta sal (Piuri *et al*, 2003), que podrían actuar como crioprotectores naturales durante la conservación a baja temperatura.

La optimización del método de electroporación para *Lactobacillus* constituye el primer paso que nos permitirá avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias para lograr la manipulación genética de bacterias lácticas y avanzar en el desarrollo de nuevas estrategias para el uso de estos microorganismos como vectores de vacunas.

Mutante *dltA*

Fue posible la construcción de una mutante de *Lactobacillus casei* en el gen *dltA* viable, involucrando que la función no es esencial. Se ha iniciado la caracterización de la mutante *dltA*. Esta mutante ha demostrado tener un fenotipo osmosensible respecto de su cepa salvaje, una total deficiencia de los ésteres de D-Alanina en los polímeros de pared sería incompatible con un proceso osmoadaptativo. Los resultados obtenidos en esta tesis indicarían la necesidad de modular el nivel de D-alanilación en los ácidos teicoicos para hacer frente al estrés salino.

Por otro lado, se ha observado un aumento en la sensibilidad de la mutante frente a péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica. Este incremento en la sensibilidad a estos componentes catiónicos estaría asociado con el aumento en la carga neta polianiónica en la envoltura de la células *dlt*.

Una mutante de *dltA* de *S. aureus* ha mostrado una mayor capacidad de unión para el glicopéptido vancomicina y un fenotipo más sensible (Peschel *et al*, 2000). Esto da cuenta de que alteraciones en la superficie bacteriana y particularmente las diferencias de cargas dadas por el nivel de D-alanilación en los ácidos teicoicos pueden influir en la susceptibilidad frente

a agentes bacterianos. Este mismo resultado de sensibilidad aumentada a nisina y vancomicina lo presenta la mutante construida en esta Tesis.

Además de modular la carga superficial, la D-alanilación de los ácidos teicoicos cumpliría un rol importante en el mantenimiento de la forma celular, en *Lactobacillus casei* la deficiencia de los ésteres de D-Alanina provoca un fenotipo aberrante con la pérdida de la forma bacilar.

La construcción de cepas probióticas mutantes en la D-alanilación de los ácidos teicoicos constituye un desafío a la hora de estudiar los efectos inmunomoduladores.

La capacidad de las bacterias probióticas para estimular o regular el sistema inmune a nivel de mucosas ha sido ampliamente estudiado (Baken *et al*, 2006; Grangette *et al*, 2005; O'Hara *et al*, 2006). Es sabido que la calidad y el grado de D-alanilación en los ácidos teicoicos son un factor importante en la inducción de citoquinas. Se ha visto un incremento de la capacidad antiinflamatoria de una mutante *dlt* de una cepa probiótica de *L. plantarum* (Grangette *et al*, 2005), las cepas capaces de inducir esta respuesta inmunológica serían buenos candidatos en el uso terapéutico contra las enfermedades inflamatorias intestinales.

Como síntesis final, esta tesis se ha enfocado al estudio de las modificaciones de la envoltura externa de *Lactobacillus casei* BL23 (pared y polímeros asociados) frente al estrés osmótico y sus consecuencias para permitir la adaptación de esta bacteria a crecer en esta condición. Es probable que varias de las modificaciones, como ser la mayor expresión o afinidad de PBP de bajo peso molecular con actividad de endopeptidasa y/o carboxipeptidasa fueran necesarias tanto para proveer aminoácidos y péptidos, reconocidos osmoprotectores (Piuri *et al*, 2003), así como para el remodelado del propio PG. La existencia de un sistema de reciclado del PG ya ha sido sugerida por Popham y Setlow, (1993). En cuanto a la variación en el nivel de D-alanilación se podría pensar que frente a un aumento en la concentración de cationes de Na^+ en el exterior, serían estos cationes los que proveerían los contraiones necesarios en los ácidos teicoicos disminuyendo la D-alanilación en esta condición, de este modo se inactivaría o reprimiría el operón para esta función. De este modo quedaría más Alanina libre en el citoplasma disponible también como molécula osmoprotectora.

En la figura 43 se esquematiza un resumen comparativo de la estructura que adoptarían las envolturas en las condiciones C y N de crecimiento. En base a los resultados obtenidos en esta

tesis, en N se representa un peptidoglicano más delgado y más laxo como consecuencia de un menor grado de entrecruzamiento, lo que se asociaría con un aumento en la expresión o la actividad de las LMW PBP y una disminución de HMW PBP. Asimismo, se reduce el contenido de ácidos teicoicos mostrando a su vez una diferencia en el nivel de D-alanilación entre ellos lo que generaría un gradiente de cargas negativas desde el exterior hacia el interior que favorecería la eliminación de cationes sodio.

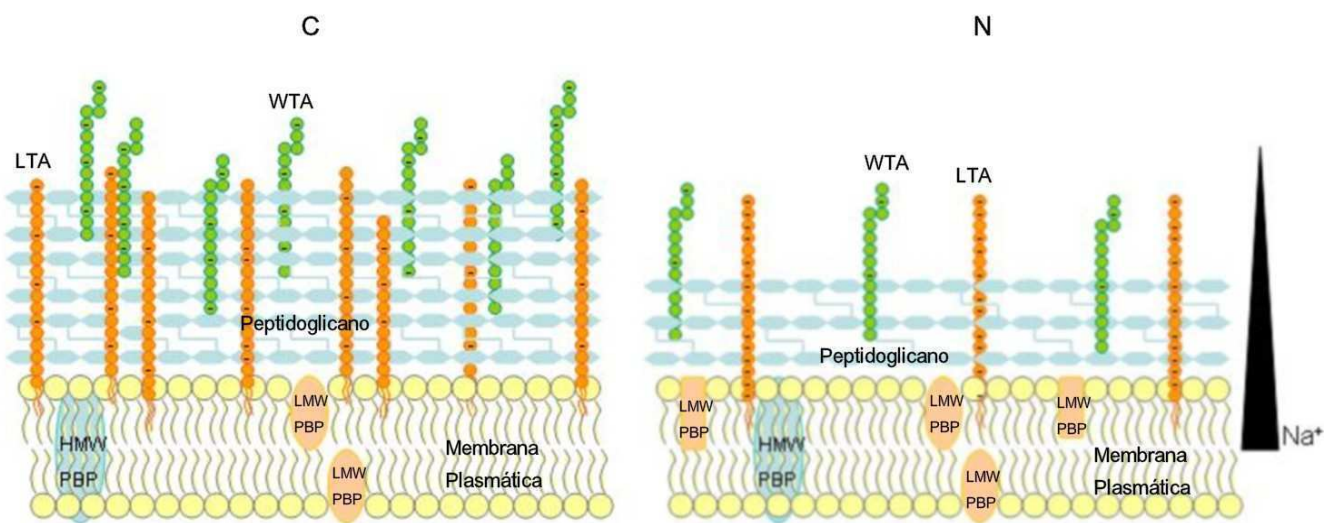


Figura 43: Esquema comparativo de envoltura de *Lactobacillus casei* BL23 en condición C y N de crecimiento. Los signos negativos en los polímeros hacen referencia al nivel de D-alanilación de los mismos. La barra triangular lateral indica el gradiente de eliminación de iones Na⁺

- Acevedo Felix E. y Pérez Martínez G.** (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a Commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 67-75
- Alegre, M.T., Rodríguez, M.C. y Mesas, J.M.** (2004). Transformation of *Lactobacillus plantarum* by electroporation with in vitro modified plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett* **241**: 73-77.
- Allievi, MC, Sabbione F, Prado-Acosta M, Palomino MM, Ruzal S M y Sanchez-Rivas C.** (2011) Metal Biosorption by Surface-layer proteins from *Bacillus* species *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **21**: 147–153
- Archibald, A. R., J. J. Armstrong, J. Baddiley, y J. B. Hay.** 1961. Teichoic acids and the structure of bacterial walls. *Nature* **191**:570–572.
- Archibald, A. R.** (1974) The structure, biosynthesis and function of teichoic acid. *Adv. Microb. Physiol.* **11**:53–95.
- Aukrust T.W., Brurberg M.B. y Nes I.F.** (1995); Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. *Methods Mol Biol.* **47**:201-8.
- Aymerich, M.T., Hugas, M., Garriga, M., Vogel, R.F. y Montfort, J.M.** (1993). Electrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation, *J. Appl. Bacteriol.* **75**:320–325.
- Baddiley, J.** (1972). Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Essays Biochem.* **8**:35–77.
- Baddiley J., Hancock I. C. y Sherwood M. A.** (1973). X-ray photoelectron studies of magnesium ions bound to the cell walls of gram positive bacteria. *Nature* **243**: 43-45.
- Baken, K. A., J. Ezendam, E. R. Gremmer, A. de Klerk, J. L. Pennings, B. Mathee, A. A. Peijnenburg, y H. van Loveren.** (2006) Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* *Shirota*: immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food Microbiol.* **112**:8–18.
- Bera Agnieszka, Raja Biswas, Silvia Herbert, Emir Kulauzovic y Christopher Weidenmaier** (2007). Influence of Wall Teichoic Acid on Lysozyme Resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**, 280–283.
- Billont-Klein D., Legrand R., Shoot B., van Heijenoort J. y Gutman L.** (1997). Peptidoglycan structure of *Lactobacillus casei*, a species highly resistant to glycopeptide antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology.* **179**, 6208-6212.
- Boyd DA, Cvitkovitch DG, Bleiweis AS, Kiriukhin MY, Debabov DV, Neuhaus FC, y Hamilton IR.** (2000) Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus* mutants results in acid sensitivity. *J Bacteriol* **182**: 6055-65

- Brenner, A.J. y E.D. Harris.** (1995). A quantitative test for copper using bicinchoninic acid *Anal Biochem* **226**:80-84 [published erratum appears in *Anal. Biochem.* 1995; 230: 360].
- Calamita, H.G. Ehringer W.D, Koch A.L. y Doyle R. J.** (2001). Evidence that the cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during respiration. *Proc. Nati. Acad Sci.* **98** 15260-15263
- Cao, M., y J. D. Helmann.** (2004) The *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function σ^x factor regulates modification of the cell envelope and resistance to cationic antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* **186**:1136–1146
- Cao, M., P. A. Kobel, M. M. Morshedi, M. F. Wu, C. Paddon, y J. D. Helmann.** (2002) Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J. Mol. Biol.* **316**:443–457.
- Chassy, B.M. y Flickinger, J.L.** (1987). Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:173–177.
- Chen, P. S., Jr., T. Y. Toribara, y H. Warner.** (1956) Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28**:1756-1758.
- Clemens, D. L., P. E. Kolenbrander, D. V. Debabov, Q. Zhang, R. D. Lunsford, H. Sakone, C. J. Whittaker, M. P. Heaton, y F. C. Neuhaus.**(1999). Insertional inactivation of genes responsible for the D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis) affects intrageneric coaggregations. *Infect. Immun.* **67**:2464–2474.
- Collins** (2002) *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanina modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *J. Infect. Dis* Vol **186** 214-219
- Collins M. D., Phillips B. A. y Zanoni P.** (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp nov., subsp *paracasei* and subsp *tolerans* and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* **39**: 105-108.
- Collins M. D., Rodrigues U. M., Ash C., Aguirre M., Farrow J. A. E., Martinez Murcia A., Phillips B. A., Williams A. M. y Wallbanks S.** (1991) Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters.* **77**: 5-12.
- Csonka L.N y A. Hanson** (1991). Procariotic osmorregulation: Genetics and Physiology. *Ann. Rev. Microbiol* **45**: 569-606.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. y Roberfroid, M.** (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition.* **81**: S1- S27.

- Doyle, R. J.** (1989) How cell walls of gram-positive bacteria interact with metal ions. p. 275–293. In T. J. Beveridge and R. J. Doyle (ed.), *Metal ions and bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Eiamphungporn, W., y J. D. Helmann.** (2008). The *Bacillus subtilis* σ^M regulon and its contribution to cell envelope stress responses. *Mol. Microbiol.* **67**:830–848.
- Fabretti F., C. Theilacker, L. Baldassari, Z. Kaczynsky, A. Kropec, O.Holst and J. Huebner** (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**: 4164-4171
- Falconer, S.B.** y Brown, E.D. (2009) New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Curr Opin Microbiol* **12**: 497–504.
- Fedtke, I et al.** (2007) *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity.. *Mol Microbiol.* **65**: 1078-1091.
- Fischer, W.** (1982). D-Alanine ester-containing glycerophosphoglycolipids in the membrane of gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **711**: 372–375.
- Fischer, W.** (1988). Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **29**: 233–302.
- Fischer, W.** (1990). Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids, p.123–234. In M. Kates (ed.) *Handbook of lipid research*, vol VI. Glycolipids, phosphoglycolipids and sulfoglycolipids. Plenum Press, Inc., New York, N.Y.
- Galdeano CM, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bonet ME, Perdigón G.** (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* **14**: 485-92.
- Glaasker E, Tjan FS, Ter Steeg PF, Konings WN, Poolman B.** (1998) Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *J Bacteriol.* **180**: 4718-23
- Ghuysen J. M.,** (1991). Serine β -lactamases and penicillin binding proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 37-67
- Guillot A, Obis D, Mistou MY.**(2000) Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *Int J Food Microbiol.* **55**:47-51.
- Grangette C, Nutten S, Palumbo E, Morath S, Hermann C, Dewulf J, Pot B, Hartung T, Hols P, Mercenier A.** (2005) Enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *PNAS* **102**:10321-6

- Greene J. D. y Klaenhammer T. D.** (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **60**, 4487-4494.
- Gross, M., S. E. Cramton, F. Götz y A. Peschel.** (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infect. Immun.* **69**:3423–3426.
- Gründling, A. y Schneewind, O.** (2007a) Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**: 2521–2530.
- Gründling, A. y Schneewind, O.** (2007b) Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8478–8483.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80
- Helmann, J. D.** 2002. The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv. Microb. Physiol.* **46**:47–110.
- Heptinstall, S., Archibald, A. R. y Baddiley, J.** (1970) Teichoic acid and membrane function in bacteria *Nature* **225**: 519-521.
- Huang, X., y J. D. Helmann.** 1998. Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* X factor using a consensus-directed search. *J. Mol. Biol.* **279**:165–173.
- Hurst, A., A. Hughes, M. Duckworth y J. Baddiley** (1975) Loss of D-alanine during sublethal heating of *Staphylococcus aureus* s6 and magnesium binding during repair. *J. Gen. Microbiol.* **89**:277–284.
- Hyrylainen, H. L., M. Vitikainen, J. Thwaite, H. Wu, M. Sarvas, C. R. Harwood, V. P. Kontinen, y K. Stephenson.** (2000). D-Alanine substitution of teichoic acids as a modulator of protein folding and stability at the cytoplasmic membrane/cell wall interface of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **275**:26696–26703.
- Iain C. Sutcliffe** (2011) Priming and elongation: dissection of the lipoteichoic acid biosynthetic pathway in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol* **79**:553-6.
- Jackson, P.** (1994). High-resolution polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled reducing saccharides. In *Guide to Techniques in Glycobiology. Methods in Enzymology*, vol. 230, ed. Lennarz, W.J. and Hart, G.W. pp. 250–265. San Diego, CA: Academic Press.
- Kandler O.** (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **49**: 209-224.
- Kiriukhin, M. Y., y F. C. Neuhaus.** (2001) D-Alanylation of lipoteichoic acid: role of the D-alanyl carrier protein in acylation. *J. Bacteriol.* **183**:2051–2058

- Koch, H. U., R. Doöker, and W. Fischer.** (1985). Maintenance of D-alanine ester substitution of lipoteichoic acid by reesterification in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **164**:1211–1217.
- Koch, S., Oberson, G., Eugster-Meier, E., Meile, L. and 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* **117**:36-42.
- 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* **188**: 3622-30.
- Lambert PA, Hancock IC, Baddiley J.** (1975) Influence of alanyl ester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acids. *Biochem J.* 1975 **3**:671-6
- Lebeer, S., S. C. De Keersmaecker, T. L. Verhoeven, A. A. Fadda, K. Marchal, and J. Vanderleyden.** 2007. Functional analysis of *luxS* in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals a central metabolic role important for growth and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189**:860–871.
- Leloup L., Dusko Ehrlich S., Zagorec M. & Morel-Deville F.** (1997). Single cross over integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Applied and Environmental Microbiology.* **63**, 2117-2123.
- Lopez, C. S., Heras, H., Ruzal, S.M., Sanchez-Rivas, C. y Rivas, E.A.** (1998) Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium. *Current Microbiology.* **36**, 55-61
- Lopez C., H. Heras, H Garda, S. Ruzal, C. Sanchez-Rivas y E. Rivas.** (2000). Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Inter. of 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.
- Luo Y, Asai K, Sadaie Y, Helmann JD** (2010) Transcriptomic and phenotypic characterization of a *Bacillus subtilis* strain without extracytoplasmic function σ factors. *J. Bacteriol* **192**(21):5736-45
- Machado C, López CS, Heras H. y Rivas EA** (2004) Osmotic response in *Lactobacillus casei* ATCC 393: biochemical and biophysical characteristics of membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **422**: 61–70
- Marteau, P.; Minekus, K.; Havenaar, R.; Hues in't Veld JHJ.** (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci*; **80**:1031-7.
- Mason, C.K., Collins, M.A. y Thompson, K.** (2005). Modified electroporation protocol for *Lactobacilli* isolated from the chicken crop facilitates transformation and the use of a genetic tool. *J Microbiol Methods* **60**:353–363

- Mazé A, Boël G, Zúñiga M, Bourand A, Loux V, Yebra MJ, Monedero V, Correia K, Jacques N, Beauflis S, Poncet S, Joyet P, Milohanic E, Casarégola S, Auffray Y, Pérez-Martínez G, Gibrat JF, Zagorec M, Francke C, Hartke A, Deutscher J.** (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol.* 192(10):2647-8.
- Meers JL, Tempest DW** (1970) The influence of growth-limiting substrate and medium NaCl concentration on the synthesis of magnesium-binding sites in the walls of *Bacillus subtilis* var. niger. *J Gen Microbiol.* 63:325-31
- Min, H., and M. K. Cowman.** (1986). Combined alcian blue and silver staining of glycosaminoglycans in polyacrylamide gels: application to electrophoretic analysis of molecular weight distribution. *Anal. Biochem.* 155:275-285.
- Morath, S., A. Geyer, and T. Hartung.** (2001). Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.* 193:393–397.
- MacArthur, A. E., and A. R. Archibald.** (1984). Effect of culture pH on the D-alanine ester content of lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 160:792–793.
- Mainardi, J.L., Billot-Klein, D., Coutrot, A., Legrand, R., Schoot, B. and Gutmann, L.** (1998) Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology* 144: 2679–2685.
- Nadathur, SR.; Gould, SJ.; Bakalinsky, A.T.** (1995) Antimutagenicity of an acetone extract of yoghurt. *Mutat Res.* 334 :213-24.
- Neuhaus F.C., Heaton M.P., Debabov D.V. y Zhang Q.** (1996) The *dlt* operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microb. Drug. Resist* 2: 77-84.
- 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 Vol* 67(4),686-723.
- Oguri, S., Watanabe, K, Nozu Ai, Kamiya A.** (2007). Screening of D-amino acid oxidase inhibitor by a new multi-assay method. *Food Chemistry* 100: 616-622.
- O'Hara, A. M., P. O'Regan, A. Fanning, C. O'Mahony, J. Macsharry, A. Lyons, J. Bienenstock, L. O'Mahony, y F. Shanahan.** (2006) Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology* 118:202–215
- Palomino M.M., Sanchez-Rivas C. y Ruzal S.M.,** (2009) High Salt Stress in *Bacillus subtilis* involvement of PBP4* as a peptidoglycan hydrolase *Res Microbiol* 160: 117-124.
- Palumbo E, Deghorain M, Cocconcelli PS, Kleerebezem M, Geyer A, Hartung T, Morath S & Hols P** (2006) D-Alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus plantarum* results in a major modification of lipoteichoic acid composition and cell wall perforations at the septum mediated by the Acm2 autolysin. *J Bacteriol* 188: 3709–3715.

- Pelkonen S, Häyrinen J. y Finne J.** (1988). Polyacrylamide Gel Electrophoresis of the capsular polysaccharides of *Escherichia coli* K1 and other bacteria. *J. Bacteriol* 170:2646-2653
- Perdigón, G.; Álvarez, S.; Rachid, M.; Agüero, G.; Gobbato, N.** (1995). Immune system stimulation by probiotics. Symposium: Probiotic Bacteria for Humans: Clinical Systems for Evaluation of Effectiveness. *J Dairy Sci*; **78**:1597-606.
- Perea Velez M, Verhoeven TL, Draing C et al.** (2007) Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microb* **73**: 3595–3604.
- Pietiäinen M, Gardemeister M, Mecklin M, Leskelä S, Sarvas M, Kontinen VP** (2005) Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiology*. **151**:1577-92
- 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**:1569-85
- Piuri M., Sanchez-Rivas C. y S.M. Ruzal.** (2003) Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes. *J Appl Microbiol* **95**, 372-379
- Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal S.M.** (2005) Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei* *Journal of Applied Microbiology* **98**: 84-95
- Perego M, Glaser P, Minutello A, Strauch MA, Leopold K, Fischer W** (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J. Biol.Chem.* **270**: 15598-606.
- Peschel A y Sahl H.G.** (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 529-536
- Peschel, A., M. Otto, R. W. Jack, H. Kalbacher, G. Jung, y F. Götz.** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J. Biol. Chem.* **274**:8405–8410.
- Peschel, A., C. Vuong, M. Otto, y F. Götz.** (2000). The D-alanine residues of *Staphylococcus aureus* teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2845–2847.
- Popham, D.L. y Young, K.D.** (2003) Role of penicillin-binding proteins in bacterial cell morphogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 594–599.
- Popham D. y P. Setlow** , 1993. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of *Bacillus subtilis* *pbpE* operon, which codes for penicillin binding protein 4* and an apparent amino acid racemase. *J Bacteriol* **175**: 2917-2925.

Poolman B, Glaasker E (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol.* **29**(2):397-407

Poolman B., P. Blount, J. H: Folgering, R. H. Friesen, P. C. Moe y T. der Heide, (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol.* **44**(4):889-902

Poyart C, Lamy MC, Boumaila C, Fiedler F, Trieu-Cuot P.(2001) Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J. Bacteriol.* **183**(21):6324-34

Rahman, O., Dover, L.G., and Sutcliffe, I.C. (2009) Lipoteichoic acid biosynthesis: two steps forwards, one step sideways? *Trends Microbiol* **17**: 219–225.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, y T. Maniatis. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanz, Y., Collado, M.C., Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta pediátrica Española.* **61**:476-482.

Salminem, S y Ouwehand, A. (2002) Probiotics, applications in dairy products. In: Roginski, H., Fuquay, J and Fox, P. *Encyclopedia of dairy Science.* Elsevier. Londres. pp 2315-2322.

Sanders M. E. (1993). Effect of consumption of lactic cultures in health. *Adv. Food Nutrition. Research.* **37**: 67-130.

Serror, P., Sasaki, T., Ehrlich, S.D. y Maguin, E. (2002) Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. *Appl Environ Microbiol.* **68**:46-52

Schleifer KH, Kandler O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* **36**: 407-77

Stackebrand E., y Teuber M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochemie.* **70**: 314-324.

Swoboda, J.G., Campbell, J., Meredith, T.C., and Walker, S.(2010) Wall teichoic acid function, biosynthesis and inhibition. *ChemBiochem* **11**: 35–45.

Thompson, K. y Collins, M.A. (1996). Improvement in electroporation efficiency for *Lactobacillus plantarum* by the inclusion of high concentrations of glycine in the growth medium, *J. Microbiol. Methods* **26**:73–79.

Tomita S, Furihata K, Nukada T, Satoh E, Uchimura T y Okada S (2009) Structures of two monomeric units of teichoic acid prepared from the cell wall of *Lactobacillus plantarum* NRIC 1068. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 530–535.

Vanderhoof JA, Young RJ. (1998) Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **27** :323-32

- Wach, A.** (1996). PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**:259–265.
- Webb, A.J., Karatsa-Dodgson, M., y Gründling, A.** (2009) Two-enzyme systems for glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **74**: 299–314.
- Wecke, J., K. Madela, y W. Fischer.** (1997). The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **143**:2953–2960.
- Wei, M.Q., Rush, C.M., Norman, J.M., Hafner, L.M., Epping, R.J. y Timms, P.** (1995). An improved method for the transformation of *Lactobacillus* strains using electroporation. *J. Microbiol. Methods* **21**: 97-109
- Wolters, P. J., K. M. Hildebrandt, J. P. Dickie, y J. S.Anderson.** (1990). Polymer length of teichuronic acid released from cell walls of *Micrococcus luteus*. *J. Bacteriol.* **172**:5154-5159.
- Wörmann, M.E., Corrigan, R.M., Simpson, P.J., Matthews,S.J., y Gründling, A.** (2011) Enzymatic activities and functional interdependencies of *Bacillus subtilis* lipoteichoic acid synthesis enzymes. *Mol Microbiol* **79**:566-83.
- Young, K.D.** (1996) A simple gel electrophoretic method for analyzing the muropeptide composition of bacterial peptidoglycan. *Journal of Bacteriology* **178**: 3962–3966.
- Zhao G., T.I. Meier, S.D. Kahl, K.R. Gee y L.C. Blaszcak.** (1999).BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin binding proteins. *Antimicrobial Agents Chemother.* **43**: 1124-1128.