

Tesis Doctoral

# S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones

Allievi, Mariana Claudia

2012

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Allievi, Mariana Claudia. (2012). S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Allievi, Mariana Claudia. "S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA**

***S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización,  
regulación, análisis funcional y aplicaciones***

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

**MARIANA CLAUDIA ALLIEVI**

**DIRECTOR DE TESIS: CÁRMEN SÁNCHEZ DE RIVAS  
CONSEJERO DE ESTUDIO: JULIA PETTINARI**

**Buenos Aires, 2012**

**ALGUNOS DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS  
FORMAN PARTE DEL SIGUIENTE ARTÍCULO:**

Allievi MC, Sabbione F, PradoAcosta M, Palomino MM, Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.  
(2011) Metal biosorption by Surface-Layer proteins from *Bacillus* species. *Journal of  
Microbiology and Biotechnology*. **21**: 147-153.

## Indice

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
<i>Bacillus sphaericus</i>	12
Envolturas en <i>Bacillus sphaericus</i>	13
Proteínas de Capa S o S-layer	15
Química y Dominios de proteínas S-layer	17
Genética y Biosíntesis	19
Funciones	21
Anclaje de la proteína S-layer a la pared celular	23
<i>Bacillus sphaericus</i> y S-layer	24
Aplicaciones nanobiotecnológicas	25
Actividad Insecticida de <i>Bacillus sphaericus</i>	27
<i>B. sphaericus</i> como bioinsecticida	27
Bioquímica y genética de las toxinas de <i>B. sphaericus</i> .	29
Toxinas del cristal	30
Toxinas Mtx	32
Toxinas Cry48 y Cry49	33
<i>Bacillus</i> y Biorremediación	33
Biorremediación	33
Bacterias y metales	35
S-layer y metales	37
Estrés osmótico	38
Estrés osmótico y S-layer	41
<b>Objetivos</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>45</b>
Cepas Utilizadas	46
Análisis basado en secuencias	46
Medios de cultivo	47
Preparación de esporas	47
Extracción de proteínas S-layer	48
SDS PAGE	48
Western blot	50
Extracción de ADN cromosómico de <i>Bacillus</i> :	51
Preparación de muestras para identificación MALDI-TOF	52
Detección de Glicoproteínas con Timol-Sulfúrico	53
Experimento de Autoagregación	54
Tratamiento con Tunicamicina	55
Ensayos de Osmorresistencia	55
Osmorresistencia y S-layer	55
Expresión de la proteína en estrés osmótico	55
Análisis transcripcional	56
Actividad Insecticida	59
Experimentos de Bioadsorción de Cu <sup>2+</sup>	60
<b>Resultados</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 1:</b>	<b>64</b>
<b>S-LAYER DE <i>Bacillus sphaericus</i> 2362:</b>	<b>64</b>
<b>ANÁLISIS <i>in silico</i> DE SU ESTRUCTURA Y PURIFICACIÓN</b>	<b>64</b>

A) Análisis <i>in silico</i> de la secuencia nucleotídica	66
Promotores	67
Análisis de la secuencia de aminoácidos	68
Perfil estructural de la proteína S-layer	70
B) Obtención de proteínas S-layer	76
C) Modificaciones postraduccionales de la S-layer	78
Tinción con Método Azul Bromo timol sulfúrico	81
Análisis del perfil de agregación de la S-layer	82
Diferenciación de O-glicosilación y N-glicosilación:	
Resistencia a tunicamicina	83
Tinción con PRO Q® Emerald 300	84
<b>Anexo Capítulo I: Análisis Bioinformático</b>	<b>86</b>
Análisis <i>in silico</i>	87
<b>Capítulo 2: EXPRESIÓN DE S-LAYER DE <i>Bacillus sphaericus</i>: ESTRÉS</b>	<b>95</b>
S-layer y desafío de estreses	96
Morfología de células en estrés osmótico	97
Función de la proteína S-layer en el crecimiento de <i>Bacillus sphaericus</i> durante el estrés osmótico	98
Análisis de expresión de las distintas cepas en diferentes condiciones de osmolaridad, en células y secretadas al sobrenadante	101
Análisis de la expresión por Real Time PCR	105
Análisis de las secuencias proteicas mediante MALDI TOF	107
<b>APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS</b>	<b>110</b>
<b>ACTIVIDAD INSECTICIDA</b>	<b>111</b>
Evaluación de toxicidad de las distintas cepas en esporas frente a <i>Culex</i>	113
Efecto insecticida de S-layer de <i>Bacillus sphaericus</i>	115
Efecto insecticida frente a <i>Aedes</i>	116
Actividad sinérgica	118
Actividad hemolítica de la S-layer	121
<b>S-LAYER Y BIORREMEDIACIÓN</b>	<b>123</b>
Bioadsorción de metales por células enteras de especies de <i>Bacillus</i>	125
Efecto de otros iones	127
Capacidad de bioadsorción de la S-layer de <i>Bacillus sphaericus</i>	128
S-layer de <i>Bacillus sphaericus</i> en las esporas	129
Bioadsorción en células provenientes de distintas condiciones de osmolaridad	131
Propiedad de bioadsorción en las cepas C7 y C11	132
<b>Discusión y Conclusiones</b>	<b>134</b>
S-layer de <i>Bacillus sphaericus</i> : fisiología y estrés	135
Funcionalidad de la proteína S-layer de <i>Bacillus sphaericus</i> : aplicaciones biotecnológicas.	139
Actividad bioinsecticida	139
Bioadsorción de Metales	142
Transformación y construcción de mutantes en <i>B. sphaericus</i>	144
<b>Bibliografía</b>	<b>147</b>

# Resumen

## **S-layer de *Bacillus sphaericus*: caracterización, regulación, análisis funcional y aplicaciones.**

Las cepas de *Bacillus sphaericus* 2362 (cepa de referencia), C7 y C11 (nuevos aislamientos) todas pertenecientes al grupo IIA, son entomopatógenas contra larvas de mosquitos. Además de las envolturas habituales de bacterias Gram positivas, estas cepas están recubiertas de una capa externa de una estructura proteica cristalina: la capa S o Surface layer (S-layer) que estaría asociada un polímero secundario de pared (SWCP). En las 3 cepas se observa que la proteína S-layer tiene un PM de aproximadamente 125 kDa y que es reconocida por el mismo anticuerpo.

Tratamientos con LiCl, que remueven la S-layer sin afectar la viabilidad, permitieron observar que en esa condición estas células (carentes de S-layer) crecen más lentamente que las células con S-layer y que en medios hipersalinos solo crecen al recuperar S-layer. El análisis por western blot con un anticuerpo anti S-layer de la cepa 2362, mostró que en las células tratadas la síntesis de S-layer se inició muy temprano durante el crecimiento bacteriano. Las modificaciones en tamaño, concentración, ubicación (fijadas a membrana, asociada a esporas, o libres en el sobrenadante) en función de las etapas de su crecimiento y de las condiciones de estrés hiperosmótico (altas concentraciones de NaCl), nos indican posibles modificaciones postraduccionales, siendo la glicosilación la más frecuentemente reportada. Los resultados de agregación de cultivos y tinción con azul de bromo-timol fueron contradictorios respecto a la presencia de glicosilación cuando se compraron con los de tinción empleando un kit comercial que distingue proteínas glicosiladas. Se discuten distintas posibilidades: O-glicosilación no enzimática, desprendimiento de la S-layer con el SWCP.

Por otro lado se exploraron dos funciones importantes que estas proteínas aportarían a la bacteria: bioabsorción de metales y actividad mosquitocida.

Distintas especies de *Bacillus* han sido involucradas en la asociación con metales como bioadsorbentes, pero hasta el momento no hay un claro entendimiento de las propiedades quelantes. Con ese objetivo, se analizó la capacidad de bioadsorción de cobre en cultivos y esporas de bacterias Gram positivas de especies que producen o no S-layer. Sólo aquellas cepas provistas de S-layer, como *Bacillus sphaericus* y *B. thuringiensis*, mostraron una bioadsorción significativa tanto en cultivos como en esporas. Esta capacidad (cerca al 50%) se retuvo luego de un proceso de

calentamiento suave de los cultivos, indicando que elementos estructurales de la envoltura son los responsables de esta propiedad. Las S-layer purificadas de dos cepas de *Bacillus sphaericus* mantuvieron la capacidad de bioadsorber cobre mostrando que la propiedad está directamente asociada a ellas. Se determinaron los parámetros de bioadsorción para la cepa *B. sphaericus* 2362 que responden al modelo de Langmuir. Tanto la afinidad como la capacidad de bioadsorción fueron comparables con otros bioadsorbentes de origen bacteriano. Se observó un efecto competitivo de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , aunque no de  $\text{Cd}^{2+}$ , lo que indicaría que esta proteína podría retener otros metales además de cobre lo que explicaría su persistencia en ambientes contaminados. La utilización del anticuerpo anti-S-layer permitió determinar que la S-layer permanece adherida a la espora y que sólo las esporas sin lavados intensivos (que eliminan la S-layer) captan eficientemente el cobre. Por primera vez se mostró una correlación directa entre el contenido de S-layer y la capacidad de bioadsorción. Esta capacidad está ligada a la retención de las S-layer adheridas a las células y esporas de *Bacillus*.

Algunas cepas de *Bacillus sphaericus* son tóxicas para larvas de mosquitos, y sus propiedades insecticidas se deben principalmente a la inclusión cristal que se produce durante la esporulación. Se inspeccionó la actividad insecticida de las S-layer de las cepas 2362 y C7. Se encontró que las S-layer *per se* muestran actividad contra larvas de *Culex*. En experimentos con preparaciones de espora-cristal tóxicas en conjunto con la S-layer, se observó un efecto sinérgico aportado por esta proteína. La S-layer de la cepa C7 en particular aumenta el rango de huésped hacia mosquitos del género *Aedes* para los cuales *B. sphaericus* no es eficiente. Los análisis *in silico* de la estructura de la S-layer muestran un motivo con actividad hemolítica que fue confirmado por experimentos realizados *in vitro*. Esta actividad explicaría los resultados de toxicidad de las S-layer.

**Palabras clave:** *Bacillus sphaericus*, S-layer, biorremediación, estrés, actividad insecticida

# **Abstract**

*Bacillus sphaericus* strains 2362 (reference strain), C7 and C11 (new isolated strains), all of them belonging to the homology group IIA, are entomopathogenic against mosquito larvae. In addition to the usual envelopes of Gram positive bacteria, this strains are covered by an external layer with a crystalline protein structure: the S-layer or surface layer. This layer could possibly be associated to a secondary wall polymer (SWCP). In the 3 strains the S-layer protein has a molecular weight of approximately 125 kDa recognized by the same antibody.

Treatments with LiCl, that removed the S-layer without affecting their viability, allowed to observe that in this condition these cells (without S-layer) grow slower than those with S-layer. In hypersaline mediums they only grow when they restore the S-layer. The western blot analysis using the anti S-layer antibody against strain 2362, showed that treated cells recover S-layer synthesis early during the start of bacterial growth. The modifications in size, concentration, location (fixed to membrane, associated with spores, or free in the supernatant) are related to the growing stages and stress conditions (high NaCl concentrations) indicating possible posttranslational modifications, being the glycosylation the most frequent. The cultures segregation and staining with bromothymol blue results are in contradiction with those obtained with commercial kit staining that distinguishes glycosylated proteins. Different possibilities are discussed as non enzymatic O-glycosylation and S-layer detachment with the SWCP.

On the other hand, two important functions of this protein as metal biosorption and mosquitocidal activity have been explored.

Various *Bacillus* species have been implicated as biosorbents of metals, but so far there is no clear understanding of the chelating properties. To that end, we examined the ability of copper biosorption in cultures and spores of Gram positive species with and without S-layer. Only those strains provided with S-layer as *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis*, showed a significant biosorption both in cultures and spores. This capacity (about 50%) was retained after a mild heating of cultures, indicating that structural elements of the envelope are responsible for this property. The S-layer extracted from two strains of *Bacillus sphaericus* maintained the ability to bioadsorb copper showing that the property is directly associated with this protein. Biosorption parameters were determined for S-layer of strain *B. sphaericus* 2362 and showed to respond to the Langmuir model. Both the affinity and biosorption capacity were comparable with other bacterial biosorbents. A competitive effect of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , but not of  $\text{Cd}^{2+}$ , was also observed, indicating that other cations may be biosorbed by this

protein, which would explain the persistence of this bacterium in polluted environments. The use of anti-S-layer antibody allowed to determine that the S-layer remains attached to spores and that only those not submitted to intensive washing (which eliminate the S-layer), efficiently capture copper. This was the first time that a direct correlation between the content of S-layer and the capacity of biosorption was shown. This capacity is linked to the retention of S-layer proteins attached to *Bacillus* spores and cells.

Some *Bacillus sphaericus* strains are toxic to mosquito larvae, and their insecticidal properties are mainly due to crystal inclusions produced during sporulation. The insecticidal activity of the S-layer of strains 2362 and C7 was inspected. It was found that the S-layer *per se* showed activity against *Culex* larvae. In experiments with toxic spore-crystal preparations in conjunction with the S-layer, we observed a synergic effect provided by this protein. In particular, the S-layer of strain C7 increased the host range to *Aedes* mosquitoes for which *B. sphaericus* is not efficient. *In silico* analysis of the structure of the S-layer show a domain with possible hemolytic activity which was confirmed by *in vitro* experiments. This activity would explain the results of S-layer toxicity and increased host range.

**Keywords:** *Bacillus sphaericus*, S-layer, bioremediation, stress, insecticidal activity.

# Introducción

## ***Bacillus sphaericus***

*Bacillus sphaericus* es una especie que históricamente se incluyó dentro del género *Bacillus*, perteneciendo al grupo de bacterias Gram positivas de bajo contenido en G+C. Producen esporas esféricas, no crecen en anaerobiosis y en general dan negativas las mayorías de las pruebas bioquímicas de fermentación de azúcares que se utilizan para identificación de grupos bacterianos (Baumann *et al*, 1991; Porter *et al.*, 1993). Sin embargo, estudios de hibridización ADN-ADN mostraron que la especie es muy heterogénea, por lo cual ha sido susceptible de reclasificaciones. En principio se las dividió en 5 grupos (I a V, el grupo II está a su vez dividido en IIA y IIB) (Krych *et al*, 1980; Rippere *et al*, 1997).

Algunas cepas poseen la particularidad de ser entomopatogénicas y se encuentran esencialmente dentro del grupo de homología II. Este presenta un 57 a 66% de homología al grupo IIB en la cual está la cepa tipo de la especie *B. fusiformis* que no posee cepas tóxicas (Krych *et al*, 1980; Rippere *et al*, 1997).

La clasificación previamente descrita fue confirmada por otros métodos demostrando la heterogeneidad de la especie y la imposibilidad de poder determinar *a priori* el nivel de toxicidad de una cepa. En este aspecto se han realizado estudios de tipificación por sensibilidad a distintos bacteriófagos (Yousten, 1984a), tipificación serológica utilizando antígenos flagelares (de Barjac *et al*, 1985), estudios nutricionales y análisis numéricos de los mismos (Alexander y Priest, 1990), análisis de la composición de ácidos grasos (Frachon *et al.*, 1991) y análisis por amplificación azarosa de ADN polimórfico (RAPDs) (Woodburn *et al*, 1995).

Nakamura y colaboradores (2000) han realizado un análisis filogenético de las cepas que se encuentran agrupadas como organismos semejantes a *B. sphaericus*, utilizando la secuencia del ARN ribosomal 16S. Como resultado del mismo se ha establecido la presencia de 7 grupos diferentes dentro de *B. sphaericus*. Sin embargo la ubicación de algunas de las cepas difiere con la de los trabajos de Krych *et al.* (1980) y Rippere *et al.* (1997).

Recientemente, Ahmed y colaboradores (2007), reevaluaron el status taxonómico del grupo y propusieron un nuevo género: *Lysinibacillus*. Se basaron en análisis filogenético, fenotípico, y de hibridización ADN-ADN, pero sopesaron la composición aminoacídica del peptidoglicano de la pared celular. Propusieron un nuevo género:

*Lysinibacillus*. El nuevo género *Lysinibacillus* incluye a microorganismos móviles, formadores de endosporas esféricas o elipsoidales, con pruebas bioquímicas catalasa y oxidasa positivas, con ausencia de producción de H<sub>2</sub>S e indol, no reductoras de nitrato y test negativo para β-galactosidasa. El principal ácido graso celular es iso-C<sub>15:0</sub>. El peptidoglicano de pared contiene lisina y ácido aspártico como diagnóstico de aminoácido, representando un péptidoglicano de tipo A4α (Lys-Asp). Los principales lípidos polares son difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol y fosfoglicolípidos ninhidrina positivos. El contenido de G+C es de 35-38%. Hasta la fecha se ha secuenciado el genoma completo de *Bacillus sphaericus* o *Lysinibacillus sphaericus* C3-41 (Hu *et al*, 2008). Se ha visto que el genoma está compuesto por un cromosoma de 4.639.821 pares de bases y un plásmidos de dos copias de 177.642 pb, que contienen 4.786 y 186 potenciales secuencias codificantes para proteínas respectivamente. Este microorganismo es incapaz de metabolizar glucosa, fructosa y varios polisacáridos, y la principal razón parece ser la falta de enzimas claves en el sistema de transporte de azúcares aunque consta de un sistema PTS para transporte de N-acetylglucosamina, de las enzimas glicolíticas (Alice *et al*, 2003) y de CcpA responsable del control de utilización de azúcares y represión catabólica (Alice Tesis doctoral 2003). Posee abundantes enzimas proteolíticas y sistemas de transportes para aminoácidos. Otro resultado de la secuenciación llamativo es la abundancia de elementos genéticos móviles (45 dentro del cromosoma y uno en el plásmido *pBsph*).

### **Envolturas en *Bacillus sphaericus***

Como toda bacteria Gram positiva, la envoltura de *B. sphaericus* esta compuesta por una membrana y una gruesa pared de peptidoglicanos. Posee además una envoltura adicional compuesta por una capa de proteínas formando un enrejado cristalino: la S-layer. La pared celular de bacterias Gram positivas está conformada por una gruesa capa de mureína que contiene iguales cantidades de polisacáridos y péptidos: el peptidoglicano-PG-(Delcour, 1999). El PG está constituido por cadenas de glicanos de la unidad repetitiva disacáridica N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico con enlaces β 1-4 alternantes. Unido al grupo carboxilo del N-acetilmurámico se encuentra un péptido corto cuya secuencia es característica taxonómica de especie. Este péptido es responsable del entrecruzamiento (cross-linking) entre las cadenas polisacáridicas.

Mediante el entrecruzamiento a través de puentes peptídicos se logra la rigidez característica de la pared bacteriana. Se han descrito más de 100 tipos diferentes de PG a partir de las variantes en cuanto a largo y composición de las cadenas laterales peptídicas y a la forma en que estos péptidos cortos se hallan entrecruzados unos con otros (Schleifer, 1972). Particularmente, en *Bacillus sphaericus* el PG está constituido por una estructura monomérica de glicanos formada por N-acetilglucosamina N-acetilmurámico, en unión  $\beta$ -1,4 y unido al murámico un puente peptídico formado por L-lisina y D-aspartato (Figura 1).

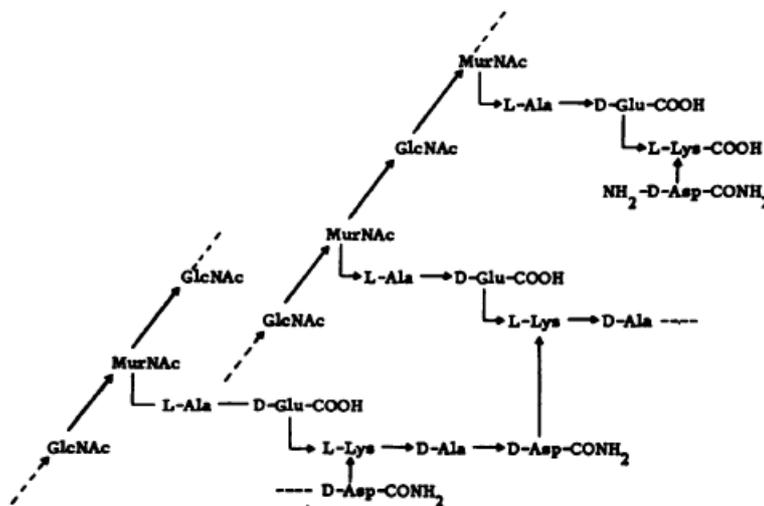


Figura 1: Estructura del peptidoglicano de pared de células vegetativas de *B. sphaericus*. La parte inferior ilustra dos cadenas entrecruzadas por unión N'-(D-alanil->Disoasparaginil) L-lisina. La parte superior contiene el peptide sin entrecruzar, que carece de alanina.

Es de tipo A $\alpha$ 4: entrecruzamiento entre la posición 3 y 4 de las subunidades del péptido. La polimerización del PG involucra la actividad de una glicosiltransferasa, para luego dar paso al entrecruzamiento de las cadenas peptídicas por medio de la reacción de transpeptidación. El PG representa el 50% de la pared celular aunque otros polímeros tales como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos están presentes en la pared celular (Figura 2). Los ácidos teicoico y otros polisacáridos de pared se hallan covalentemente asociados al PG y representan un 20-50% del peso seco de la pared. Estos polisacáridos son importantes antígenos y receptores de bacteriófagos. Son largas moléculas polianiónicas cargadas negativamente importantes en la mantención de un medio iónico apropiado (especialmente por la captación de cationes divalentes).

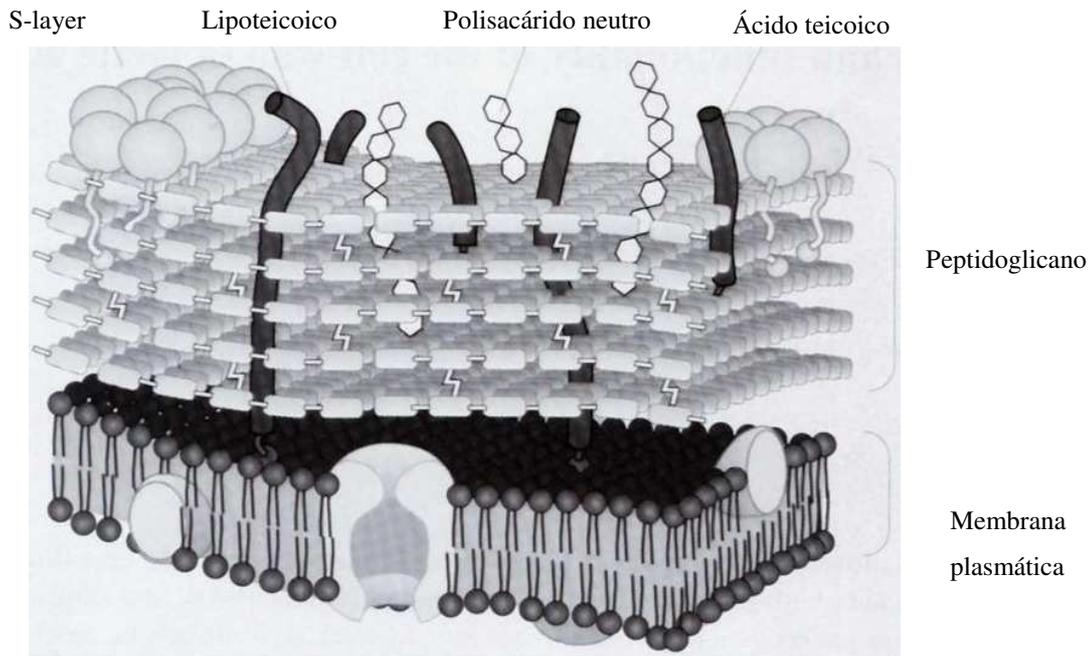


Figura 2: esquema de la pared de bacterias Gram positivas.

### Proteínas de Capa S o S-layer

Las S-layers presentes en especies de Archaea y Bacteria (tanto en Gram positivas como negativas), conforman arreglos monomoleculares cristalinos de una o varias proteínas o de glicoproteínas que se autoensamblan a una forma multimérica. Estas cubren la superficie entera de la célula representando hasta el 15% de las proteínas. Son una estructura común de la superficie de la célula de algunas especies bacterianas (Sleytr 1997; Sleytr y Beveridge 1999; Luckevich y Beveridge 1989; Bowditch *et al*, 1989) que provee a la bacteria de una capa adicional (o S-layer).

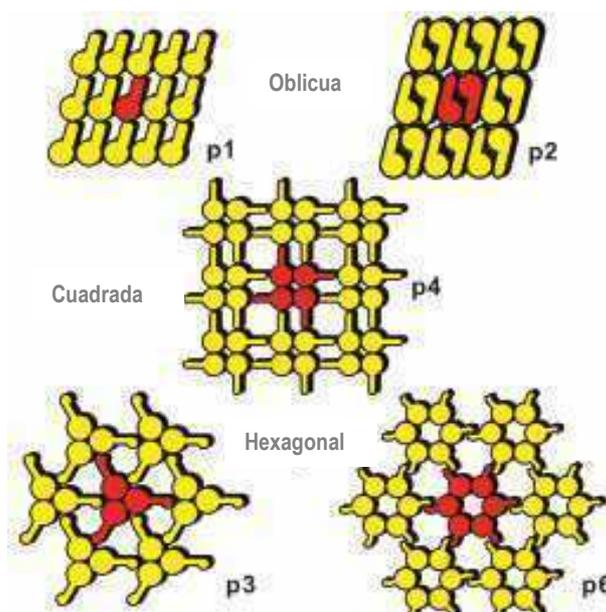


Figura 3: Esquema de distintos tipos de entramados de Capa S. El arreglo regular muestra simetría oblicua (p1, p2), cuadrada (p4) o hexagonal (p3, p6). Las unidades morfológicas se componen de una, dos, tres, cuatro o seis subunidades (reproducción de Sleytr *et al*, 2001)

La estructura de la S-layer permite establecer en la superficie un entramado o enrejillado con simetría oblicua (p1, p2), cuadrada (p4) o hexagonal (p3 y p6) (Figura 3). La simetría hexagonal predomina en Archaea. Dependiendo del tipo de entramado, una unidad morfológica consiste en una, dos, cuatro, tres o seis subunidades (glico) proteicas, que tienen una separación centro-centro de 2,5 a 35 nm. Esta estructura puede ser bastante porosa, con poros que ocupan hasta un 70% de la superficie bacteriana. El tamaño de los poros puede ser idéntico, o formar una capa con dos o más clases de poros (Sára y Sleytr 2000).

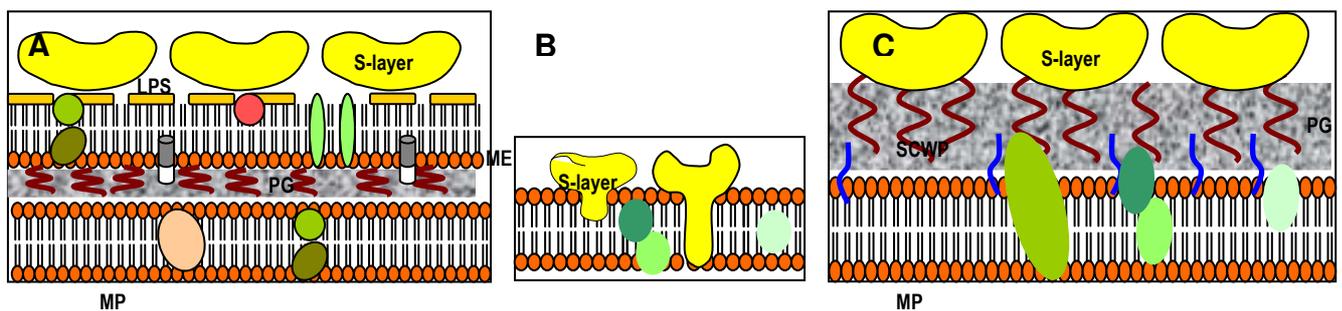


Figura 4: Ilustración que muestra las tres tipos de estructuras de envolturas de organismos que contienen S-layer. A: Estructura de envoltura de bacterias Gram negativas; B: estructura de envoltura de Archaea; estructura de envoltura de bacterias Gram positivas. PG: peptidoglicano. MP: membrana plasmática. ME: membrana externa. SCWP: *secondary cell wall polymers*. LPS: lipopolisacárido.

Como la S-layer se encuentra tanto en bacterias Gram positivas, negativas como en arqueas, pueden asociarse a distintos componentes de la envoltura. En Gram positivas y arqueas se unen a la capa de peptidoglicano o a la pseudomureína, mientras que en Gram negativas la unión se hace a través de algún componente de la membrana externa, como el lipopolisacárido. En Archaea, la S-layer es el único componente de la pared, asociándose fuertemente a la membrana plasmática (Engelhardt, 2007) (Figuras 4 y 5).

Para extraer y “despegar” a las S-layers individuales de la superficie se han utilizado diferentes métodos, la mayoría se relacionan con la ruptura de uniones puente de hidrógeno (urea o cloruro de guanidina), detergentes a pH ácido o por sustitución de cationes ( $\text{Li}^+$  o  $\text{Na}^+$ ) que reemplacen al  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto ha indicado que las subunidades individuales interactúan unas con otras y con el resto de los componentes de la envoltura a través de fuerzas no covalentes. Las proteínas aisladas de esta forma mantienen la capacidad para recristalizar en arreglos regulares, tanto en suspensión como en distintas superficies.

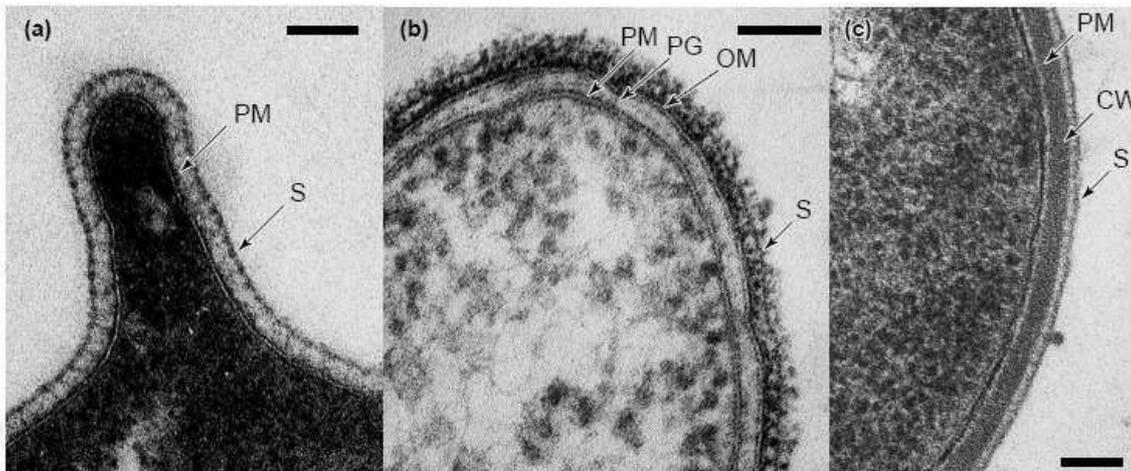


Figura 5: Micrografía electrónica de cortes de sección de microorganismos que poseen S-layer en su envoltura. (a) una Arquea (*Sulfolobus acidocaldarius*); (b) una bacteria Gram-negativa (*Aeromonas salmonicida*); (c) una bacteria Gram-positiva bacterium (*Bacillus thuringiensis*). PG: peptidoglicano. PM: membrana plasmática. OM: membrana externa. CW: cell wall. S, S-layer. Escala 5:50 nm. Tomada de Sleytr y Beveridge, 1999.

La capa S está compuesta generalmente por una proteína o glicoproteína de un tamaño aproximado entre 40 y 170 kDa (Sleytr *et al* 1993, 1999, Åvall-Jääskeläinen y Palva 2005) Son proteínas levemente ácidas, con un porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos entre 40 al 60%, y pocos aminoácidos azufrados. El pI varía entre 4 y 6, aunque en lactobacilli y algunas archaea es mayor, entre 8 y 10.

En muchas especies es común encontrar más de un gen codificando para S-layers. En *B. anthracis*, han sido caracterizadas dos principales S-layer cuya expresión es excluyente entre ellas (Mesnage *et al*, 1997) aunque en esta especie se han descrito una docena de posibles genes codificando S-layers (Kern y Schneewind, 2008). En *Bacillus sphaericus*, Hu y colaboradores en 2008, analizando la secuencia de la cepa C3-41, se encontraron 22 secuencias codificantes para S-layer o proteínas homólogas a ella.

### Química y Dominios de proteínas S-layer

Estudios comparativos de genes de S-layer de distintos grupos taxonómicos mostró que no hay homología de secuencias entre organismos no relacionados. Las altas homología son explicadas desde el punto de vista evolutivo por factores de selección como las condiciones de crecimiento y estrés ambiental. Dentro de la familia *Bacillaceae*, en general, hacia el extremo amino terminal hay secuencias con alta identidad. En algunas cepas, los motivos SLH (S-layer homology domain) están

involucrados en la adhesión de las proteínas a polisacáridos (SCWP: secondary cell wall polymers) que se unen a la capa de peptidoglicano (Sára 2001) mientras que en otras bacterias la afinidad es directamente por el peptidoglicano. En proteínas S-layer sin dominios SLH, los extremos amino terminal o carboxi terminal contienen aminoácidos cargados positivamente, que interactúan con SCWP a través de fuerzas electrostáticas o puente de hidrógeno. Esta interacción es altamente específica (Ferner-Ortner *et al*, 2007). Un dominio SLH contiene uno, dos o tres motivos repetidos de SLH. Cada uno de estos motivos contiene de 10 a 15 residuos conservados. En la cepa CCM2177 de *B. sphaericus* Huber *et al* (2005) mostraron que la presencia de los 3 motivos SLH, no son suficientes para explicar la unión al polímero de pared del huespéd.

Se han estudiado las modificaciones post-traduccionales que sufren las S-layer, que incluyen fosforilaciones y glicosilaciones. La glicosilación de las S-layer es uno de los casos más estudiados de glicosilación en proteínas procariotas (Messner *et al*, 2008). Aunque es más frecuente la glicosilación en bacterias Gram positivas, también se encontró glicosilación en S-layer de especies Gram negativas, como *Tannerella forsythia* (Lee *et al*, 2006). La cadena de glicanos y su unión a la parte proteica es completamente diferente entre glicoproteínas bacterianas y de arqueas respecto de las eucariotas. En arqueas las glicoproteínas están compuestas por heteropolisacáridos cortos, que no tienen unidades repetitivas, y la unión a la proteína es típicamente N-glicosídica. En cambio en bacterias, las uniones son O-glicosídicas. Las cadenas de glicanos bacterianos están compuestas por homo o heterosacáridos lineales o ramificados, de 20±50 unidades idénticas repetidas. Los monosacáridos que conforman las cadenas incluyen un amplio rango de hexosas neutrales, 6-desoxihexosas y aminoazúcares. También pueden componerla azúcares raros como los típicos constituyentes del antígeno O del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas. La unión a la cadena polipeptídica es a través de residuos tirosina, serina y treonina. Los N-glicanos solamente se han encontrado en arqueas, sin embargo no hay estructuras antenarias como ocurre en eucariotas (Schäffer y Messner 2004). En la figura 6 se muestran en un esquema los tres tipos de glicanos unidos a las cadenas polipeptídicas: una cadena de glicanos con una región core, una cadena de glicanos y un pseudo core y la estructura trunca, que solamente presenta el core.

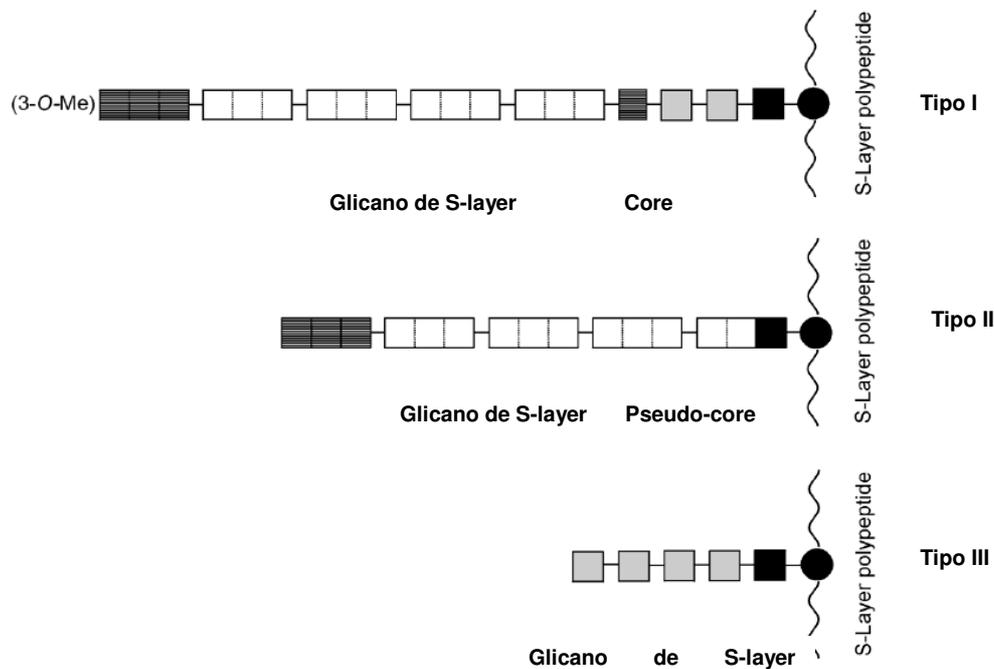


Figura 6: Representación esquemática de los tres planos de arquitectura de los glicanos en las S-layer. Tipo I: estructura extendida que comprende una región core y cadena de glicanos. Tipo II: estructura extendida simplificada, que comprende un pseudo core y la cadena de glicanos. Tipo III: estructura truncada, que solamente está compuesta por la región core. Las unidades repetitivas se componen de 2 a 6 monosacáridos, y se representan por símbolos abiertos. Los cuadrados sombreados indican el core-oligosacárido. Las posibles variaciones en el largo o en la cadena de glicanos se muestran con cuadrados rallados. Residuos de azúcares (cuadrados) y aminoácidos (círculos) que participan en la unión glicosídica se indican con símbolos llenos.

## Genética y Biosíntesis

Se requiere una gran cantidad de proteína S-layer para cubrir una superficie bacteriana con un entramado cerrado durante todos los estadios del crecimiento. A nivel molecular esto se refleja en un promotor fuerte y un mensajero muy estable. En el contexto de la regulación de la biosíntesis, se ha observado que algunas bacterias pueden expresar distintas proteínas S-layer. Esta variación de síntesis puede otorgar una estrategia frente a cambios ambientales por expresión de genes diferentes o por recombinación de secuencias codificantes parciales (Fouet, 2009; Sára *et al*, 1996; Jakava-Viljanen *et al*, 2002). Los genes que codifican para las S-layer deben tener un eficiente sistema de transcripción y/o traducción. Para alcanzar estos altos niveles de expresión, los diferentes microorganismos que poseen estas proteínas han adoptado varias estrategias. El rearrreglo de las S-layer a una estructura supramolecular es un proceso dinámico, en las que las unidades se unen de forma espontánea y regular. A alta velocidad de crecimiento bacteriano, se ha demostrado que 500 subunidades por segundo deben

sintetizarse, translocarse a la superficie e incorporarse a la estructura de entramado preexistente. La diferencia de carga neta en superficie e interacciones específicas entre la parte interna y externa de la superficie de las S-layers a la capa existente es esencial para una orientación correcta (Sleytr *et al*, 2002).

Pese a la existencia de homología de secuencia a nivel aminoacídico, la homología de genes de S-layer es muy rara. Como las S-layers son las proteínas predominantes en las células, es común encontrar que los genes son de alta expresión. Por ejemplo, el promotor del gen *slpA* de *L. acidophilus* es dos veces más efectivo que el gen que codifica para la lactato deshidrogenasa, que es uno de los promotores más fuertes en el género *Lactobacillus*. Además, en *L. acidophilus* hay dos promotores y solo uno de estos promotores (el más cercano a la región codificante) es activo en diferentes fases de crecimiento (Boot *et al*, 1997).

En *L. brevis*, hay dos promotores involucrados en la expresión, uno cerca del codón de inicio que es utilizado en fases exponencial y estacionaria temprana, y otro más lejano, utilizado en menor medida. La expresión en *B. brevis* demostró que necesita de tres promotores (Sleytr *et al*, 2001).

En *Bacillus anthracis* hay dos genes principales que codifican para proteínas S-layer (*sap* y *eag*) además de unos 20 posibles genes codificando S-layers (Kern y Schneewind, 2008). El gen cromosómico *sap* codifica para una proteína de 94 kDa. Se ha descubierto que luego de realizar una mutante de delección de este gen, el arreglo cristalino continuaba formándose. Es decir, que otra proteína de capa S se estaba traduciendo, esta proteína fue llamada EA1 (gen *eag*). Luego de esta primera observación, fue determinado que en superficie ambas proteínas coexistían. Esta última proteína estaba más débilmente adherida a la pared, era mayoritaria y representaba el principal antígeno bacteriano de esta especie. En medio rico, *B. anthracis* sintetiza las dos proteínas (Sap y EA1). En fase exponencial Sap es expresada y es reemplazada en estacionaria por EA1. Los genes están controlados por factores  $\sigma$  y por Sap que actúa como represor de *eag*. Otros dos reguladores AtxA (regulador maestro que activa a *eag* y reprime a *sap*) forman parte de la red regulatoria, y PagR, que es el efector directo que se une a los promotores *sap* y *eag* (Mignot *et al*, 2004).

Otra estrategia que poseen los microorganismos que poseen S-layer, como *Lb. acidophilus*, *Campylobacter fetus* y *Geobacillus stearothermophilus*, es la variación de la proteína S-layer mediante rearrreglos en el ADN bacteriano. *Lb. acidophilus* tiene además del gen *slpA* de S-layer que es normalmente expresado, otro gen silenciado de

una proteína similar a *slpA*, llamado *slpB*. Estos genes se encuentran a una distancia de 6 Kpb y en orientación opuesta uno del otro. Se cree que cuando ocurre una mutación que afecta al gen *slpA*, ocurre un rearrreglo en el cromosoma que lleva a la expresión del gen *slpB* (Kleanhammer *et al*, 2008).

La mayoría de las proteínas S-layer son secretadas y posicionadas en la envoltura celular a través de rutas guiadas por “péptido-sígnal”. En *Bacillus sphaericus* JGA12 y 9602 este péptido es de 31 aa y es clivado entre dos residuos alanina.

El análisis genómico de *Bacillus sphaericus* C3-41 mostró que el gen *slpC* está incluido en el genoma cromosomal, compuesto por 3521 pares de bases que codifican para una proteína de 1176 aminoácidos. La codificación genética es igual a la de la cepa 2362 (Li *et al*, 2009).

## Funciones

Teniendo en cuenta que los organismos que poseen S-layer son ubicuos en la biosfera, se tiene el concepto de que esta proteína debe cumplir un amplio espectro de funciones. Existen casos en los que bacterias no expuestas a presión de selección ambiental pueden perder su capa S, lo cual indicaría que el gran esfuerzo de biosíntesis es sólo requerido en habitats naturales. En términos funcionales, forman parte de una estructura de envoltura compleja y en consecuencia no puede considerarse como una capa aislada. Ninguno de los aspectos funcionales hallados hasta la fecha puede considerarse como un atributo de una función general que sería importante para la mayoría de los procariontes (Beveridge *et al*, 1997; Sleytr *et al*, 2001). En el caso de existir una función general, se considera que debe haberse modificado en el curso de la evolución. Se ha pensado que una capa proteica sería precursor de polímeros de pared más complejos como el peptidoglicano o la pseudomureína. Funciones primarias pueden distinguirse de secundarias, o adquiridas luego del contacto con presión de selección diferente, como por ejemplo la presencia de organismos superiores en el caso de protección contra la defensa inmune (Engelhardt, 2007). Las funciones específicas reflejan interacciones ambientales y adaptaciones. La estabilización mecánica y osmótica es un requerimiento esencial, sobre todo para aquellos microorganismos de ambientes desprotegidos. Engelhardt (2007) ha explicado en términos teóricos la importancia de las S-layers de arqueas para mantener la integridad bajo presión osmótica. Las funciones primordiales en se han mantenido más claramente en arqueas, debido a que es el único componente

de pared, por lo cual no es sorprendente que no haya podido lograrse mutantes nulas de S-layer. Las funciones primordiales, que parecen ser tan claras en arqueas, no lo son tanto entre bacterias. La presencia del peptidoglicano en la envoltura atenúa el significado evolutivo de la S-layer en la estabilización. Pese a no haber experimentos concluyentes al respecto, Beveridge y colaboradores (1997) describieron a través de tinciones que en el género *Bacillus* hay mayor integridad en cepas que portan capa S. Sin embargo esto se contrarrestaría por un aumento en el espesor del peptidoglicano (Matias y Beveridge, 2006). La obtención de un mutante (condicional, por ejemplo trabajando con ARN de interferencia) de S-layer, permitiría conocer la función de modo más preciso. Por esta razón muchas de las funciones asignadas a las S-layer son aún hipotéticas y necesitan un cambio en las estrategias experimentales. También surge de manera obvia que no todas tendrán la misma función (específica o secundaria), debido al amplio rango de nichos y de microorganismo en los que se hayan. En la tabla 1 se indican algunas funciones recopiladas por Sleytr *et al*, 2002, Engelhardt 2007 y Prado Acosta *et al*, 2008)

Funciones Generales	Funciones Específicas
Determinación y mantenimiento la forma celular	Determinación de la forma y la división celular en archaea que poseen S-layer como único componente de pared
Tamiz molecular	Limitan el espacio periplásmico en bacterias Gram positivas Previene la adsorción no específica de macromoléculas
Protección	Resistencia a fagos y a fagocitosis por predadores
Reconocimiento de superficie y adhesión celular a sustratos	Conforman matrices físico-químicamente definidas Enmascaramiento de cargas netas negativas del peptidoglicano bacteriano ( <i>Bacillaceae</i> )
Zona de adhesión para exoenzimas Patogenicidad y adhesión celular	Rol en la invasión y supervivencia dentro del huésped Adhesión específica a moléculas del huésped Capa protectora frente a respuesta inmune
Exclusión de patógenos	Actividad hidrolasa en cepas prebióticas ( <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC4356)
Estabilización mecánica, osmótica y térmica	Resistencia a diferentes tipos de estrés

Tabla 1: Funciones descritas para las proteínas S-layer.

En *Lactobacillus*, se ha avanzado en establecer funciones específicas relacionadas a la característica prebiótica de algunas cepas. En *Lb. brevis* una de las funciones adjudicadas a estas proteínas es la de adhesión al organismo hospedador, en especial a

las células epiteliales del tracto gastro-intestinal humano y a las fibronectinas en la matriz extra celular (Hynönen *et al*, 2002); en *Lb. crispatus* se adhieren al colágeno que compone la matriz extracelular sub-intestinal. La ausencia de S-layer anula las propiedades de autoagregado que tienen algunas bacterias tales como *Lb. kefir* y *Lb. parakefir*, involucradas en la adhesión a células Caco-2 (Golowczyc *et al*, 2007, 2009). Este autoagregado es de importancia tanto en los procesos de inhibición de otros microorganismos, de protección epitelial, como en los de intercambio genético entre cepas de *Lactobacillus*.

Dentro del laboratorio donde se desarrolló esta tesis doctoral, hemos hallado una nueva función biológica que no había sido descrita previamente para la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. Se encontró una capacidad de mureín-hidrolasa sobre la pared celular y células enteras de *Salmonella enterica* serovar *Newport* que es un patógeno intestinal humano. La capacidad de la bacteria para hidrolizar un patógeno que coloniza su mismo hábitat indica una ventaja competitiva por el mismo nicho. Esta actividad respaldaría la característica probiótica de la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (Prado Acosta *et al*, 2008). También se utilizó a la S-layer como compuesto sinérgico con el antibiótico nisina, esto sirvió para disminuir la concentración inhibitoria mínima casi un 50 % en organismos patógenos del tracto intestinal como *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (Prado Acosta *et al*, 2010).

Las bacterias que poseen S-layer forman un espacio periplásmico, el cual está caracterizado por brindar protección al citoplasma.

### **Anclaje de la proteína S-layer a la pared celular**

Sumado al peptidoglicano, la pared celular de los *Lactobacillus* contiene una capa de polímeros de pared celular secundaria (SCWP), que consiste en ácidos teicoicos, lipoteicoicos, lipoglicanos, ácidos teicurónicos. (Navarre *et al*, 1999). Muchas de las S-layer mencionadas poseen en su extremo N-terminal los motivos llamados homólogos en S-layer (SLH motif) los cuales son responsables del anclaje a la pared celular o a la pared celular secundaria (SCWP) (Mesnage *et al*, 2000) y en algunos casos directamente al peptidoglicano. Los ligandos a los cuales la S-layer parece adherirse incluyen ácidos teicoicos, lipoteicoicos y polisacáridos neutros; en *Lb. acidophilus* se determinó que la porción N-terminal sería la responsable del anclaje a ácidos teicoicos,

mientras que la C terminal estaría comprometida con la unión a la pared celular y la interacción con el peptidoglicano de la bacteria.

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

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

La asociación de las proteínas S-layer directamente con la membrana citoplasmática se da solamente en Archaea, donde las proteínas se agrupan sobre la membrana directamente. En estos casos las S-layers son el único componente de la pared celular.

El estudio de la S-layer SbpA de *Bacillus sphaericus* CCM 2177 reveló que los tres motivos SLH no son suficiente para la unión al SCWP piruvilado. La proteína reconoce el SCWP con estructura  $\rightarrow 3$ )-[4,6-O-(1-carboxyethylidene)]<sub>-0,5</sub>- $\beta$ -D-ManpNAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcpNAc ( $\rightarrow$  indica donde se une a la capa rígida de pared). El polímero está constituido por ocho a nueve unidades repetidas de disacáridos unidas al esqueleto del PG. Las bases moleculares que explican la afinidad por el polímero no han sido elucidadas (Huber *et al*, 2005).

### ***Bacillus sphaericus* y S-layer**

Algunas proteínas S-layer de *Bacillus sphaericus* de cepas no patogénicas fueron estudiadas hasta la fecha y caracterizadas. Lewis y su grupo en 1987 trabajaron con la proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 y P1, ambas cepas patogénicas hacia insectos, a través de métodos estructurales, bioquímicos y serológicos. Los entramados cristalinos están formados por arreglos lineales que se repiten en intervalos de 5 nm. Este grupo informó que se trata de una glicoproteína de peso molecular que estaría en el rango de 133 y 155 kDa. A través de mapeo de péptidos y análisis serológico de las S-layer de distintas cepas patogénicas de *B. sphaericus* pudieron separarlas agrupando en

ocho grupos distintos. Estos grupos coinciden con los agrupamientos por tipificación por fagos y por serotipificación por antígeno flagelar.

El entramado de la S-layer de *Bacillus sphaericus* CCM 2177 muestra una simetría cuadrada compuesta por subunidades idénticas con un peso molecular estimado de 127 kDa. El autoensamblado *in vitro* depende de la presencia de cationes divalentes (Sleytr *et al*, 1994). La S-layer reconoce una SCWP cargada negativamente como sitio de unión en la capa rígida de la envoltura celular. Esta SCWP está compuesta por unidades de disacáridos repetidos de N-acetilglucosamina y N-acetilmanosamina. Cada segundo residuo de N-acetilmanosamina transporta un ceto-piruvato, lo que provee a la cadena de una carga negativa (Ilk *et al*, 1999).

En cuanto a la S-layer de las cepas JG-A12 y NCTC 9602, se ha visto que ambas conforman una capa S con simetría cuadrada, y su peso molecular es de 127 kDa. Contienen un péptido señal de 31 aa, responsable de la secreción a superficie. El extremo N-terminal es muy similar entre sí, con tres dominios SLH. La parte central de ambas es altamente homóloga tanto entre ellas como a las S-layer de cepas CCM 2177 y P-1. Sin embargo, la porción carboxi-terminal es muy diferente. La S-layer de la cepa JG-A12 comparte homología con la CCM 2177. Tanto en JG-A12 como en NCTC 9602, los genes cromosómicos están seguidos de elementos de inserción que comprenden tres ORFs, que codificarían para una probable transposasa, integrasa/recombinasa y una proteína que contiene un motivo de unión al ADN de tipo hélice-vuelta-hélice y una copia del gen tipo S-layer *sIIA* (9602) o *sIIB* (JG-A12). En ambas cepas se halló un gen silente codificado en el plásmido con la misma secuencia de los genes cromosómicos. La estructura primaria es casi idéntica en ambas cepas. La parte N-terminal comparte identidad con la S-layer funcional cromosómica. La secuencia C-terminal es muy distinta, lo que sugiere que los genes evolucionaron por transferencia horizontal de información genética por rearrreglos de ADN mediado por elementos móviles (Pollmann *et al*, 2005).

### **Aplicaciones nanobiotecnológicas**

La expresión a nivel de superficie celular de enzimas o epítopes requiere asociarles un sistema de transporte hacia el exterior celular. Las proteínas S-layers son un excelente candidato para esos fines. Para ser útil en aplicaciones nanobiotecnológicas, la S-layer

debe ser capaz de tolerar inserciones o fusiones con otras proteínas o dominios y continuar seguir reagrupándose. Hasta la fecha, hay dos estrategias para la producción de proteínas de fusión S-layer con importancia nanobiotecnológica: la expresión homóloga y la secreción por células o producción dentro de un organismo huésped (Ilk *et al*, 2011). La mayor ventaja de realizar ingeniería genética sobre S-layer con una aproximación nanoestructural es la periodicidad de dominios funcionales en el rango nanométrico en la superficie del entramado de S-layer y la capacidad de aplicar el principio 'S-layer tag' a casi cualquier dominio funcional. Esto permite una variabilidad dentro de los grupos funcionales que se unen con la proteína, que co-cristalizan formando el entramado característico pero ahora como proteína de fusión. Varios compañeros de fusión se han elegido para construir quimeras de S-layer.

Para generar una matriz universal para unir una amplia gama de moléculas biotiniladas (como proteínas, alérgenos, anticuerpos u oligonucleótidos), se construyeron proteínas de fusión S-layer-estreptavidina (Hubert *et al*, 2006).

Se ha trabajado tratando de desarrollar sensores utilizando la proteína S-layer como sistema de detección. En técnicas de SPR (surface plasmon resonance) se probó utilizar quimeras de S-layer como superficie de contacto (Pleschberger *et al*, 2004).

La incorporación de péptidos o dominios funcionales bien conocidos en regiones hidrofílicas de estas proteínas ha sido realizada con éxito por distintos grupos (Fouet *et al*, 1999, Mesnage *et al*, 1999, Vollenkle *et al*, 2004; Scheppler, 2002). Estas construcciones permitirían el desarrollo de nuevos tipos de diagnóstico o de vacunas. Debido a sus propiedades intrínsecas como adyuvante y su capacidad para expresar epitopes, las S-layer son excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas, utilizándolas como carriers. Dominios SLH de estas proteínas son suficientes para anclar enzimas o péptidos a las superficies celulares sobre la pared de la célula. Los determinantes expuestos conservan la antigenicidad e incluso la actividad enzimática. Utilizando el fragmento C de la toxina del tétanos (ToxC) de *Clostridium tetani* como antígeno heterólogo modelo posibilitó extender este sistema para propósitos de vacunación. El sistema de expresión válido para propósitos médicos y veterinarios permite alta protección (el 85%) después de solamente dos inmunizaciones y la protección máxima después de tres inmunizaciones lo que es comparable a los obtenidos con otras bacterias recombinantes vivas que expresan ToxC (Mesnage *et al* 1999). También el grupo de Mesnage expresó la Levano sacarasa (SacB) de *Bacillus subtilis* en la S-layer de *B. anthracis* (Mesnage *et al*, 2000)

Para desarrollo de dispositivos inmovilizados con objetivo de biocatálisis también la proteína fue considerada. Las ventajas son su estabilidad y posibilidad de almacenamiento y su propiedad de ser reutilizada. Las proteínas de fusión S-layer/enzima con las que se consiguió este propósito fueron proteínas de la familia *Bacillaceae* y enzimas de ambientes extremos (extremozimas). La enzima b-1,3-endoglucanasa LamA de la bacteria extremófila *Pyrococcus furiosus* fue fusionada en el extremo carboxiterminal de la proteína SbpA<sub>31-1068</sub> de *B. sphaericus* CCM 2177 (Tschiggerl *et al*, 2008).

Actualmente se están realizando estudios para construir con la proteína biomarcadores fluorescentes (Kainz *et al*, 2010). Se diseñaron cuatro proteínas de fusión SgsE de *G. stearothermophilus* NRS 2004/3a acarreando tres mutantes distintas de GFP y la proteína roja fluorescente mRFP1. El grupo de trabajo consiguió construir una proteína S-layer bifuncional en tandem (ECFP-SgsE-YFP) que podía autoensamblarse en soporte sólidos sin perder funcionalidad. Este resultado permite pensar en superficies bifuncionales para futuras aplicaciones en nanobiotecnología, como indicadores de pH o marcadores fluorescentes para sistemas de distribución de drogas.

S-layers representan un sistema muy versátil de autoensamblado, que puede ser explotado estructuralmente para construir kits que involucren las principales biomoléculas.

## **Actividad Insecticida de *Bacillus sphaericus***

### ***B. sphaericus* como bioinsecticida**

El primer aislamiento de una cepa de *B. sphaericus* con actividad mosquitocida fue realizado de una larva de mosquito moribunda, sin embargo la actividad era tan baja que su uso para control de mosquitos no fue considerado (Kellen *et al*, 1965). Recién con el aislamiento de la cepa 1593, con alta actividad contra larvas, es que se consideró a *B. sphaericus* como agente para el control biológico de mosquitos que transmiten enfermedades con alto impacto en humanos y animales (Singer 1973).

*B. sphaericus* actúa contra larvas de los géneros *Culex* y *Anopheles* (Singer 1973; de Barjac *et al*, 1985; Lacey y Undeen 1986) mientras que *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* actúa contra los géneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* y *Simulium* (Krywienczyk 1978; Lacey

y Undeen 1984; Lacey y Singer, 1982). Dichos insectos son los vectores responsables de la transmisión de diversas enfermedades como por ejemplo: malaria (*Anopheles*), fiebre amarilla (*Aedes*), filariasis linfática (*Culex*, *Anopheles* y *Aedes*) y dengue (*Aedes*) (Porter 1996).

El uso de pesticidas como el diclorodifenilcloroetano (DDT), malathion y otros productos químicos, al igual que la utilización de barreras físicas, han sido los métodos de elección para el control de estos mosquitos. Sin embargo los fenómenos de resistencia observados hacia estos productos químicos y sus efectos tóxicos para el hombre y los animales debido a su acumulación en el medio ambiente favorecieron la implementación de un método de control biológico de estos insectos con un menor impacto ambiental (O.M.S. 1986a, b, c; Yousten 1984b; Porter *et al.*, 1993). Por estos motivos preparados de *B. sphaericus* y *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* (esporas con cristales tóxicos) son utilizados como bioinsecticidas. En este último microorganismo los componentes activos son cuatro proteínas Cry (proteínas del Cristal) y dos proteínas citolíticas (las Cyt). Con *Bti* se han desarrollado la mayor parte de las formulaciones de control biológico (Zhang *et al.*, 2010).

Con estos preparados se presentan otros tipos de dificultades: rango de especificidad muy acotado, baja persistencia de los mismos en los sitios de diseminación, problemas de flotabilidad en medios acuáticos (el complejo espora-cristal decanta rápidamente mientras que las larvas se alimentan en la superficie) y alta sensibilidad a condiciones de estrés de la espora-cristal y células vegetativas (por ejemplo: radiación UV). Es por estos motivos que se hace necesaria la realización de diseminaciones periódicas (Davidson *et al.*, 1984; Ohana *et al.*, 1987; Porter 1996). *B. sphaericus*, sin embargo, posee la ventaja de mayor persistencia en aguas poluidas y mayor resistencia a luz UV que *B. thuringiensis* subesp. *israelensis* además de poder reciclarse en los cadáveres de las larvas (Porter 1996).

Recientemente la emergencia de resistencia a la toxina cristal de *B. sphaericus* ha sido analizada en casos de resistencia seleccionados en condiciones de laboratorio y en condiciones de campo. El mecanismo de resistencia aparentemente es distinto en ambos casos: en los casos de resistencia observados en laboratorios es la funcionalidad del receptor la que está involucrada debido a la alta presión de selección mientras que en los casos de resistencia en campo el receptor sería funcional. Cuando los tratamientos en campo son suspendidos esta resistencia declina rápidamente (Charles *et al.*, 1996).

Varios laboratorios están llevando a cabo distintas estrategias para tratar de mejorar las condiciones para el uso de esta especie como agente bioinsecticida. La utilización de cepas de *B. sphaericus* que pertenecen a diferentes serotipos y/o poseen secuencias de

las toxinas del cristal distintas de las cepas comerciales evitaría o disminuiría la aparición de resistencia; otra alternativa es la posibilidad de expresar las toxinas Mtx durante la esporulación. Con el objetivo de ampliar el rango de acción contra otras especies de mosquitos se han clonado e introducido en *B. sphaericus* los genes de las toxinas de *Bti* (Servant *et al*, 1999). Para evitar los problemas de flotabilidad se han expresado los genes de las toxinas en cianobacterias, estas bacterias se reproducen en este habitat natural a diferencia de las esporas que necesitan de larvas ricas en proteínas para su germinación y permanencia en el campo. Unos de los primeros trabajos en los que se reportó el clonado de genes relacionados a la actividad tóxica fue el de Tandeau de Marsac y colaboradores en 1987, que trabajaron clonando un fragmento de 3.6 kb proveniente de *Bacillus sphaericus* 1593M en *Escherichia coli* y *B. subtilis* y en la cianobacteria *Anacystis nidulans* R2. El nivel de toxicidad frente a mosquitos del género *Culex* fue el mismo en *Escherichia coli* que en la cianobacteria.

Los genes que codifican para las toxinas binarias de *Bacillus sphaericus* 2362 se clonaron exitosamente en la cianobacteria *Synechococcus* PCC6301, que puede servir de alimento para las larvas. La toxicidad alcanzada contra larvas de *Culex quinquefasciatus* fue de una  $CL_{50}$  2,1.  $10^5$  células por ml al segundo día. Sin embargo, en ausencia de selección, la actividad mosquitocida descendió considerablemente (más de diez veces) al cabo de veinte generaciones (Sangthongpitag *et al*, 1997).

### **Bioquímica y genética de las toxinas de *B. sphaericus*.**

Durante la esporulación *Bacillus sphaericus* produce inclusiones cristalinas conocidas como las toxinas binarias, que son patogénicas para algunas larvas de mosquitos. De este modo, se ha utilizado a esta especie bacteriana como un biopesticida para el control de poblaciones de mosquitos vectores de enfermedades como malaria, filariasis, dengue, encefalitis, fiebre de Nilo.

La actividad larvicida de *B. sphaericus* es alta contra larvas de mosquitos de los géneros *Culex* y *Anopheles* y bastante menor o inexistente contra *Aedes*. A su vez dentro de cada género la susceptibilidad es variable como también es variable la toxicidad entre los serotipos en los que están divididas las cepas entomopatógenas (Baumann *et al*, 1991; Porter *et al*, 1993; Charles *et al*, 1996).

Las principales toxinas que intervienen en esta función son las proteínas Mtx (*mosquitocidal toxins*) y las toxinas binarias (Bin), que forman el cristal. Estas toxinas difieren tanto en su composición como en su ubicación y en el momento en que son sintetizadas. Las toxinas binarias se producen durante la esporulación en inclusiones cristalinas paraesporales en cepas altamente tóxicas, mientras que las proteínas Mtx (Mtx, Mtx2 y Mtx3) son sintetizadas durante la fase vegetativa tanto en cepas con baja actividad como en cepas con alta actividad larvívica (Priest *et al*, 1997).

### **Toxinas del cristal**

Las toxinas del cristal (o toxina binaria) están compuestas por dos proteínas que son sintetizadas en cantidades equimolares y ensambladas en una estructura que es visible en el estadio III del proceso de esporulación (Baumann and Baumann 1989). Estas proteínas son designadas como P42 (Bin A) y P51 (Bin B) debido a que el peso molecular (PM) de las mismas es de 51,4 y 41,9 kiloDaltons (kDa). Los genes que codifican estas proteínas fueron clonados y secuenciados en distintas cepas altamente tóxicas. Los mismos están organizados en un operón con una región intergénica de 174-176 pares de bases (pb) y un terminador de la transcripción río abajo del gen Bin A (Baumann *et al*, 1988). Un análisis de la región promotora no revela ninguna secuencia similar a los promotores de esporulación presentes en *Bacillus subtilis*, sin embargo estudios en *B. subtilis* y fusiones con *lacZ* en *B. sphaericus* demuestran que son expresados durante el proceso de esporulación (Baumann y Baumann 1989; Ahmed *et al*, 1995).

Los genes están presentes en todas las cepas altamente tóxicas, sin embargo también se encuentran en cepas moderadamente tóxicas (Aquino de Muro *et al*, 1992). En la cepa C3-41 se encuentran localizados en un fragmento de 35kb presente en el cromosoma y en el plásmido junto con genes homólogos de Mtx2-3 y con características de unión a quitina (Hu *et al*, 2008). Las secuencias de aminoácidos no son similares a ninguna otra toxina bacteriana, pero entre ellas poseen segmentos con similitud (Baumann *et al*, 1988).

Ambas proteínas son necesarias en cantidades equimolares para una actividad completa de esta toxina. Además forman polímeros mixtos tóxicos (Smith *et al*, 2005) (Figura 7).

Mientras que Bin B no tiene actividad larvicida por sí sola, Bin A tiene esta actividad pero la misma es menor que la del cristal completo (Nicolas *et al*, 1993). La proteína Bin B es la responsable de la unión de la toxina a un receptor altamente específico de 60 kDa  $\alpha$ -glucosidasa (Cpm1) en la superficie de las células epiteliales del intestino medio de la larva mientras que Bin A sería el componente tóxico que ejerce su acción por mecanismos desconocidos. (Charles *et al*, 1996; Silva-Filha *et al*, 1999 ; Darboux *et al*, 2001).



Figura 7: Fotografía electrónica de células esporuladas de *Lysinibacillus sphaericus*. Las pequeñas inclusiones negras señaladas por flechas están compuestas por las proteínas BinA y BinB. (Imagen de Dr. J.-F. Charles, desde Berry 2011)

Luego de su ingestión, el complejo spora-cristal se disuelve en el lumen del estómago de la larva por la acción combinada de proteasas y el alto pH (Charles, 1987). Ambas proteínas son procesadas en el ambiente alcalino del intestino a proteínas más estables de menor PM, así la Bin A es procesada a un derivado de 39 kDa mientras que Bin B es procesada a 43kDa (Broadwell y Baumann 1987). Se observan alteraciones en el intestino medio a los 15 minutos de la ingesta y en general los síntomas de la intoxicación difieren entre las distintas especies de mosquitos. En *Cx. pipiens* se observan grandes vacuolas y mitocondrias hinchadas, mientras que en *Anopheles stephensi* aparecen grandes áreas densas al microscopio electrónico (Charles 1987; Davidson *et al*, 1987; Charles *et al*, 1996).

El principal problema para comprender el mecanismo de acción es la falta de información estructural de ambas proteínas binarias. Estas fueron clonadas en *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*, pero la expresión ocurrió en

cuerpos de inclusión. Recientemente se ha logrado clonar y expresar la forma soluble y activa de las toxinas binarias (Srisucharitpanit *et al*, 2012).

### **Toxinas Mtx**

Hasta el momento se han descrito 4 tipos de toxinas Mtx: Mtx, Mtx2, Mtx3 y Mtx4 con un PM de 100, 31,8 y 35,8 kDa respectivamente (Thanabalu *et al*, 1991; Thanabalu and Porter 1996; Liu *et al*, 1996). Existen dos familias: la de las proteínas Mtx1 y la de las Mtx2 (incluye a la Mtx2, 3 y 4). Estas proteínas son sintetizadas durante la fase vegetativa de crecimiento y los respectivos genes han sido detectados y/o secuenciados de cepas con baja o alta toxicidad. La localización de la Mtx1 es en envoltura. Ninguna de ellas tiene similitud a las toxinas cristal de *B. thuringiensis*, sin embargo un fragmento de 27 kDa de Mtx tiene similitud a varias toxinas con actividad ADP-ribosilantes (Thanabalu *et al*, 1991), mientras que las proteínas Mtx2 y Mtx3 tienen similitud a dos toxinas activas contra células de mamíferos como son la  $\epsilon$ -toxina de *Clostridium perfringens* y una citotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (Thanabalu and Porter 1996; Liu *et al*, 1996). La proteína Mtx4 ha sido caracterizada recientemente, luego de secuenciar la cepa de *Bacillus sphaericus* C3-41. Aparentemente es un pseudogen perteneciente a la familia de la Mtx2. Es probable que las Mtx se hayan originado por duplicación de los genes de estas familias (Berry, 2012).

La proteína Mtx1 es tan tóxica como la proteína cristal y puede ser procesada en el intestino por proteasas a derivados de 27 y 70 kDa siendo ambos fragmentos necesarios para una total actividad de la toxina.

Si bien el mecanismo de acción de las toxinas de *C. perfringens* y *P. aeruginosa* no se conoce, se cree que forman poros en las membranas de las células susceptibles. Es por ello que se ha postulado un mecanismo de acción similar para las proteínas Mtx2 y Mtx3 (Thanabalu y Porter 1996; Liu *et al*, 1996).

Debido a su bajo nivel de expresión y la susceptibilidad a proteasas llamadas “sphericasas”, Mtx1 y Mtx2 no contribuyen a la toxicidad en las formulaciones utilizadas en los programas de control de plagas (Yang *et al*, 2007). Sin embargo estas toxinas ejercen su mecanismo de acción diferente al de las Bin y son activas frente a *Aedes*. La principal limitación es que son degradadas durante el proceso de esporulación por las numerosas proteasas presentes en ese momento, lo que condujo al grupo de

Berry (2007) a intentar expresarla construyendo un recombinante con un promotor de esporulación de Mtx; sin embargo esta proteína sigue siendo degradada.

### **Toxinas Cry48 y Cry49**

Luego del muy buen desempeño de formulaciones anti mosquitos en el campo, los insectos blanco desarrollaron resistencia a las Bin. Existen cepas que se han sobrepuesto a esta resistencia con la producción de proteínas del cristal extra durante la esporulación. El análisis de éstas reveló la presencia de un sistema de toxinas de dos componentes. (Jones *et al*, 2007). Uno de los componentes es la proteína Cry48, que está relacionada con las toxinas Cry de *B. thuringiensis*. La segunda es la proteína Cry49 que es miembro de la familia de las toxinas Bin. Ninguno de los dos componentes es tóxico *per se* pero en combinación ejercen altos niveles de patogenicidad frente a larvas de *Culex*, y restringido sólo a este género (Jones *et al*, 2008). El análisis de los efectos de Cry48/Cry49 en *Culex* mostró cambios morfológicos en las células blanco que imitan la acción sinérgica de las Bin y Cry11 de *B. thuringiensis*, típicos de intoxicación por Bin (vacuolización citoplasmática, fragmentación del retículo endoplasmático) y algunos de la actividad de Cry (aumento del tamaño mitocondrial) (de Melo *et al*, 2009). Hasta el momento los roles de cada uno de los componentes no han sido determinados. La toxicidad es bastante alta, sin embargo está limitada a la baja producción de Cry48 (Berry, 2012).

### ***Bacillus* y Biorremediación**

#### **Biorremediación**

El consumo de metales y químicos durante los procesos industriales se ha incrementado dramáticamente en los últimos años. El uso industrial de metales con diversos fines tanto como parte de procesos de extracción así como de catálisis, ha generado una gran cantidad de efluentes acuosos que contienen niveles altos de metales pesados. Estos metales de potencial toxicidad incluyen cadmio, cromo, cobalto, cobre, hierro, magnesio, níquel, plata, molibdeno y zinc. Los efluentes industriales contaminados liberados a plantas de tratamiento de efluentes pueden dejar grandes concentraciones de

metales en barros activados. Las poblaciones microbianas de ambientes contaminados contienen microorganismos que se han adaptado a concentraciones tóxicas, volviéndose resistentes a los metales en cuestión (Kasan *et al*, 1989).

Algunos de los metales son esenciales y son requeridos por los organismos como micronutrientes (cobalto, cromo, níquel, hierro, magnesio, etc.), sin embargo otros no poseen ningún rol en los procesos biológicos de los organismos, y además resultan tóxicos aún en bajas concentraciones (cadmio, mercurio, plomo, etc.). De todas formas a concentraciones altas, ambos tipos de metales, esenciales y no esenciales se vuelven tóxicos para los organismos. Los recursos naturales así como los recursos antropogénicos en ocasiones se hallan contaminados con estos metales, poniendo en peligro la salud de los organismos. Tanto cadmio como plomo y zinc son liberados al ambiente (Rathnayake *et al*, 2009). Los compuestos derivados del cadmio son importantes contaminantes ambientales que afectan tanto células eucariotas como procariontas. Las principales fuentes humanas de cadmio son los fertilizantes, el uso de combustibles fósiles y las industrias del hierro y del acero. El ochenta por ciento de la industria del cadmio se dedica a la fabricación de baterías recargables. Las baterías de níquel-cadmio tienen numerosas aplicaciones hogareñas e industriales. Se obtiene como un subproducto de la industria del zinc y también se lo emplea para fabricar componentes electrónicos, para proteger de la corrosión a otros metales y para estabilizar plásticos, ya que absorbe la luz UV que los degrada. Una vez que se libera al ambiente, se acumula en los seres vivos. Algunos vegetales lo absorben fácilmente del suelo, dando lugar al proceso de bioacumulación (la incorporación de algunos de estos metales dentro de la cadena alimentaria) lo que agrava el problema. En reacciones fisiológicas catalíticas relevantes, algunas enzimas requieren iones metálicos como átomos centrales. Para obtener energía, muchos microorganismos dependen de compuestos metálicos que actúan como aceptores finales de electrones durante la respiración anaeróbica y como donantes de electrones en el metabolismo quimiolitotrófico. Los iones metálicos a concentraciones altas, en general, perjudican a las células vivas desplazando potencialmente los iones metálicos esenciales, dañando las membranas celulares, alterando a estructura del ADN, compitiendo con compuestos no metálicos estructuralmente relacionados en las reacciones celulares y bloqueando grupos funcionales en las biomoléculas (Mendoza-Cozatl *et al*, 2005). Sin embargo, los organismos han desarrollado diversos mecanismos de homeostasis con metales y estrategias de detoxificación, que incluyen sistemas de transporte activo, cambios en la

permeabilidad de la membrana, adsorción, asociación intra y extra celular, biotransformación y compartimentalización (Bruins *et al*, 2000), en respuesta a la presión de selección proveniente del crecimiento en el ambiente afectado.

Las bacterias juegan un rol importante en la movilidad de los metales, han sido objeto de numerosos estudios por su participación en los ciclos biogeoquímicos de los elementos esenciales para la vida (C, N, P y S), así como por su capacidad para transformar compuestos no esenciales, que eventualmente pueden volverse tóxicos para el ambiente. Como consecuencia de su pequeño tamaño, sus actividades metabólicas diversas, la alta capacidad de reproducción y de adquirir o mutar genes, las bacterias son capaces de interactuar con los iones metálicos presentes en su ambiente. Su interacción con los iones metálicos presenta una gran relevancia en el campo de la biorremediación. Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

### **Bacterias y metales**

Las interacciones entre las bacterias y los metales pueden ocurrir a nivel extracelular, en superficie bacteriana o intracelularmente. A nivel extracelular, se ha determinado el papel de los microorganismos en la movilización e inmovilización de metales así como la secreción de compuestos orgánicos de bajo peso molecular con alta afinidad por estos elementos. Las interacciones con la superficie celular varían con el tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente en cada uno de ellos. A nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones enzimáticas o la síntesis de proteínas específicas. Además, existen bacterias con capacidad de utilizar los metales como fuente de energía.

Las principales interacciones extracelulares entre bacterias y metales son la movilización e inmovilización de éstos, la producción de polímeros extracelulares y la liberación de sideróforos. Dentro de los procesos de inmovilización descritos se encuentra la bioadsorción, que es la propiedad de la biomasa microbiana de inmovilizar y concentrar metales en soluciones acuosas en su superficie (López *et al*, 2000).

La alternativa de la utilización de microorganismos para la remoción y recuperación de metales tóxicos provenientes de efluentes industriales puede ser un método económico y

efectivo (Leung *et al*, 2000). La solubilización provee una vía para la remoción de metales de suelos, sedimentos y desechos industriales. El proceso de inmovilización permite la transformación de metales *in situ* en formas químicas inertes e insolubles y resulta prácticamente aplicable a la remoción de metales de fases acuosas (Merroun *et al*, 2005).

Los componentes de la membrana celular que actúan como bioadsorbentes son polímeros estructurales y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales, que interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura. Los polímeros extracelulares están compuestos principalmente por polisacáridos, aunque también pueden contener proteínas y sus interacciones con los iones metálicos son consecuencia directa de la presencia de grupos funcionales cargados negativamente en su estructura (Suárez *et al*, 2002).

En ecosistemas contaminados se han hallado numerosas especies de *Bacillus* resistentes a diversos metales pesados. Se han aislado cepas de *B. thuringiensis* y de *Paenibacillus sp.* tolerantes a cadmio, cobre y zinc, de suelos contaminados (Prado Acosta *et al*, 2005; Rathnayake *et al*, 2009). También se vio adsorción de cadmio, plomo y cobre en la superficie celular de *B. subtilis* y *B. licheniformis*, cuya adsorción se vio modificada por las variaciones de los iones en solución (Daughney *et al*, 1997).

La interacción inicial entre los microorganismos y los metales ocurre por atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular bacteriana. En las bacterias Gram positivas, la pared celular constituye la primera instancia de interacción con las moléculas presentes en el ambiente. Las especies Gram positivas presentan una pared celular cargada negativamente, dependiendo del medio, y contiene cargas positivas pero en menor proporción. Los sitios aniónicos los conforman el carboxilato del peptidoglicano y el fosfato del ácido teicoico. Los sitios catiónicos son los grupos amonio de la D-alanina (ácido teicoico), los grupos amino de los azúcares (glicanos) y del ácido diaminopimélico (porción peptídica del peptidoglicano). Estos grupos son las porciones iónicas que sirven de mediadoras entre la pared celular y los iones metálicos. Los cationes necesarios para las funciones proteicas o la actividad enzimática deben atravesar la pared celular de las bacterias Gram-positivas para alcanzar sus sitios de unión cerca de la membrana o en el citoplasma. El peptidoglicano es el componente que se une con mayor significancia a los iones metálicos por los grupos carboxilo, es por esto que las bacterias Gram positivas tienen mayor capacidad de unir especies metálicas que las bacterias Gram

negativas, debido a sus diferencias en la composición estructural de la superficie celular (Suárez *et al*, 2002).

¿Qué factores podrían afectar la adsorción? Varios estudios realizados han demostrado que determinados factores tales como las condiciones de crecimiento, la temperatura, el pH y la cepa bacteriana, pueden alterar la química de la superficie celular y consecuentemente el fenómeno de adsorción de metales. Un factor adicional es la presencia de polímeros extracelulares en la envoltura. Éstos modifican la adsorción en *Bacillus licheniformis* (Tourney *et al*, 2009). Las paredes celulares bacterianas, cargadas negativamente bajo condiciones de pH ácido, presentan una afinidad alta por iones metálicos en solución. En estas condiciones, la concentración de sitios aminoacídicos cargados negativamente es igual a la concentración de aquellos cargados positivamente, siendo la carga neta de la superficie celular igual a cero. A medida que se incrementa el pH más allá del punto isoeléctrico, los grupos funcionales ácidos de la pared se desprotonan progresivamente generando una superficie de carga negativa en la pared celular y consecuentemente un potencial electronegativo en la envoltura celular (Merroum, *et al* 2005). En *B. subtilis*, se ha observado que cambios en el pH del medio, producen variaciones en la capacidad de adsorción de cadmio (Boyanov *et al*, 2003). Se ha reportado que a bajo pH, mientras que el uranio se une a grupos fosfato, el cadmio se une a grupos carboxilo (Kelly *et al*, 2001).

### **S-layer y metales**

Numerosos estudios han examinado la interacción entre los iones metálicos y la pared celular en bacterias Gram positivas, particularmente en aquellas del género *Bacillus*. Se han centrado en los sitios carboxilos dentro del peptidoglicano y los grupos fosfato del ácido teicoico y de otros polímeros secundarios. La pared celular puede estar recubierta por un gran número de estructuras de superficie que interactúan con iones metálicos (exopolisacáridos o EPS y S-layer etc.). En el laboratorio, en el que se desarrolló este trabajo, se mostró que una cepa de *Paenibacillus polymyxa* presenta una alta capacidad de bioadsorción de cobre gracias a la producción de una gruesa capa de EPS (Prado Acosta *et al*, 2005). Las proteínas S-layer podrían unir selectiva y reversiblemente grandes cantidades de metales, funcionando probablemente como una barrera frente a la contaminación de los metales pesados en el ambiente. Las S-layer constituyen un

entramado poroso, cubriendo completamente la superficie celular, que podrían funcionar como un tamiz molecular o una cubierta protectora. Debido a la habilidad de las S-layer de auto ensamblarse y reemplazarse continuamente en la superficie celular, se puede asociar este comportamiento a una función protectora contra diversos metales. Además, la saturación con metales puede dar lugar a la desarreglo del entramado de S-layer, el cual es reemplazado con la síntesis de nuevos monómeros.

Se ha descrito la captación de metales por cepas de *Bacillus sp* de forma selectiva y reversible. *Bacillus sphaericus* JG-A12, aislada de un sitio de minas de uranio, posee una S-layer que difiere significativamente en su estructura primaria de otras S-layer de *B. sphaericus*. Posee seis veces más fósforo que la S-layer de la cepa de referencia de *B. sphaericus* NTC 9602 (Merroum *et al*, 2005). Esta podría poseer una función protectora de la célula, previendo que ésta tome metales del ambiente (Fahmy *et al*, 2006). Se ha demostrado que esta cepa acumula el uranio en la envoltura celular. La superficie celular de esta bacteria es capaz de unir uranio así como otros iones metálicos (cobre, plomo, aluminio y cadmio). Esta adsorción como método de inmovilización posee una relevancia significativa para la biorremediación de aguas contaminadas con uranio. Otro fenómeno similar se observó en otra cepa de *B. sphaericus*, cepa JG-7B. En *Pseudomonas fluorescens* se encontró uranio unido en la totalidad de la envoltura externa de la célula, asociada a peptidoglicanos (Merroum *et al*, 2005).

Se han reportado otras bacterias Gram positivas, termófilas como *Geobacillus stearothermophilus* y *G. thermocautenulatus*, que presentan una tolerancia alta a cadmio, por adsorción del ion en la superficie celular (Hetzer *et al*, 2006). Estas cepas también poseen S-layer en su envoltura.

## **Estrés osmótico**

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

Al aumentar la concentración osmótica, el agua del interior celular fluirá al exterior hasta que la actividad del agua interior se equipare con la del exterior, esto ocasionará disminución de la presión de turgencia y del volumen citoplasmático y aumentará la concentración intracelular de solutos. A la inversa, en un ambiente hipotónico, el agua

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

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

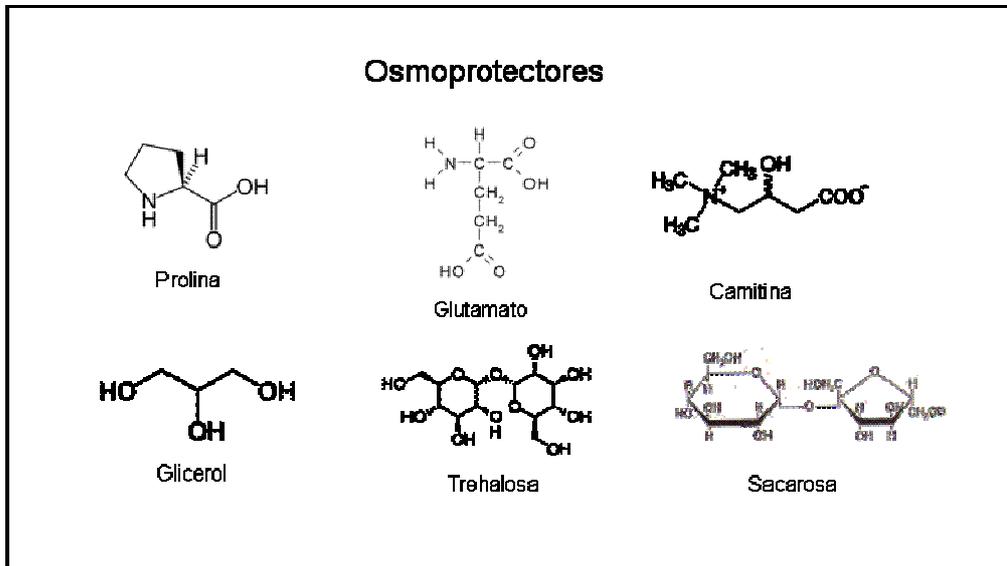


Figura 8: Osmoprotectores de uso más frecuentes en microorganismos

Las bacterias Gram positivas tienen mayor osmotolerancia. La envoltura bacteriana constituye la primera barrera en detectar los cambios ambientales y se debería a su particular estructura y composición. En medios hiperosmóticos, los cultivos de *B.*

*subtilis* presentan un fenotipo no esporulante, una extensa filamentación (Ruzal y Sanchez-Rivas 1994) y sensibilidades muy diferentes hacia la acción de antibióticos que actúan a nivel de la pared bacteriana o de la membrana (López *et al*, 1998). La cardiolipina (CL), el fosfatidilglicerol (PG) y un glicolípido (diglucosildiglicérido), están involucrados en los cambios de composición que se producen a causa del estrés osmótico (Lopez *et al*, 1998, 2002, 2006).

A su vez, los cambios de composición y estructura de las envolturas interfieren en la presencia y/o actividad de proteínas, como la proteasa PrtP de *Lactobacillus* (Piuri *et al*, 2003) la proteína FtsH chaperona de proteína de membrana (de la familia de las AAA proteasas) (Deuerling *et al*, 1997) y los sensores de K<sup>+</sup> (Holtmann *et al*, 2003) o transportadores de osmoprotectores de glicinbetaína de *B. subtilis* (OpuA, B, C, D, E) (Poolman, 2002). Modificaciones post-transcripcionales como glicosilación, fosforilación, la lipidización, y/o dimerización, son cambios estructurales importantes en proteínas de membrana. Algunos de ellos son consecuencia de los cambios de composición y estructura de las envolturas, otros son necesarios a la función (sistemas de transducción de señales, marcación de proteínas para degradación, activación de transportadores, etc.) (Poolman *et al* 2004; Poolman 2002)

Tanto la síntesis del peptidoglicano como el entrecruzamiento (cross-linking) entre las cadenas polisacáridicas requieren de las PBPs (penicillin binding proteins). En nuestro laboratorio se pudo mostrar un rol importante tanto en la estructura como en la configuración (Piuri *et al* 2003, 2005).

En *Bacillus subtilis* se ha visto que las modificaciones de la pared celular para la adaptación osmótica requieren de la actividad hidrolasa de la proteína PBP 4\*. Esta Penicillin Binding Protein 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 (Piuri *et al*, 2005). Se ha observado un incremento en la lisis frente a mutanolisina tanto en células enteras como en paredes purificadas de la condición en alta sal. Se ha visto también una mayor susceptibilidad a antibióticos con blanco de acción 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 PBPs.

### **Estrés osmótico y S-layer**

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

A pesar de esto, la presencia de la S-layer, las cuales se encuentran ancladas a la membrana lipídica, el anclaje esta dado por interacciones hidrofóbicas, las porciones hidrofóbicas de las S-layer en Archaea interactúan con las moléculas lipídicas que la rodean (Peters *et al*, 1996). La transferencia de estos residuos a un ambiente acuoso, requiere de energía y esto no ocurrirá hasta que la membrana sea destruida (Jensen y Mouritsen, 2004). Esta característica no solo estabiliza a la proteína en la membrana sino que también inmoviliza a la misma membrana a la S-layer. Esto genera que en la membrana se formen subdivisiones debido al anclaje de los residuos hidrofóbicos de la S-layer. Esta subdivisión en pequeños parches, de la membrana plasmática aumenta la estabilidad de la envoltura lipídica, cuando se la compara con una estructura sin S-layer (Engelhardt *et al*, 2007), lo que confiere una mayor resistencia a los cambios de presión de agua generados durante el estrés salino. Si bien esto es una gran ayuda en las arqueas, ningún grupo ha descripto aún la importancia de la proteína S-layer frente al estrés osmótico en bacterias. También hay evidencias crecientes de bacterias que portan S-layer que expresan genes alternativos de esta proteína para adaptarse a distintos factores, como respuesta inmune, cambios drásticos en el ambiente en cepas no patogénicas o cambios en el huésped en patógenicas.

En la mayoría de los casos, el mecanismo de variación se basa en rearrreglos del ADN (Boot y Pouwels, 1996; Scholz *et al*, 2001), que incluye inversión de promotores

localizados entre dos genes de orientación opuesta, recombinación de segmentos de genes de S-layer e inversión de segmentos cromosomales que contienen dos variantes del gen orientados opuestos que da como resultado la expresión de un gen originalmente silente (Boot y Pouwels, 1996). En *Bacillus stearothermophilus* PV72 se reportó un cambio en el ordenamiento de la estructura cristalina desde hexagonal a un orden oblicuo por expresión de las proteínas SbsA y SbsB respectivamente en la envoltura por aumento en la aireación de un cultivo (Kuen *et al*, 1997). En *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 se observó un cambio en la expresión de tres proteínas S-layer en función de la condición respecto del oxígeno. Uno de los genes, *slpC*, no se expresa en las condiciones en las que fue testeado, y se cree silente. Los otros dos son *slpB* y *slpD* cuya expresión se afecta por el estatus de oxígeno en los cultivos. Bajo anaerobiosis, solamente se expresa la proteína SlpB, mientras que en aerobiosis ambos genes son transcriptos (Jakava-Viljanen *et al*, 2002).

En nuestro laboratorio se ha investigado la relación entre la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus* y el estrés osmótico y estrés ácido. Se observó que las células provenientes de condiciones de estrés aumentan notablemente la cantidad de S-layer y el índice de hidrofobicidad de los cultivos. Se estudió la expresión genética por qPCR real time (transcripción) y ensayos de Western blot (traducción) evidenciándose un aumento en la expresión tanto a nivel transcripcional como traduccional en células provenientes de cultivos crecidos en condiciones de estrés salino y ácido. La S-layer mostró ser de gran importancia para la supervivencia de la bacteria en estas condiciones de estrés (Tesis Doctoral Prado Acosta 2010, Tesis de Licenciatura Paula Ojeda, 2011).

# Objetivos

## Objetivos

### Objetivo General

Caracterizar la proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 (entomopatógeno de mosquitos) y estudiar su regulación. Profundizar en establecer el rol funcional de la S-layer estudiando la influencia de la S-layer en las respuestas a estreses ambientales y a la presencia de metales. Utilizar la S-layer tanto de cepas de *Bacillus sphaericus* como de *Bacillus thuringiensis* var *isrealensis* (BTI) en procesos de biorremediación y como proteína con acción insecticida, sola o en combinación. En este último caso se podría mejorar las preparaciones destinadas a los programas de control de mosquitos vectores de enfermedades.

### Objetivos Específicos

Las S-layers son estructuras externas de una sola especie de (glico) proteína, con grupos amino, carboxilo u oxidrilo alineados en la superficie, donde es posible un amplio espectro de modificaciones químicas. Se calcula que aproximadamente  $5 \times 10^5$  monómeros de la proteína S-layers son necesarios cubrir una célula bacilar procariótica haciéndola un excelente candidato para expresar grupos funcionales en alta densidad.

En este contexto, los objetivos planteados para esta tesis fueron los siguientes:

- 1- Caracterizar la/las proteínas S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 (cepa de referencia), cepas C7 y C11, ambas aisladas en este laboratorio. Observar la presencia de modificaciones postraduccionales.
- 2- Estudiar la regulación de la expresión y las modificaciones que ocurren en la S-layer de *Bacillus sphaericus* frente al estrés osmótico u otros estreses a fin de determinar su función.
- 3- Caracterizar la relación de la S-layer de *Bacillus sphaericus* (2362, C7 y C11) con el efecto insecticida frente a las especies de mosquitos del género *Culex* y *Aedes*.
- 4- Evaluar la utilización de cepas de *Bacillus sphaericus* como agentes de biorremediación. Determinar la relación entre la captación de metales y la presencia de S-layer.

# **Materiales y Métodos**

## Materiales y Métodos

### Cepas Utilizadas

- *Bacillus sphaericus* 2362
- *Bacillus sphaericus* Clon 7 (C7: aislamiento de una laguna de lagartos de Cuba)
- *Bacillus sphaericus* Clon 11 (C11: aislamiento de tierra de Cahuita, Costa Rica)
- *Bacillus sphaericus* 1593
- *Bacillus sphaericus* Kellen Q
- *Bacillus subtilis* YB886
- *Bacillus subtilis* 168
- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 1884
- *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* 1884 Cry-4 (CP1)
- *Escherichia coli* JM109
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

### Análisis basado en secuencias

Para predecir la estructura proteica y la funcionalidad de la S-layer y comparar con posibles proteínas ortólogas se utilizaron los siguientes sitios de acceso libre.

Links URL:

CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) (Geer *et al*, 2002)

CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) Marchler-Bauer *et al*, 2011)

Clustal-O, Global alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>)

EMBOSS Matcher Pairwise Sequence Alignment

([http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss\\_matcher&context=protein](http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_matcher&context=protein))

I-TASSER 3D structure and function prediction platform

(<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>)

MEME, Motif discovery tool (<http://meme.nbcr.net>)

PRODORIC, virtual footprint promoter matches (<http://www.prodoric.de>)

RCSB PDB Protein Comparison Tool and database  
(<http://www.rcsb.org/pdb/workbench/workbench.do>)

SABLE Solvent AccessiBiLitiEs secondary structures prediction  
(<http://sable.cchmc.org/>)

SMART, Simple modular architecture research tool ([http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do\\_annotation.pl?DOMAIN=CLECT](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=CLECT))

Specialized BLAST, Needleman-Wunsch alignment of two protein sequences  
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

STRING: functional protein association networks ([http://string-db.org/newstring.cgi/show\\_input\\_page.pl?UserId=3Teig01ic8xW&sessionId=jQUqiiTvBUG](http://string-db.org/newstring.cgi/show_input_page.pl?UserId=3Teig01ic8xW&sessionId=jQUqiiTvBUG))

## Medios de cultivo

**LB:** Extracto de levadura 5 g/L, Triptona 10 g/L, Cloruro de sodio 5 g/L

**LB Amp:** LB + 100 mg/ml ampicilina

**LB ágar:** LB + 1,5% Agar

**MRS:** Peptona de caseína 19 g/L, Extracto de levadura 4 g/L; Extracto de carne 8 g/L, D(+) Glucosa 20 g/L, Fosfato de Potasio di-básico 2 g/L, Citrato de di-Amonio 2 g/L, Tween 80 1g/L, Acetato de sodio 5 g/L, Sulfato de magnesio 0,2 g/L, Sulfato de manganeso 0,04 g/L.

**Medio de esporulación de Schaeffer:** Caldo Nutritivo 8 g/l;  $MnCl_2$  10 mM; KCl 1 g/l;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2 O$  1 M; ágar 10g/l. Se ajustó a pH 7,2 con NaOH 1N y se autoclavó 20min a 120° C, después se agregó en frío:  $Cl_2Ca$  0.5M;  $FeSO_4$   $10^{-3}M$

## Preparación de esporas

Para la obtención de esporas se cultivaron las distintas cepas de *Bacillus* por 2 ó 3 días a 32° C en medio Schaeffer sólido. Las placas fueron levantadas con 1M NaCl, y se lavaron cuatro veces en agua bidestilada. Se almacenaron a -20° C. Cuando fue necesario, las esporas se liofilizaron.

## Extracción de proteínas S-layer

Se evaluaron tres tratamientos de extracción: hidrocloreuro de guanidina 2M pH 2, o LiCl 6M ó EDTA 10 mM y 2 condiciones de cultivo (fase exponencial y estacionaria). Los cultivos fueron en LB (donde más difícilmente se forman esporas) y se cosecharon 50 ml después de 24hs (estacionaria) y de 6hs de crecimiento que se lavaron una vez con buffer PBS. Los pellets fueron sometidos a los tratamientos de extracción (hidrocloreuro de guanidina 2M pH 2, o LiCl 6M ó EDTA 10 mM) durante 30 minutos temperatura ambiente con rotación. Luego se centrifugó y el sobrenadante se dializó contra agua o contra 10 mM CaCl<sub>2</sub> a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó y el pellet conteniendo las S-layer se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,1M PMSF 1 mM. En los casos en los que se prepararon S-layer para ensayos de bioadsorción, se dializó contra agua y se resuspendió en agua MiliQ.

## Determinación de la concentración de proteínas

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

## SDS PAGE

Con el objeto de separar las proteínas según su peso molecular, se corrieron las mismas en un gel SDS-PAGE 7,5% ó 10% en buffer de corrida (Tris base 15 g/l, Glicina 72 g/l, SDS 5 g/l) con una cuba Mini-Protean® II Electrophoresis Cell (BioRad). Para esto se confeccionó un gel de 7,5%, añadiendo:

Concentrador:

Solución A (30% acrilamida 0,8% bis acrilamida).....	0.85ml
H <sub>2</sub> O.....	3.5 ml
Solución C (Tris 0,5 M a pH 6,8 con HCl).....	0.6
Solución D (20% SDS).....	25 µl
APS (10%).....	25 µl
TEMED.....	5 µl

**Separador:**

Solución A (30% acrilamida 0,8% bis acrilamida).....	2.5 ml
H <sub>2</sub> O.....	4.9 ml
Solución B (Tris 1,5 M a pH 8,8).....	2.5 ml
Solución D (20% SDS).....	50 µl
APS (10%).....	50 µl
TEMED.....	10 µl

*Soluciones:*

- Solución A: 30% acrilamida + 0,8% bis acrilamida  
 Solución B: Tris 1,5 M Ajustar a pH 8,8 con HCl  
 Solución C: Tris 0,5 M Ajustar a pH 6,8 con HCl  
 Solución D: 20% SDS

La corrida electroforética se realizó en cámara fría a 120 volts constantes durante una hora y media en buffer de corrida. Se realizó en frío para minimizar la degradación de las muestras.

*Buffer de corrida:*

- Tris 0,025 M 25 ml madre 1M (Ajustado a pH 8 con HCl)  
 Glicina 0,19 M 14.26g  
 SDS 0,1% (p/v) 5 ml madre 20%  
 Agua necesaria para 1 litro

*Loading buffer 4X:*

Tris HCl 0.2M pH=6.8	1M 0.2ml/ml
Azul de bromofenol 0,15% (p/v)	0.001g/ml
β- mercaptoetanol 20% (p/v)	[13.3µl/ml]
Glicerol 40% (v/v)	0.46/ml 87%
SDS 8% (p/v)	0.4ml/ml 20%

Coomassie blue

El gel corrido en condiciones desnaturalizantes se tiñó con solución de tinción, para visualizar las proteínas corridas.

*Solución de tinción:* Coomassie blue R-250 0,1 % (0.12g en 120ml)

En agua destilada: metanol: Ac. Acético (5: 5: 2) 50 ml H<sub>2</sub>O: 50 ml MeOH: 20 ml AcOH.

### **Western blot**

El western de las proteínas S-layer o de las esporas se ensayó con anticuerpo policlonal, perteneciente a *Bacillus sphaericus* 2362 (Lewis *et al.*, 1987).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF previamente activada con metanol (porablot PVDF, Macherey-Nagel) en buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% v/v) empleando un transfer ECL-Semi-dry Blotter, Amersham Biosciences. La electrotransferencia se realizó a 45 mA durante una hora. Luego de transferir, se lavó la membrana durante 5 minutos con PBS.

A continuación se bloqueó la membrana con 20 ml de Buffer de Bloqueo. Durante la noche (O.N.), en heladera, a 4° C. Luego se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con 20 ml de Buffer de lavado, para eliminar el remanente del buffer de bloqueo. Se incubó con 5 ml del anticuerpo anti S-layer (dilución 1:2000 en Buffer de Incubación) durante 90 minutos. Luego se lavó la membrana 5 veces durante 5 minutos cada vez, con 20 ml de Buffer de lavado. A continuación se incubó con 5 ml de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa de rabanita (Santa Cruz Biotechnology) (dilucion 1/1000 en Buffer de Incubación) durante 60 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos cada vez con 20 ml de Buffer de lavado. Posteriormente se detectó por quimioluminiscencia utilizando el reactivo ECL (Sigma) en el equipo Fuji Scanner, observando quimioluminiscencia como resultado de la hibridización del anticuerpo con

### Buffers utilizados

#### PBS 10X

0,58 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,23 g
0,17 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,35 g



repitió este paso, quedándose con la fase acuosa. Luego se agregaron 50 µl de Acetato de sodio 3M a pH 6,3 y 2 volúmenes de etanol. Se mezcló por inversión y se extrajo el ADN enrollándolo en una varilla de vidrio.

### **Extracción de ADN plasmídico de *Bacillus sphaericus***

Se lavaron las células de 2 ml de cultivo en LB con el antibiótico correspondiente en solución fisiológica. Luego se depletó de proteína S-layer con LiCl 6M durante 15 min en rotación. Luego se centrifugó a 14000 rpm y se obtuvieron de ese modo células desprovistas de S-layer. Se resuspendió el *pellet* en 0,2 ml de buffer Tris Cl 25 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; 2mM Sacarosa; RNasa A 100 µg/ml. Se agregaron 0,2 ml de buffer NaOH 200 mM; SDS 1%. Se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregaron 0,2 ml de buffer Acetato de potasio 3.0 M, pH 5,5 frío, y luego de mezclar por inversión, se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm en microcentrífuga durante 20 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionaron 0,9 ml de etanol absoluto y se dejó una hora a -20 °C. Se volvió a centrifugar durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 0,02 ml de agua deionizada.

### **Preparación de muestras para identificación MALDI-TOF**

Para el envío de las muestras a ser analizadas, se tuvo los recaudos necesarios para minimizar las contaminaciones de las muestras con keratina humana, por lo cual se trabajó con guantes sin talco todo el tiempo durante la preparación del gel, la tinción y cortado de bandas y se prepararon soluciones especialmente para espectrometría de masa (MS).

Se realizó una corrida electroforética SDS-PAGE, del mismo modo que lo explicado anteriormente, pero todas las cubas de corrida y los recipientes y frascos de preparación de soluciones fueron lavados y luego enjuagados con metanol.

Para la tinción del gel se utilizó el método de revelado por Coomassie Coloidal (G250)

Revelado de gel por Coomassie coloidal (G250):

Se siguió el protocolo que detallo a continuación:

- 1- Se fijó el gel 3x30 min en la Solución 1, con agitación moderada.
- 2- Se realizaron 3 lavados de 20 min en Solución 2, con agitación moderada.
- 3- Se descartó la Solución 2 y se agregó la Solución 3, agitando 30 min.
- 4- Se agregó al gel 1% del volumen (1 ml) de Solución 4, dejando de 24 a 72 hs en agitación.
- 5- En caso de mucha tinción, se removi6 con agua el fondo.
- 6- Se recortaron las bandas con hojas de bisturí nuevas.

Solución 1

	<u>Para 150 ml</u>
Etanol 30%	45 ml
Ác. Fosf6rico 2% (v/v)	3,5 ml
Agua	101 ml

Soluci6n 2

	<u>Para 150 ml</u>
Ác. Fosf6rico 2% (v/v)	3,5ml
Agua	147 ml

Soluci6n 3

	<u>Para 100 ml</u>
Etanol 18%	18 ml
Ác. Fosf6rico 2% (v/v)	2,35 ml
Sulfato de amonio 15% (p/v)	15g
Agua	68 ml

Se prepara: 50 ml de agua miliQ en vaso de precipitado + 2,35 ml 6cido fosf6rico (que es 85%) + 15 g de sulfato de amonio. Se deja disolver y se lleva a 82 ml en probeta, y se vuelve al vaso de precipitado y se adiciona 18 ml de etanol absoluto.

Soluci6n 4

	<u>Para 2 ml</u>
Coomassie Blue	0,04g
Agua	2 ml

Luego, las bandas a analizar se enviaron al CEQUIBIEM (Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa MALDI TOF).

**Detecci6n de Glicoproteínas con Timol-Sulfúrico**

Se sigui6 el protocolo de Gander (1984)

Los residuos hexisil, hexuronosil o pentosil reaccionan con  $H_2SO_4$  formando derivados furfurales. Estos reaccionan con Timol para dar un cromógeno. La sensibilidad: 50ng de glúcido.

1. Se lavó el gel 2 veces (1 h c/u) con isopropanol:acético: $H_2O$  (25:10:65) para fijar las proteínas.
2. Se incubó con 0.2% bromo-timol en la misma solución, (2 h).
3. Se realizó una segunda incubación en  $H_2SO_4$ :etanol absoluto (80:20) a temperatura ambiente con agitación, hasta ver desaparición de opalescencia del gel. Las zonas con glicoproteína se tiñen de rojo sobre fondo rojo mas claro, la coloración se mantiene por 1h. Luego se optó por lavar con agua el gel, que se decolora, pero se observan las bandas en amarillo claro.

### **Tinción con PRO Q® Emerald 300**

Se utilizó este kit comercial para detectar bajas concentraciones de glicoproteínas (detecta hasta 0,5 ng of glicoproteína por banda, dependiendo de la naturaleza y grado de glicosilación). Es 50 veces más sensible que el método PAS (*periodic acid-Schiff base*). La detección es posible luego de una excitación a 280-300 nm en un transiluminador UV. La emisión máxima es una señal verde fluorescente a 530 nm.

Luego de realizar un SDS-PAGE se siguieron las instrucciones del fabricante para la tinción.

### **Experimento de Autoagregación**

Se siguió el protocolo de Golowczyc *et al* (2007)

Se realizaron cultivos de *Bacillus sphaericus* 2362, *Bacillus subtilis* 168 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y se cosecharon por centrifugación en fase exponencial tardía. Se lavaron las células en buffer PBS pH 7,2 y se resuspendieron estandarizadamente a  $DO_{600}=1$  ( $1 \times 10^8$  UFC/ml) (en *Lb. acidophilus* es  $2 \times 10^8$  UFC/ml). A una fracción de cada una de las especies se les hizo un tratamiento con LiCl 6M para extraerles la capa S a las células productoras. Posteriormente se realizaron de 3 a 4 lavados con PBS para eliminar los restos de LiCl. Luego se resuspendieron a  $DO_{600}=1$ . Se midió a tiempos regulares la densidad óptica a 600 nm sin generar disturbios en las suspensiones

microbianas. Se obtuvieron los parámetros cinéticos de sedimentación. El coeficiente de agregación (CA) se calculó a tiempo  $t$  de acuerdo a Kos *et al* 2003:

$$CA_t = [1 - (DO_t/DO_i)] \times 100$$

### **Tratamiento con Tunicamicina**

*Bacillus sphaericus* fue subcultivado en caldo LB con tunicamicina (0; 0,1; 5; 10; 20  $\mu\text{g/ml}$ ) a 32° C 24 hs en condiciones aeróbicas. Luego se extrajo la S-layer y se realizó un SDS-PAGE.

### **Ensayos de estrés osmótico**

#### **Ensayos de Osmorresistencia**

*Bacillus sphaericus* fue crecido en medio líquido LB con concentraciones crecientes de NaCl (0; 0.3; 0.6y 0.7 M). Luego se incubaron a 32° C con agitación, y se monitoreó su crecimiento por DO a 600nm.

#### **Osmorresistencia y S-layer**

Se investigó el rol de de la proteína S-layer de *B. sphaericus* en el crecimiento de las células en altas concentraciones de NaCl, para esto se midió el crecimiento de las bacterias con tratamiento de LiCl, que deja a la célula sin S-layer, o sin ningún tratamiento. Luego de esto se midió el crecimiento por densidad óptica en medio LB control o con concentraciones de NaCl 0,5M y 0,7 M.

#### **Expresión de la proteína en estrés osmótico**

*B. sphaericus* se crecen en condición de estrés osmótico agregando NaCl a concentraciones finales 05 y 0.7 M. Para evaluar cuantitativamente la producción de S-

layer en cada condición de crecimiento, se analizan células enteras liofilizadas y fraccionadas en alícuotas de igual masa de peso seco, que se siembran previo hervor en buffer Laemmli 1970 en SDS-PAGE. Las S-layer se revelan en el Western blot con los antisueros mencionados revelando con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rabanita y sustrato ECL (Sigma) que produce quimioluminiscencia. Las bandas visualizadas se analizan por densitometría empleando el equipo y software Fuji LAS1000.

## **Análisis transcripcional**

### **Extracción de ARN de *Bacillus sphaericus***

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

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

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

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

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

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

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

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

## Síntesis ADNc

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

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

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

## Real Time PCR

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

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

Para realizar la cuantificación relativa de los niveles de ARNm, se realizó la reacción de PCR desde el ADNc con un volumen de 25 µl, en presencia de Sybr Green (Stratagene) como fluoróforo intercalante y se emplearon primers diseñados especialmente para utilizar en un ciclador Real Time. Las características en el diseño de los primers es tal que el producto amplificado es de entre 150 a 300 nt desde la secuencia génica y cercano al inicio de transcripción del gen y se realizó con el software Beacon Designer.

Los primers utilizados fueron:

Primer Forward *slyrt1*: 5' ATCTGCAATCGTACCTGTAGC'3

Primer Reverse *slyrt2*: 5' TGGGTTGAAGTTGCCGTTAG'3

Primer Forward *16srt1* 5'-GCGAAGGCGGCTGTCTGG-3'

Primer Reverse *16srt2* 5'-GGCACTGAAGGGCGGAAACC-3'.

Que amplifican para una región de 136 nt, del gen codificante para la S-layer (Accession number: M28361) y de 134 nt del gen *ARNr 16S* respectivamente.

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

1 ciclo: 10 min 95° C

40 ciclos: 15 seg 95° C

30 seg 50° C

20 seg 72° C

Lectura

Los cálculos iniciales del número de copias de ARNm en cada muestra se hicieron en base al método CT (“cycle threshold”, o ciclo umbral, recopilación por Dr. Margaret Hunt desde Pfaffl 2001). El CT es el número de ciclos mínimos de PCR (amplificaciones) necesarias para que el producto de la amplificación sea detectado por el equipo. Es decir, que a menor valor de CT, mayor es la concentración de sustrato original en la muestra con el que se inicia la reacción. Los valores de CT fueron normalizados empleando la amplificación del gen del ARN ribosomal 16S como control interno (denominado gen house keeping o mantenimiento). Se realizó un análisis de disociación de los productos de PCR para confirmar la especificidad de la reacción.

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

$C_T$ : n ciclos de PCR

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

$\Delta \Delta C_T$ : es la diferencia entre los promedios de  $\Delta C_T$  para el gen de interés entre la condición control (células crecidas en LB) y el promedio de los valores  $C_T$  de cada muestra tratada (células crecidas con NaCl) ( $\Delta \Delta C_T = \Delta C_T^{slp}$  de células controles -  $\Delta C_T^{16S}$  de células crecidas en NaCl)

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

## Geles de agarosa

Los geles de agarosa fueron preparados según las indicaciones de Sambrook et al., 1989. La concentración de los geles de agarosa varió entre 1% y 1.5 %, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando buffer TAE a 100 V en cubas de Bio-Rad. Como marcador de peso molecular se utilizó la escalera de 1 kb de Fermentas. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0,5  $\lambda$ g/ml) durante 15 minutos. El ADN se visualizó con un transiluminador de luz UV.

## Actividad Insecticida

Los primeros abordajes experimentales se desarrollaron con la colaboración del Grupo de Estudio de Mosquitos, del Dpto de Ecología, Genética y Evolución, de esta Facultad, quien proveyó las balsas con los huevos de *Aedes aegypti* y las larvas de *Culex*.

Para ello se trabajó con el siguiente diseño experimental: Se obtuvieron larvas de mosquitos del género *Culex* o *Aedes aegypti* en estadíos II, III y IV. En una placa de Petri conteniendo 20 ml de agua se agregaron 20 larvas de un mismo estadío por ensayo; a ella se agrega 20-50  $\mu$ l del agente larvicida para ensayar (esporas-cristal o proteínas S-layer). Se incubó a temperatura ambiente (28° C) y a las 24 h se realizó el recuento de larvas vivas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y con el respectivo control sin tratamiento. Se calculó tanto el porcentaje de mortalidad como la LC<sub>50</sub> (Concentración Letal 50: que equivale a la cantidad de la sustancia utilizada como agente tóxico, esporas-cristal o S-layer, necesaria para obtener un 50 % de mortandad en los organismos utilizados como blanco de la toxina).

## Experimentos de hemólisis en placa

Se prepararon placas de agar sangre 5%. Se sembraron preparaciones de esporas-cristal, células en fase vegetativa y S-layer purificadas. Se incubaron a 30°C durante 1, 2, 4, 6 y 16 hs para observar la actividad hemolítica tanto de las enzimas (a

tiempos cortos) como de las esporas. Se evidenció la presencia actividad hemolítica a través de la observación de un halo de degradación alrededor de la siembra de S-layer y en las colonias crecidas en el ágar.

### **Experimentos quimioluminiscentes de hemólisis cuantitativa (Luminol)**

Para hacer un análisis cuantitativo se ensayó un método indirecto para observar la actividad hemolítica de las proteínas S-layer. Se tuvo en cuenta que al lisar los glóbulos rojos, se liberan enzimas, entre ellas las peroxidasas. Al estar en solución, quedan libres para catalizar reacciones y ser medidas con algún sustrato cromogénico o luminiscentes. En este caso se utilizó luminol (ECL) como sustrato luminiscente. Se utilizó placas multiwell de 96 pocillos planos y se colocó en ellos: glóbulos rojos 5% en glicerol 15% como osmoprotector y el efector de lisis (S-layer) en distintas concentraciones. Se incubó durante una hora y luego se agregó el reactivo ECL y se midió en el equipo G-Box el desarrollo de quimioluminiscencia. Se realizó el control de lisis espontánea y se restó de la actividad de la S-layer. Para los experimentos de desplazamiento de la actividad por agregado de azúcares específicos, se agregaron cantidades crecientes de dichos azúcares teniendo la precaución de considerar restar glicerol en el caso de que sean osmoprotectores.

### **Experimentos de Bioadsorción de $\text{Cu}^{2+}$**

Se utilizó un sistema en lote por células enteras. El fundamento de este método consiste en la incubación de las células bacterianas con el metal, hasta que lleguen a un equilibrio de adsorción. Al cabo de este tiempo se mide el metal remanente en el sobrenadante. De esta forma, conociendo la concentración inicial del metal se puede determinar la cantidad de metal adsorbida por las células.

Se determinó el peso seco de los cultivos bacterianos y las esporas desde muestras liofilizadas y se calculó la relación peso seco/ $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$  para cada cepa.

Se utilizó  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma) de grado analítico y se prepararon soluciones madre de 1000 ppm en agua desionizada. Las esporas que se liofilizaron y frizaron fueron luego pesadas y alicuotadas desde 0,1 a 1 mg para resuspenderse en agua desionizada

conteniendo las soluciones con el metal ( $\text{Cu}^{2+}$  a 100 o 200 ppm), en condiciones optimizadas de pH y temperatura (pH 5 y 25° C). Luego de alcanzar el equilibrio de adsorción, se removieron las células o esporas por centrifugación (20,000  $\times$ g). El metal residual no adsorbido en el sobrenadante se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA). El metal bioadsorbido se calculó como:  $(C_i - C_f)$ , donde  $C_i$  y  $C_f$  son la concentración inicial y la concentración en el equilibrio en la solución en ppm. Los resultados siempre representan de tres a cuatro experimentos independientes.

Para los ensayos con células enteras, se realizaron cultivos en LB o MRS en fase exponencial de crecimiento, se preparó una suspensión bacteriana en solución fisiológica de peso 0,1 a 1 mg (0,2 a 2 unidades de densidad óptica a 600 nm). Se realizaron lavados intensivos en agua, para retirar la presencia de cualquier otro ión. Se agregó a una serie de tubos eppendorf 0.5 ml de la suspensión celular, junto con diferentes concentraciones iniciales de  $\text{Cu}^{2+}$  desde 25 a 200 ppm y se incubó con agitación orbital a temperatura ambiente por 17 hs, tiempo suficiente para permitir llegar al estado de equilibrio. Se determinó la concentración adsorbida como se hizo con las esporas. Se realizó cada condición por duplicado. A continuación se centrifugó durante 15 minutos a 14.000 rpm y se descartaron las células enteras, conservando el sobrenadante. Se cuantificó la concentración del metal remanente en los sobrenadantes, siendo ésta la no adsorbida por las células. La determinación de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  remanente se determinó por el método colorimétrico del ácido bicinconínico (BCA). La curva de calibración se realizó a partir de una solución patrón de  $\text{Cu}^{2+}$  1 g/L (0,015 M, 952,5 ppm). Para la confección de la curva se realizaron diluciones para cubrir concentraciones desde 2  $\mu\text{M}$  hasta 20  $\mu\text{M}$  (0,127 ppm – 1,27 ppm). A cada una de las muestras (20  $\mu\text{l}$ ) se agregaron 480  $\mu\text{l}$  de agua desionizada. Para medir se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1:1 de N, N-dimetilformamida y ácido bicinconínico, llegando a un volumen final de 1 ml. Se incubó durante 15 minutos a 37° C y se midió la absorbancia a 550nm contra un blanco (0,5 ml de agua y 0,5 ml de la mezcla de ambos reactivos).

Cuando se trabajó con la S-layer purificada, se utilizaron masas de 0,1 a 1 mg de proteína.

Se calculó el *metal uptake* o metal adsorbido como  $q=V(C_f-C_i)/W$ , donde V es el volumen de solución en el tubo, W la masa del bioadsorbente en gramos (S-layer, esporas o células enteras) y  $C_i$  y  $C_f$  la concentración inicial y en el equilibrio respectivamente del metal en la solución en ppm.

Se ensayó la influencia de otros iones metálicos a distintas concentraciones (25, 50, 100, 150, y 200 ppm) en la biadsorción de cobre (100 ppm). Para preparar las soluciones madre de 1000 ppm se utilizaron  $CdSO_4$ ,  $CaCl_2$  y  $ZnSO_4$  (Sigma) en agua desionizada.

### **Cálculo de los Parámetros de Isotermas de Bioadsorción**

Los datos de isotermas se ajustaron a la forma lineal de la ecuación del modelo de bioadsorción de Langmuir:

$C_f/q_{max}=(1/q_{max})b+C_f/q_{max}$ , donde q es la retención del metal por el bioadsorbente (mg/g),  $C_f$  es la concentración del metal en el equilibrio en la solución (ppm), y b y  $q_{max}$  son constantes empíricas de las isotermas de Langmuir, que representan la afinidad y la capacidad máxima de retención respectivamente.

# Resultados

# Capítulo 1:

**S-LAYER DE *Bacillus sphaericus* 2362:**

**ANÁLISIS *in silico* DE SU  
ESTRUCTURA Y PURIFICACIÓN**

## S-LAYER DE *Bacillus sphaericus* 2362: ANÁLISIS *in silico* DE SU ESTRUCTURA Y PURIFICACIÓN

El análisis estructural de S-layer de varias cepas de *B. sphaericus* ha sido descrito, sin embargo la estructura cristalina no ha sido aún establecida. Se sabe poco de su anclaje a la pared y de las modificaciones de su estructura en función de las condiciones ambientales o funciones. Contamos con la secuencia de varias Slp (“*S-layer protein*”) lo que nos permitió efectuar un análisis *in silico* de la proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 (*slpC*) a fin de caracterizar su posible estructura y luego de la puesta a punto de su purificación, analizar la estructura y sus posibles modificaciones post-traduccionales así como las variaciones de la misma frente al estrés (osmótico).

En la siguiente imagen se muestra una fotografía de un cultivo en el cual se distingue la capa de S-layer rodeando a toda la célula bacilar procariota.

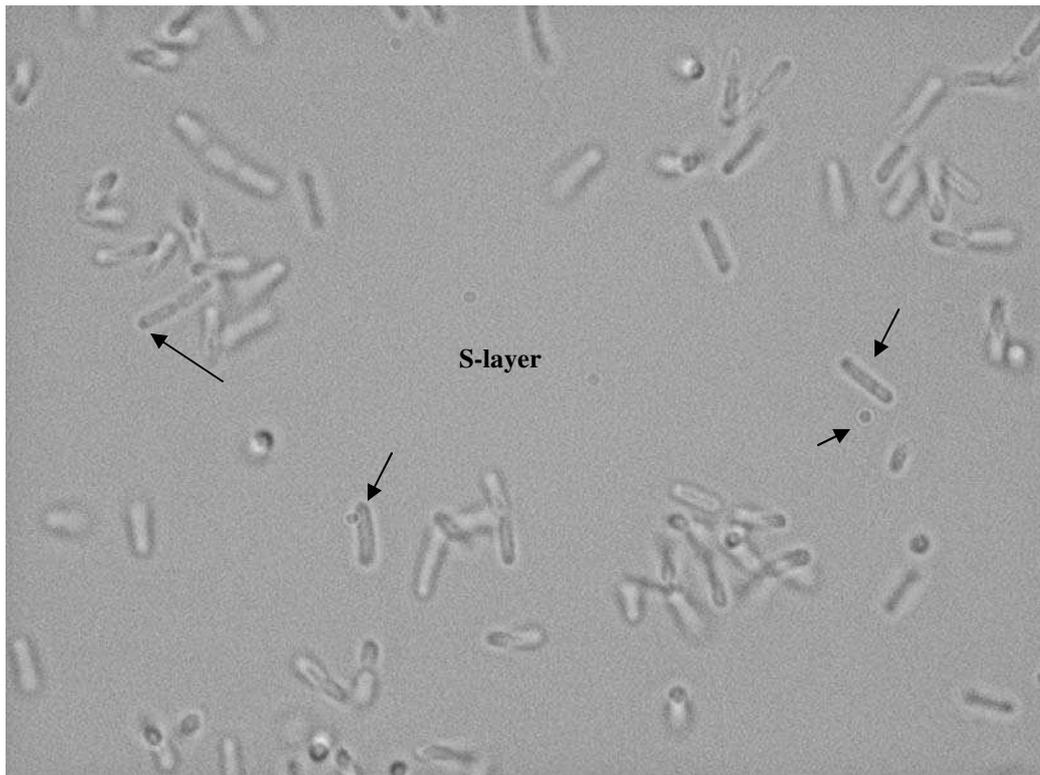


Figura 9: Microscopía de *Bacillus sphaericus* 2362. Las flechas indican células en las cuales puede apreciarse la proteína S-layer conformando el entramado característico en su envoltura (Olympus BX51 microscope, 1000X).

## A) Análisis *in silico* de la secuencia nucleotídica

Analizamos la secuencia nucleotídica codificante para la proteína S-layer (*slp*) de la cepa 2362 (M28361).

```

cttactagaatggtattctactactcattttcttagtaactttactaagaaaatttgctttagtttgaattattcgagaaagctataa
tacatataatttaggcaactaattatggtggtactatagttttcgttggaataatcaatttttaggaatattaggggggaataaatt
aATGgcaaagcaaaacaaaggccgttaagttcttcgcggcatcagcaacagctgcattagttgcatctgcaatcgtacctgtagcatct
gctgcacaattaaacgacttcaacaaaatctctggctacgctaaagaagcagttcaatctttagtagacgctggtgtaatccaagggg
atgctaacggcaacttcaaccacttaaaactatctcacgtgcggaagctgctacaatcttcaactaacgctctagaattagaagcaga
aggtgatgtaaaacttcaaagcgttaaagctgatgcttggtagctacgatgctatcgagcaactgtagaaaacggaatttttgaaggt
gtaagtgctactgaaattcgacccaacaaacaataaactcgttctgaagctgctaaaattttagtagatcgtttcgaattagaggggtg
aaggggatctaagcgaattcgctgacgcttctactgttaaacatgggctaaaactctacctagaaaatcgagttgcaaacggcgttat
caaaggttctgaagcaaatggtaaaacaaacttaaacccaaatgctccaattactcgccaagacttgcagttgtattctcacgtaact
attgaaaacgttagatgctactccaaaagttgacaaaatcgaaagttagtgacgctaaaactttaaactgtactttatctgacggtaacta
aagaaactgttacttttagaaaagcttttagagcctaacaagaaacagaaagttaactttcaaaatgaaggtgtgaaatacaaaagctaa
agttacttatgttgaactacagctactgcagttaaatctgtatctgcaactaaccttaaagaagtagtagttgaattcgacggtaact
gttgataaagaacagctgaagatgcagctaaactcagctttaaactcaggtaaaacaattaaactctgtatctttagctgctgataata
aaacagctactgttacactaactgataaaacttaacaacaacaaagctgatgctattagcatttctaagttaaaagctggcgataaaga
aatcaatgtgaaaaatggtgaattacagcagtagataataaaatccagaagttactgaaagttaaacttttaggacaacaaagctga
aaagttacattatctgaacctgttgagaacttaagttctacaaactcacttttagacggaagcgtacttgcgggaatgttgttatgg
gtgctggtataaaacagttatcttaaaccttacagctcttctgcacttctgttggcgatcataagctactgtttctggtgcaaa
agacttcgctggttttgtttcattaaattcaacgcgatgaatttaaagttgttgaagataaagaagcaccacagtaactgaagctact
gcaacactgaaactgttacattaacattctcagaagatattgacatggatactgtaaaagcttcaaacgtttattggaaatctggag
attctaagaagaagcatctgaattcgagcgtattgctgataataaatacaaaatcgtattcaaaggtctgaaaaaactctccaac
tggaaaagtagatgtgacgtagaagacattaaagattactctgataacaaaatgctaaagatacaaaagttactgtaactcctgaa
atcgaccaactcgtccagaagtaagaaaagtaactgctctgtgaaaaaactatcaaagttacattctcaaaactgttgaagggag
agtctgctataaaaaacagcgaactacacagttaaagacaagacgcaaaagtagtttctgttgataaagtaactgttgaattcaaaaga
ttctaactctgtaattattgacctatactcaaaagtaagttggtgaaaaatacaattacaattagaatgttaaagatgcaacaaaa
cttaacaatacaatgctagattacactggtaaaattacaagatcagataaagaaggtccagattatgaacatgtaataatgctgatg
caaaagctaaaaaagttgttttaaaattcgacaaaaaaatggatgcagcatctttagctgactattcaaacctacagtaaaaaatcaa
tgactttacaaacattatcagaagatgttgctacactttcagtttcaaatgatgctacagtagtaactattactttgcagagaca
attaaaggtgctgatgttatttgccttggtaagcaatttctggatctgtaaaagtaaatgtaaatgcaattcaagttatgggag
taaaagatacttctggtaacgtgcataagaaattaatggttcagaaaataaaatcttcatcaacatcaacgccataaaact
tgctaaaatcgacaaagattatgatgcaaaatacacagcagaattagttgatagaaaaactgtaaaagttaaaattctctacagttatt
aactcagcagctgcaaatgcatttacttctgaatcacataaaaattgattctattcaagtgaatggtacttcaactgttacagttaaat
tcaaagatgaaattaaacaaaacgcttctgatttagattttaaagtttaatttatctaaattagttgatattgcaggaacgaaagtaac
aaataaactccaatcgcaattaaagctggtattaaacttatagattctgttgaccagttggtgtaggagagcctgttgtgataaa
gaaacaattactttcactttctcagaaaacttaactagtttctattggagaagtttaaagcacagactttactgtaactcgtgtat
ctgataataaagatttagcaattaaagattacagttgctatagctaaataaaccagttgttattacacttagtgacaaccgctga
agttgcaactgcttataaaagttacagcaaaaaatgctaaaatcaactcactgatgataatggtgataaagaaaatgcaattgctgattt
actaaaacaacagctactaaagttgaagcatctggaactttatcacttgatgcagcaaaaaaaaattaaacaatgaaatcactaaag
caaaagatgcaaaaagctactggaacagaaggcacagcagcaactaaccaaatggtggatcgaaaagatgctctacaagttgctattga
ttagcagaattagttaaaaatgacacagctgctacattacaacaataaactgatgcaaaaactgatttaactgctgctattacagcc
tacaatgctgctaaagttgaagatattcatcgttattagttgctccagatttagtattaggtaactacagataatggtaactattacag
gtttttagctggtactggtgaaacattaaaagttacttcagactctgcagcaaatgttgaagttactgatccaacaggtttagctgt
aactgctaaagctaaaggtgaagctaacatttagtgcaaggtttaaagggcgataaagtaattaaaactggtaactgtaaaagttact
gttctgtaataaaaactaaatgaaacgttactctataaactgaattattcagtgaaatggagtgaaatgaaaaccccatgtcttgcaatt
tagcaggaacatgggggtttctttataactaaaacctcaatttgggattaaattcttattattagaagatattaatctacaacagc
ctaatccttctgtgtttaaagcttggctgaatcacacaaaagggatgaagtcaggtgaagtcgtaccagtggtaccggggcgcggtt
ctttaaaaggtttctatggttaggcagacgaatccatgtaggcagggtaagcaggtgacgggtgaaataaagcataggagctcact
gtatattccagatgcaatgctatagtgggcatcgataaaattgactgttaaaccggtcgttcttattcctggatagtgaaacctaaagga
aatcaaaaataagggatggaagtagtgaaacggttgaagcttattagaagaggtgtgacagcaccagtgaggctaataaagatggcagc
gggttttagtagttagtggtatcgctaga

```

Figura 10: Secuencia nucleotídica *slpC* de *Bacillus sphaericus* 2362

Esta secuencia consta de 4251 pb, con una región promotora posible que comprende la región -35 (TAGT del nt 60 al 64) y la señal -10 (TATAATA nt 84 al 89), el sitio de unión a ribosomas RBS (GGAGG del nt 164 al 168), a 13 pb de distancia del inicio esperable de la traducción teniendo en cuenta la secuencia codificante (CDS) que va del nt 178 al 3708. Los sitios 3764 al 3806 conforman la región terminadora con dos repeticiones invertidas.

Sin embargo el análisis de secuencia muestra varios sitios promotores alternativos con sus respectivos ATG de inicio, lo que indicaría que podrían ser utilizados para transcripción y síntesis de S-layer en diferentes condiciones. Además, según estos sitios de inicio diferentes también podrían transcribirse y traducirse pequeños péptidos funcionales. En uno de los marcos de lectura (+3) se obtiene un péptido de 166 aminoácidos, con homología de secuencia a una acetilasa.

## Promotores

En bacterias, y en particular en las proteínas S-layer, es común utilizar promotores alternativos como estrategia para responder a ambientes cambiantes. Por esto utilizamos el sitio PRODORIC como una herramienta bioinformática para predecir sitios de promotores alternativos al ya conocido para la proteína en fase de crecimiento vegetativo (Figura 11).

```

1  TAAAAGTGAT AGGAAAGAGG CGGAATTCGC TAAAAAATC TAGCTATGTT TCTGTTTCTT TACAAATATA ACTAAAATGT 80
81  TACGGGAGTC TTTAATTTTT GACAATTTAG TAACCATTCC AGAAAATGCT TGGTTATTAT GGAGAGTCAG GTATAATAGG 160
161 AAATGGAACT ATATGTTACC AATACAAATG AGGGTAAAAT TAGTTGGAAG AAAGTAGCCA TCTAGTAAGG TCCATGGTAA 240
241 AAAAATCTTC TATATCTAAA TTTATGTCCC AATGCCTTGAA TTTCGGAAAA GATAATGTTA TATTATTGTA GAAAGTGAAT 320
321 AAGCTTACTA GAATGGTATT CTACTACTCA TTTTCTAGTA ACTTTACTAA GAAAATTTGC TTTAGTTTTG AATTATTCCA 400
401 GAAAGCTATA ATACATAAAT TTAGGCAACT AATTATGGTG GTACTATAGT TTTCGTTGGA ATAATATCCA TTTTAGGGAA 480
481 TATTAGGGAG GAATAAATTA ATGGCAAAGC AAAACAAAGG CCGTAAGTTC TTCGCGGCAT CAGCAACAGC TGCATTAGTT 560

```

Factores de transcripción, proteínas de unión al ADN, reguladores transcripcionales	inicio	final	cadena	score	secuencia
DegU	120	140	-	14.2	<b>ATAATAACCAAGCATTCTG</b>
GerE	244	255	-	5.60	<b>ATATAGAAGATT</b>
GerE	163	174	-	5.60	<b>ATATAGTTCCAT</b>
Spo0A	95	106	-	7.09	<b>ATTGTCAAAAAT</b>
SigB	189	200	+	5.65	<b>TGAGGGTAAAAT</b>

Figura 11: Promotores predichos por Prodorica y posición. Los reguladores transcripcionales corresponden a los presentes en la base de datos del programa usando a *B. subtilis* 168 como cepa modelo. La secuencia

asociada de cada uno se indica con color. En celeste los sitios de inicio. En negrita el sitios de inicio utilizado fase vegetativa.

Del análisis por PRODORIC, se desprenden 4 tipos de posibles de operadores y estos se correlaciona con importantes reguladores en *B. subtilis*:

- DegU: regulador dual de un sistema de 2 componentes. En fase estacionaria interviene en la producción de exoenzimas y su forma fosforilada es un regulador importante de la respuesta a estrés osmótico (Ruzal y Sanchez-Rivas 1994, 98); por otro lado también está presente en la cepa *B. sphaericus* C3-41.
- SpoOA Regulador principal y final una cadena de transducción de señales y desencadenante en su forma fosforilada de la esporulación.
- SigB: factor sigma de la RNA polimerasa esencial en las respuesta generales a varios estrés
- GerE regulador de la confección de las cubiertas de esporas. También presente en la cepa *B. sphaericus* C3-41.

Este resultado es un buen indicativo de que el gen *slpC* podría responder a diferentes situaciones de estrés como osmótico, tema de estudio del laboratorio, y cuyos resultados se presentan en el capítulo II.

### Análisis de la secuencia de aminoácidos

Las secuencias de aminoácidos de la proteína S-layer de la cepas 2362 y C3-41 presentan una alta homología. Su secuencia primaria se puede ver en la Figura 12.

```

MAKQNKGRKFFAASATAALVASAIVPVASAAQLNDFNKISGYAKEAVQSLVDAGVIQGDANGNFNPL
KTISRAEAATIFTNALELEAEGDVNFKDKADAWYYDAIAATVENGIFEGVSATEFAPNKQLTRSEA
AKILVDAFELEGEGLSEFADASTVKWAKSYLEIAVANGVIKSEANGKTNLNPAPIRQDFAVVF
SRTIENVDPKVDKIEVVDAKTLNVTLSGDKETVTLKALEPNKETEVTFKIKDVEYKAKVTYVV
TTATAVKSVSATNLKEVVVEFDGTVDKETAEDAANYALKSGKTIKSVSLAADNKATVTLTDKLNND
KADAISISNVKAGDKEINVKNVEFTAVDNKIPEVTEVKSGLTKAVKVTLSEPVENLSSTNFTLDGKA
YFGNVVMGAGNKTIVILTPYSSSALSVGDHKLTVSGAKDFAGFVSLNSTHEFKVVEDKEAPTIVTEATA
TLETVTILTFSEDIDMDTVKASNVYWKSGDSKKEASEFERIADNKYKVFVKGSEKTLPTGKVDVYVED
IKDYSDNKIAKDTKVTVTPEIDQTRPEVRKVTALDEKTIKVTFSKTVGDGSAIKTGNVTVKDKDDKV
VSVDKVTVDKSDSKSVIIDLYSKVSVGENTITIKNVKDATKLNNTMLDYGKFTRSDEKGPDEYHVI
NADAKAKVVLKFDKMDAASLADYSNYLVKINDTLQTLSEDVATLSVSNDAVVTITFAETIKGDD
VVFASGKAISGSGKVNVELQVMGVKDTSGNVHKKFNGSENKITLSSTSTPLKLAKIDKDYDAKYTA
ELVDRKTVKVKFSTVINSAAANAFTSESHKIDSIQVNGTSTVTVKFKDEINTNASDLDLKVNLSKLV
DIAGNESTNPTPIAIKAGINLLDSVAPVVVGEVVDKETITFTFSENLTSVSIGEVLSTDFTVTRVS
DNKDLAIKDYSAIANNQVVIITLSDNREVATAYKVTAKNAKLITDDNGDKKNAIADFTKTTATKVE
ASGTLSDLAAKTNLNNEITKAKDAKATGTEGTAATNQIVGSKDALQVAIDVAELVKNDTAATLQQLT
DAKTDLTAAITAYNAAKVEDISSLLVAPDLVLGTTDNGTITGFVAGTGETLKVTSDSAANVEVTDPT
GLAVTAKAKGEANILVQVLKGDKVIKGTGTVKVTVSE

```

Figura 12: Estructura primaria de la proteína SlpC de *Bacillus sphaericus* 2362

La S-layer de 2362, presenta un punto isoeléctrico de 5,05, confirmando la característica ácida de la proteína a pH neutro.

Tal como en muchas otras S-layer, aminoácidos como la treonina, valina y aminoácidos ácidos como el aspartato y el glutamato se encuentran en un alto porcentaje en la proteína. Aminoácidos con grupos sulfhídricos como la cisteína no se encuentra presente en la proteína y la metionina, la histidina y el triptofano se hallan en menos del 0,5%.

En general, las S-layer provenientes de bacterias son proteínas ácidas pIs 4 a 6, que contienen típicamente aminoácidos hidrofóbicos en un 40-60%. Los pIs de las proteínas de capa S de archaeas y lactobacillus son básicos, de 8 a 10.

En la tabla 2 se encuentra el porcentaje de cada aminoácido.

<b>aminoácido</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>aminoácido</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Ala	132	11,2	Leu	74	6,3
Arg	12	1,0	Lys	128	10,9
Asn	78	6,6	Met	6	0,5
Asp	95	8,1	Phe	38	3,2
Cys	0	0	Pro	22	1,9
Gln	16	1,4	Ser	86	7,3
Glu	73	6,2	Thr	130	11,1
Gly	59	5,0	Trp	3	0,3
His	5	0,4	Tyr	24	2,0
Ile	61	5,2	Val	134	11,4

**Composición de aminoácidos**

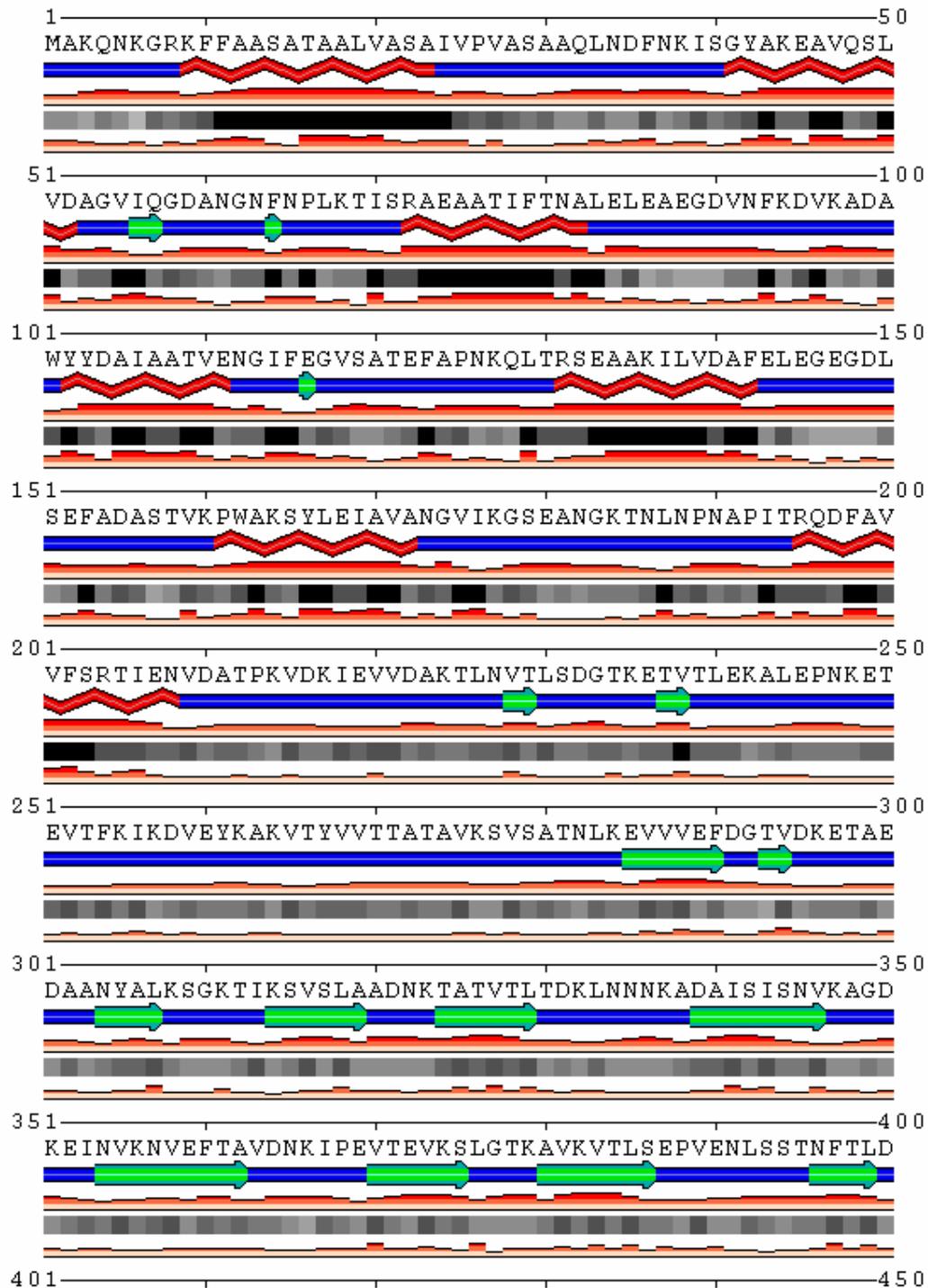
**Número total de residuos cargados negativamente (Asp + Glu): 168**  
**Número total de residuos cargados positivamente (Arg + Lys): 140**  
**Número total de residuos hidrofóbicos: 806 (68%)**

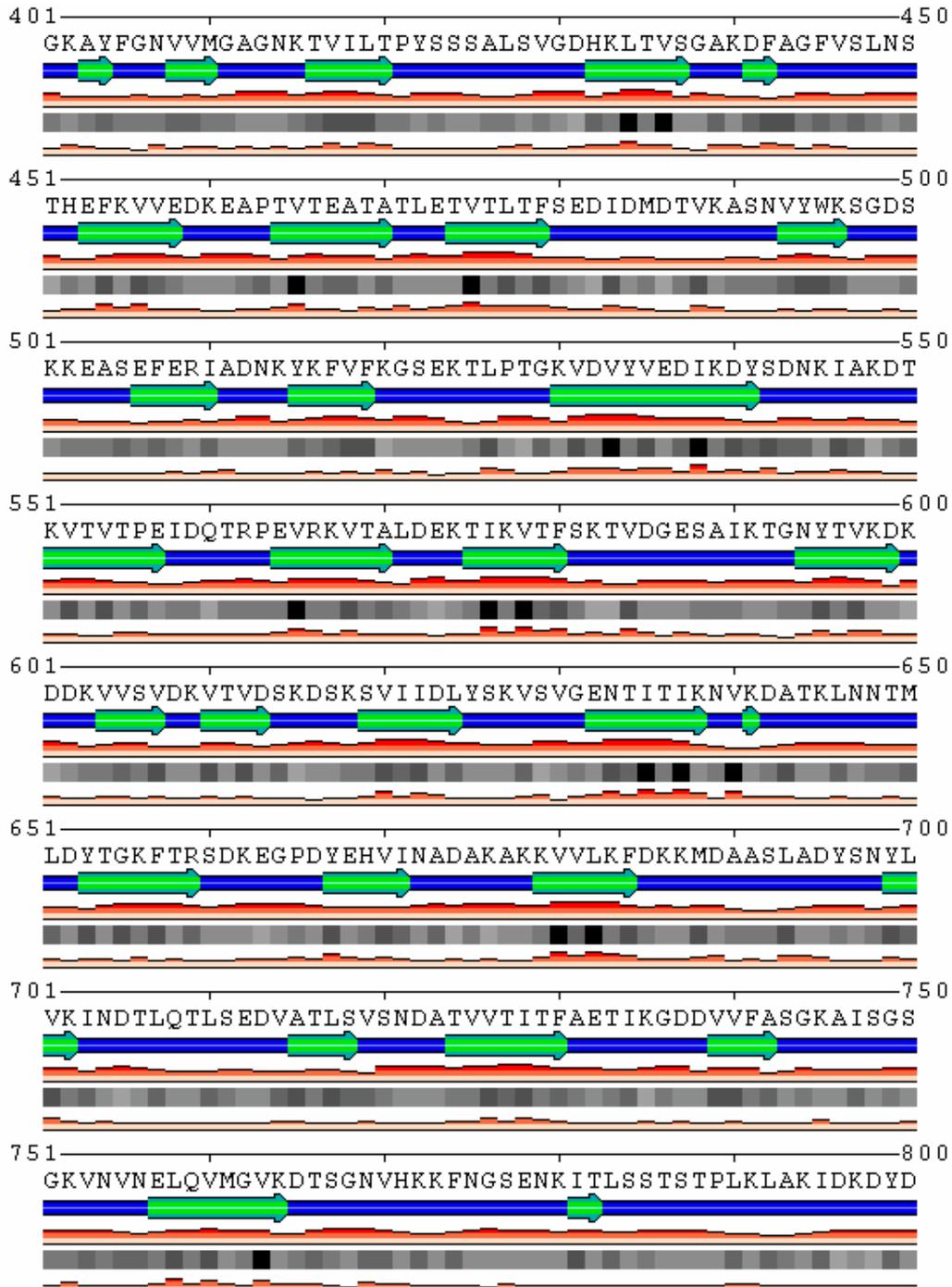
Tabla 2: Composición de aminoácidos de SlpC de *Bacillus sphaericus* 2362

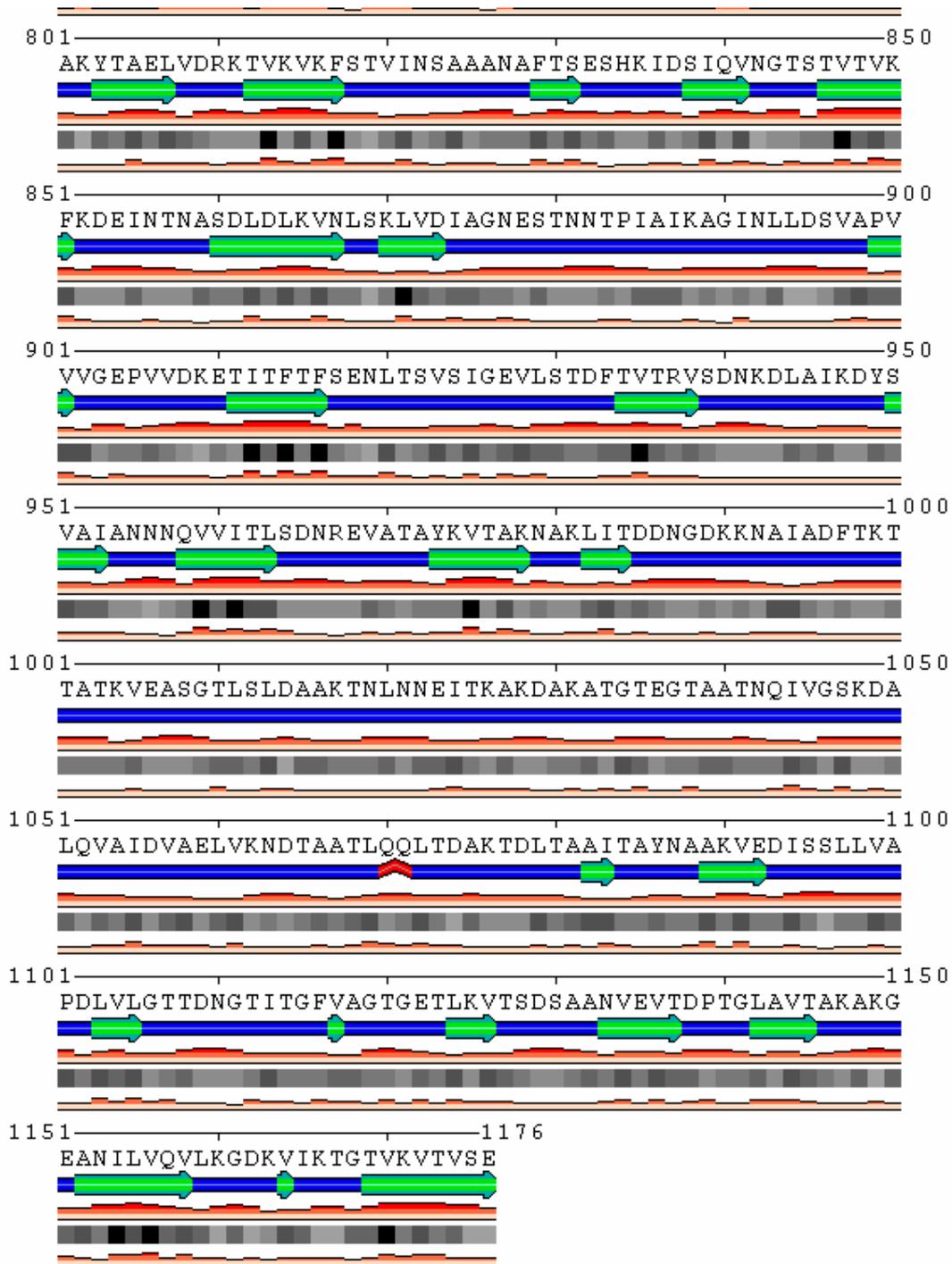
Una de las características más importantes en todo el grupo de S-layer, y se confirma en *Bacillus* es un alto porcentaje de grupos carboxilo u oxhidrilo alineados, ya que la treonina también se encuentra en un alto porcentaje. Otra característica dentro de las S-layer de la familia *Bacillaceae* es el alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, que también se observan en esta secuencia.

## Perfil estructural de la proteína S-layer

Con la secuencia de aminoácidos también se pudo predecir la estructura secundaria de la proteína, *in silico*, mediante programas apropiados, y mostraron la estructura representada en la figura. (<http://sable.cchmc.org/>) (Figura 13).







**Indice inestabilidad:**

El índice de inestabilidad (II) es 10,69. Esto clasifica a la proteína como estable.

Figura 13: Estructura secundaria predicha para la proteína S-layer de la cepa 2362. En rojo, se grafican las estructuras en alfa- hélice, en verde, las hojas plegadas beta y en azul las plegadas al azar (random coil)

Los resultados de la predicción estructural, arrojaron un índice de estabilidad de 10,69 que indica que la proteína es muy estable lo que la hace interesante para su utilización en procesos de biotecnológicos y en diferentes sistemas de expresión, tanto en células eucariotas, como en levaduras y en bacterias.

El porcentaje de residuos hidrofóbicos es del 68%, ligeramente superior a los de otras S-layer, tanto incluyendo como excluyendo al péptido señal que es removido luego de direccionar a la proteína al exterior.

En la siguiente figura se muestra un esquema de la distribución de la hidrofobicidad calculada a través del programa ProtScale del sitio Expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protscale/protscale.pl?1>). Este programa utiliza el algoritmo basado en la escala de Kyte y Doolittle, en la cual regiones con valores por encima de 0 son hidrofóbicas.

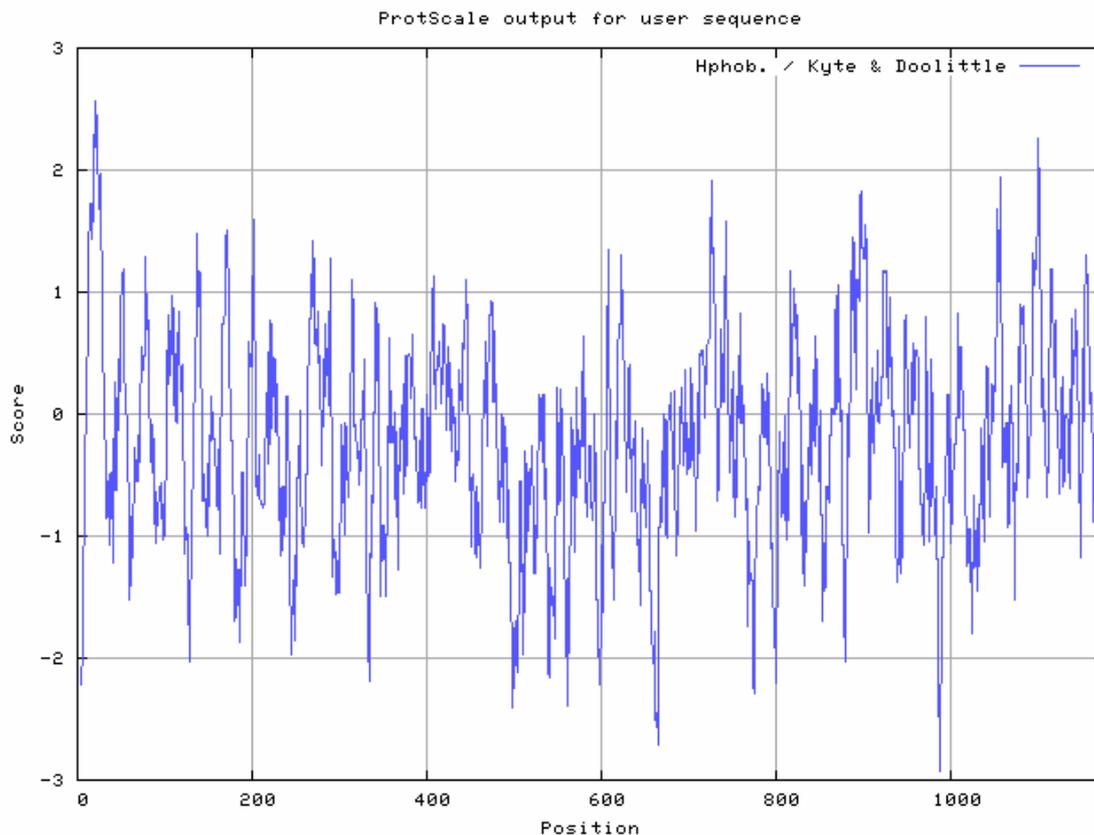


Figura 14: Gráfico de hidrofobicidad según Kyte y Doolittle. Valores positivos indican

Nos interesó buscar dominios conservados conocidos como las regiones SLH, descritas como ligadas al anclaje a la envoltura bacteriana, y que se encuentran en la región amino terminal. Se utilizaron dos programas de predicción de dominios

conservados para los SLH, SMART y el SABLE. Con todos ellos se confirman los tres motivos SLH dentro del dominio (Figura 15).

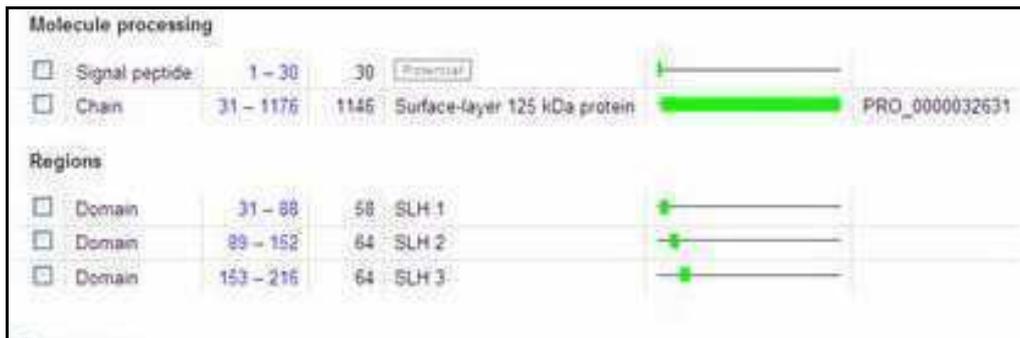
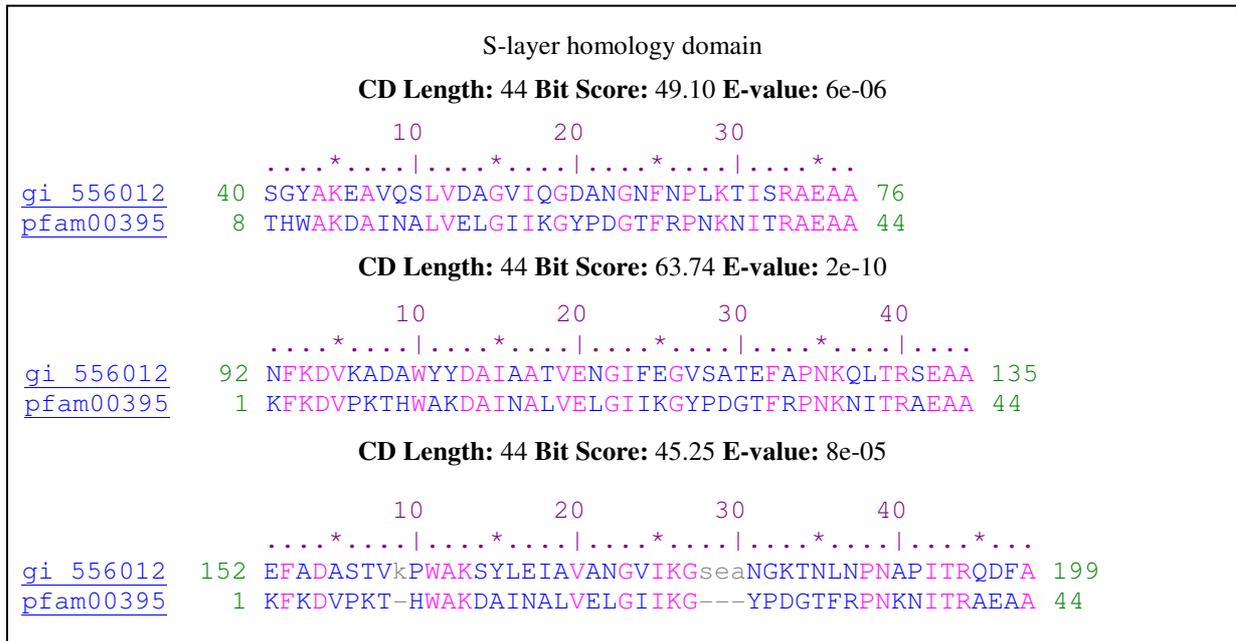


Figura 15: Dominios SLH

Con el programa SABLE se observó la estructura secundaria de los dominios SLH predichos:

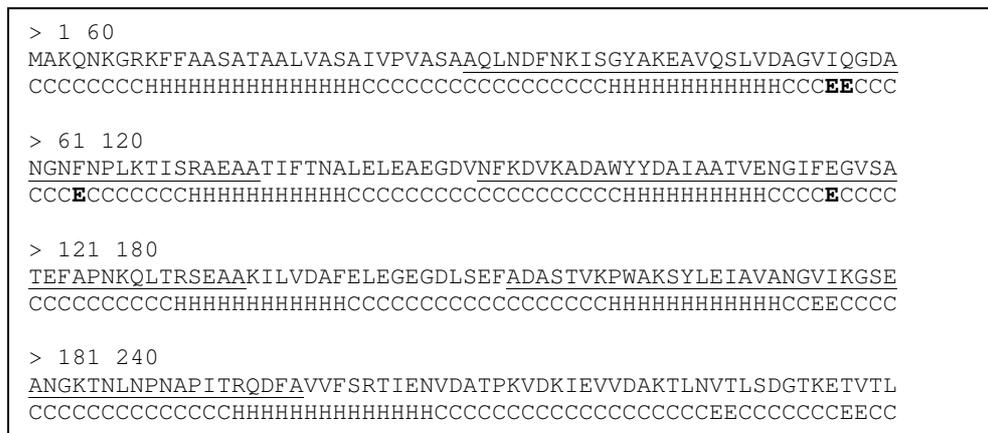


Figura 16: Estructura secundaria de la región que contiene los SLH predichos. H: hélice, E: hoja plegada beta C: plegadas al azar. Se subrayan los SLH.

Gracias a los programas utilizados, se observan dominios conservados como son los tres motivos SLH, lo que coincide con lo reportado en la bibliografía respecto de las proteínas S-layer del género *Bacillus*. En algunas cepas, estos motivos hacia el extremo amino terminal están involucrados en el anclaje de estas proteínas a polisacáridos (SCWP: secondary cell wall polymers) que están unidos a la capa de peptidoglicano que subyace. El extremo N terminal de *B. sphaericus* C3-41 se uniría específicamente al SCWP. El tercer motivo SLH es la parte proteica de la S-layer esencial para la unión, que es especie-específica (Li *et al*, 2009).

Los tres motivos que empiezan en las posiciones 2, 62 y 124 luego del final del péptido señal (de 30 aminoácidos, al principio de la secuencia). La estructura secundaria de los motivos se caracteriza por dos  $\alpha$ -hélices que rodean a una corta cadena de hoja  $\beta$  (Ilk *et al*, 2002).

Utilizando el programa STRING para analizar funciones y la asociación con otras proteínas, se encontró homología a una hemolisina de 874 aminoácidos de *Bacillus sphaericus* C3-41 con dominios de unión a calcio. Además se observa homología con proteínas de tipo Ig de grupo II (Figura 17). Estas proteínas normalmente unen azúcares.

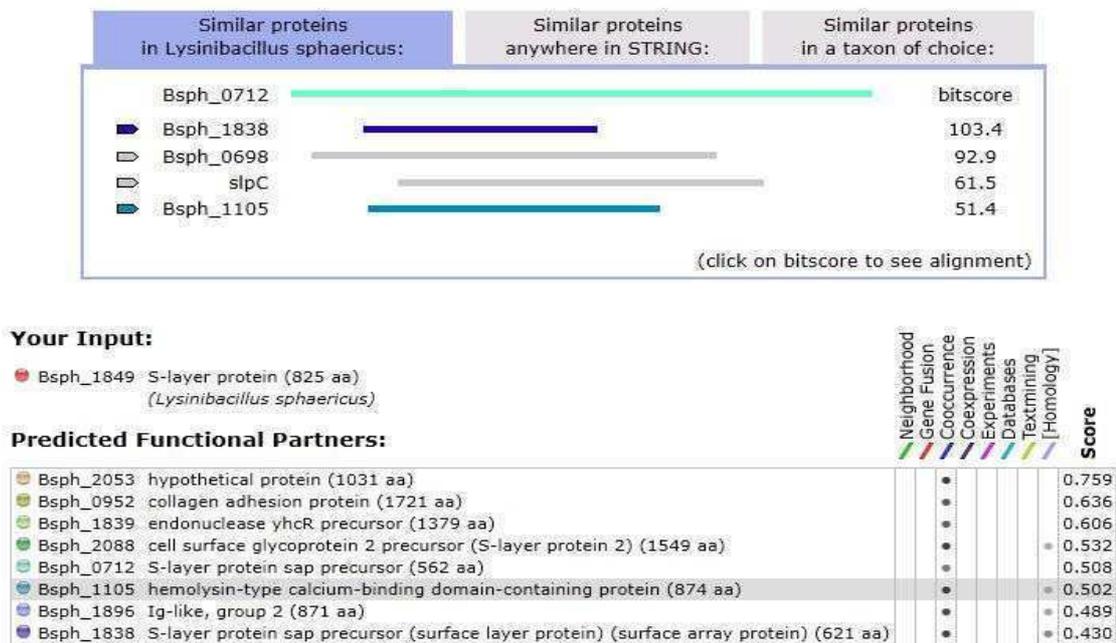


Figura 17: Imagen de la búsqueda bioinformática de funciones conservadas por STRING.

## B) Obtención de proteínas S-layer

Como la mayoría de las proteínas S-layer, estas requieren para su desprendimiento de la envoltura algún agente desagregante por sustitución catiónica. Para la extracción de S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 se ensayaron diferentes protocolos a fin de obtener la mayor cantidad y estabilidad de la misma. Para ello se contaba con un anticuerpo específico gentilmente donado por la Dra. Lewis L.

Se evaluaron tres tratamientos de extracción: hidrocloreuro de guanidina 2M pH 2, o LiCl 6M ó EDTA 10 mM y 2 condiciones de cultivo (fase exponencial y estacionaria). Las mejores recuperaciones se obtuvieron cuando los cultivos fueron de 6 hs. La extracción con LiCl mostró ser más efectiva, cuando se verificó por western blot la presencia de la proteína revelando con anticuerpo anti S-layer específico (Figura 20). La extracción con EDTA presentó un alto grado de impurezas con otras proteínas (ver coomassie Figura 18 y 19) y la realizada con HCl guanidina mostró una proteína de similar peso molecular pero no detectable por western blot (Figura 20). La diálisis contra agua mostró varios productos de degradación mientras la diálisis contra 10 mM  $\text{CaCl}_2$  fue más efectiva a la hora de preservar la estabilidad y la estructura tridimensional de la proteína. Este resultado concuerda con los de otros grupos que trabajan con S-layer de otras cepas de *Bacillus sphaericus* que indican que los iones calcio son necesarios para el ensamblado y armado de la estructura de la capa de S-layer (Ilk *et al*, 1999).

Quizás para la unión de la SlpC a la pared celular sean necesarios cationes bivalentes, como sucede con la proteína SbpA de *Bacillus sphaericus* CCM 2177, debido a la naturaleza ácida de los SLH. Estos iones pueden ser requeridos para autoensamblarse durante la extracción y recristalizar en estructuras regulares y estables durante la fase de diálisis.

En adelante, se siguió trabajando con la proteína extraída con LiCl y diálisis en  $\text{CaCl}_2$ .



Figura 18: Tinción con coomassie de extracción de S-layer

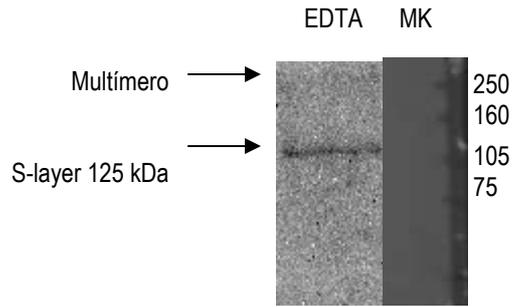


Figura 19: Western blot de S-layer

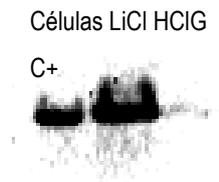
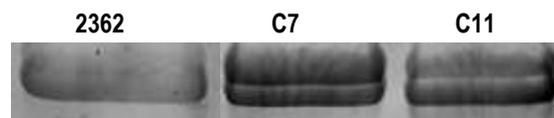


Figura 20: Western blot de S-layer extraídas con LiCl 6M ó con HCl de Guanidina 2M. Control positivo: células

Además de analizar la cepa patrón 2362, se incluyó en el estudio dos aislamientos de *Bacillus sphaericus* (cepas C7 y C11) obtenidos en el laboratorio. Estos clones pertenecen al mismo grupo de homología de 2362, analizados tanto con antígenos flagelares como por sensibilidad a fagos. Por otro lado, preparaciones de espora-cristal de ambos clones mostraron ser mucho más tóxicos que 2362 frente a larvas de mosquitos del género *Culex* (Lanati L y Sanchez-Rivas C). La Dra. Lewis, en 1987, trabajó con cepas de *B. sphaericus* patogénicas de mosquitos y determinó que a través de mapeo de péptidos y análisis serológico de S-layer se establecieron ocho grupos, que coincidieron con el agrupamiento mediante tipificación por fagos y antígeno flagelar. Cuando se analizaron las proteínas de capa S con anticuerpos específicos para distintas S-layer, ambas cepas mostraron tener homología con la de la cepa 2362 y por ende su S-layer pertenece al mismo grupo.

Figura 21: Western blot de células de *Bacillus sphaericus* 2362, C7 y C11 crecidas en medio LB y cosechadas en fase exponencial de crecimiento, revelado con anti S-layer.

Un aspecto que centró nuestra atención fue la observación de dos bandas reactivas con el anticuerpo, tanto en la cepa de referencia 2362, como en los aislamientos C7 y C11 (Figura 21 y tabla 3).

	<b>2362</b>	<b>C7</b>	<b>C11</b>
Mayor	130,1 ± 8,1	133,6 ± 4,1	136,2 ± 3,9
Menor	116,8 ± 5,3	119,7 ± 2,2	119,7 ± 2,8

Tabla 3: Peso molecular aparente de S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362, C7 y C11.

En las tres cepas la cantidad de S-layer total como las proporciones de las 2 especies es diferente. El resultado más llamativo es que la producción de S-layer en las cepas C7 y C11 es mucho mayor que en la cepa de referencia (más del doble para C7). Por otro lado, para C7, la proteína de mayor peso molecular aparente es mucho mayor en cantidad en comparación a las otras dos cepas.

	<b>2362</b>			<b>C7</b>			<b>C11</b>		
	Mayor PM	Menor PM	Suma	Mayor PM	Menor PM	suma	Mayor PM	Menor PM	suma
Señal densitometría	10,04	18,59	28,63 (100%)	32,89	44,18	77,07 (269%)	17,89	37,23	55,12 (193%)
Relación de bandas	0,35	0,65		0,43	0,57		0,32	0,68	
Relación a S-layer de mayor PM	1	1,9		3,3	4,4		1,8	3,7	

Tabla 4: Cuantificación por densitometría de las proteínas S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362, C7 y C11

Estos resultados nos condujeron a investigar qué modificaciones postraduccionales o asociaciones con elementos de pared pueden explicar la presencia de dichas dos bandas.

### **C) Modificaciones postraduccionales de la S-layer**

La diferencia entre las dos bandas es de  $15,3 \pm 4,1$  kDa. Estas dos bandas con diferentes movilidades pueden deberse tanto a distinta conformación peptídica como a modificaciones postraduccionales.

En primer lugar se analizó qué moléculas como azúcares o derivados de peptidoglicanos podrían adherirse a la porción peptídica de la proteína que justifique el peso molecular.

Calculamos las masas de glucosas y de N-acetilglucosamina, N-acetil-murámico y de un pentapéptido sumados para obtener una unidad de peptidoglicano. Se calculó entonces para las diferentes formas qué azúcares podrían estar presentes (Tablas 5 y 6).

180	Glucosa
101,03	Ceto-piruvato
221,21	N-acetil glucosamina
221,21	N-acetil manosamina
293,27	N-acetil murámico
500	Pentapeptido
1014,48	PG
543,45	SCWP

Tabla 5: peso molecular en Daltons de los azúcares de pared y de la unidad de peptidoglicano.

Daltons	diferencia	n° glucosas	n° PG	n° SCWP
130100		74	13	24
129600	500	3	0	1
116800	13300			

Tabla 6: Modificaciones probables según la diferencia en peso molecular aparente en Daltons de las proteínas S-layer.

Las diferencias entre las movibilidades de las especies proteicas podrían ser explicadas entonces por la presencia de azúcares.

Pero además, teniendo en cuenta que el SCWP une a las proteínas S-layer, podría ocurrir que los residuos azúcares provengan del anclado a la pared, que al extraer la proteína para su purificación, queden adheridos. Uno de los SCWP más estudiado es el de *B. sphaericus* CCM 2177, y es sabido que está compuesto por unidades repetitivas del disacárido N-acetil glucosamina y N-acetil manosamina, este último transportando un ceto piruvato, que carga negativamente al polímero (Ilk *et al*, 2011). Es decir, que las diferentes bandas podrían tener origen también en proteínas con fracciones adheridas del SCWP.

**Las S-layers presentan dos bandas de PM diferente probablemente porque una de ellas quedaría asociada a un fragmento de PG (o polímero asociado a él) o una de ellas representa una forma más glicosilada.**

La glicosilación es la más común modificación post-traduccional de las proteínas, y juega un rol importantísimo en todos los organismos vivos. Sin embargo, no se detectó en procariotas hasta principio de los 80, por lo que su presencia para la literatura quedó restringida a organismos eucariotas. Actualmente se sabe que este proceso post traduccional también ocurre en procariotas. Entre las glicoproteínas mejor estudiadas se encuentran las proteínas de los flagelos y las S-layer de la familia *Bacillaceae* (Schäffer y Messner 2004). Dentro de la familia *Bacillaceae*, estas glicoproteínas poseen una larga cadena de glicanos unidos en uniones O-glicosídicas. En algunas ocasiones, la glicoproteína guarda relación con los efectos patogénicos de la especie (Messner *et al*, 2008) y puede variar con el estado fisiológico, de modo de diversificar las propiedades de superficie para supervivencia en un hábitat competitivo.

Debido a la habilidad de la proteína de autoensamblarse a una forma plana bidimensional cristalina en distintos soportes (sílicas, polímeros, liposomas, films lipídicos, o estructuras de membranas), son consideradas candidatas para realizar dispositivos de glicanos *in vivo* e *in vitro* en escala nanométrica. Conocer tanto el tipo de modificación como su funcionalidad facilitaría las posibles aplicaciones de motivos o dominios en microbiología en general, nanobiotecnología y utilización para vacunas.

La presencia de azúcares en la proteína S-layer de *B. sphaericus* 2362 ha sido estudiada y reportada de manera controversial. Estudios iniciales (Lewis *et al*, 1987) reportan un contenido de carbohidratos  $1,46 \pm 0,11$  %. Estos valores son avalados en otros trabajos (Lozano *et al*, 2011). Sin embargo, el grupo de trabajo de Messner en varias ocasiones presenta a la proteína de esta cepa como no glicosilada, tal como se describe en sus trabajos (Messner *et al*, 2008, 2010).

No ha quedado claro en la literatura si la proteína S-layer está o no glicosilada. Esta modificación podría afectar la funcionalidad y la forma en la que interactúa con otras proteínas glicosiladas o no.

Existen familias de proteínas que aún no estando glicosiladas pueden interactuar con azúcares a través de determinados dominios. Ejemplo de este grupo es la galectina-1 (van Kooyk y Rabinovich 2008, Erbacher 2009) que posee dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que reconocen glicanos en sus ligandos. Del mismo modo, la S-layer podría interactuar con los azúcares del SCWP o del exterior a través de ellos.

Se intentará profundizar sobre las posibles modificaciones postraduccionales de la S-layer de *Bacillus sphaericus*.

## Tinción con Método Azul Bromo timol sulfúrico

Para determinar si la proteína S-layer estaba modificada postraduccionalmente mediante glicosilación, se realizó una tinción para azúcares desde una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se hicieron preparaciones de S-layer de *Lactobacillus acidophilus* y de *Bacillus sphaericus*, y se corrieron en un gel 7,5% junto con proteína  $\beta$ -galactosidasa, como control negativo de glicosilación.

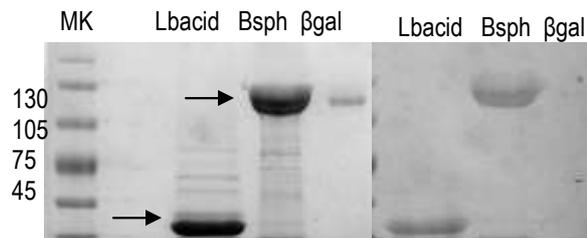


Figura 22: Panel izquierdo, coomassie de S-layer de *Lactobacillus acidophilus*, de *Bacillus sphaericus* y proteína  $\beta$ -galactosidasa como control negativo. Panel derecho, tinción de Azul de Bromo Timol de las mismas proteínas. Las flechas señalan las S-layer.

La proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 se tiñó con azul de bromo timol sulfúrico, indicando que podría estar glicosilada. No se observó banda en el control de  $\beta$ -galactosidasa (Figura 22).

Para confirmar que se trate de proteína de capa S, se realizó un western blot con anticuerpo anti S-layer de *B. sphaericus* 2362, que dio positivo en la misma posición.



Figura 23: Panel izquierdo, coomassie de S-layer de *Bacillus sphaericus*. En el centro, la tinción de coomassie y en la derecha el western blot.

Se hizo una búsqueda de de glicosilación en las S-layers de otras cepas de *Bacillus sphaericus*, como son el clon C7 y C11. Las proteínas fueron extraídas de cultivos en medio LB y LB con NaCl 0,7M (LBN)

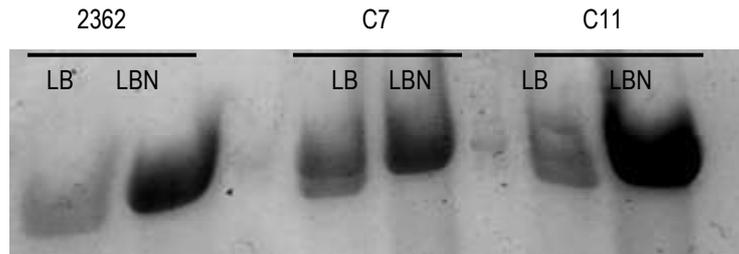


Figura 24: Tinción de Azul de bromo timol sulfúrico de S-layer de cepas 2362, C7 y C11 de *Bacillus sphaericus*, crecidas en LB y LBN.

Se ve que en las tres cepas la proteína de capa S se tiñe para azúcares, y se observa un patrón de bandas diferencial entre la glicosilación que ocurre en condición de hiperosmolaridad con una única banda, respecto del control, donde se ven distintas bandas.

Estos resultados están de acuerdo con los resultados iniciales aportados por el grupo de Lewis L. y Yousten A. (1987), en los que caracterizan a S-layers de diversas cepas de *Bacillus sphaericus* como glicoproteínas, con contenido de carbohidratos medidos por método de tinción con fucsina de Mc Guckin y Mc Kenzie (1958). El contenido de azúcares para la S-layer de otras cepas es por ejemplo  $1,17 \pm 0,41$  para Kellen Q y para la Kellen K es de  $1,29 \pm 0,29$ .

### Análisis del perfil de agregación de la S-layer

La capacidad agregativa de algunas cepas de *Lb. kefir* con proteína S-layer se correlaciona con la presencia de esta proteína modificada por glicosilación (Mobili y colaboradores en 2009). Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos la capacidad de autoagregación de *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus sphaericus*. La cepa de *Lactobacillus acidophilus* es el control negativo ya que produce S-layer y no esta glicosilada. Para este ensayo ambos cultivos fueron pretratados o no con LiCl para depletar de capa S y luego se siguió a través de la disminución de la densidad óptica la capacidad de agregar. A los 60 minutos se calculó el coeficiente de agregación porcentual (CA). Los resultados en el tiempo se grafican a continuación y el cálculo de los CA para las condiciones se muestran en la tabla.

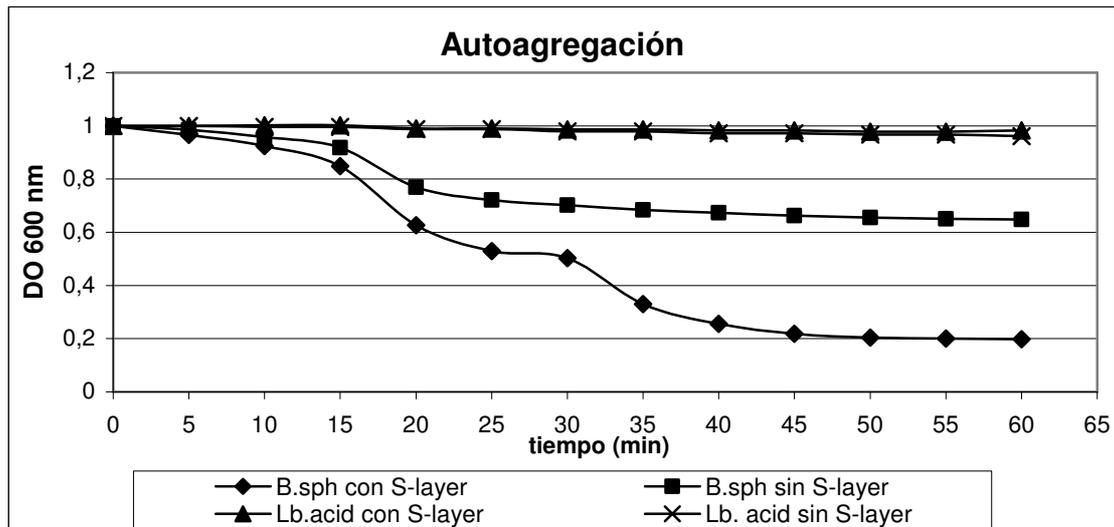


Figura 25: Cinética de Autoagregación de *Lb. acidophilus* y *B. sphaericus* depletadas de S-layer por LiCl o con su capa S intacta.

	<i>B. sphaericus</i> con S-layer	<i>B. sphaericus</i> sin S-layer	<i>Lb. acidophilus</i> con S-layer	<i>Lb. acidophilus</i> sin S-layer
<b>CA<sub>60min</sub></b>	<b>80,0</b>	<b>10,0</b>	<b>1,7</b>	<b>3,9</b>
Error	8,5	5,7	0,1	0,2

Tabla 7: Coeficientes de autoagregación de cepas bacterianas depletadas o de S-layer.

Claramente los cultivos de *B. sphaericus* 2362 tienen la capacidad de autoagregarse, tal como se observa en la figura 25, y el CA es del 80%. El tratamiento del cultivo con LiCl resulta en la pérdida de la S-layer y de la capacidad de agregación (el CA descende al 10%). Esa capacidad no se observa en la especie *Lb. acidophilus* en ninguna de las 2 condiciones (con o sin S-layer presentan CA menores al 5%).

Atribuimos la autoagregación a la presencia de una proteína S-layer glicosilada, sin embargo, no puede descartarse que restos del SCWP queden unidos covalentemente a la proteína y que ellos otorguen capacidad agregativa y sean los responsables de las tinciones observadas previamente.

### Diferenciación de O-glicosilación y N-glicosilación: Resistencia a tunicamicina

La tunicamicina es un antibiótico que interfiere con las vías de N-glicosilación por inhibir a la enzima N-acetilglucosamina fosfotransferasa, sin inhibir a las O-glicosilaciones.

La adición de tunicamicina al medio no inhibió el crecimiento hasta concentraciones de 5  $\mu\text{g/ml}$ , es decir, no se trataría de una N-glicosilación. Concentraciones mayores impidieron el crecimiento bacteriano quizás debido a interferir con la síntesis del peptidoglicano.

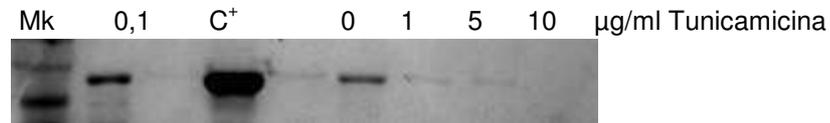


Figura 26: Tinción de Coomassie de las extracciones de S-layer de los cultivos crecidos en medio con Tunicamicina en la concentración indicada.

En el caso de verificar la modificación por agregado de azúcares a la proteína, la unión del azúcar al péptido sería del tipo O-glicosídica, tal como ocurre en la mayoría de las bacterias y a diferencia de lo que sucede en arqueas.

### Tinción con PRO Q® Emerald 300

Se utilizó un kit comercial que tiene mayor poder de resolución (50 veces mayor) que el método de tinción antes ensayado para observar si otras S-layer (la de *Lb. acidophilus*, por ejemplo) estarían glicosiladas.

Se observó ausencia de tinción de las proteínas de capa S de todas las cepas de *Bacillus sphaericus*, a diferencia de lo ensayado en lo precedente. El control de *Lb kefir* JCM 5818 dio positivo para su S-layer.

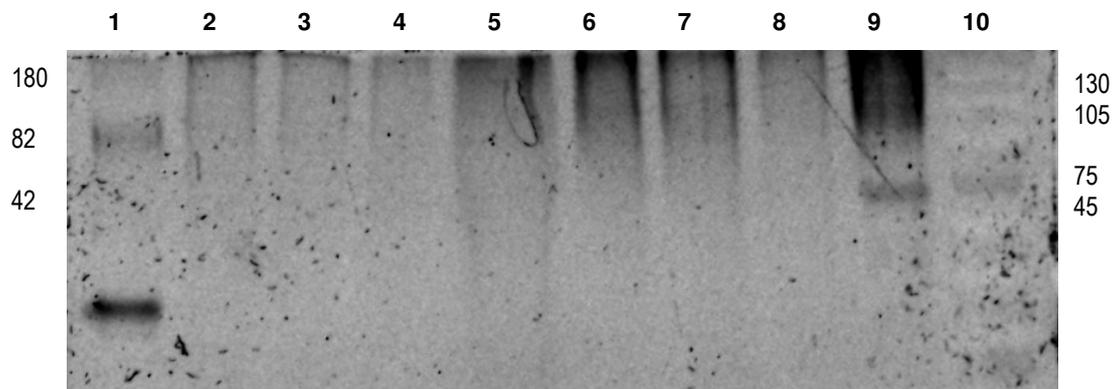


Figura 27: Calles: 1: MK glicoproteínas CandyCane; 2,3, 4 y 5: S-layer 2362, C7, C11 y de preparaciones de esporas respectivamente; 6 y 7: células enteras crecidas en LB o LBN; 8 y 9: S-layer de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 (45kDa) y *Lb kefir* JCM 5818 (66 kDa) respectivamente; 10: MK de peso molecular

Como resultados de todos los ensayos previos, se desprendía que la proteína de capa S de *Bacillus sphaericus* 2362, C7 y C11 estarían glicosiladas y que la glicosilación se modifica en condiciones de crecimiento en medios de distinta osmolaridad, lo que podría atribuirse a la posible función en la osmoadaptación. Además, la modificación sería del tipo de O-glicosilación, que acuerda con las glicosilaciones dentro del género *Bacillus*. Es importante mencionar que en arqueas, claramente la S-layer presenta mayor glicosilación por crecimiento en medios hipersalinos (Calo *et al*, 2011)

Sin embargo, el ensayo más común para evidenciar glicosilación de proteínas es el PAS (periodic acid staining) o similar mediante kit. Por ello realizamos una tinción con el kit comercial (PRO Q® Emerald 300). El ensayo dio negativo para las S-layer. Suponemos que la tinción que previamente nos dio positiva para azúcares se debe al modo de unión de las S-layers al peptidoglicano. En la familia *Bacillaceae*, la región N-terminal es la responsable del anclado de las subunidades S-layer a la envoltura rígida por unión al heteropolisacárido al que se denomina SCWP (secondary cell wall polymer) (Ferner Ortner *et al*, 2007). El anclaje puede ser a través de los dominios SLH, o como se observó en *Geobacillus stearothermophilus* unidos a la proteína que carece de SLH en el extremo amino terminal. Es factible que glicanos del SCWP queden adheridos a las proteínas durante la extracción. De todos modos, restaría hacer un análisis de RMN para confirmar esta hipótesis o descartarla. Por otro lado, los resultados ensayados en células enteras podrían tener distinto resultado que en proteínas purificadas.

# Anexo Capítulo I:

Análisis Bioinformático

## Análisis *in silico*

Como primera aproximación para encontrar probables sitios de glicosilación se realizó una búsqueda *in silico* en la secuencia aminoacídica de la proteína S-layer de *B. sphaericus* 2362 utilizando los programas de la página <http://expasy.org>.

<b><u>Residuos O-Glicosilados Predichos</u></b>			
Number	Position	Mini-Pattern	Score
1	786	L-n-STS-n-PL	0.770833
2	844	V-n-GTS-n-VT	1.000000

Figura 28: Resultado de la búsqueda *in silico* de residuos O-glicosilados.

Con la búsqueda anterior se predijo la presencia de dos sitios probables de glicosilación, para O-glicoproteínas, que es el tipo de unión que normalmente realizan las bacterias.

Con el programa de la página <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/> (YinOYang - O-beta-GlcNAc attachment sites in eukaryotic protein sequences) se predijeron más sitios probables (Figura 29).

SeqName	Residue	O-GlcNAc result	Potential	Thresh. (1)	Thresh. (2)
Sequence	16	T +	0.5740	0.5232	0.6556
Sequence	158	T +	0.5078	0.4572	0.5667
Sequence	270	T +	0.6574	0.5303	0.6652
Sequence	273	T +	0.5102	0.5001	0.6244
Sequence	371	T +	0.5376	0.4858	0.6052
Sequence	423	S +	0.5648	0.5006	0.6252
Sequence	424	S ++	0.6782	0.5001	0.6245
Sequence	466	T ++	0.6181	0.4746	0.5901
Sequence	830	T +	0.5303	0.4776	0.5941
Sequence	831	S ++	0.6283	0.4796	0.5969
Sequence	1127	T +	0.4909	0.4736	0.5888
Sequence	1137	T +	0.4799	0.4650	0.5771
Sequence	1173	T ++	0.6087	0.4602	0.5707
Sequence	1175	S ++	0.5980	0.4442	0.5491

Figura 29: Resultado de la búsqueda *in silico* de residuos O-glicosilados obtenido de base de datos de eucariotas.

No ha quedado claro en la literatura si la proteína S-layer está o no glicosilada. Esta modificación podría afectar la funcionalidad y la forma en la que interactúa con otras proteínas glicosiladas o no.

Existen familias de proteínas no glicosiladas como por ejemplo galectina-1 (van Kooyk y Rabinovich 2008, Erbacher 2009) que poseen dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) que reconocen glicanos en sus ligandos. Del mismo modo, la S-layer podría interactuar con los azúcares del SCWP o del exterior a través de ellos. Se utilizaron herramientas bioinformáticas para inferir posibles funciones a través del análisis de la secuencia aminoacídica y la estructura utilizando métodos para identificar motivos o dominios a lo largo de la secuencia proteica. Como la S-layer de *B. sphaericus* no fue cristalizada, no ha sido resuelta estructuralmente, se buscaron motivos que reconocen azúcares CRD (carbohydrate-recognition domains) y se comparó la estructura secundaria y estructura 3D depositada en los bancos de datos.

Cuando analizamos la secuencia de SlpC en el programa CDART, encontramos que una parte de la S-layer alinea estructuralmente con probables dominios que unen carbohidratos (CBD: carbohydrate binding domain) de un subgrupo de proteínas bacterianas homólogas a proteínas lectinas tipo C. Una proteína de *Clostridium difficile* QCD-76w55 (gi|255316714|ref|ZP\_05358297.1) tiene dos CLECT: lectinas tipo C (CTL)/ dominios tipo lectina C (CTLD), dominios homólogos a los CRDs de lectinas tipo C (CLECT cd03603 and CLECT\_VCBS, CTLD, cd00037). Las secuencias consenso CLECT alinean con SlpC y el CRD de Galectina-1.

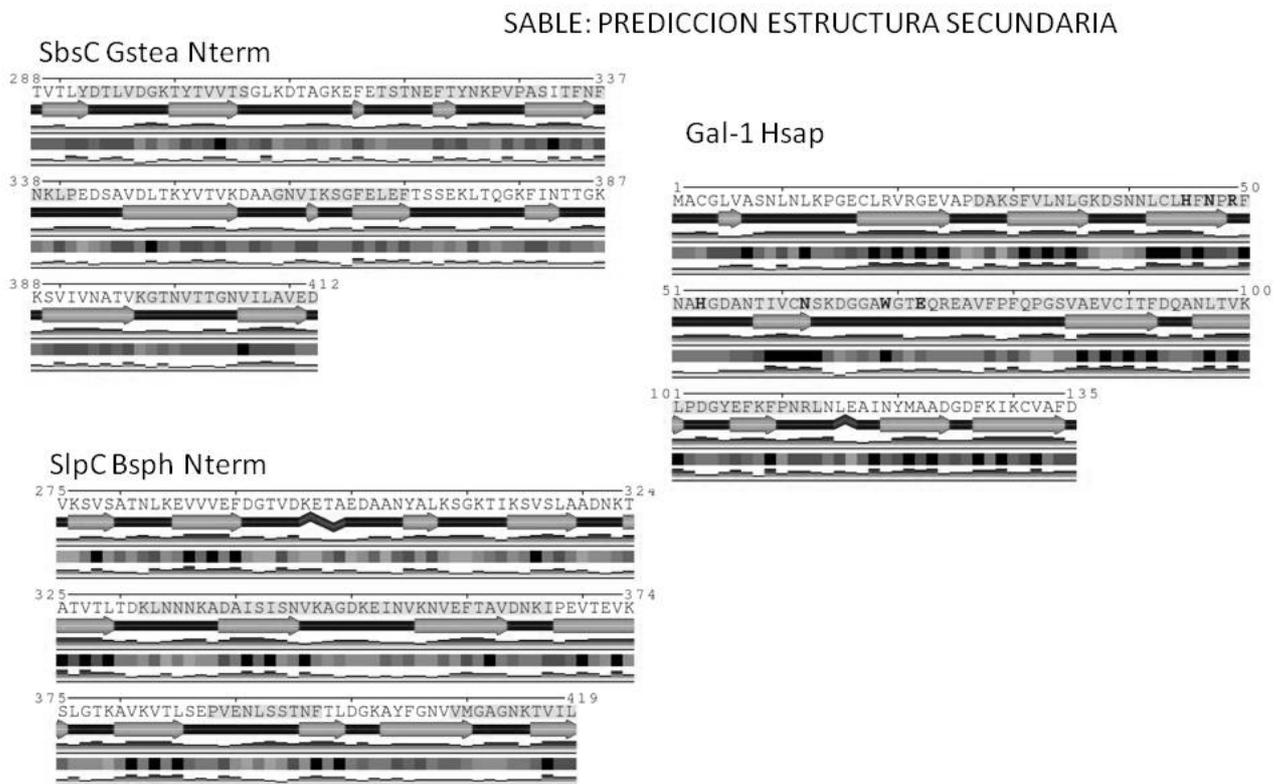
Además se encontró alineamiento al dominio big-2 (bacterial Ig-like domain: dominios con similitud de plegamiento a las inmunoglobulinas) de la proteína SbsB de *Geobacillus stearothermophilus*; y a dominios GH 18 (glicosil-hidrolasas) tipo quitinasa II, que son dominios que catalizan hidrólisis de polímeros de N-acetilglucosamina unidos beta-1,4. En la figura 30 a continuación se muestra el alineamiento.

<b>SlpCBsph</b>	1102	DLVLGTTDNGTITGFVAGTGETLKVTSDSAANVEVTDPTGLAVTAKAKGE	1151
		.:.:.:.: .:.:.: .:.:.: .:.:.: .:.:.: .:.:.: .:.:.: .:.:.:	
CLECT1236	3	DDIITYNPQNGNYQFIEDKRITWKNAKERAEKMEYRGLKGLHATIKSKYE	52
SlpCBsph	1152	ANI	1154
		...:	
CLECT1236	53	LDL	55
-----			
SlpCBsph	459	DKEAPTIVTEATATLETVTLTFSIDMDTVKASNVMYKSGDSKKEASEFE	508
		.:.:.:.:.: .:.:.:.:.: .:.:.:.:.: .:.:.:.:.: .:.:.:.:.:	
CLECT 702	32	DAEKQELLGVRGYLATIITSAYEQEVIHNL--TANCIWLGGTDEKEEGKWE	79
SlpCBsph	509	RIADNKY	515
		.....:	
CLECT 702	80	WVTKPEF	86

Figura 30: Alineamiento de la proteína S-layer con un subgrupo bacteriano de dominios tipo lectina C (CTLD), homólogos a dominios de reconocimiento de carbohidratos. Los números en CLECT indican la posición en la proteína de *Cl. difficile* (EMBOSS MATCHER).

Para Galectina-1, una proteína lectina tipo C que une galactosa, la estructura cristalográfica 3D fue resuelta y depositada en PDB con ID:3M2M. Una de las proteínas S-layer que ya está depositada en PDB es la proteína SbsC, PDB ID:2RA1 de *Geobacillus stearothermophilus*, clasificada como una proteína que une azúcares, debido a su interacción con el SCWP. Esta proteína fue recientemente caracterizada estructuralmente (Horejs *et al*, 2008 y 2010).

A continuación se muestra la predicción de estructura secundaria por SABLE para estas tres proteínas, y el porcentaje de residuos que conforman hoja plegada  $\beta$  (Figura 31).



Proteína	Tamaño fragmento	N° hoja plegada $\beta$	Porcentaje
SbsC	125	52	0,42
Gal-1	135	61	0,45
SlpC	145	70	0,48

Figura 31: Estructura secundaria predicha por el programa SABLE para fragmentos que alinean entre sí de las proteínas SlpC, SbsC y Gal-1. En tabla se muestra el porcentaje de residuos hoja plegada  $\beta$ .

Las tres proteínas tienen similitud de estructura secundaria predicha por SABLE. A la vez, al hacer el cálculo de hoja plegada  $\beta$ . Esta estructura es común en los dominios que interactúan directamente con ligandos que contienen azúcares.

Cuando se analiza con la herramienta NCBI-Blast Needleman-Wunsch el alineamiento proteico de la porción amino terminal de SbsC con SlpC incluye motivos CRD.

---

```

Score = 29.3 bits (64), Expect = 5e-04, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 52/162 (32%), Positives = 70/162 (43%), Gaps = 19/162 (12%)

SlpCBsph 275 VKSVSATNLKEVVVEFDGTVDKETAEDAANYA--LKSGKT---IKSVSLAADNKTATVTL 329
              V+SVSA +      V F   VDK TA   N++ LK +T   KSV ++   TATVTL
SbsC      233 VESVSAIDSTSFKVTFTKPVDKATA-IPKNFSITLKGTTETKLYPKSVEVSESGLTATVTL 291

SlpCBsph 330 TDKLNNNKADAISISNVK--AGDKEINVKNVEFTAVD-----NKIPEVTEVKSLG 377
              D L + K   +   S +K   AG KE           EFT           NK+PE + V
SbsC      292 YDTLVDGKTYTVVTSGLKDTAG-KEFETSTNEFTYNKPVPASITFNFNKLPEDSAVDLTK 350

SlpCBsph 378 TKAVKVTLSEPVENLSSTNFTLDGKAYFGNVVMGAGNKTIVIL 419
              VK      +++   FT   K   G   +   G K+VI+
SbsC      351 YVTVKDAAGNVIKSGFELEFTSSEKLTQGKFINTTGKKSVIV 392
Length=1099

```

---

Figura 32: Alineamiento NCBI BLAST Needleman-Wunsch entre las proteínas SlpC y SbsC (PDB ID: 2RA1). Se marcan resaltados los bloques estructurales de SbsC de *Geobacillus* en SlpC de *B. sphaericus* que corresponden a los probables CRD.

Cuando se realizó el alienamiento de estructura 3D para comparar SbsC (PBD ID: 2RA1) y Galectina-1 PBD ID: 3M2M) usando la herramienta de comparación en RCSB PDB con el algoritmo jFATCAT\_flexibl, se observó un claro alineamiento. (Link:[http://www.rcsb.org/pdb/workbench/showPrecalcAlignment.do?action=pw\\_fatcat&name1=2RA1.A&name2=3M2M.A](http://www.rcsb.org/pdb/workbench/showPrecalcAlignment.do?action=pw_fatcat&name1=2RA1.A&name2=3M2M.A)). Los bloques de alineamientos incluyen los motivos de unión al ligando descripta para Galectina-1 (secuencia H44 N46 R48 H52 N61 W68 E71, Figura 33).

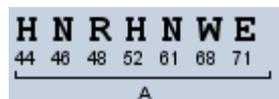


Figura 33: Secuencia de unión a galactosa para Galectina-1

Align 2RA1.A.pdb 412 with 3M2M.A.pdb 132

---

```

2RA1: 291 KNFSITLKGTTETKLYPKSVEVSESGLTATVTLYDTLVDGKTYTVVTSGLKDTAGKEFETSTNEFTYNKPV
      11111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111111122
3M2M: 27 AKSFVNLNLGK-----DSNNLCLHFNPRFNAIG-----DANTIVCNSKDDGT

2RA1: 361 PASITFNFNKLPEDSAVDLTKYVTVKDAAGNVIKSGFELEFTSSEKLTQGKFINTTGKKSVIVNATVKGT
      222222 222222222                333333333333                333333333
3M2M: 68 WGTQR-ETAFPFQP-----GSITEVxITFD-----QADLTIKLP-----

2RA1: 431 NVTIGNVILAVED
      333333333333
3M2M: 102 -DGHEFKFPNRL

```

---



Galectina-1 PBD ID:3M2M

SbsC PBD ID:2RA1

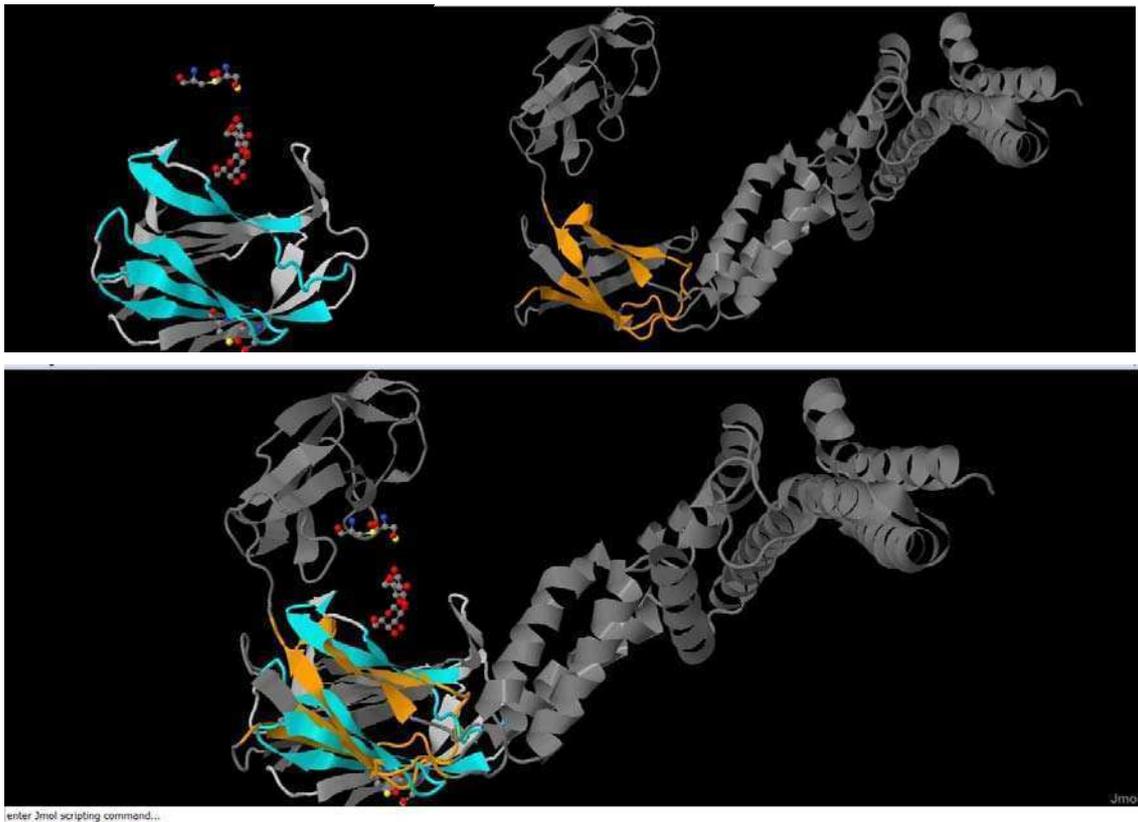


Figura 36: Arriba: Estructura 3D de Galectina-1 en PBD ID: 3M2M (izquierda) y SbsC en PBD ID: 2RA1 (derecha). Abajo: superposición de ambas estructuras.

En el esquema siguiente se muestra la disposición de los dominios hallados con SMART sobre la proteína SlpC.



Figura 37: Esquema del resultado de predicción con el sitio SMART. En rojo, peptide señal; en fucsia segmentos de baja complejidad; RPT: repeticiones detectadas pero no cubiertas por dominios; SLH, en gris

Luego de este análisis, realizamos un resumen sobre el alineamiento SlpC y SbsC de los dominios estructurales y de secuencias encontrados sobre la proteína SlpC.

NW Score = 145  
 Identities = 280/1262 (22%), Positives = 450/1262 (36%), Gaps = 249/1262 (20%)

SlpCBsph 1    MAKQNKGRKFFAASATAALVASAIVPVASAAQLNDFNKISGYAKEAVQSLVDAGVIQGDA    60

SbsC	1	M K+ K K ASA AA A P AS A D + AK ++ MDKK-KAVKLTASAVAASAFVAANPHASQAA--TDVATVVSQAKAQMKAEAYTYTSHTVTE	58
SlpCBsph	61	<b>SLH1</b> NGNFNPLKTIISRA--EAA TIFTNALELE-----AEGDVNFKDVKA-- <b>SLH2</b> G F +K + A +A + NA+ + A+ D D++A + + + A + E	111
SbsC	59	TGQFPDIKDVYAAYNKAKQAYANAVAVVNKAGGAKKDAYLADLQAIYETYVFKANPKSGE	118
SlpCBsph	112	<b>SLH2</b> NGIFEGVSATEFAPNKQLTRSEAAKILVDAFELEGEGLSEF <b>ADASTVKPWAKSYLEIAV</b> + + A +A R E K VDA +L+ +L + K E+	171
SbsC	19	ARVATYIDAYNYATKLDKMRQEL-KAAVDAKDLKKAEL-----YHKISYELKT	166
SlpCBsph	172	<b>SLH3</b> ANGVIKGEANGKTNLNPAPITRQDFAVVFSTRITENV DATPKVDKIEVVDAKTLNVTLS ++ G++ + D + R I ++ K E DA V	231
SbsC	167	RTVIL--DRVYQSTRELLRSTFKADAQALRDLRIYDITVAMKAR--EAQDA----VKAG	218
SlpCBsph	232	DGTKETVTLEKALEPNKETEVTFK--IKDVEYKAKVTVVTTATAVKSVSATNLKEVVVE + K L++ + + FK ++ AK Y V+SVSA + V	289
SbsC	219	NLDKAKAALDQVNQYVSKVTDFAKELQKAAQDAKAAEALTPKVESVSAIDSTSFKVT	278
SlpCBsph	290	FDGTVDKET <b>A-EDAANYALKSGKTI---KSVSLAADNKATVTLTDKLNNNKADAISISN</b> F VDK TA + LK +T KSV ++ TATVTL D L + K + S	345
SbsC	279	FTKPVDKATAIPKNFSITLKGTEKLYPKSVEVSESG <b>LATVTLTYDTLVDGKTYTVVTSG</b>	338
SlpCBsph	346	<b>VK-AGDKEINVKNVEFTA</b> VD-----NKIPEVTEVKSGLTKAVKVLSEPVENLSS +K KE EFT NK+PE + V VK +++	394
SbsC	39	<b>LKDTAGKEFETSTNEFTY</b> NKVPASITFNFNKLPEDSAVDLTKYVTVKDAAGNVIK <b>SGFE</b>	398
SlpCBsph	395	<b>TNFTLDGKAYFGNVVMGAGNKTVILT</b> PYSSSALSVDGDKLTVSGAKDFAGFVSLNSTHEF FT K G + G K+VI+ TV G G V L	454
SbsC	399	<b>LEFTSSE</b> KLQKGFINTTG <b>KKSIV</b> NA-----TVKGTNVTTGNVIL----- <b>CLECT</b>	439
SlpCBsph	455	KVVE <b>DKEAPTVEATATLETVTLTFSE</b> DI <del>MD</del> TVKAS-NVYWKSGDSKKEASEFERIADN VED++A V+E T ++ ++ T+ A+ N + K G+ + S	513
SbsC	440	-AVEDEKAAEVSELKLT-----KDNKEVVTLYANGNAFDKDG-----QISSGLTLTLTA	487
SlpC	514	<b>KYKVFVKGSEKTLPTGKVDVYVEDIKDYS</b> DNKIAKDTKVT-VTPEIDQTRPEVRKVTALD K+K + G+E T D E + +A D VT + P + + +VT	572
SbsC	488	KFKDQY-GNELTGKVAGTDTYTFESLNP-EVLVVPDGSVTPIVPGTALVKVYGEVTKTI	545
SlpC	573	EKTIKV-----TFSKTVDGESAIK----TGNYTVKDK-DDKVVSVDKVTVDKSKSVII T+K T + G S K T T+KD+ +K VI D ++ +V +	622
SbsC	546	PVTVKANPVLETIAVDSTGVSVAKGQKATFKVTLKDQYGNKFTGNVNVTSDKTETATVSV	605
SlpC	623	DLYSKVSVGENTITIKNVKDATKLNNTMLDYTGKFRSDKEGPDYEHVINADAKAKKVVL S + E T+T+ V + G T + K G K KV	682
SbsC	606	S-NSGIGQSEYTVTVNGVAE-----GSTTITIKSG-----TKEVKV--	640
SlpC	683	KFDKMDAASLADYSNYLVKINDTLQTL <b>SEDVATLSVSN</b> DATVVVITFAETIKGDDVVFA ++ + +NY +K+ D + + AT E+ +DV	742
SbsC	641	----PVNVVAGGPVANYQIKVLDDGK-----IDKSAT-----ESPANNDV---	676
SlpC	743	<b>SGKAISGSGKVNVELQVMG</b> VKDTSGNVHKKFNGSENKITLSSTSTP-----LKLAKIDK +L+V V D +GN+ N +T++S +T + +K	797
SbsC	677	-----QLKVYAV-DANGNI---VGDITNDVITITSEATDTNGVIVNASKSTA	718
SlpC	798	<b>DYDAKYT-----AELVDRKTVKVFSTVINS</b> AAANAFTSESHKIDSIQVNGTSTVTVKFK + D Y ++ V ++T+ VK TV T + ++ I +TV K	852
SbsC	719	NGDTVYVITDNGSKVKETLTVKLGTV-----TLGTVDVEVIDITLTKATVVTKKA	769
SlpC	853	DEINTNASD-----LDLK-VNLSKLVDIAGNESTNNTPIAIKAGINLLDSVAPV D I +A+D LD+K N + +VD A +TN A+K+ ++ + S	900
SbsC	770	DLIELDAADNGDALAKLLANLDIKDQNGNPMVDSAATPNTNEKLQALKSVLSGIVSSDTS	829
SlpC	901	VVGEPPVDKETITFTFSENLTSVSIGEVLSTDFTVTRVSDNKDLAIKDYSAIANNQVV V+G SVS + L D +++ ++ K + V ++	960
SbsC	830	VIG-----SVSNVDNLKDDASISGLAVKKAGTVTLTLVFNEDSKIAP	871
SlpC	961	ITLSDNREVATAYKVTAKNAKLIIDDNGDKKNAIADFTKTTATKVEASGTLSDAAKTNL I ++ AT VT L+ G K TK TAT SG A +	1020
SbsC	872	IAITVKAPAATQDGVTVGLDLVPGVTGVGK-----TKFTATDKIKSGHKLYAVDDSD	924
SlpC	1021	NNEITKAKDAKATGT---EGTAATNQI-VGSKDALQVAIDVAELVKNDT----- A A A GT T N+I VG+ + A + +++ D+	1065
SbsC	925	-----AVPAPAVGTTTRNSTKFANEITVGTTEVAANAGQIITVIEVDSSDRVVGKTFTV <b>CLECT</b>	978
SlpC	1066	-AATLQQLTDAKTDLTAAITAYNAAKVEDISSLLVAP <b>DLVLGTTDNGIITGFVAGTGET-</b> AA L D KT TA +T +V +LL DL G G A	1123

```

SbsC  979  EAADLSVAAD-KTGFTATVPTGGNQVTTGKTL LAVSDLANGHKLYAAAAGSSAAAAPVK  1037
                               CLECT
SlpC  1124  -LKVTSDSAANVEVTDPTGLAVTAKAKGEANI-LVQVLKGDKVIKTGTVKVT-----V  1174
                               + T + T+ T V A+ +I +++V + KV+ +T
SbsC  1038  GIAYTDTTVRTTYGTEVTS GTVEVDAQDGHISIIIEVDENGKVVGYKDYTITGIQIGTKS  1097

SlpC  1175  SE  1176
                               +
SbsC  1098  AS  1099

```

---

Figura 38: Se marcan los Bloques estructurales de SbsC de *Geobacillus stearothermophilus* en SlpC de *B. sphaericus* que corresponden a los probables CRD (carbohydrate binding domains). En gris están marcados los SLH, en verde los dominios tipo lectinas, en amarillo y rojo los probables CRD y en celeste las repeticiones internas.

# Capítulo 2:

## **EXPRESIÓN DE S-LAYER DE**

### ***Bacillus sphaericus*: ESTRÉS**

## Expresión de S-layer de *Bacillus sphaericus* durante estrés

El estudio de la respuesta a estrés es un tema de investigación abordado por el laboratorio donde se realizó la tesis. Siendo la Capa-S (S-layer) la primera barrera de contacto en relación al medio externo, esta puede sufrir modificaciones por estrés y en particular por el agregado de NaCl, generando un estrés hiperosmótico. En el presente capítulo, se evaluará la función de la proteína S-layer frente a distintos efectores de estrés.

### S-layer y desafío de estreses

Para investigar el rol de la S-layer en la adaptación frente a estrés, se decidió ensayar experimentos de pelado de S-layer y desafío con distintas condiciones de estrés. Estos desafíos fueron: estrés frío, de calor, ácido, oxidativo, osmótico.

El protocolo fue el siguiente: cultivos líquidos en LB de *Bacillus sphaericus* 2362 en fase exponencial de crecimiento fueron sometidos o no al pelado de S-layer por LiCl. A esos dos tipos de cultivos (+ y – S-layer) se los enfrentó a estrés de temperatura (frío y calor), acidez, etanol, peróxido y osmótico por cloruro de sodio del siguiente modo:

- Frío: -20° C 24 h
- Calor: calentamiento 60° C 30 min
- Acidez: pH 3,5 1h
- Etanol: + etanol 20% 30 min
- Oxidativo: LB 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 h
- Hiperosmótico: LB + 0,5 M NaCl, 3 y 24 h
- Controles: LB sin tratamientos, 30 min, 1 h y 3 h

Luego se efectuaron recuentos en placas con diluciones seriadas al décimo y se calcularon las UFC/ml.

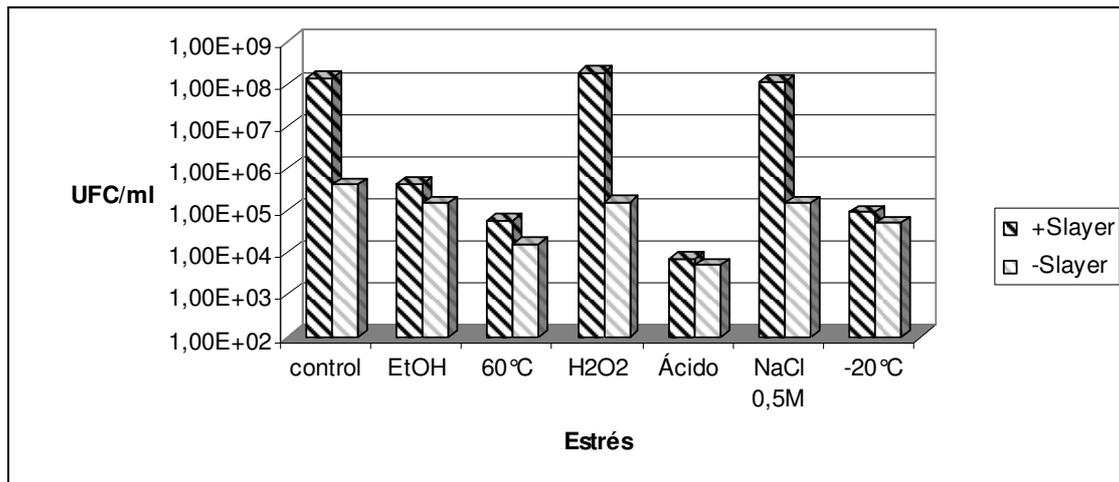


Figura 39: Efecto de la ausencia de S-layer frente a distintas condiciones de estrés.

Se puede observar que los estreses de etanol, ácido, por calor y frío en sí ya muestran efectos deletéreos en la condición control y no se modifican mayormente en los cultivos depletados de S-layer (Figura 39).

Solo los tratamientos con peróxido e hiperosmótico no afectan la viabilidad de los cultivos controles. En esos casos la eliminación de la S-layer produce recuentos aun menores que en el control no sometido a estrés.

Por ello se continuaron los experimentos de estrés por agregado de NaCl (hiperosmótico).

### Morfología de células en estrés osmótico

Para evaluar las modificaciones en la envoltura celular por agregado de NaCl, se hicieron observaciones microscópicas de los cultivos de *Bacillus sphaericus* 2362 crecidos en medio LB o LB + 1M NaCl (Microscopio Olympus, aumento 1000X)

En la Figura 40 se observa la diferencia de morfologías de la pared bacteriana de los bacilos. En la condición de estrés, los bacilos tienen una pared mucho más angosta y menos difusa que lo que se observa en la condición normal, además de verse mucho más alargados.



Figura 40: Observación de *Bacillus sphaericus* 2362 en condición a) normal y b) de estrés osmótico

Esta morfología de la pared puede deberse a un cambio que se produce en la capa S. Mutantes de una S-layer de *Bacillus anthracis* (BsIO) presentan la misma morfología que la que vemos en la condición de hiperosmolaridad (Anderson *et al*, 2011).

### **Función de la proteína S-layer en el crecimiento de *Bacillus sphaericus* durante el estrés osmótico**

A fin de observar si la S-layer participaba en la osmoadaptación, se realizaron ensayos donde se compararon cultivos desprovistos (pelados) o no de S-layer.

En primer lugar se evaluó la toxicidad del tratamiento de LiCl, observando la viabilidad del tratamiento de las células luego de quitarles la capa S. Para esto se trataron las células con el agente desagregante y se observó la recuperación en LB. Para eliminar la S-layer, los cultivos fueron sometidos a tratamiento suave con LiCl. Cultivos crecidos en LB 17hs son cosechados, tratados con LiCl (6M) durante 15 minutos.

Lo que se desprende del ensayo, es que el LiCl no afecta la viabilidad, y que las células luego del pelado de capa S tienen una etapa lag para su recuperación de 3 horas. Sin embargo en esas condiciones y en presencia de NaCl no se observa crecimiento en las 4 horas del ensayo.

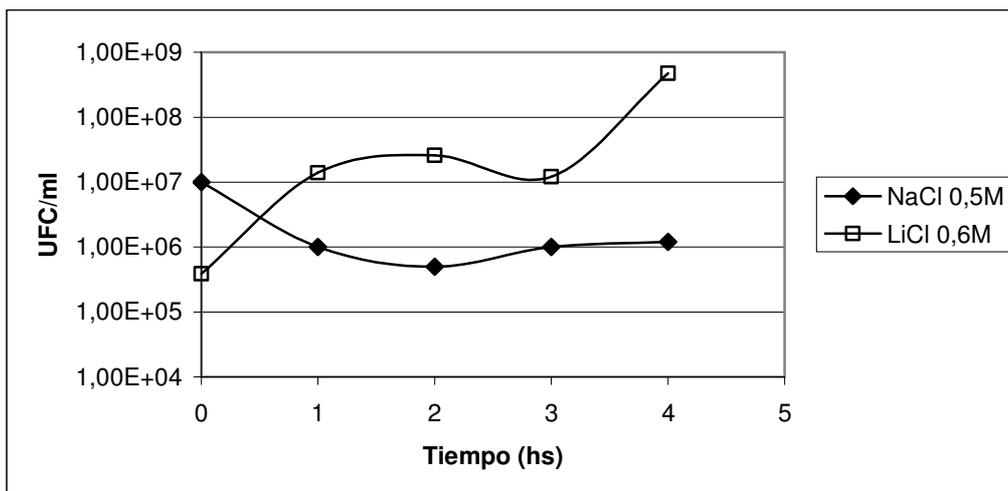


Figura 41: Viabilidad luego del tratamiento de LiCl. También se observan las UFC/ml de un cultivo crecido en hiperosmolaridad.

En un segundo experimento se sometieron las células “peladas” de S-layers a diferentes concentraciones de NaCl (0,3 0,5 y 0,7M). Como controles también se realizaron cultivos sometidos directamente a estrés osmótico sin extraer las S-layers.

Las células a las cuales se les extrajo las S-layers tuvieron un crecimiento en todas las condiciones de estrés mucho más retrasado que las células que poseían su capa S intacta en las mismas condiciones de estrés (Ver Figura 42)

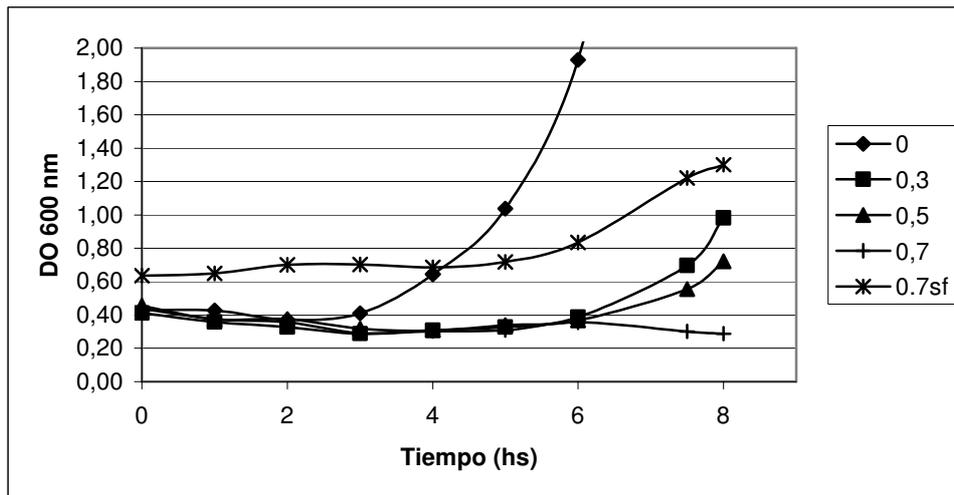


Figura 42: crecimiento medido por DO 600 nm. Luego de extracción de S-layer, se cultivó en LB + NaCl en las Concentraciones indicadas. SF: control de células sin extraer la capa S

A diferentes tiempos del experimento se evaluó la presencia de la S-layer en los cultivos realizando un western blot revelando con anticuerpo anti S-layer. Como se observa en la Figura 43, la S-layer se debe resintetizar en estadios tempranos del crecimiento bacteriano (antes de las 3 hs).

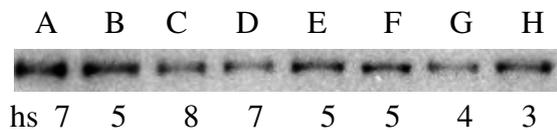


Figura 43: WB de las células luego del pretratamiento con LiCl. Revelado con anticuerpo anti S-layer. Calles A y B: células crecidas en LB 0,5M NaCl; calles C, D y E, crecimiento en LB 0,3M NaCl; calles F, G y H, crecimiento en LB. Las calles corresponden a los cultivos de los tiempos post-extracción de S-layer que se indican en las calles.

Teniendo en cuenta estos resultados, se buscó encontrar la condición de tiempo de recuperación que permita observar la ausencia de S-layer (o de su ubicación en superficie). Se realizó el mismo protocolo pero cosechando las células durante las primeras dos horas de recuperación post-tratamiento con LiCl.

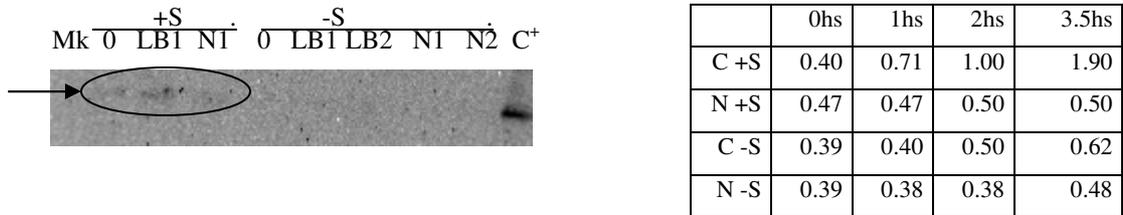


Figura 44: Western blot de células luego del tratamiento con LiCl (-S) para quitar la proteína S-layer o con solución fisiológica (+S). C+: proteína S-layer pura. LB, cultivo control; N, cultivo crecido en 0,5M NaCl; 1 y 2 indican 1 y 2 horas de recuperación luego del pretratamiento. A la derecha se indica la densidad óptica alcanzada al cosechar las células para el wb

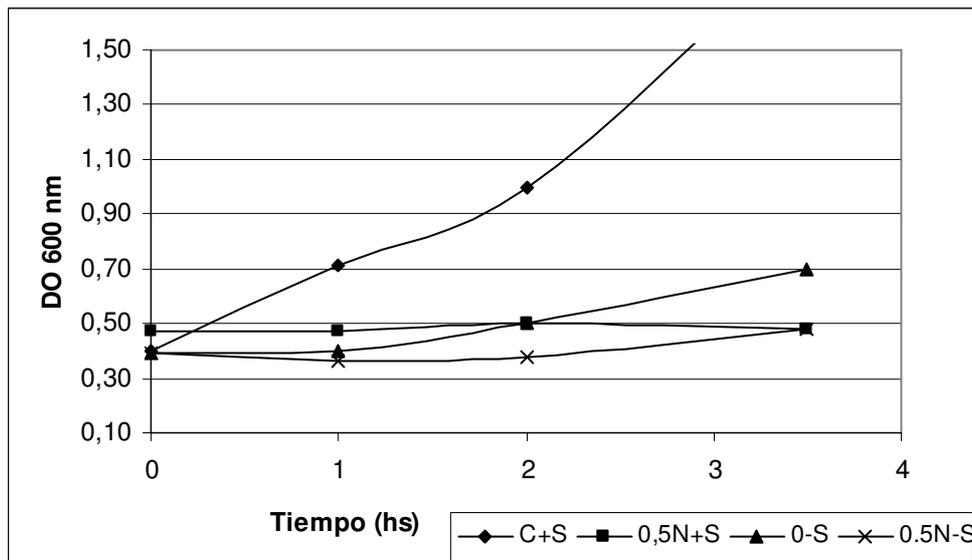


Figura 45: crecimiento medido por DO 600 nm. Luego de extracción de S-layer o no (-S y +S), se cultivó en LB + 0,5 M NaCl.

En estos experimentos realizados en tiempos más cortos post-tratamiento de eliminación de la S-layer, recién después de 3 hs de crecimiento se revela la presencia de S-layer en cultivos en hiperosmolaridad, lo que coincide con el inicio del crecimiento.

En la condición control no pareciera alterarse el crecimiento, bajo condiciones de elevada concentración de sal se observa un retardo significativo en el crecimiento. Esto sugiere que la S-layer es necesaria en la osmoadaptación.

## Análisis de expresión de las distintas cepas en diferentes condiciones de osmolaridad, en células y secretadas al sobrenadante

Para evaluar las proteínas S-layer de las cepas *B. sphaericus* 2362 y C7 provenientes de cultivos con o sin el agregado de NaCl como efector de estrés (LBN y LB), se extrajeron las proteínas S-layer y corrieron en un gel de poliacrilamida 7,5%.

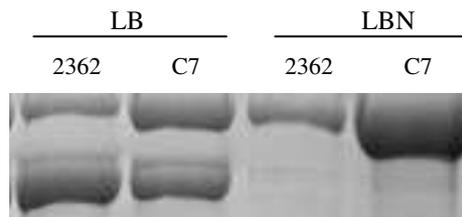


Figura 46: Tinción con coomassie blue de un SDS-PAGE 7,5% de extracción de S-layer de *B. sphaericus* 2362 y C7 crecidos en medio LB y LB + NaCl 0,6M (LB y LBN correspondientemente).

Como puede verse en la figura, en la condición control de crecimiento en ambas cepas puede distinguirse dos formas de proteína, de pesos moleculares aparentes de 130 y 116 kDa, mientras que en la condición de estrés osmótico, sólo se observa una banda única de PM cercano a 129 kDa. Esta diferencia puede ser debida entonces a la presencia de S-layer glicosilada, en uno o dos sitios, con heterogenicidad del largo de los glicanos; o alguna otra modificación postraduccional.

Para otorgar identidad de las proteínas, se realizó un western blot de las mismas corridas.

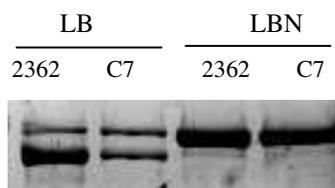


Figura 47: Western blot de extracción de S-layer de *B. sphaericus* 2362 y C7 crecidos en medio LB y LB + NaCl 0,6M revelado con Ac anti S-layer *B. sphaericus* 2362.

Como se aprecia en la figura, todas las bandas de las extracciones corresponden a proteínas S-layer.

El peso molecular de la proteína de acuerdo a su secuencia proteica debería ser de 125kDa. La obtención de dos bandas hace sospechar que por lo menos una de ellas

correponde a modificaciones postraduccionales o a la utilización de un promotor alternativo.

Se sabe que la glicosilación representa la mayor modificación postraducciona en bacterias y, en particular, en las S-layers. Dentro de la familia *Bacillaceae*, estas glicoproteínas poseen una larga cadena de glicanos unidos en uniones O-glicosídicas. En algunas ocasiones, la glicoproteína guarda relación con los efectos patogénicos de la especie (Messner *et al*, 2008) y puede variar con el estado fisiológico, de modo de diversificar las propiedades de superficie para supervivencia en un hábitat competitivo. En este contexto, se decidió analizar las S-layers de cultivos obtenidas de LB con o sin NaCl 0,6M de distintas fases de crecimiento. Se cosecharon células de fase exponencial ( $DO_{600} \sim 1$ ) y de cultivos de fase estacionaria ( $DO_{600} \sim 4-5$ ). Las alícuotas normalizaron a la misma densidad óptica y se separó el pellet del sobrenadante. Todas las fases y alícuotas se liofilizaron y se corrieron en un SDS-PAGE, seguido de western blot.

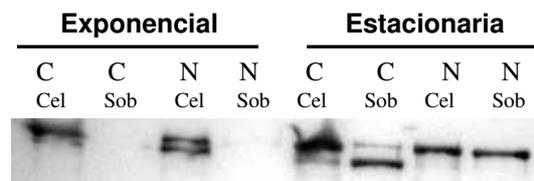


Figura 48: Western blot de distintas fases de crecimiento en condiciones C:control y N: hiperosmolaridad. Cel: S-layer proveniente de células, Sob: proveniente de sobrenadante. Panel A y B: mayor y menor tiempo de exposición en el revelado respectivamente.

Como se puede observar en la figura 48, durante la fase estacionaria, una gran cantidad de S-layer queda expulsada en el sobrenadante y corresponden a la forma de mayor peso molecular.

Todas estas formas proteicas encontradas fueron cuantificadas por densitometría. La mayor diferencia entre ambas formas se observa en fase estacionaria. Mientras que en las células en medio control la mayor parte de la proteína tiene alto peso molecular (en proporciones 0,8 vs 0,2), la excretada o desprendida al sobrenadante es la de menor peso molecular (en relación 0,9 vs 0,1). En condición de alta osmolaridad, la proteína hallada tanto en la célula como en el sobrenadante es de alto peso molecular, en menor cantidad que en la condición de crecimiento en LB, alrededor de un 40 % respecto del crecimiento en medio control (ver tabla 8).

Densitometría en fase	células en LB	sobrenadante	células en N	sobrenadante en
-----------------------	---------------	--------------	--------------	-----------------

exponencial		LB		N
Mayor PM aparente	58	ND	26	1
Menor PM aparente	81	2	80	0

Densitometría en fase estacionaria	células en LB	sobrenadante LB	células en N	sobrenadante en N
Mayor PM aparente	100,0	5,6	42,8	41,1
Menor PM aparente	26,6	41,8	10,1	2,0

Tabla 8: Densitometría de las formas proteicas halladas. Se tomó como referencia (100%) la banda de mayor intensidad.

En la Figura 48 puede verse una diferencia de peso molecular entre dos formas de S-layer que fue calculada (Tabla 9)

PM	<b>2362</b>	<b>2362 N</b>
mayor	130,1 ± 8,1	129,6 ± 5,6
menor	116,8 ± 5,3	

Tabla 9: Cálculo de peso molecular para las tres formas proteicas de S-layer.

Autores han reportado que en un mismo microorganismo pueden coexistir distintos grados de glicosilación de una misma proteína S-layer. Un ejemplo es el microorganismo *Geobacillus stearothermophilus*, que posee tres grados de glicosilación para la misma S-layer (Schäffer y Messner 2001). Además, sostienen que las bacterias pueden regular la glicosilación en S-layers de modo que no sólo varíen el número de sitios que se glicosilan (macroheterogenicidad) sino también el grado en que se glicosila cada uno de los sitios, en cuanto al largo de la cadena de glicanos (microheterogenicidad).

A fin de comprobar si estas diferencias se deben a la glicosilación de una de las formas, se realizó una corrida SDS-PAGE seguida de una tinción que revela glicoproteínas (Gander JE, 1984) de todas estas formas (ver capítulo 1) (Esta técnica revela residuos hexosas, hexuronosil o pentosas). Se observa que en todas condiciones la proteína podría estar glicosilada. Estos resultados indican que podría haber una regulación de la síntesis proteica y de su direccionamiento en medio de hiperosmolaridad.

Para comprobar si los clones de *B. sphaericus* C7 y C11 responden de la misma forma a las condiciones de estrés, se analizaron las S-layer en las dos condiciones: LB y LBN

Como se observa en la figura 49, estas cepas presentan la misma distribución de formas. Por otro lado, la producción de S-layer en medio salino es mucho mayor en estas cepas que en la 2362.

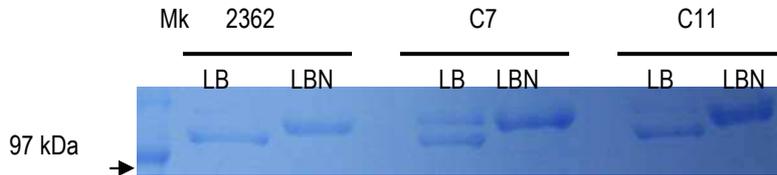


Figura 49: Coomassie de una corrida electroforética en condiciones de cultivo en medio LB y LBN hiperosmolaridad para las cepas *B. sphaericus* 2362, C7 y C11.

También se analizó la presencia de S-layer en las distintas fases de crecimiento, sometidas o no a estrés, tanto las que forman parte de la envoltura como las secretadas al medio.

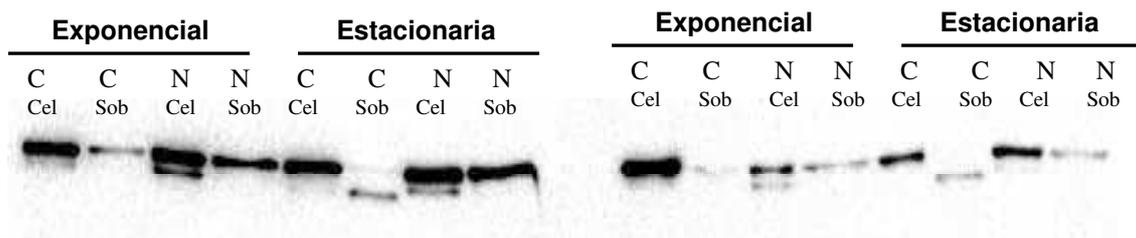


Figura 50: Western blot de distintas fases de crecimiento en condiciones C: control y N: hiperosmolaridad. Cel: S-layer proveniente de células, Sob: proveniente de sobrenadante. Panel izquierdo, *Bacillus sphaericus* C11; panel derecho C7.

Análisis para C11

	Densitometría respecto a mayor PM aparente en C11 LB							
Mayor PM	100,0	4,2	106,8	38,3	79,2	ND	86,6	101,9
Menor PM	4,2	0,7	16,2	0,1	5,1	6,4	17,6	0,5

Análisis para C7

	Densitometría respecto a mayor PM aparente en C7 LB							
Mayor PM	100,0	0,5	13,4	2,4	16,3	ND	21,9	2,5
Menor PM	4,6	0,3	3,9	0,1	0,1	4,3	0,4	0,2

Tabla 10: densitometría

El patrón de síntesis de las proteínas en distintas condiciones y en distintos compartimientos celulares (envoltura y sobrenadante) es similar al encontrado en la cepa de *Bacillus sphaericus* 2362.

Todas estas formas fueron enviadas para identificar por el servicio de MALDI de esta facultad (CEQUIBIEM), reafirmando que las tres S-layer tienen la misma secuencia proteica.

### Análisis de la expresión por Real Time PCR

Para determinar si hay un cambio en la concentración proteica de la S-layer en medio hiperosmótico, se realizaron cultivos en medio LB y LB + 0,5M NaCl y fueron cosechados en fase exponencial de crecimiento. Posteriormente se analizó el nivel de proteína expresada en la superficie bacteriana. Como puede observarse en la figura 51, en condición de hiperosmolaridad, aumenta la concentración de proteína S-layer en la envoltura.

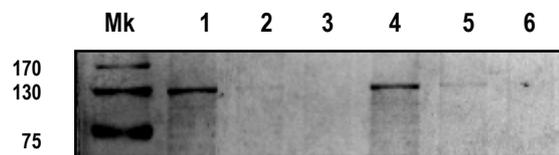


Figura 51: Tinción de coomassie de S-layer provenientes de cultivos en LB (1, 2, 3) y LBN (4, 5, 6) en fase exponencial. Calles: 1 y 4, tal cual; 2 y 5, dilución 1/10; 3 y 6, dilución 1/100

Nos interesó saber si este aumento se debe a mayor estabilidad, menor degradación, o mayor transcripción. Para esto hicimos una Real Time PCR con primers que amplifican para una región del gen que codifica para ARNr 16S (gen normalizador) y primers que amplifican para región codificante de la S-layer. En la figura 52 se ve el producto final de expresión corrido en un gel de agarosa, como control de la RT.

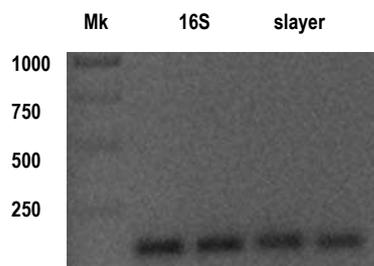


Figura 52: Gel de agarosa del producto de Real Time PCR de los genes utilizados para amplificar el gen ARNr 16S y el gen de la proteína S-layer

Se analizó el nivel de expresión y se obtuvo como resultado que existe un aumento de síntesis de mensajeros en la condición de hiperosmolaridad mayor a 2 veces y media.

Condición	Ct gen <i>s/pC</i>	Ct gen 16s	$\Delta$ Ct <i>s/pC</i> -16s	$\Delta\Delta$ Ctcontrol	Actividad relativa
Control	21,61	29,99	-8,38	0	1
0,5 M NaCl	20,91	30,94	-10,03	-1,65	2,7225

Tabla 11: Real Time PCR

Observamos que el aumento en la expresión de la proteína S-layer en alta sal no es significativo.

En efecto, en LBN la cantidad de proteína S-layer es mayor: tanto la fijada a la envoltura como la secretada al sobrenadante.

Los experimentos de depletado de los cultivos de S-layer, indican claramente que la capa S es importante para sobrellevar el estrés. ¿A qué se deben por un lado el aumento de capa S en las células y le expulsión hacia el sobrenadante en la condición LBN? ¿Podrían estos resultados deberse a que como la proteína se encuentra adherida en la célula por fuerzas no covalentes en la condición de alta concentración de NaCl, hay un aumento de la fuerza iónica, lo que aumenta la cantidad de S-layer liberada al medio? Puesto que se “libera” proteína, la célula debe sintetizar más S-layer para dirigirla a la pared, lo que se refleja en el aumento en el nivel de expresión.

Resultados similares tanto de cantidades de S-layer como de aparición de diferentes formas en cuanto al peso molecular frente al estrés osmótico se han obtenido en el laboratorio con cultivos de *Lactobacillus acidophilus* (Paula Ojeda Tesis de licenciatura diciembre 2011). En esta caso se postuló que el aumento en la cantidad de proteína S-layer sintetizada en estrés salino cumpliría la función de proveer rigidez para contrarrestar la laxitud de la nueva pared celular provocada por las diferencias en peptidoglicanos + ácidos teicoicos ya observados en trabajos previos del laboratorio (Piuri y Palomino tesis doctorales).

En cuanto a el o los tipos de S-layer, tanto los resultados aquí presentados, como los obtenidos en otras especies, sugieren la presencia de modificaciones postraduccionales (glicosilación o lipidización) importantes para expresar virulencia y/o adhesión a células epiteliales blanco de acción. Estos cambios, a diferencia de los cambios en la composición de aminoácidos, permiten adaptarse a modificaciones transientes ambientales relativamente rápidos y reversibles.

## Análisis de las secuencias proteicas mediante MALDI TOF

Sabiendo que la proteína podría ejercer un rol en la osmoadaptación y que quizás se vea reflejado en modificaciones en su estructura, ya sea primaria o conformacional, se decidió enviar a secuenciar por MALDI las tres formas observadas en las corridas electroforéticas y la encontrada para las de la cepa C7.

Cada una de las bandas obtenidas y purificadas, se trató con tripsina a fin de obtener el espectro de péptidos. El reporte de la secuenciación indica que todas las proteínas corresponden a una S-layer típica de *B. sphaericus*.

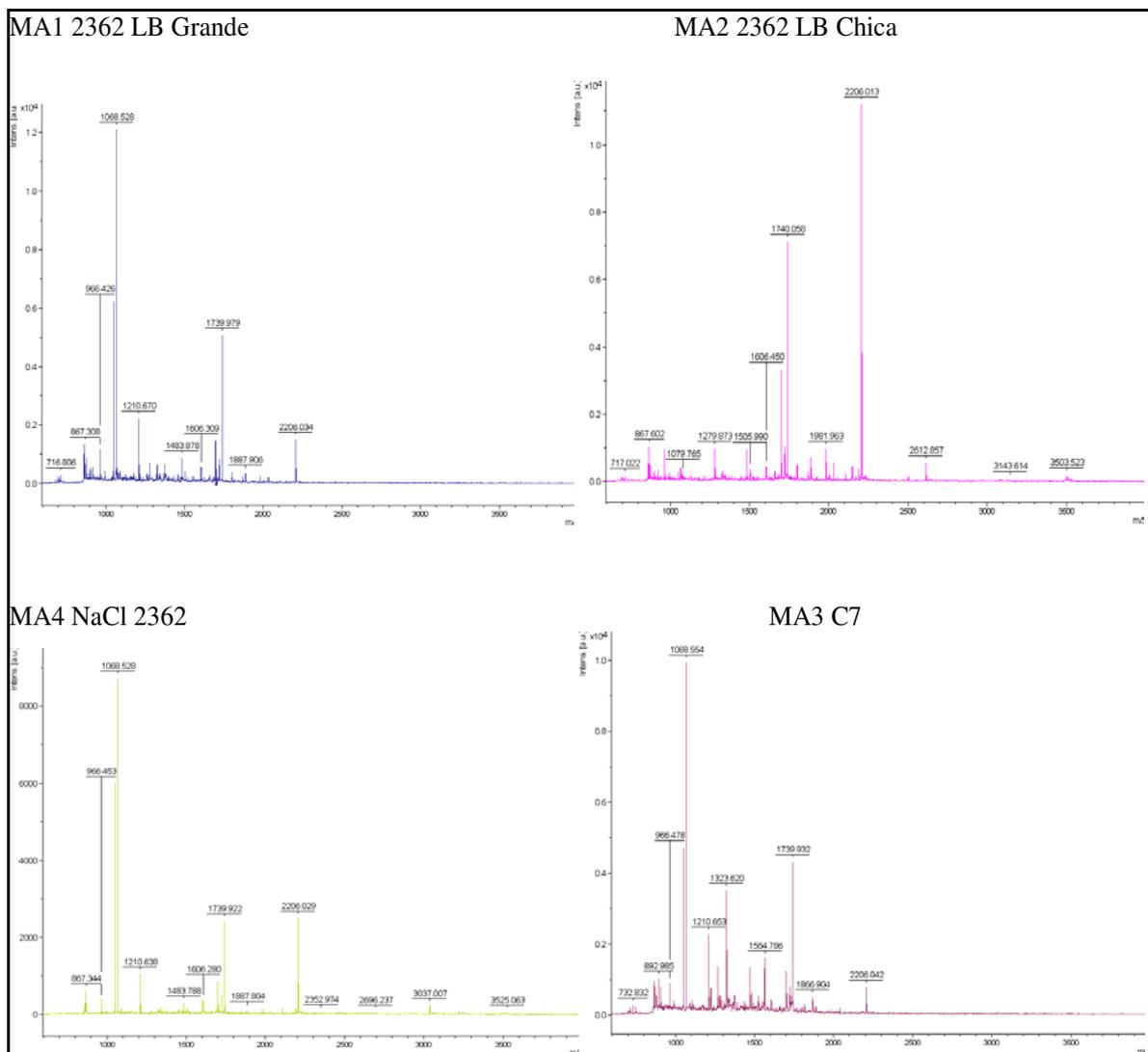


Figura 53: Análisis MALDI TOF. Espectros de % de intensidad en función de la relación m/z de los resultados de tripsinización de las proteínas S-layer provenientes de *Bacillus sphaericus* 2362 crecido en LB (proteínas de 130 y de 116 kDa, grande y chica respectivamente) y en LB + NaCl 0,6M; y de la proteína S-layer de la cepa C7.

Los péptidos obtenidos son similares en todas las muestras. Sin embargo algunos de los péptidos se hallan presentes solo en la condición control (LB) y ausentes en otros. Por ejemplo, los péptidos de m/z 2352, 2696, 3037 y 3525 están presentes en la proteína extraída desde la condición de hiperosmolaridad (LBN) y no están en la de condición de crecimiento en LB. Los péptidos 1323 y 1564 aparecen en S-layer de la cepa C7 y no aparecen en las otras tres proteínas.

Con algunos de los péptidos de cada una de las proteínas se secuenció para obtener las huellas peptídicas que permiten identificar los aminoácidos que componen las proteínas en cuestión. A continuación en la figura se muestran en rojo los productos que lograron ser secuenciados luego de la digestión con tripsina.

MA1 2362 LB grande	score 389	MA2 2362 LB chica	score 290
1 MAKQKGRKFAAASATAALV ASAIVPVASA AQLNDFNKIS GYAKEAVQSL		1 MAKQKGRKFAAASATAALV ASAIVPVASA AQLNDFNKIS GYAKEAVQSL	
51 VDAGVIQGDA NGNFNPLKTI SRAEAAITFT NALLEAEGD VNFKDVKADA		51 VDAGVIQGDA NGNFNPLKTI SRAEAAITFT NALLEAEGD VNFKDVKADA	
101 WYYDAIAATV ENGIFEGVSA TEFAPNKQLT RSEAAKILVD AFELEGGDL		101 WYYDAIAATV ENGIFEGVSA TEFAPNKQLT RSEAAKILVD AFELEGGDL	
151 SEFADASTVK PWAQSYLEA VANGVIKGESE ANGK <b>TNLNPN APITRQDFAV</b>		151 SEFADASTVK PWAQSYLEA VANGVIKGESE ANGK <b>TNLNPN APITRQDFAV</b>	
201 VFSRTIEWVD ATPKVDKIEV VDAKTLNVL SDGKTEVTL EKALEPNKET		201 VFSRTIEWVD ATPKVDKIEV VDAKTLNVL SDGKTEVTL EKALEPNKET	
251 EVTRKIDVE YKAKVTVVVT TATAVKVSA TNLKEVVVEF DGTVDKETAE		251 EVTRKIDVE YKAKVTVVVT TATAVKVSA TNLKEVVVEF DGTVDKETAE	
301 DAANYALKSG KTKSVSLAA DNK <b>TATVTLT DKLNNKADA</b> ISISNVKAGD		301 DAANYALKSG KTKSVSLAA DNK <b>TATVTLT DKLNNKADA</b> ISISNVKAGD	
351 KEIN/KNVEF TAVDNKIEV TEVKSGLTKA VKVTLSEPVENLSSTNFTLD		351 KEIN/KNVEF TAVDNKIEV TEVKSGLTKA VKVTLSEPVENLSSTNFTLD	
401 <b>GKAYFGNVVM GAGNKT</b> VILT PYSSSALS VG DHKLTVSGAK <b>DFAGFVSLNS</b>		401 <b>GKAYFGNVVM GAGNKT</b> VILT PYSSSALS VG DHKLTVSGAK <b>DFAGFVSLNS</b>	
451 <b>THEFKV</b> VEDK EAPTVTEATA TLETVTLTFS EDIDMDTVKA SNVYWKSGDS		451 <b>THEFKV</b> VEDK EAPTVTEATA TLETVTLTFS EDIDMDTVKA SNVYWKSGDS	
501 <b>KKEASEFERI</b> ADNKYKVFVK GSEKTLPTGK VDVYVEDIK YSDNKAIDT		501 <b>KKEASEFERI</b> ADNKYKVFVK GSEKTLPTGK VDVYVEDIK YSDNKAIDT	
551 <b>KVTVTPBDQ TRPEV</b> RKVTA LDEKTKVTF SKTVDGESAI KTGNYTVKDK		551 <b>KVTVTPBDQ TRPEV</b> RKVTA LDEKTKVTF SKTVDGESAI KTGNYTVKDK	
601 DDKVVSVDKV TVDSKDSKSV IDLYSKVSV GENTITKVN KDATKLNTM		601 DDKVVSVDKV TVDSKDSKSV IDLYSKVSV GENTITKVN KDATKLNTM	
651 <b>LDYTGK</b> FRS DKEGPDYEHV INADAKAKKV VLKFDK <b>MDA ASLADYSNYL</b>		651 <b>LDYTGK</b> FRS DKEGPDYEHV INADAKAKKV VLKFDK <b>MDA ASLADYSNYL</b>	
701 <b>VKINDL</b> QTL SEDVATLSVS NDA TVTITF AETIKGDDVV FASGKAISGS		701 <b>VKINDL</b> QTL SEDVATLSVS NDA TVTITF AETIKGDDVV FASGKAISGS	
751 <b>GKVNVELQV MGV</b> KDTSGNV HKKFNGSENK ILSSTSTPL KLAIDKDYD		751 <b>GKVNVELQV MGV</b> KDTSGNV HKKFNGSENK ILSSTSTPL KLAIDKDYD	
801 <b>AKYTAELVDR</b> KTVKVK <b>FSTV INSAANAFT</b> SESHKIDSIQ VNGTSTVTVK		801 <b>AKYTAELVDR</b> KTVKVK <b>FSTV INSAANAFT</b> SESHKIDSIQ VNGTSTVTVK	
851 FKDEINTNAS DLDLKVNLSK LVDIAGNEST NNTPAIKAG INLLDSVAPV		851 FKDEINTNAS DLDLKVNLSK LVDIAGNEST NNTPAIKAG INLLDSVAPV	
901 VVGEVPV DKE TITTFSENLS TSVSIGEVLSD TDFVTRVSD NKDLAID <b>KDYS</b>		901 VVGEVPV DKE TITTFSENLS TSVSIGEVLSD TDFVTRVSD NKDLAID <b>KDYS</b>	
951 <b>VAIANNQV V I</b> TLSDNREVA TAYKVTAKNA <b>KLITDDNGDK KNAIADFTKT</b>		951 <b>VAIANNQV V I</b> TLSDNREVA TAYKVTAKNA <b>KLITDDNGDK KNAIADFTKT</b>	
1001 TATKVEASGT <b>LSLDAAK</b> TNL NNETKAKDA KATGTEGTA TNOVGS <b>KDA</b>		1001 TATKVEASGT <b>LSLDAAK</b> TNL NNETKAKDA KATGTEGTA TNOVGS <b>KDA</b>	
1051 <b>LQVAIDV AEL</b> VKNDTAA TLQ QLTDAKDTL AAITAYNAAK VEDISSLLVA		1051 <b>LQVAIDV AEL</b> VKNDTAA TLQ QLTDAKDTL AAITAYNAAK VEDISSLLVA	
1101 PDLVLTGTDN GTITGFVAGT GETLKVTSDS AANVEVTDPT GLAVTAKAKG		1101 PDLVLTGTDN GTITGFVAGT GETLKVTSDS AANVEVTDPT GLAVTAKAKG	
1151 EANILVQVLK GDKVKTGTV KVTVSE		1151 EANILVQVLK GDKVKTGTV KVTVSE	
MA4 2362 N	score 445	C7 grande en LBscore 389	
1 MAKQKGRKFAAASATAALV ASAIVPVASA AQLNDFNKIS GYAKEAVQSL		1 MAKQKGRKFAAASATAALV ASAIVPVASA AQLNDFNKIS GYAKEAVQSL	
51 VDAGVIQGDA NGNFNPLKTI SRAEAAITFT NALLEAEGD VNFKDVKADA		51 VDAGVIQGDA NGNFNPLKTI SRAEAAITFT NALLEAEGD VNFKDVKADA	
101 WYYDAIAATV ENGIFEGVSA TEFAPNKQLT RSEAAKILVD AFELEGGDL		101 WYYDAIAATV ENGIFEGVSA TEFAPNKQLT RSEAAKILVD AFELEGGDL	
151 SEFADASTVK PWAQSYLEA VANGVIKGESE ANGK <b>TNLNPN APITRQDFAV</b>		151 SEFADASTVK PWAQSYLEA VANGVIKGESE ANGK <b>TNLNPN APITRQDFAV</b>	
201 VFSRTIEWVD ATPKVDKIEV VDAKTLNVL SDGKTEVTL EKALEPNKET		201 VFSRTIEWVD ATPKVDKIEV VDAKTLNVL SDGKTEVTL EKALEPNKET	
251 EVTRKIDVE YKAKVTVVVT TATAVKVSA TNLKEVVVEF DGTVDKETAE		251 EVTRKIDVE YKAKVTVVVT TATAVKVSA TNLKEVVVEF DGTVDKETAE	
301 DAANYALKSG KTKSVSLAA DNK <b>TATVTLT DKLNNKADA</b> ISISNVKAGD		301 DAANYALKSG KTKSVSLAA DNK <b>TATVTLT DKLNNKADA</b> ISISNVKAGD	
351 KEIN/KNVEF TAVDNKIEV TEVKSGLTKA VKVTLSEPVENLSSTNFTLD		351 KEIN/KNVEF TAVDNKIEV TEVKSGLTKA VKVTLSEPVENLSSTNFTLD	
401 <b>GKAYFGNVVM GAGNKT</b> VILT PYSSSALS VG DHKLTVSGAK <b>DFAGFVSLNS</b>		401 <b>GKAYFGNVVM GAGNKT</b> VILT PYSSSALS VG DHKLTVSGAK <b>DFAGFVSLNS</b>	
451 <b>THEFKV</b> VEDK EAPTVTEATA TLETVTLTFS EDIDMDTVKA SNVYWKSGDS		451 <b>THEFKV</b> VEDK EAPTVTEATA TLETVTLTFS EDIDMDTVKA SNVYWKSGDS	
501 <b>KKEASEFERI</b> ADNKYKVFVK GSEKTLPTGK VDVYVEDIK YSDNKAIDT		501 <b>KKEASEFERI</b> ADNKYKVFVK GSEKTLPTGK VDVYVEDIK YSDNKAIDT	
551 <b>KVTVTPBDQ TRPEV</b> RKVTA LDEKTKVTF SKTVDGESAI KTGNYTVKDK		551 <b>KVTVTPBDQ TRPEV</b> RKVTA LDEKTKVTF SKTVDGESAI KTGNYTVKDK	
601 DDKVVSVDKV TVDSKDSKSV IDLYSKVSV GENTITKVN KDATKLNTM		601 DDKVVSVDKV TVDSKDSKSV IDLYSKVSV GENTITKVN KDATKLNTM	
651 <b>LDYTGK</b> FRS DKEGPDYEHV INADAKAKKV VLKFDK <b>MDA ASLADYSNYL</b>		651 <b>LDYTGK</b> FRS DKEGPDYEHV INADAKAKKV VLKFDK <b>MDA ASLADYSNYL</b>	
701 <b>VKINDL</b> QTL SEDVATLSVS NDA TVTITF AETIKGDDVV FASGKAISGS		701 <b>VKINDL</b> QTL SEDVATLSVS NDA TVTITF AETIKGDDVV FASGKAISGS	
751 <b>GKVNVELQV MGV</b> KDTSGNV HKKFNGSENK ILSSTSTPL KLAIDKDYD		751 <b>GKVNVELQV MGV</b> KDTSGNV HKKFNGSENK ILSSTSTPL KLAIDKDYD	
801 <b>AKYTAELVDR</b> KTVKVK <b>FSTV INSAANAFT</b> SESHKIDSIQ VNGTSTVTVK		801 <b>AKYTAELVDR</b> KTVKVK <b>FSTV INSAANAFT</b> SESHKIDSIQ VNGTSTVTVK	
851 FKDEINTNAS DLDLKVNLSK LVDIAGNEST NNTPAIKAG INLLDSVAPV		851 FKDEINTNAS DLDLKVNLSK LVDIAGNEST NNTPAIKAG INLLDSVAPV	
901 VVGEVPV DKE TITTFSENLS TSVSIGEVLSD TDFVTRVSD NKDLAID <b>KDYS</b>		901 VVGEVPV DKE TITTFSENLS TSVSIGEVLSD TDFVTRVSD NKDLAID <b>KDYS</b>	
951 <b>VAIANNQV V I</b> TLSDNREVA TAYKVTAKNA <b>KLITDDNGDK KNAIADFTKT</b>		951 <b>VAIANNQV V I</b> TLSDNREVA TAYKVTAKNA <b>KLITDDNGDK KNAIADFTKT</b>	
1001 TATKVEASGT <b>LSLDAAK</b> TNL NNETKAKDA KATGTEGTA TNOVGS <b>KDA</b>		1001 TATKVEASGT <b>LSLDAAK</b> TNL NNETKAKDA KATGTEGTA TNOVGS <b>KDA</b>	
1051 <b>LQVAIDV AEL</b> VKNDTAA TLQ QLTDAKDTL AAITAYNAAK VEDISSLLVA		1051 <b>LQVAIDV AEL</b> VKNDTAA TLQ QLTDAKDTL AAITAYNAAK VEDISSLLVA	
1101 PDLVLTGTDN GTITGFVAGT GETLKVTSDS AANVEVTDPT GLAVTAKAKG		1101 PDLVLTGTDN GTITGFVAGT GETLKVTSDS AANVEVTDPT GLAVTAKAKG	
1151 EANILVQVLK GDKVKTGTV KVTVSE		1151 EANILVQVLK GDKVKTGTV KVTVSE	

Figura 54: Secuencia aminoacídica de la proteína S-layer. En rojo se indica para cada una de las proteínas secuenciadas los productos de digestión por tripsina que pudieron identificarse.

En el gráfico de la figura se ilustran los péptidos teóricos que se obtendrían de la digestión con tripsina de la secuencia de S-layer y los péptidos reales obtenidos para las secuenciaciones para la cepa 2362.

Como resultado más evidente, los productos peptídicos hallados para la condición N son diferentes de las otras tres proteínas S-layer extraídas. Pueden observarse péptidos hacia el extremo amino terminal que no se encuentran en la condición control. Es decir, que hacia el extremo amino terminal de la condición N la tripsina cortó más eficientemente que en el resto de los casos. Una probable razón para que ocurra mayor corte es que en N los sitios estén más expuestos, por un plegado conformacional diferente entre las condiciones. Por otro lado, podría estar ocurriendo que en la condición control alguna modificación los sitios de corte con tripsina y permite mayor anclaje.

Hacia el extremo carboxilo, se produce mayor digestión para la proteína pequeña de la condición LB. En cuanto a la proteína de la cepa C7, notamos que no hay diferencia con la proteína de mayor peso molecular aparente de la condición control.

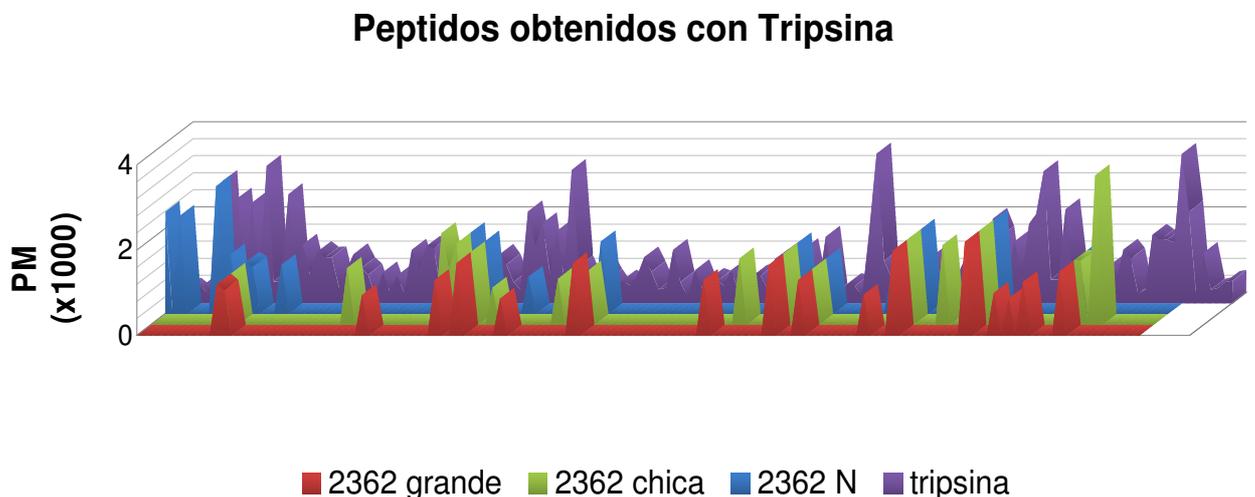


Figura 55: Análisis MALDI TOF. Péptidos obtenidos luego de la digestión con tripsina. En violeta se graficó los tamaños de los péptidos obtenidos luego de realizar un corte teórico.

**Con estos datos, podemos concluir:**

- **Que las 3 cepas 2362, C7 y C11 de *B. sphaercus* producen proteínas S-layer similares y modulables en su composición y fijación a la envoltura.**
- **Que estas proteínas son esenciales para su crecimiento en condiciones de estrés osmótico, lo que implica mayor producción de la proteína y presencia de una S-layer de mayor peso molecular.**
- **Que presentan modificaciones de peso molecular que podrían deberse a modificaciones postraduccionales (glicosilaciones no convencionales, lipidizaciones), adherencia más fuerte al componente de anclaje (SWCP) o a utilización de algún promotor de estrés que brindaría una proteína de diferente tamaño con algún motivo peptídico adicional en su extremo amino terminal.**

# **ACTIVIDAD INSECTICIDA**

## Actividad insecticida

Cepas de *B. sphaericus* del serogrupo H5 como 2362, C7 y C11 presentan actividad entomopatógena contra larvas de mosquitos, en especial las del género *Culex*. Casualmente *Culex* (y en particular *quinquefasciatus*) es el género más abundante tanto en Buenos Aires como en Córdoba (Gleiser y Zalazar 2010). Con menor susceptibilidad, algunas especies de *Anopheles*, *Aedes* (*Aedes aegypti* es el mosquito transmisor del virus del dengue) y *Mansonia* pueden ser blanco de estas toxinas. Estos mosquitos son transmisores de varias patologías virales como Dengue, malaria, fiebre del Nilo y encefalitis.

*Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) y *Bacillus sphaericus* son los dos agentes de control biológico para larvas de mosquito más utilizados y presentan rangos de huéspedes susceptibles y actividades complementarias. Esta complementariedad condujo a varios grupos de investigación a construir cepas recombinantes con ambas toxinas, principalmente en *Bti*, ya que las cepas de *B. sphaericus* son difícilmente transformables, como se verá más adelante. Algunas formulaciones de *B. sphaericus* se usaron en programas operacionales de campo (Klein *et al*, 2002). Se ha observado en campos experimentales un set de proteínas larvicidas de *Bti* que actuarían de manera sinérgica y que disminuirían el desarrollo de resistencias esencialmente por la presencia de proteínas con actividad hemolítica (Cyt). Estos bioinsecticidas son lo más atractivo para un posible reemplazo de los insecticidas químicos (El-Bendary 2006).

A principios de 2009, Argentina sufrió un brote de dengue en varias provincias del territorio, y se focalizó en esfuerzos para controlar la epidemia a través de la prevención primaria: la erradicación del vector (mosquito *Aedes aegypti*) desde la reproducción. Existen dos etapas principales de control: el mosquito adulto y la larva. Estos bioinsecticidas son solo activos en larvas y este trabajo se enfocó en esta última instancia. El estudio de la acción larvicida de la S-layer de *Bacillus sphaericus* 2362 y cepas relacionadas abriría las puertas de un nuevo aspecto a tener en cuenta a la hora de desarrollar programas de control de plagas frente a la reciente epidemia de dengue en Argentina.

Recordemos que son varias las toxinas y las etapas de su producción. Durante la fase vegetativa *B. sphaericus* sintetiza 3 proteínas Mtx con diferente tipo de actividad larvicida, siendo la Mtx1 la más cercana en cuanto a peso molecular y localización en la envoltura con la S-layer. Durante la esporulación las Mtx son degradadas por la

importante actividad proteolítica que ocurre en esta etapa y solo permanece la actividad larvívica de la toxina binaria presente en el exosporium junto con la espora. Hay que mencionar que en estas preparaciones de espora-cristal queda asociada la S-layer, como se verá en el capítulo sobre biorremediación (Allievi *et al*, 2011). Por otro lado, Pollmann (2005) sugiere que la estructura de la Capa S de estas cepas contribuiría a su patogenicidad. En la literatura existe una gran confusión en cuanto a la presencia de una proteína de peso molecular 120kDa con actividad larvívica producida en fase vegetativa que podría ser tanto la Mtx1 como la S-layer.

Es el trabajo de Peña y colaboradores (2006) que demuestra por primera vez la toxicidad de la S-layer de una cepa de *B. thuringiensis* frente a coleópteros. En ese contexto, el estudio de la actividad larvívica en *B. sphaericus* de sus S-layers es relevante, pues ésta podría mejorar el control de insectos, sumándose a las toxinas binarias.

Teniendo en cuenta estas observaciones, nos dispusimos a realizar los primeros abordajes experimentales, con la colaboración del Grupo de Estudio de Mosquitos, del Dpto. de Ecología, Genética y Evolución, de esta Facultad.

Para ello se trabajó con S-layers purificadas provenientes de las cepas de *B. sphaericus* 2362, C7 y C11 aisladas en el laboratorio por presentar mayor toxicidad en preparaciones de espora-cristal (Lanati). Es importante señalar que las 3 cepas producen S-layer con importantes similitudes tanto por ser reconocidas por el anticuerpo específico de 2362, su alto peso molecular, punto isoeléctrico ácido como por su concentración e ubicación frente a estrés osmótico (Capítulo de estrés).

### **Evaluación de toxicidad de las distintas cepas en esporas frente a *Culex***

Se utilizaron larvas de *Culex* provenientes de charcos de agua de lluvia de la ciudad. Evaluamos en primera instancia y en nuestras condiciones la toxicidad de las preparaciones de esporas-cristal de *B. sphaericus* 2362. Se utilizaron diluciones seriadas donde se evaluó el número de esporas por recuentos en placas (UFC/ml). En placas de Petri conteniendo 20 ml de agua de cloración por aeración y 20 larvas de estadio III se agregaron las diferentes diluciones de espora-cristal. Hasta  $1.10^6$  UFC de esporas enfrentadas a 20 larvas en 20 ml, la mortalidad fue del 100% (Figura 56). La  $LC_{50}$  en

nuestro caso fue de  $1014 \pm 51$  UFC/ml. Se ensayó la dilución adecuada para utilizar en los experimentos de sinergia.

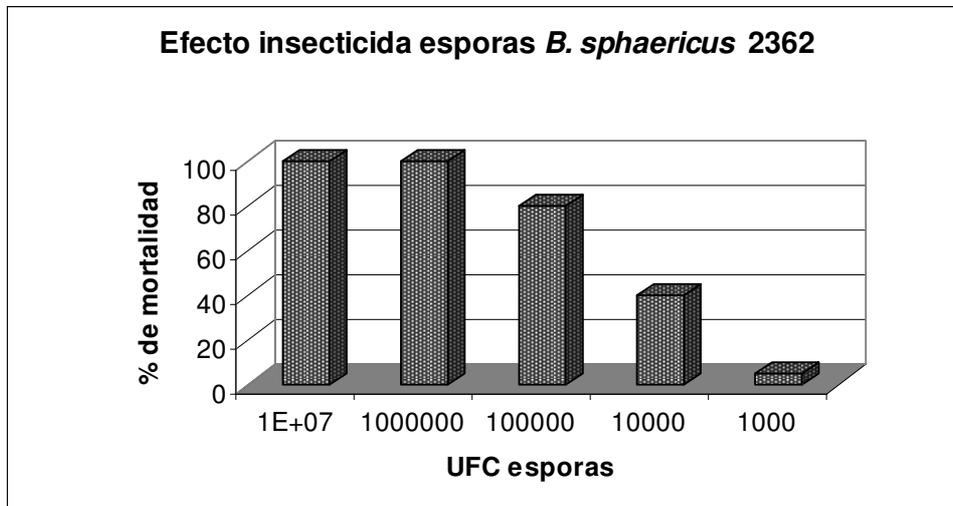


Figura 56: Efecto larvicida de esporas-cristal de *Bacillus sphaericus* 2362.

También testamos las preparaciones de espora crista de la cepa C7.

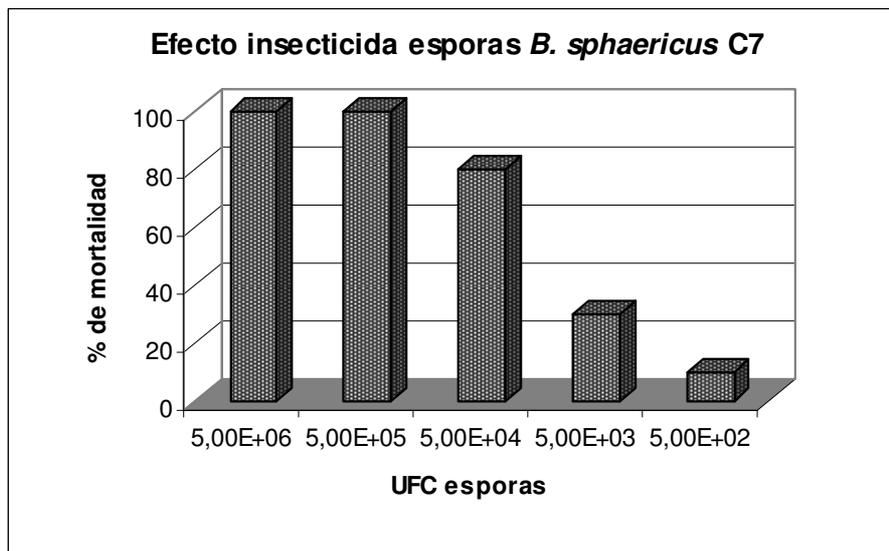


Figura 57: Efecto larvicida de esporas-cristal *Bacillus sphaericus* C7

Los resultados indicaron que hasta  $5 \cdot 10^5$  UFC por placa de 20 ml la toxicidad fue del 100% (Figura 57). La  $LC_{50}$  para las esporas de C7 fue de  $550 \pm 19$  UFC/ml. Estos valores difieren a los encontrados inicialmente en nuestro laboratorio. Es posible que las diferencias se deban a variaciones intraespecíficas del organismo blanco (larvas del género *Culex*) y a las diferencias de susceptibilidad de los distintos estadios larvales del mismo. Dado que es difícil lograr una perfecta sincronía en el desarrollo de estos

insectos, leves variaciones en los estadios larvales utilizados (II y III), pudieron haber generado las diferencias observadas. Igualmente comprobamos que tienen una toxicidad superior ( $LC_{50}$  menor) a la cepa de referencia 2362 utilizada ( $LC_{50}= 13$  UFC/ml para C7 y 1977 UFC/ml para 2362). Esta cepa produce toxinas Bin en cantidades y peso molecular similar a la cepa 2362. Siendo la toxina Mtx degradada en estas preparaciones se postuló que sería la presencia de S-layer la causa de este aumento de la toxicidad. En el Capítulo 1 mostramos que esta cepa C7 (al igual que C11) produce mayores cantidades de S-layer.

### Efecto insecticida de S-layer de *Bacillus sphaericus*

Para determinar si la S-layer contribuye a la patogenicidad, se purificó la proteína S-layer de *B. sphaericus* 2362 y se las enfrentó a las larvas de estadio 3 de *Culex sp.*

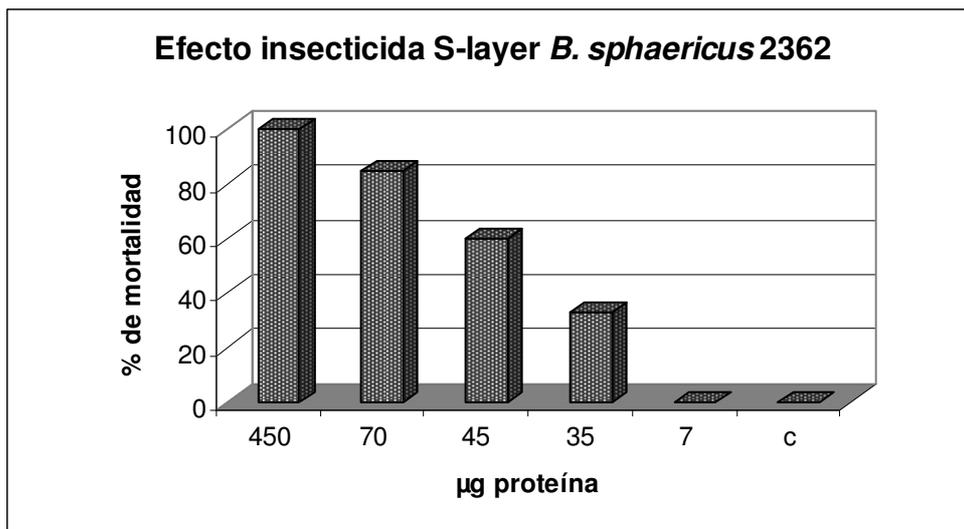


Figura 58: Efecto larvicida de S-layer frente a larvas estadio 3 de *Culex sp.* Se grafica el porcentaje de mortalidad de las larvas. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Como se ve en la Figura 58, las S-layer mostraron tener actividad larvicida de manera dosis dependiente. Con 450 µg de S-layer, la mortalidad fue del 100%.

Luego ensayamos la toxicidad de la proteína S-layer del clon C7 frente a larvas de estadio 3 de *Culex sp* y obtuvimos una respuesta dosis dependiente de la S-layer. Con 80 µg de proteína la mortalidad fue del 100% mientras que con 12 µg aún hubo cierta

mortalidad, muy baja. Se observa un claro efecto larvicida de la proteína pura (Figura 59).

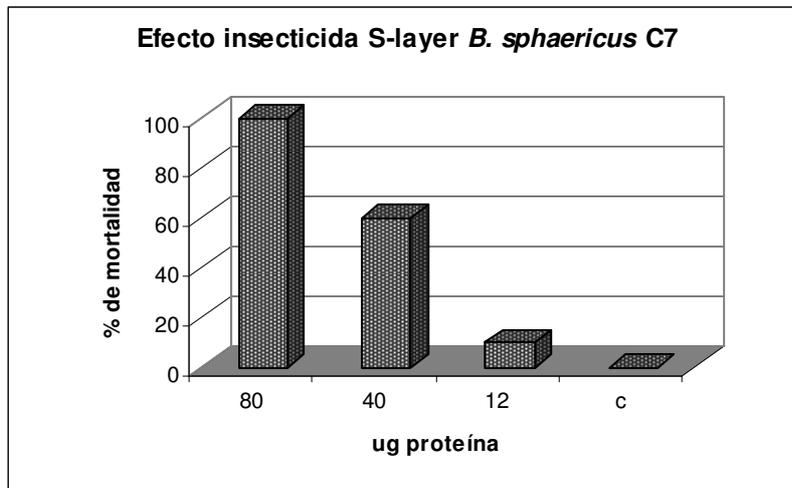


Figura 59: Efecto larvicida de S-layer de *Bacillus sphaericus* C7 frente a larvas estadio 3 de *Culex* sp. Se grafica el porcentaje de mortalidad de las larvas. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

Al comparar la cantidad de proteína S-layer por placa de ensayo para alcanzar el 50% de mortalidad, los valores fueron similares ( $45 \pm 4 \mu\text{g}$  de proteína para 2362 y  $39 \pm 3$  para C7)

### Efecto insecticida frente a *Aedes*

Con la idea de determinar el rango de huésped, se decidió ensayar la susceptibilidad de mosquitos *Aedes aegypti* al cual *Bacillus sphaericus* es poco eficiente ya que no parece poseer los receptores adecuados para sus toxinas. Se inició con esporas de la cepa *Bacillus sphaericus* C7 y 2362 para determinar la dilución de esporas a utilizar que sea sensible para mejorar el efecto por agregado de otros componentes. Las concentraciones más altas mostraron una toxicidad del 100 %, pero aún con  $2,1 \cdot 10^6$  UFC por placa de 20 ml se observó efecto larvicida (Figura 60). Agregando la preparación de esporas, C7 también mostró ser efectivo contra *Aedes*.

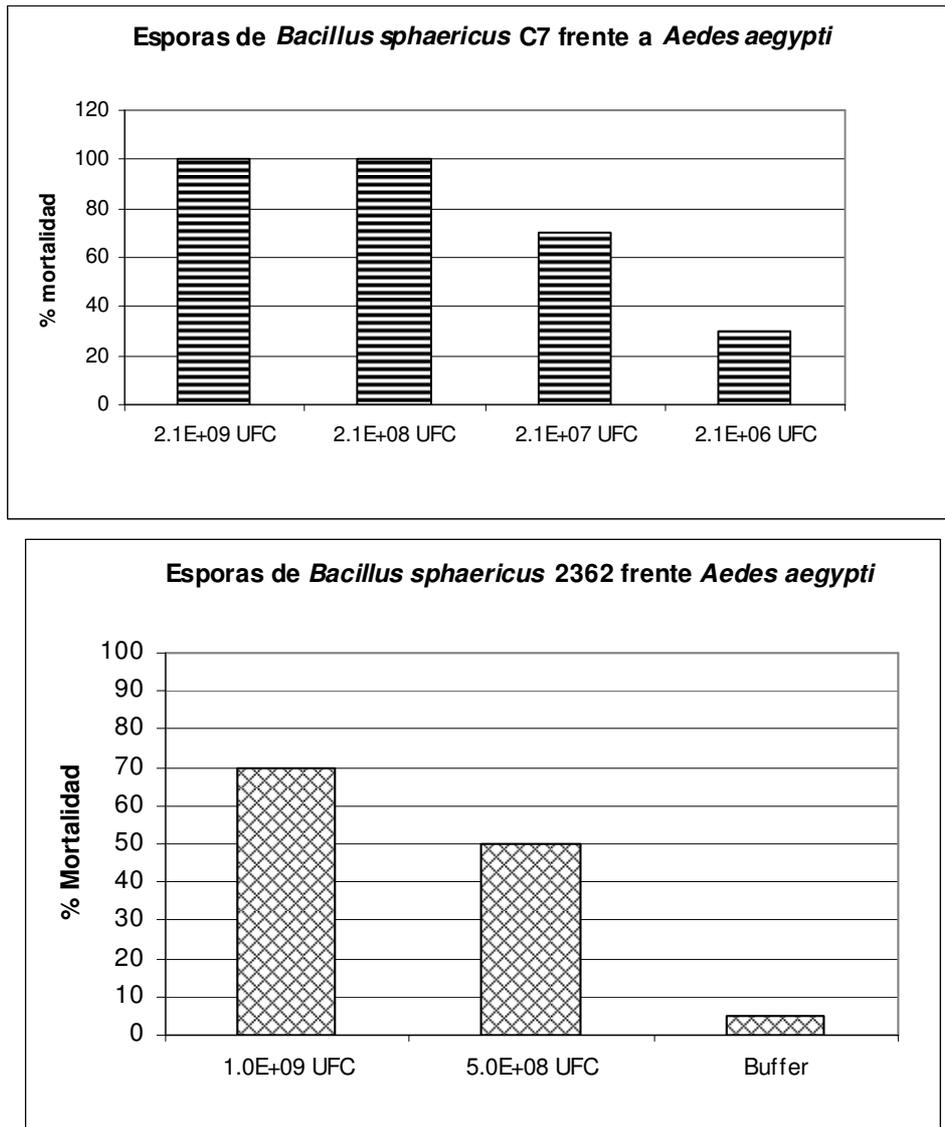


Fig. 60: Efecto de las esporas frente a larvas de estadio larva 3 de *Aedes aegypti*.

También se observó actividad de las esporas de 2362 contra *Aedes aegypti*, pero mientras que con la cepa C7 se alcanzó una mortalidad del 100 % con  $2.10^8$  UFC, con la cepa 2362 enfrentando  $1.10^9$  UFC se alcanzó el 70 %. Es decir, que frente a *Aedes*, las esporas de C7 resultaron más potentes ( $LC_{50}$  de 2362 y de C7  $5 \times 10^8$  y  $<10^7$  respectivamente).

En cuanto a las S-layer, las fracciones purificadas de ambas cepas confrontadas a las mismas condiciones, muestran que solo C7 presenta toxicidad apreciable. En estos experimentos con  $80\mu\text{g}$  de proteína C7 presenta 30% de mortalidad mientras que la 2362 es de 10% con un control de 5% (Figura 61).

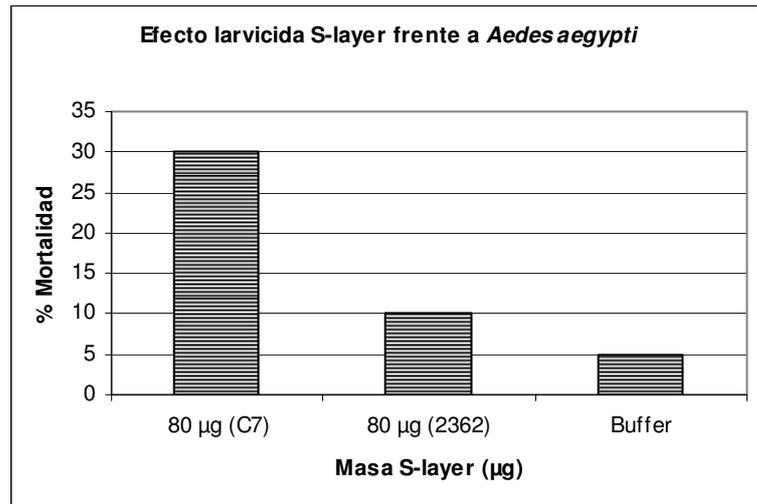


Figura 61: Efecto de las S-layer frente a larvas de estadio larva 3 de *Aedes aegypti*.

### Actividad sinérgica

En 2002, Klein y su grupo encontraron sinergismo en la toxicidad entre las Bin de *B. sphaericus* 2297 y preparaciones de extracciones con urea de pared celular. Esta toxicidad se ejerció durante la fase de crecimiento logarítmico tardío, pero previo a la aparición de las toxinas del cristal. Atribuyeron esta actividad tóxica sinérgica a la presencia de las proteínas P42 y P51 que permanecían adheridas en la pared celular. Esto nos llevó a pensar que quizás la sinergia en realidad se estaba produciendo entre las S-layer presente en esa preparación y los otros componentes con los que evaluaron la toxicidad. Por ello nos propusimos evaluar la sinergia entre las preparaciones espora-cristal y S-layer.

Testeamos la sinergia de las esporas con las S-layer para *Culex*. Utilizamos concentraciones de S-layer y espora-cristal que por separado dieran baja toxicidad: 12 µg de proteína y 5000 UFC de esporas. En esta condición, la presencia de ambas preparaciones resultaría en una mortalidad del 40%. Como se observa en las figuras, las esporas de la cepa C7 muestra ser muy tóxica frente a larvas de mosquitos en conjunto con la proteína S-layer, actuando de manera sinérgica. La toxicidad obtenida fue del 90%.

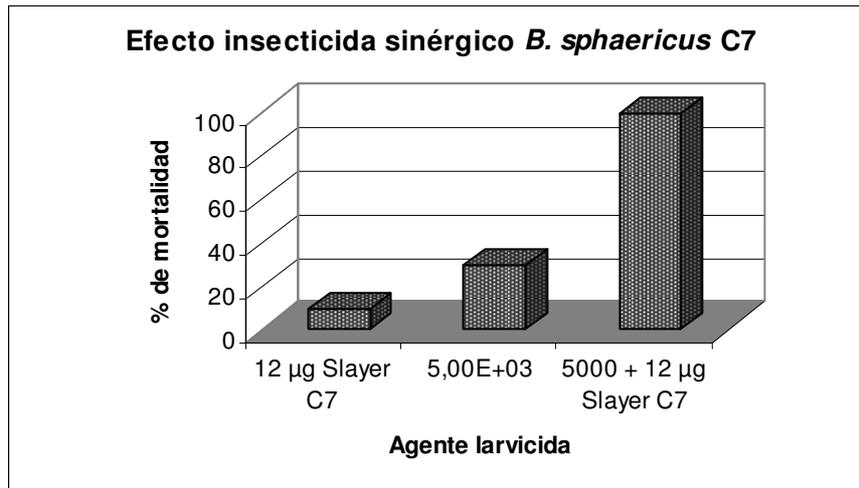


Figura 62: Actividad larvicida de S-layer de *B. sphaericus* C7 y la sinergia con esporas frente al género *Culex*.

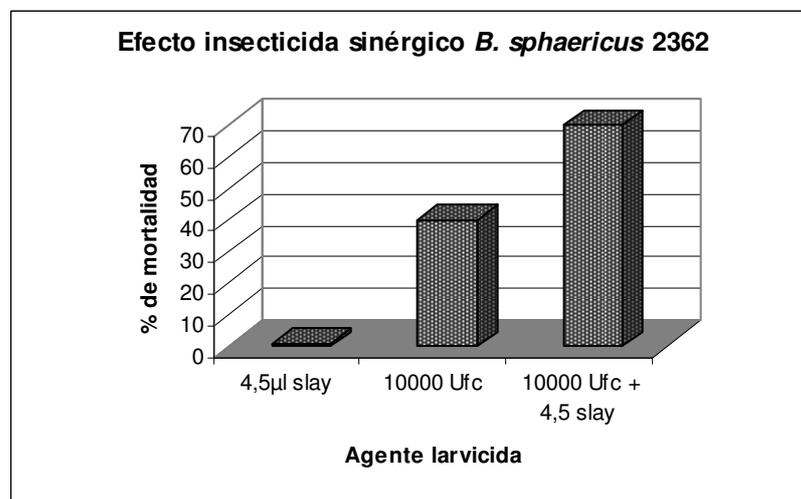


Figura 63: Actividad larvicida de S-layer de *B. sphaericus* 2362 y la sinergia con esporas frente al género *Culex*.

**Se puede concluir:**

- Que la S-layer de las cepas tanto 2362 como C7 presentan toxicidad *per se*.
- Que existe un efecto sinérgico con las proteínas Bin.
- Que la S-layer de C7 presenta mayor actividad.
- Que dicha actividad permite a la cepa C7 aumentar su rango de huésped hacia *Aedes aegypti*

### Pero ¿cuál es su mecanismo de acción?

Para acercarnos al mecanismo de acción por el cual la S-layer podría tener un efecto insecticida, utilizamos una herramienta bioinformática disponible en el banco de datos del NCBI, que es la opción psi-blast (Figura 64). Esto permite mediante iteraciones, acercarse a funciones generales de una secuencia a través de similitud de secuencia proteicas. Al trabajar la secuencia de la proteína S-layer de la cepa 2362 encontramos los siguientes resultados:

1. putative S-layer protein/N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Lysinibacillus sphaericus C3-41] 1176 aa protein YP_001696783.1 GI:169826625
2. Ig-related protein [Clostridium thermocellum ATCC 27405] 1036 aa protein YP_001038743.1 GI:125974833
3. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Bacillus thuringiensis str. Al Hakam] 537 aa protein YP_893690.1 GI:118476539
4. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Bacillus anthracis str. Ames] 529 aa protein NP_843409.1 GI:30261032
5. hemolysin-type calcium-binding domain-containing protein [Lysinibacillus sphaericus C3-41] 874 aa protein YP_001696845.1 GI:169826687
6. crystal protein [Bacillus thuringiensis] 823 aa protein BAA13073.1 GI:1434920

Figura 64: Análisis bioinformático de homología de secuencias proteicas.

El análisis revela homología con una proteína tipo hemolisina. Con el programa EMBOSS MATCHER se encontró alineamiento con dominios GH 18 (glicosil-hidrolasas) tipo quitinasa II, que son dominios que catalizan hidrólisis de polímeros de N-acetilglucosamina unidos beta-1,4.

En función de este análisis, y teniendo en cuenta que *B. sphaericus* es un microorganismo que habita suelos, donde la quitina es un polímero habitual que proviene de los insectos, se decidió evaluar la actividad quitinasa de la proteína S-layer. Para esto se realizó un ensayo de zimograma en gel en el que se incluyó quitina, y luego

de la corrida y renaturalización proteica se reveló el ensayo. No pudimos observar ningún halo de degradación en la tinción de la quitina, por lo que descartamos actividad quitinasa.

### Actividad hemolítica de la S-layer

Nos interesó el resultado bioinformático de la proteína que contiene un dominio hemolisina. Realizamos un ensayo para determinar si los cultivos o las proteínas S-layer puras de la cepa 2362 tendrían capacidad hemolítica. Utilizamos un ensayo en placas de ágar LB + sangre 5%. A las placas las inoculamos con cultivos o preparaciones proteicas puras y se observó si se producían halos de degradación. En la figura 65 a continuación se observa el halo proveniente del cultivo. En menor medida se observó con la proteína pura (Figura 66).

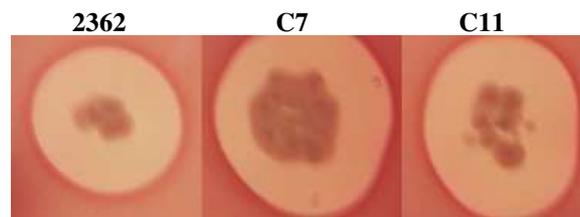


Figura 65: Actividad hemolítica *B. sphaericus* 2362, C7 y C11

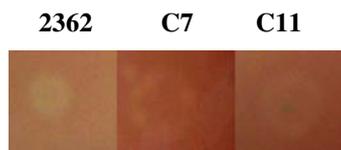


Figura 66: Actividad hemolítica de 2 µg de S-layer de *B. sphaericus* 2362, C7 y C11

Este resultado nos estaría dando un indicio de que es probable que la actividad insecticida de la proteína esté asociada a una función hemolítica.

Quisimos evaluar la capacidad hemolítica en sí de la S-layer, descartando probables interferencias con los resultados de los cultivos que pudieran estar afectando, a través de componentes celulares tóxicos como las Mtx que estarían presentes en fase vegetativa. Para esto decidimos realizar un ensayo en placas en el que la actividad hemolítica

podría cuantificarse. Trabajamos con glóbulos rojos, que contienen peroxidasas. En el caso que las proteínas ejercieran actividad hemolítica, se liberarían las enzimas, entre ellas las peroxidasas. En este caso podemos medir la actividad peroxidasa con un reactivo luminiscente, el ECL (luminol). De este modo, la hemólisis producida por la S-layer podríamos cuantificarla indirectamente estimando la intensidad de quimioluminiscencia.

En la figura 67 puede verse el resultado de la luminiscencia de los glóbulos rojos intrínseca, y la luminiscencia de las S-layer de las tres cepas. No observamos luminiscencia de los glóbulos rojos *per se*. Sí se detectó en las S-layer. La actividad de C7 es mayor a la C11.



Figura 67: Actividad hemolítica medida por ECL. GR: glóbulos rojos

En 2008, Hu y colaboradores lograron expresar la proteína S-layer de *Bacillus sphaericus* C3-41 en *E. coli* BL21 y realizaron los experimentos de toxicidad frente a *Culex quinquefasciatus*. En este trabajo ellos dicen que no hay una relación directa entre la toxicidad contra larvas de mosquitos y la S-layer. Sin embargo, al expresar en *E. coli*, probables modificaciones podrían no estar ocurriendo.

**La proteína S-layer presenta una actividad hemolítica que podría ser la responsable de su actividad larvicida así como el aumento del rango de mosquitos susceptibles.**

# **S-LAYER Y BIORREMEDIACIÓN**

## S-layer y Biorremediación

El cobre es un elemento esencial para los organismos vivos, pero en altas concentraciones se vuelve tóxico. La biorremediación es una herramienta importante de tratamiento ambiental en sitios con altos niveles de metales pesados (Andreazza *et al* 2010). Los métodos biológicos para remover metales desde efluentes líquidos tienen ventajas potenciales. El uso de biomasa bacteriana o fúngica como bioadsorbente cobra un renovado interés, sobre todo en países no desarrollados, donde las industrias generadoras de contaminantes no pueden afrontar los costos de instalación de plantas de tratamiento de alta performance. Allí es cuando los bioadsorbentes se vuelven una alternativa frente a los métodos químicos convencionales (Garavaglia *et al*, 2010). Los miembros de la familia *Bacillaceae* poseen características que los vuelve atractivos para su utilización como bioadsorbentes, fundamentalmente por poseer múltiples capas en la envoltura bacteriana y por la estructura y composición de sus esporas (*coat* o *exosporium*). La pared celular posee numerosas estructuras que pueden interactuar con los iones metálicos, como por ejemplo el exopolisacárido (EPS) y la capa de S-layer. En cuanto al EPS, su capacidad de bioadsorción ya fue establecida en *Paenibacillus polymyxa* P13 en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis (Prado Acosta *et al*, 2005). En relación a las S-layers, ellas son susceptibles de introducirseles motivos de unión a metales o inmunológicos (Liu *et al*, 2008, Pollmann y Matys, 2007). Como ya hemos visto, las S-layer pueden sufrir modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y glicosilaciones. Grupos aminos, carboxilos e hidroxilos se alinean en la superficie de Capa S y se mantienen unidos a través de fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o de Van der Waals. Se ha observado que una cepa de *Bacillus sphaericus* aislada de una mina con desechos de uranio (JG-A12) acumula altas concentraciones de metales tóxicos como U, Cu, Pb, Al y Cd, además de metales preciosos, y esta capacidad fue atribuida a la superficie celular (Pollmann *et al*, 2006). Además, el género *Bacillus* es esporoformador. La mayoría de las propiedades de resistencia se deben en parte a la estructura de la cubierta, compuesta por proteínas con pequeñas cantidades de hidratos de carbono y lípidos. Las proteínas de la cubierta son ricas en aminoácidos tirosina y cisteína, con potencial para la bioadsorción de metales (Driks, 1999). Una de esas proteínas, la CotA, tiene alta similitud con enzimas multicobre-oxidasas (Hullo *et al*, 2001). Selenska-Pobell *et al* (1999) reportaron que esporas de aislamientos bacterianos de *Bacillus* (*B.*

*megaterium*, *B. sphaericus*, *B. cereus*) bioadsorben U, Cu, Pb, U, y Al. Por otro lado, Chung *et al* observaron que en las esporas existía un ligando que unía metales. He y Tebo reportaron que esporas de la cepa marina *Bacillus sp* SG-1 son capaces de oxidar Mn(II) y Co(II) y exhiben afinidad por el Cu(II). La carga en superficie estaría asociada con la capa más externa de la superficie de la spora (exosporium) y por ende sería responsable de la captación de los metales (Francis *et al* 2002, Dick *et al* 2008). Pero hasta el momento no hay ningún reporte que indique claramente cuál es la naturaleza de estas interacciones y cuál es la estructura relacionada en la bioadsorción. Nuestro candidato es la proteína S-layer y el siguiente capítulo tratará de resolver las cuestiones planteadas más arriba.

### Bioadsorción de metales por células enteras de especies de *Bacillus*

En función de estos antecedentes, evaluamos la capacidad de cultivos de distintas cepas de *Bacillus*, productoras o no de S-layer, para retener metales. Utilizamos el cobre (CuSO<sub>4</sub>) como metal modelo. El ensayo consistió en la incubación de 200 ppm de cobre por 16 hs junto con las células enteras y posterior determinación del cobre retenido en la fase celular. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

CEPAS	Capacidad adsorción CULTIVOS (ppm de Cu <sup>2+</sup> )
<i>Bacillus subtilis</i> YB886	9,8±4,8
<i>Bacillus subtilis</i> 168	9,7±0,7
<i>Bacillus sphaericus</i> 2362	36,3±1,7
<i>Bacillus sphaericus</i> 1593	7,4±2,2
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1884	22,9±1,3
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1884 Cry-4 (CP1)	31,9±2,7

Tabla 12: Bioadsorción de cobre por cultivos de distintas especies de *Bacillus*. Se realizaron los experimentos con 1mg de células enteras contra 200 ppm de cobre.

Sólo las especies capaces de sintetizar S-layer (*B. sphaericus* 2362 y *B. thuringiensis*) retuvieron cantidades importantes de cobre.

Para continuar estudiando el comportamiento de los cultivos bacterianos que captaban metales, se decidió determinar si esta capacidad dependía de una actividad enzimática, un transporte activo o si se trataba de una estructura. Se continuó ensayando con dos

especies productoras de S-layer como *inputs* bacterianos, *B. sphaericus* y *B. thuringiensis*. Se las sometió o no a un tratamiento de calentamiento suave y se les ensayó la captación de cobre.

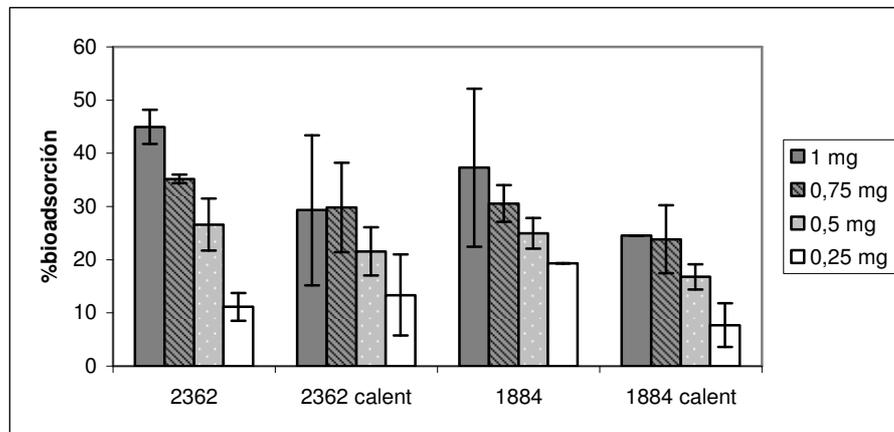


Figura 68: Bioadsorción de cobre por células de *Bacillus sphaericus* 2362 y *Bacillus thuringiensis* 1884 que fueron tratadas o no por calor (10 min at 70°C). Desde 0,25 a 1 mg de células fueron ensayadas para captación. Se calculó el porcentaje de bioadsorción de cuatro experimentos independientes con sus respectivos errores.

Como se observa en la figura 68, para ambas especies se obtuvo una correlación directa entre la concentración de células inicial y el porcentaje de retención del metal, con un valor de 40% de cobre captado por miligramo de bacteria en las dos cepas. No se ven diferencias entre el tratamiento con calor y los cultivos sin calentar, lo cual nos permite descartar que se trate de un transporte activo o actividad enzimática, sino de un fenómeno de superficie, y que algún componente de la estructura de envoltura sería responsable. Un comportamiento similar fue observado para otras cepas de *Bacillus sphaericus* (Velasquez y Dussan 2009).

Para continuar caracterizando la bioadsorción de los cultivos se construyeron las isotermas para el cobre a distintas concentración del metal. Se ensayó con la cepa de *B. sphaericus* 2362. Se graficó la retención del cobre vs. la concentración final en el equilibrio. Luego se analizaron los resultados obtenidos de acuerdo a modelos de adsorción conocidos, como los de Freundlich y de Langmuir. El modelo de Freundlich no considera la existencia de una monocapa homogénea, sino una superficie heterogénea en donde no todos los sitios de interacción son iguales e independientes. No se puede aproximar a una capacidad adsorptiva de saturación máxima, ya que la superficie se va modificando a medida que la adsorción progresa. El comportamiento

ajustó perfectamente con el modelo de bioadsorción de Langmuir (Figura 69A), que supone que el proceso ocurre en una monocapa, que todos los sitios son idénticos, y que no hay cambios en la energía libre de adsorción para cada sitio. Se obtuvieron los parámetros de Langmuir (Figura 69B): la capacidad de captación máxima  $q_{\max}$  de Cu (II): 47,17 mg/g y la constante de afinidad (b) constante: 0,0063 l/mg, con un coeficiente  $R^2$  de 0,9976. Este valor de afinidad está en el mismo orden de magnitud que lo que se determinó para EPS (exopolisacárido) (Prado Acosta *et al*, 2005), y la capacidad de bioadsorción está dentro del rango descrito para otras biomásas (Lo *et al* 2003; Tsekova *et al* 2010).

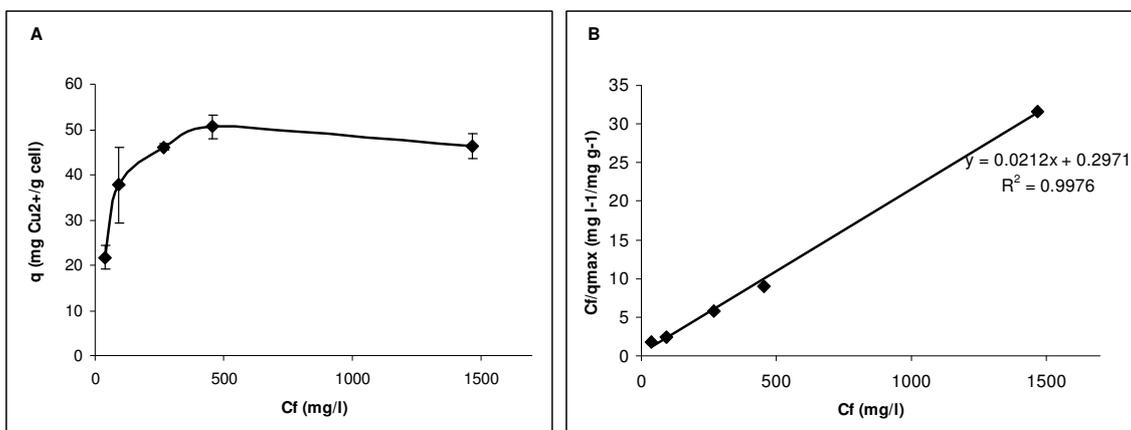


Figura 69 Isothermas de bioadsorción de Cu<sup>2+</sup> por *B. sphaericus* 2362: (A)  $q$  (número de sitios ocupados: mg Cu<sup>2+</sup> adsorbidos por g de peso seco de células) vs.  $C_f$  (Concentración de cobre en el equilibrio): (A) datos experimentales, (B) modelo de linealización de Langmuir.

## Efecto de otros iones

Se ha investigado en otras cepas de *B. sphaericus* la bioadsorción no sólo de cobre, sino de otros metales con interés de biorremediación (Selenska-Pobell *et al*, 1999), por lo cual nos pareció interesante averiguar si células enteras de *B. sphaericus* productores de S-layer podrían captar y retener otros metales. Con ese objetivo diseñamos experimentos de bioadsorción de Cu<sup>2+</sup> en presencia de un segundo ión que compitiera. Elegimos los cationes divalentes Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>. Se ensayó con concentraciones de Cu<sup>2+</sup> de 50 ppm constante y el segundo catión a concentraciones crecientes de 25 a 200 ppm.

Observamos que el Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> pero no Cd<sup>2+</sup> compitieron con el cobre. A 50 ppm, se observó un 20% de inhibición (Figura 70) indicando que esta cepa con S-layer puede

retener de forma eficiente otros cationes además del cobre, lo que sería interesante para trabajar en ambientes contaminados.

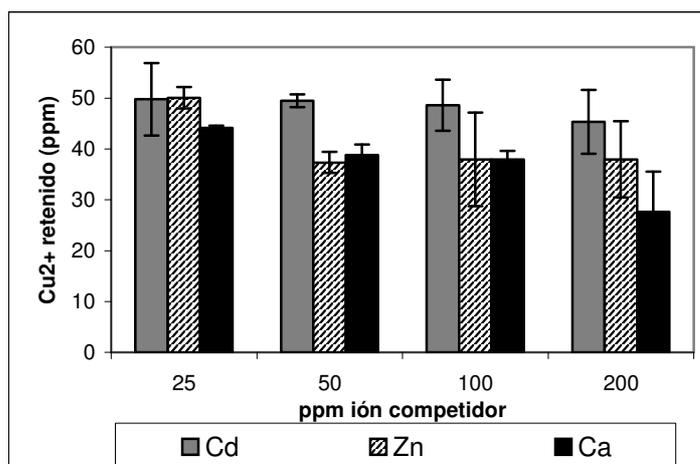


Figura 70: Efecto de otros iones en la competencia contra cobre. Se evaluaron concentraciones crecientes de los iones utilizando una concentración inicial de cobre de 100 ppm y 4 mg de células/ ml.

### Capacidad de bioadsorción de la S-layer de *Bacillus sphaericus*

Finalmente nos interesó saber si era la proteína S-layer la responsable de la capacidad de bioadsorción. Para esto, trabajamos con extracciones de S-layer purificadas de dos cepas distintas de *B. sphaericus* (2362 y *Kellen Q*) y con la S-layer de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. A estas S-layers puras y a las células enteras se les ensayó la capacidad de captar cobre.

CEPAS	Tipo de bioadsorbente	Cantidad de bioadsorbente ensayado	
		0,1 mg	1 mg
<i>B. sphaericus Kellen Q</i>	Células enteras	15,8±1,5	24,1±1,5
	S-layer	16,2±1,7	93,0±2,5
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	Células enteras	<1,0	<1,0
	S-layer	0,7±0,5	ND
<i>B. sphaericus</i> 2362	Células enteras	7,1±1,8*	36,3±1,7*
	S-layer	12,8±4,3	85,9±3,2*

Tabla 13: Experimentos de adsorción de cobre con células enteras o fracciones de S-layers. Se calcularon las ppm de cobre adsorbidas. \* en estos experimentos se agregaron 200 ppm de cobre.

Los resultados de la Tabla 13 muestran que las S-layer puras de ambas cepas de *B. sphaericus* tenían capacidad de bioadsorber, mientras que no se obtuvo captación

cuando se trabajó con las proteínas de *Lb. acidophilus*. Lo mismo ocurrió con los cultivos.

Para evaluar la capacidad de la S-layer *per se*, se realizó una titulación con concentraciones crecientes de S-layer de *Bacillus sphaericus* pura. Existe una relación proporcional entre la concentración de S-layer y el cobre retenido, alcanzando una captación de 85 ppm por mg S-layer (Figura 71).

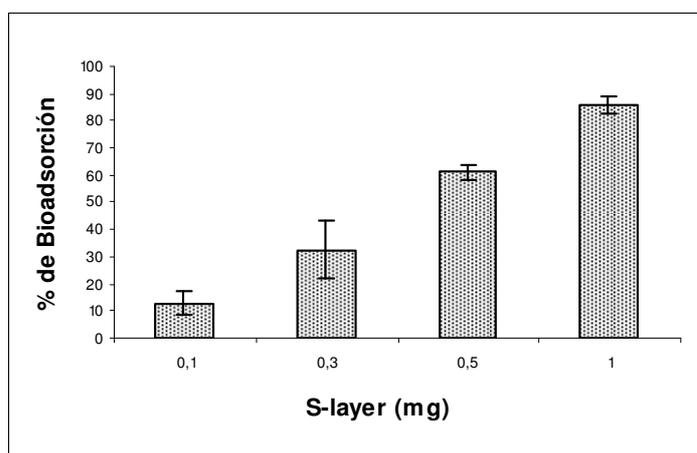


Figura 71: Capacidad de Bioadsorción de S-layer de *B. sphaericus* 2362. Diferentes concentraciones de S-layer purificadas (desde 0,1 mg a 1 mg) se enfrentaron con 100 ppm de cobre y se calculó el porcentaje de cobre retenido.

### S-layer de *Bacillus sphaericus* en las esporas

Ya otros investigadores habían reportado la presencia de algún elemento en la espora que captaría metales (Selenska-Pobell *et al* 1999, He y Tebo, 1998, Francis *et al* 2002, Dick *et al* 2008). Por esto es que quisimos determinar cómo era la captación de cobre en las esporas de distintas especies de *Bacillus*.

CEPAS	Capacidad adsorción ESPORAS (ppm de Cu <sup>2+</sup> )
<i>Bacillus subtilis</i> YB886	8,9±0,1
<i>Bacillus subtilis</i> 168	10,3±1,1
<i>Bacillus sphaericus</i> 2362	12,5±0,8
<i>Bacillus sphaericus</i> 1593	15,8±1,7
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1884	15,8±1,5
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> 1884 Cry-4 (CP1)	18,8±0,2

Tabla 14: Bioadsorción de cobre por esporas distintas especies de *Bacillus*. Se realizaron los experimentos con 1mg de esporas contra 100 ppm de cobre.

Como resultado, vimos que solamente las esporas de especies productoras de S-layer captaban cantidades importantes del metal (ambas cepas de *B. sphaericus* y de *B. thuringiensis*) (Tabla 14).

Por otro lado, Williams y Turnbough (2004) demostraron que durante el proceso de esporulación, las S-layer permanecían firmemente adheridas en las preparaciones de esporas en bacterias productoras de S-layer como *B. anthracis*. Por otro lado, nuestros resultados muestran que la retención de cobre se produjo cuando las cepas en fase vegetativa sintetizaban S-layer. Nos interesó evaluar si la capacidad de captación de las esporas de *B. sphaericus* se debía la presencia de la proteína. Para esto trabajamos con las esporas de este microorganismo y lo sometimos a tres protocolos de lavado, con intensidad creciente, el último de ellos incluyó EDTA, que es un conocido desagregante de capa S. Luego a esas esporas se les ensayó la bioadsorción y también se les hizo un western blot revelado con anticuerpo anti S-layer.

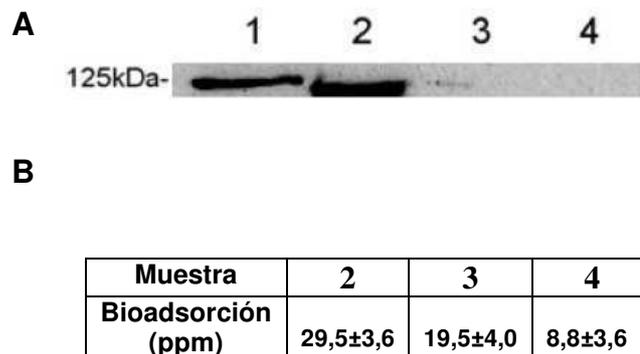


Figura 72: Presencia de S-layer en las preparaciones de S-layer y capacidad de bioadsorción en *B. sphaericus* 2362. Se levantaron esporas de 3 días preparadas en placas de medio Yousten con 10 ml de 1 M NaCl y se sometieron a distintos protocolos de lavado: muestra 2 se lavó una vez con agua desionizada; muestra 3 se lavó cinco veces con agua desionizada; muestra 4 se lavó una vez con agua desionizada, seguida de un lavado con 0,5 mM EDTA y cuatro lavados posteriores con agua desionizada. Todas las esporas fueron liofilizadas y consecutivamente se analizó el contenido de S-layer y la capacidad de bioadsorción. A- Se llevó a cabo un western blot con anticuerpo anti S-layer. Calle 1: control de proteína S-layer pura (10 µg); calles 2 a 4: muestras 2, 3 y 4 de esporas lavadas (64 µg). B- Se determinó la bioadsorción de las muestras 2, 3 y 4 con 1 mg de esporas y 200 ppm de Cu<sup>2+</sup>.

La muestra 2 retiene mucho más cobre que las muestras 3 y 4, que casi carece de S-layer. Se observa que al aumentar la intensidad del lavado, la señal de S-layer desaparece, y al desaparecer la S-layer, desciende el porcentaje de Cu<sup>2+</sup> retenido. Es decir, que las S-layer son las responsables de la capacidad de bioadsorción de las esporas de los bacilos que fueron ensayados. Es destacable que la muestra 4 tiene

valores de captación similares a los hallados para las cepas de *Bacillus subtilis*, que carecen de S-layer (8,8 comparado con 8,9 ppm para *B. subtilis* YB886, valor de Tabla 12). Este valor de captación de fondo puede ser atribuido a la envoltura de la spora, que está negativamente cargada y de este modo puede retener cationes inespecíficamente.

### Bioadsorción en células provenientes de distintas condiciones de osmolaridad

Con un objetivo futuro de aplicación biotecnológica, nos propusimos determinar en qué condiciones la proteína de capa S podría captar mejor metales. Para determinar si las modificaciones que sufren las células en ambientes de alta salinidad podrían afectar la capacidad de adsorción, se realizaron los ensayos de captación con distintas concentraciones de células enteras de *B. sphaericus* 2362 provenientes de condición control y estrés salino. Se procuró cosechar las células en el mismo estadio de crecimiento, en fase exponencial, a la misma densidad óptica a 600 nm.

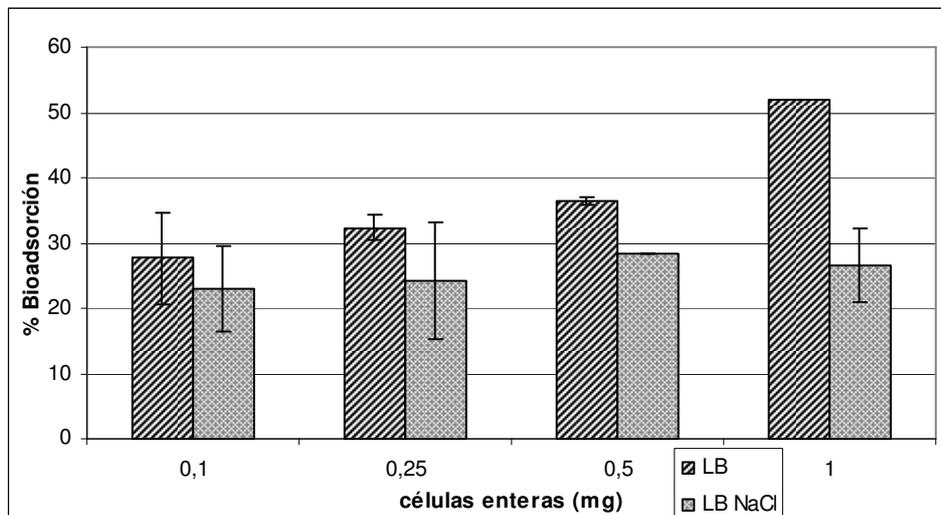
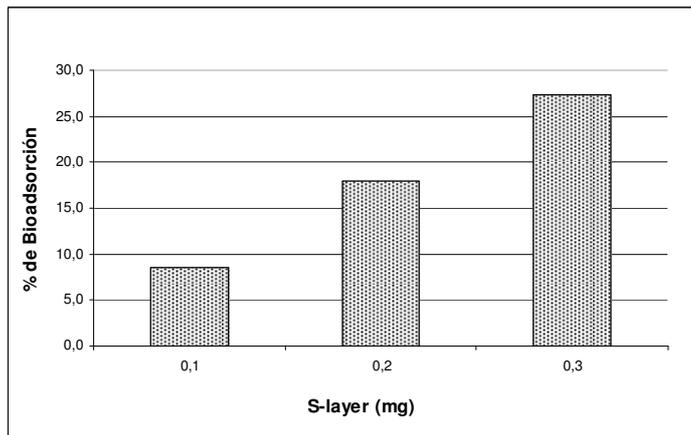


Figura 73: Bioadsorción de cobre por células de *Bacillus sphaericus* 2362 crecidas en LB y LB + 0,6M NaCl. Desde 0,1 a 1 mg de células fueron ensayadas para captación. Se calculó el porcentaje de bioadsorción.

Las células crecidas en medio no estresado captaron siempre mayor concentración de cobre que las células en hiperosmolaridad. Con 1 mg de células, el porcentaje de captación difiere entre ambos casos en un 49% a favor de las células crecidas en LB.

Estas diferencias pueden deberse por un lado a las diferencias estructurales de la S-layer en ambas condiciones, o a la diferencia en la composición de la proteína en relación a modificaciones como la unión de azúcares.

Purificamos fracciones de S-layer de células provenientes de cultivos en hiperosmolaridad, y luego ensayamos la bioadsorción de cobre.



S-layer de LBN (mg)	Relación con LB
0,1	0,67
0,2	0,79
0,3	0,84

Figura 74: Capacidad de Bioadsorción de S-layer de *B. sphaericus* 2362 purificadas de cultivos crecidos en hiperosmolaridad. Diferentes concentraciones de S-layer purificadas (desde 0,1 mg a 0,3 mg) se enfrentaron con 100 ppm de cobre y se calculó el porcentaje de cobre retenido. A la derecha se calculó la relación de captación con las proteínas extraídas del medio control (LB).

En la misma línea de los resultados celulares, las S-layer desde condición de estrés osmótico captaron menos cobre que las de cultivos control.

### Propiedad de bioadsorción en las cepas C7 y C11

Se evaluó si las S-layer de las cepas C7 y C11 tendrían las mismas propiedades de bioadsorber que la cepa de referencia 2362. Se realizaron los experimentos de captación correspondientes, y pese a que resultaron bioadsorbentes, no fueron tan eficientes las proteínas de capa S de estas cepas que la de 2362 (Figura 75).

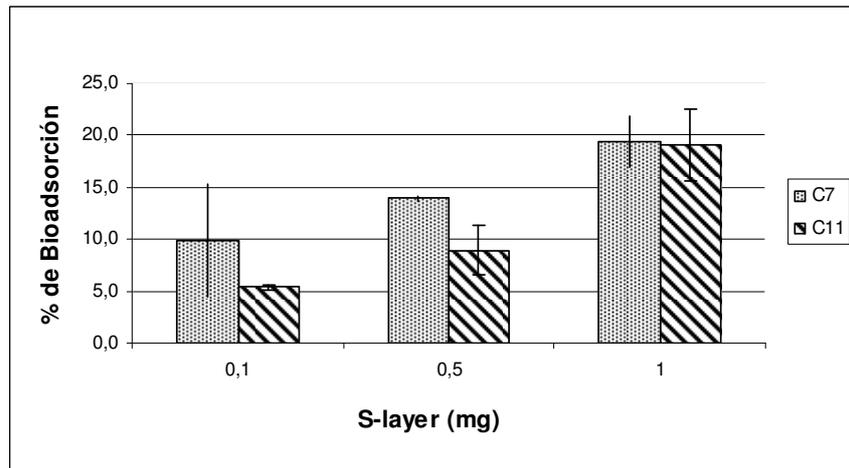


Figura 75: Capacidad de Bioadsorción de S-layer de *B. sphaericus* C7 y C11 purificadas de cultivos crecidos en medio LB. Diferentes concentraciones de S-layer purificadas (desde 0,1 a 1 mg) se enfrentaron con 200 ppm de cobre y se calculó el porcentaje de cobre retenido.

#### Se puede concluir que

- Las cepas de *Bacillus* que producen S-layer presentan gran capacidad de bioadsorber cobre. Además son capaces de retener otros cationes, como calcio y zinc.
- Los cultivos calentados son aún capaces de retener el metal, lo que nos habla de un fenómeno de superficie.
- La capacidad de biorremediación de las esporas está ligado a la retención por parte de las esporas que quedan adheridas durante el proceso de esporulación en *B. sphaericus* y *B. thuringiensis*.
- Este es el primer reporte de una correlación directa entre el contenido de S-layer y la bioadsorción.

# **Discusión y Conclusiones**

## Discusión, Conclusiones y Perspectivas

### **S-layer de *Bacillus sphaericus*: fisiología y estrés**

En esta tesis se ha caracterizado a la proteína S-layer de 3 cepas de *Bacillus sphaericus* entomopatógenas: la cepa de referencia 2362, y dos aislamientos C7 y C11. Las tres pertenecen al mismo grupo antigénico y serológico (HIIA). Por otro lado sus S-layer presentan suficiente homología como para ser reconocida con el mismo anticuerpo anti-S-layer de 2362.

Existe una sola cepa de esta especie cuyo genoma ha sido completamente secuenciado (*Bacillus sphaericus* C3-41 Hu *et al*, 2008) pese a que existen estudios con numerosas cepas que presentan diferente grado de patogenicidad y que varios de los genes relacionados con la toxicidad han sido secuenciados y clonados en distintos contextos genético.

Llamativamente las cepas mas virulentas presentan S-layer con una alta homología de secuencia (95 a 100%) no así con cepas las cepas poco activas (Hu *et al*, 2008).

Las 3 cepas muestran tanto por el análisis *in silico* de la estructura (cepa 2362) o por el de los péptidos liberados por digestión con tripsina en MALDI, la presencia de los tres motivos SLH. Estos motivos han sido involucrados en otras especies del género *Bacillus* en el anclado a la pared. Es por esto que se propone que la interacción entre la proteína y la pared celular estaría mediada por estos dominios (en general cargados positivamente) directamente al SCWP con cargas negativas (de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos presentes en la pared celular) (Schaffer *et al*, 2005). Es importante señalar que estudios del laboratorio realizados en *Bacillus subtilis* y en *Lactobacillus casei*, mostraron que la estructura de la pared, composición, grosor, presencia de LTA y WTA se modifican por estrés (López *et al*, 1998, 2006; Palomino *et al*, 2009; Piuri *et al*, 2005). Estas modificaciones podrían tener consecuencias en diferencias en el balance de cargas del entorno, y posiblemente en la fijación de las S-layer a la envoltura.

En geles de SDS-PAGE estas S-layer presentan varias bandas de peso molecular mayor al esperado para la proteína de acuerdo a su secuencia, cuyo porcentaje varía en función de la fase de crecimiento (vegetativa o estacionaria) y fundamentalmente en crecimiento en medios hiperosmótico con NaCl. *Bacillus sphaericus* 2362 frente a un estrés hiperosmótico, muestra células mucho más angostas y menos difusas que en la

condición control. Por otro lado, en ensayos donde se depletó la S-layer, las células presentaron una tasa de crecimiento más lenta que cuando los bacilos poseían su envoltura intacta; en particular, solo crecen en medios estresantes (calor, hiperosmótico, ácido) cuando resintetizan suficiente S-layer, lo que demuestra su importancia en la adaptación a situaciones de estrés. En medio hipersalino, la expresión de la proteína es mayor. Tanto en *Lb. acidophilus* (Ojeda P. Tesis de licenciatura) como en *B. sphaericus*, las S-layer se desprenden en el sobrenadante durante el estrés osmótico. Esta presencia en el sobrenadante podría deberse a que la proteína está más “suelta” o menos anclada a la pared y al soltarse sería necesaria una mayor actividad de síntesis *de novo* para recubrir la célula. Los resultados de medición de mensajero no muestran un aumento significativo de la síntesis del mRNA, indicando que la mayor obtención de S-layer en los cultivos obtenidos en alta sal no procede de un aumento en expresión génica. En todo caso la presencia de S-layer es indispensable como lo muestran los experimentos de pelado y posterior crecimiento en diferentes medios, o la ausencia de mutantes de S-layer en diferentes microorganismos donde se analizaron las S-layer. Es importante señalar que en la cepa C3-41 secuenciada se encontraron 17 posibles proteínas de membrana de tipo S. En *Bacillus anthracis* (Kern, 2010), se mostró que según el medio de crecimiento se expresan diferentes S-layer.

Estas observaciones, junto con las diferencias de ubicación y movilidad de las proteínas, nos condujo a analizar posibles modificaciones postraduccionales en la S-layer de *B. sphaericus*, en particular cuando crece en alta sal (puesto que la glicosilación es la modificación postraduccional de proteínas más frecuente).

En haloarqueas se ha mostrado la importancia de la S-layer frente a estrés. Aunque la glicosilación *per se* no es esencial para el rearrreglo cristalino, en *Haloferax volcanii* se observó que en ocasiones afecta a la estabilidad de la proteína (Abu-Qarn *et al*, 2007). Una mutante de glicosilación de la misma cepa, disminuye drásticamente su crecimiento al aumentar la salinidad del medio. Esto estaría asociado a una capacidad de reestructurarse para ser funcional frente al medio externo hostil. Recientemente se pudo observar que dependiendo del medio y grado hiperosmolaridad, *Haloferax volcanii* no solo modula el tipo de glicosilación de las S-layer sino también el grado y sitios (Guan *et al*, 2012 y Kandhiba *et al*, 2012).

En *Geobacillus stearothermophilus* se observó que durante el estrés térmico se sintetiza una variante de S-layer glicosilada (además de modificar el SCWP de anclaje a la pared). A altas temperaturas una S-layer con azúcares sería ventajosa adaptativamente,

puesto que allí las moléculas de agua quedarían retenidas, entre las cadenas de glicanos hidrofílicas (Egelseer *et al*, 2001). En un caso similar, durante estrés osmótico podría observarse una forma de S-layer diferente en cuanto a su glicosilación, o un mayor porcentaje de una forma glicosilada.

Del estudio de modificaciones postraduccionales de la proteína S-layer de *B. sphaericus* 2362 pudimos observar que la proteína podría estar modificada postraduccionalmente con glicanos. Las diferentes bandas proteicas que se observan cuando se las somete a un SDS-PAGE difieren en 15-20 kDa, valores reportados en *G. stearothermophilus* (cuya S-layer SbsD es homóloga a la SlpC de *B. sphaericus* 2362) como diferencias entre glicopéptidos (Egelseer *et al*, 2001). Sin embargo, tinciones por técnicas de kit comerciales (PRO Q® Emerald 300) no revelan que la proteína esté glicosilada.

Por otro lado, la capacidad de cultivos de autoagregarse se relaciona con el grado de glicosilación de su capa S, al menos en *Lactobacillus* (Kos *et al*, 2003). En experimentos de agregación se observó que este microorganismo es capaz de agregar en soluciones (y también en cultivos en frascos agitados) y que la capacidad se pierde completamente luego de un tratamiento con LiCl 6M. Parece entonces, que la propiedad de superficie se relaciona con una S-layer y que sería glicosilada.

Para tratar de profundizar en el tipo de glicosilación de esta proteína, crecimos a las células en un medio con tunicamicina. La imposibilidad de este antibiótico para interferir con la glicosilación de la S-layer nos sugiere que los residuos azúcares no están unidos a la parte peptídica a través de uniones N-glicosídicas. La inhibición total de crecimiento a alta concentraciones puede deberse a que quizás interfiera con la síntesis peptidoglicano.

En 1993, el grupo de Neckerson trató de elucidar la controversial pregunta, en ese momento, de si el cristal de *Bacillus thuringiensis* estaba compuesto por glicoproteínas. Finalmente consideraron tres razones por las cuales se trataría de una glicosilación no enzimática: porque no pueden ser removidos por O- o N-glicosidasas; porque los azúcares adheridos se modifican tanto por el medio en el que se crecía a la bacteria como por el tiempo en el que se cosechaban los cristales; porque los azúcares hallados no acordaban con ningún modelo conocido de glicoproteínas. La glicosilación no enzimática involucra la formación inicial de una base de Schiff reversible entre grupos aminos primarios de aminoácidos, péptidos y proteínas con grupo carbonilo de los azúcares reductores. Esta estructura puede estabilizarse o desarmarse. Por otro lado, no

todos los grupos capaces de reaccionar con el grupo carbonilo de los azúcares lo hacen, ya que pueden estar ocultos en la estructura tridimensional de la proteína y el sitio de la proteína donde se encuentra cada grupo determina localmente su basicidad, esto es, su capacidad para reaccionar a través de su par de electrones libres. Cuanto más básico es un grupo amino más fácilmente reaccionará con el grupo carbonilo de los azúcares. Ambos factores, la accesibilidad y la basicidad, determinan que cuando una proteína reacciona con un azúcar, sólo algunas de las cadenas laterales de sus residuos de lisina y arginina participarán directamente en la reacción. Las dos primeras consideraciones planteadas por Neckerson (1993) son aspectos que se observaron en la S-layer de *B. sphaericus* (aunque no pudimos inhibir la O-glicosilación). La S-layer modificó su PM aparente en función del estadio de cosecha, el lugar (sobrenadante de cultivo o celular), y el medio (hipersalino o no). Además se tiñe con algunos métodos de tinción de azúcares y no con otros. Es decir, podríamos estar frente a una glicosilación no enzimática, en la que los parámetros ambientales y condiciones determinan la unión covalente del azúcar y los aminoácidos.

Otra posibilidad en cuanto a la presencia de S-layer de mayor tamaño estaría relacionada al aporte de fragmentos de pared. Está reportado que las hidrolasas de peptidoglicano son enzimas que clivan las uniones del polímero, y que pueden clasificarse como amidasas, endopeptidasas, carboxipeptidasas, N-acetilmuramididasas, transglicosilasas y N-acetilglucosaminidasas. Estas hidrolasas tienen funciones normalmente en la morfogénesis de la pared celular. Pero además, en *Bacillus anthracis* se demostró que BslO (una proteína S-layer) está implicada en la separación bacteriana y en particular en el clivaje del peptidoglicano y el SCWP (Anderson *et al*, 2011). Uno de los dominios que revela el análisis *in silico* de la S-layer de *B. sphaericus* es el de una actividad N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (ver capítulo de actividad insecticida) que se relaciona con funciones de hidrólisis del peptidoglicano. Durante estrés osmótico, quizás haya un aumento en la actividad amidasa, posiblemente como consecuencia de la misma composición de la pared, lo cual permitiría mayor corte y liberación de S-layer al medio. En este caso una fracción del SCWP podría quedar unida a la proteína, por lo que se observarían S-layer de distintos pesos moleculares. Los resultados de diferencia de movilidad y de liberación al sobrenadante también podrían explicarse por la existencia de S-layer con o sin fragmentos de SCWP.

Los resultados obtenidos hasta el momento no permiten dar una respuesta única, razón por la cual se plantearon tres posibilidades para explicar las modificaciones observadas:

- Que la proteína esté glicosilada enzimáticamente, mediante una O-glicosilación, pero que los azúcares y/o uniones fuesen susceptibles de tinción por determinadas técnicas y no por otras (PAS, PRO Q® Emerald 300, por ejemplo).
  - Que la modificación fuese una glicosilación no enzimática.
  - Que no se trate de una glicosilación, sino que los azúcares detectados provengan del SCWP al cual se une la proteína para anclarse al PG. Serían las modificaciones de la pared y del motivo SCWP los responsables de las diferencias al quedar o no adherida la proteína.
- 
- ¿Qué consecuencias puede tener la existencia de estas dos formas en las propiedades para la bacteria de aumentar su capacidad de control de efectores de estrés?
  - ¿A cuál de las dos especies se puede adjudicar la capacidad entomopatogénica?
  - ¿Cuál de las dos especies es importante en captación de metales y biorremediación?
  - ¿O la presencia de ambas especies solo afecta alguna de estas tres propiedades?

## **Funcionalidad de la proteína S-layer de *Bacillus sphaericus*: aplicaciones biotecnológicas.**

### **Actividad bioinsecticida**

En este trabajo hemos purificado proteínas S-layer de la cepa *Bacillus sphaericus* 2362 y mostrado que presentan una actividad larvicida contra mosquitos del género *Culex sp.* Al mezclar dicha proteína con preparaciones de esporas-cristal de este mismo microorganismo se observa mayor actividad larvicida, evidenciando un efecto sinérgico. Estas características muestran que esta cepa presenta varias proteínas con propiedades entomopatogénicas sintetizadas en distintos momentos de su ciclo de reproducción, con la ventaja que la S-layer está presente en todas las etapas.

Será importante determinar cuál es el rango de especificidad de la S-layer y ver si es posible aplicarlo para mejorar el biocontrol de mosquitos. También se ha determinado

experimentalmente que una cepa de *B. sphaericus* aislada en nuestro laboratorio (C7) presenta características más potentes como larvicida, evidenciándose en una menor concentración mínima para alcanzar el mismo nivel de mortalidad en larvas del género *Culex*, y en un mayor rango de huésped, puesto que la S-layer también es efectiva frente a larvas de mosquito del género *Aedes*, lo que no ocurre con la cepa 2362. A su vez el clon C7 presenta mayor producción de S-layers de ambos PM, siendo la más abundante la de mayor tamaño (o menor movilidad aparente); por lo cual podríamos inferir que es esa la que tiene mayor actividad larvicida. A su vez, del análisis de MALDI se observa que ambas bandas, grande y chica, están desprotegidas para tripsina según los cortes en condición control hacia el extremo N terminal. Pero la de menor PM aparente está más desprotegida en el C terminal, por lo que es accesible al corte por tripsina y se podría pensar que no está modificada. Esto implicaría que hacia el carboxi-terminal la banda menor no estaría glicosilada y sí la mayor (en C7 esta es mayoritaria). Esta observación permite concluir que la cepa C7 tiene una forma proteica la mayoritaria modificada hacia el extremo carboxilo, que en su conjunto tiene más actividad larvicida.

Bhattacharya y colaboradores (1993) dedicaron gran parte de sus trabajos a evaluar las variaciones en glicosilación (porcentajes, tipo, amino-ácidos) del cristal tóxico de *B. thuringiensis*. Determinaron que efectivamente la glicosilación se producía en las cadenas laterales de las lisinas (es importante recordar que la S-layer se caracteriza por poseer un alto porcentaje de lisinas en su composición aminoacídica), pero que ocurría una glicosilación no enzimática dependiendo del medio y no de la bacteria. Por el contrario en nuestro caso pusimos en evidencia que son las condiciones fisiológicas y el estrés que resultan en modificaciones de la S-layer, así como en las otras modificaciones de envoltura que ya fueron descritas por trabajos de este laboratorio. Estas alteraciones modifican la toxicidad de la cepa. En *B. sphaericus*, las protoxinas se activan en el intestino de la larva por un clivaje tríptico que ocurre en las uniones peptídicas del lado carboxilo de las lisinas o argininas. De ese modo, una modificación podría afectar tanto el patrón de clivaje (nosotros observamos en los resultados de MALDI diferencias en la concentración de dos formas proteicas de la S-layer del clon C7, con una mayor proporción de la forma que tiene protegido de la digestión por tripsina el extremo carboxilo) como la toxicidad (la cepa más tóxica es aquella que casualmente aparece más glicosilada).

El grupo de Yang (2007) se dedicó a ampliar el espectro de acción de estos bacilos entomopatógenos, ya que *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) es esencialmente eficiente contra *Aedes* y *Bacillus sphaericus* contra *Culex*. Para ese fin clonaron la toxina Mtx1 de *B. sphaericus* en un vector adecuado agregándole un promotor de esporulación e introduciéndolo en *Bti*. En ese contexto, se evita la aparición de resistencias de mosquitos por la actividad hemolítica de las toxinas Cyt asociadas al cristal de *Bti*. De esa forma, lograron aumentar la toxicidad de la cepa en la esporulación temprana, pero declinó rápidamente a causa de la inestabilidad proteolítica de la toxina. Luego, intentaron mutar la proteína Cry1Aa en *Bti* para permitir la producción de niveles significativos de la proteína asociadas a la espora-cristal y lo consiguieron. Mostraron que durante el proceso de esporulación, la cristalización es un proceso importante para secuestrar proteínas dentro de las inclusiones que son inaccesibles a las proteasas. Una ventaja de trabajar con S-layer (en vez de Mtx) en sinergia con proteínas del cristal es que por un lado la S-layer es de por sí muy estable, está presente durante la esporulación y queda adherida a la espora, tal como lo mostramos en el capítulo de biorremediación. Sería importante determinar qué promotor utilizar en esta (y otras) etapas.

El microorganismo más utilizado en control de mosquitos es *Bti*. El mecanismo de toxicidad propuesto implica dos modelos: uno en el que la toxina activada (que se une a una cadherina, el receptor), se oligomeriza y luego se une a una aminopeptidasa y a una fosfatasa alcalina para ejercer su toxicidad; y el otro en el que la oligomerización no sería necesaria y como monómero se une a la cadherina para desarrollar su actividad. En ambos modelos está implicada la interacción toxina receptor como el más importante para la especificidad. La aminopeptidasa es una glicoproteína que interactúa o con los glicanos o con los residuos aminoácidos. Cry1Ac interactúa con la N-acetilgalactosamina de las aminopeptidasas del intestino medio de lepidópteros. Cry1Aa sólo interactúa en forma carbohidrato- independiente (Zhang *et al*, 2010). Estos autores postulan que los fragmentos de la aminopeptidasa actuarían como un puente entre la toxina y el receptor en el intestino de las larvas. Con un modelo similar, la S-layer por su actividad hemolítica, podría permitir el acceso a otro receptor y el ingreso de las proteínas BinAB de *B. sphaericus* en mosquitos a los cuales la BinA no tienen afinidad y así ampliar su espectro de acción.

El análisis *in silico* mostró que la proteína podría interactuar con azúcares tal como lo hacen la proteína Gal-1 y el precursor de la proteína SlpA de *Clostridium difficile*, aún

sin estar glicosilada, a través de los dominios de unión a carbohidratos. De este modo, la bacteria en su hábitat natural podría unirse a su blanco mediante un acercamiento provisto por la S-layer (primera estructura en contacto con el medio externo) y a través de los motivos que reconocen azúcares. Los azúcares que podría reconocer serían las estructuras de quitina, que son polímeros de N-acetilglucosaminas, presentes en insectos. Esta hipótesis está sustentada en el alineamiento de estructuras de la secuencia aminoacídica de SlpC, en la que encontramos dominios GH 18 (glicosil-hidrolasas) tipo quitinasa II, que catalizan la hidrólisis del polímero. De esta forma se podría explicar la sinergia que se produce entre la S-layer y la preparación de esporas-cristal.

Quizás no sea casual que este microorganismo que no fermenta azúcares, si tenga un sistema eficiente de utilización de aminoazúcares como la N-acetilglucosamina (Alice *et al*, 2003).

### **Bioadsorción de Metales**

Hemos visto que cepas de *Bacillus* productoras de S-layer presentaron muy alta capacidad de bioadsorber cobre. La cinética de bioadsorción de los cultivos acuerda con el modelo de Langmuir. Los cultivos calentados son aún capaces de retener el metal, lo cual permitió identificar el fenómeno como bioadsorción. La posibilidad de poder calentar y conservar la actividad tiene la ventaja de inactivar proteasas, que siempre están presentes y muy activas en los bacilos, dejando la S-layer funcional.

Si bien muchos artículos involucraron la S-layer en la retención de metales por cepas de *Bacillus* (Pollmann *et al*, 2006), nuestro trabajo es el primero que mostró una correlación directa entre el contenido de S-layer y la bioadsorción (Allievi *et al*, 2011). Mostramos claramente, con extracciones purificadas, que la S-layer puede retener otros metales además de cobre, lo que la vuelve interesante para trabajar con la proteína en ambientes contaminados. También mostramos que estas proteínas permanecen asociadas a la espora, conservando su capacidad de captar metales. La cubierta de la espora o el exosporium no son bioadsorbentes *per se* ya que esporas de *B. subtilis* desprovistas de exosporium y esporas de *B. sphaericus* tratadas por EDTA y lavadas intensivamente para eliminar la S-layer y el acomplejante de cationes, tienen la misma baja actividad.

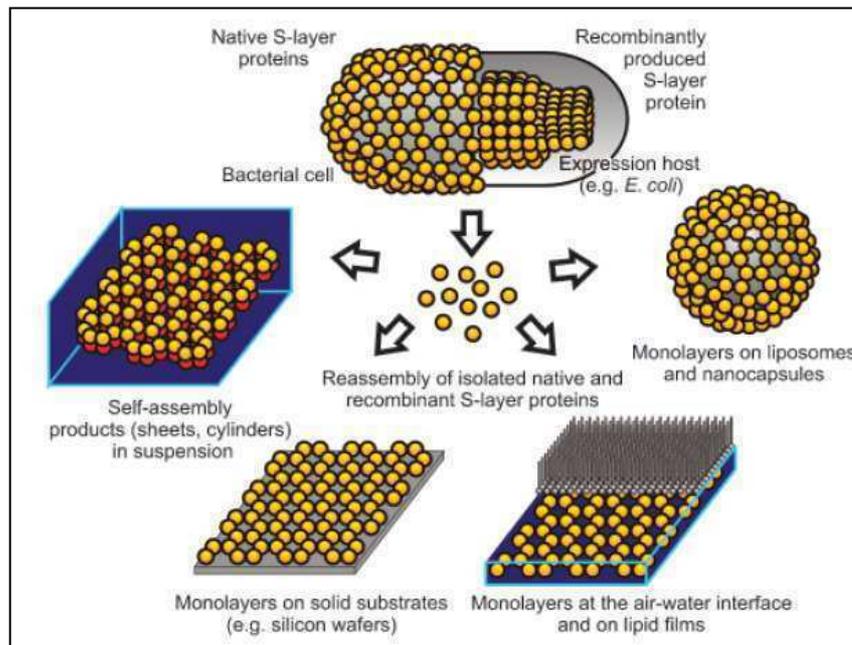
¿Cuales serían los sitios de captura del metal?

Tanto la presencia de aminoácidos fosforilados como los hidratos de carbono proveniente de la glicosilación de la proteína son candidatos a sitios de captura. Merroun y su grupo atribuyeron la adsorción al contenido de grupos fosforilables en S-layer de *B. sphaericus* JG-A12. Nosotros hemos hecho un análisis *in silico* de la S-layer de *Lb. acidophilus* (que no capta metales) y de *B. sphaericus* y encontramos que el contenido es similar (21% y 18%), indicando que esta característica en sí no es suficiente. Quizás sea la glicosilación la modificación importante, pues esta es la diferencia mayor entre la proteína de ambas especies, ya que la S-layer de *B. sphaericus* podría estar glicosilada y la de *Lb. acidophilus* no lo está.

En cuanto al rendimiento de la S-layer, nuestra experiencia es que cultivos en fase exponencial de *B. sphaericus* produjeron S-layer más fuertemente adherida que en fase de crecimiento estacionaria temprana. Esto quizás explique las grandes diferencias obtenidas entre lotes de la misma cepa.

Tanto los cultivos como las proteínas purificadas son eficientes como bioadsorbentes. La ventaja de utilizar las S-layer purificadas, es que pese a tener que hacer un paso previo de extracción, este paso es muy simple, utilizando la S-layer endógena y luego puede adherirse a numerosos soportes (nanocápsulas, liposomas, monocapas en sustratos sólidos, incluso en cilindros en suspensión) para ser enviados al medio a decontaminar para finalmente ser retirado. Por otro lado, la proteína de *B. sphaericus* es muy estable térmicamente, lo cual la hace muy atractiva con vistas a ser utilizada biotecnológicamente.

Las variaciones ambientales han mostrado ejercer influencia sobre la composición de la S-layer y localización (adherida, libre o adentro de la espora), e incluso la expresión de genes *slp* de las cepas (Jakava-Viljanen, *et al* 2002, Mignot *et al*, 2002). Optimizar las condiciones de producción para obtener una proteína adherida o no a la célula o la espora, y las condiciones de bioadsorción (selección de la cepa, fase de crecimiento, medio, efector de estrés, y metales ensayados) son los siguientes pasos a seguir.



Se puede concluir que las S-layer de *B. sphaericus* le aportan al menos dos propiedades importantes a estos cultivos:

- 1- capacidad de captación de metales lo que le permite a estos bacilos crecer en medios contaminados y de mantener sus esporas. Esto explicaría porqué las preparaciones de *Bacillus sphaericus* se mantienen mejor (mayor persistencia) que *Bti* en sitios contaminados para su uso como bioinsecticida
- 2- proveer algún motivo proteico, posiblemente una actividad hemolítica, que aumentaría la actividad y espectro de acción. Esta actividad, similar a las Cyt presentes en cristales de *Bti*, podría disminuir la aparición de mosquitos resistentes a las toxinas de *Bacillus sphaericus*.

Además, presentan modificaciones estructurales, postraduccionales, que modularían estas actividades frente a efectores de estrés y que sería importante determinar.

### **Transformación y construcción de mutantes en *B. sphaericus***

Para poder determinar las funciones en la osmoadaptación hubiera sido interesante contar con una mutante ya sea nula o condicional de *slpC*.

El estudio genético de *Bacillus sphaericus* 2362 ha sido obstaculizado debido a la falta de un sistema eficiente de transformación. Los protocolos existentes para *Bacillus* fueron ineficientes en *B. sphaericus*. La primera cepa de esta especie en lograr ser

transformada fue la cepa 1593 utilizando protoplastos y transformación con PEG (polietilenglicol) y ADN del plásmido *pUB110* (en 1984 por Mc Donald y Burke).

Los ensayos de electroporación han sido muy variados y en algunas cepas como la 2297 o MR4 el grupo de Delécluse consiguió transformación, no así con la 2362 (Thiéry *et al*, 1998).

En nuestro laboratorio, solo con la cepa ABS13052 (deficiente en restricción *hsdR*) de Yousten se lograron resultados positivos (A. Alice, Tesis doctoral 2001). Durante el desarrollo de esta Tesis se probaron diferentes estrategias para conseguir resultados de transformación.

Es previsible que la S-layer pueda ser un obstáculo a la entrada del ADN. Por eso se intentó desnudar de S-layer a la bacteria para después someterla a un protocolo de electroporación según Seyler (1991).

También, se intentó utilizar protocolos de electroporación de células precrecidas en medio hiperosmótico generado por NaCl, en vista de los resultados positivos desarrollados en nuestro laboratorio para *Lactobacillus* (Palomino *et al*, 2010). Se intentó adaptar el protocolo, lavando previo a la generación de competentes con EDTA para lavar de la capa S, aunque de todos modos la eficiencia resultó muy baja.

Luego, se ensayaron protocolos de transformación mediado por protoplastos, realizando modificaciones a las ya descritas por Mc Donald y Burke (1984). Se realizó un protocolo por generación de protoplastos y PEG. Pese a que la generación de protoplastos resultó muy exitosa, no se pudo lograr mejorar los valores de eficiencia, fundamentalmente por problemas en la regeneración de los mismos.

La presencia de glicosilación en la capa S ha sido considerada un factor más para la resistencia de algunas bacterias a tomar ADN foráneo. En particular, en *Paenibacillus alvei* CCM 2051 se demostró que la eficiencia de transformación en una mutante de glicosilación mejoró en un factor 500 respecto de las células salvajes. Los autores de este trabajo argumentan que las razones fundamentales para la mejora en la transformabilidad se deben a la repulsión de carga que existía en la cepa salvaje entre los glicanos de la S-layer y las moléculas de ADN a incorporar o por el impedimento estérico (Zarschler *et al*, 2009). En el caso de que la S-layer de *Bacillus sphaericus* portara una S-layer glicosilada, la obtención de una mutante de glicosilación podría ser una ventaja para obtener una cepa más transformable.

En cuanto a la presencia de genes que podrían encenderse debido a la ausencia del gen *slpC*, ya desde 1989 se describió para la cepa 2362 un ORF codificante para una

probable proteína de 80 kDa con alta similitud a la S-layer (Bowditch *et al*, 1989). Para la cepa emparentada C3-41 se encontraron 22 posibles secuencias codificantes para S-layer, que podrían haber sido objeto de duplicaciones de secuencias genómicas. En las cercanías de las duplicaciones, se hallaron secuencias de transposasas y proteínas de la familia de integrasas de fagos, lo que avalaría esta hipótesis (Hu *et al*, 2008).

Por otro lado esta especie es altamente productora de sistemas de restricción a los cuales su ADN está modificado, razón por la cual sería importante pensar en estrategias de “protección del ADN” entrante. En este contexto tanto la fusión con un “donante” inactivado por calor portador del plásmido, obtenido en una cepa con altos niveles de modificación, con un receptor final parcialmente saturado en su sistema de restricción serán considerados.

En cuanto a la obtención de una mutante de S-layer es importante evaluar una estrategia de mutante condicional, por ejemplo utilizando un plásmido con una secuencia antisentido del promotor *slpC* que pueda generar mutantes a través de ARN de interferencia.

# Bibliografía

## Bibliografía

**Abu-Qarn M, Yurist-Doutsch S, Giordano A, Trauner A, Morris HR, Hitchen P, Medalia O, Dell A, Eichler J.** (2007) *Haloferax volcanii* AglB and AglD are involved in N-glycosylation of the S-layer glycoprotein and proper assembly of the surface layer. *J Mol Biol.* 374(5):1224-36

**Ahmed HK, Mitchell WJ, Priest FG.** (1995) Regulation of mosquitocidal toxin synthesis in *Bacillus sphaericus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43(2):310-4.

**Alexander B Priest FG** (1990). Numerical classification and identification of *Bacillus sphaericus* including some strains pathogenic for mosquito larvae. *J Gen Microbiol* 136, 367-376.

**Alice AF** (2001) Tesis Doctoral. Sistema de fosfotransferasa dependiente del fosfoenolpiruvato (Pts) y represión catabólica en *Bacillus sphaericus*.

**Alice AF, Pérez-Martínez G, Sánchez-Rivas C.** (2003). Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system and N-acetylglucosamine metabolism in *Bacillus sphaericus*. *Microbiology.* 149 (Pt 7):1687-98.

**Allievi MC, Sabbione F, PradoAcosta M, Palomino MM, Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.** (2011) Metal biosorption by Surface-Layer proteins from *Bacillus* species. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21: 147-153.

**Anderson VJ, Kern JW, McCool JW, Schneewind O, Missiakas D.** (2011) The SLH domain protein BslO is a determinant of *Bacillus anthracis* chain length. *Mol. Microbiol.* 81(1):192-205.

**Andreazza R, Pieniz S, Wolf L, Lee MK, Camargo FA, Okeke BC** (2010). Characterization of copper bioreduction and biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from copper-contaminated vineyard soil. *Sci Total Environ* 408:1501-1507

**Aquino de Muro M, Mitchell WJ, Priest FG.** (1992) Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol.* 138(6):1159-66.

**Åvall-Jääskeläinen S, Palva A** (2005). *Lactobacillus* surface layers. *Microbiol Rev* 29, 511-529.

**Bailey TL, Elkan C** (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on*

*Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.

**Baumann L, Baumann P** (1989) Expression in *Bacillus subtilis* of the 51- and 42-kilodalton mosquitocidal toxin genes of *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 55(1):252-3.

**Baumann, L, Broadwell AH, Baumann P** (1988). Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4- and 41.9-kilodalton proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297. *J. Bacteriol.* 170:2045-2050.

**Baumann, P, Clark MA, Baumann L, Broadwell AH** (1991). *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiol. Rev.* 55, 425-436.

**Berry C.** (2012) The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. *J Invertebr Pathol.* 109(1):1-10.

**Beveridge TJ, Pouwels PH, Sára M, Kotiranta A, Lounatmaa K, Karia K, Kerosuo E, Haapasalo M, Egelseer EM, Schocher I, Sleytr UB, Morelli L, Callegari M-L, Nomellini JF, Bingle WH, Smit J, Leibovitz E, Lemaire M, Miras I, Salamitou S, Béguin P, Ohayon H, Gounon P, Matuschek M, Sahn K, Bahl H, Grogono-Thomas R, Dworkin J, Blaser MJ, Woodland RM, Newell DG, Kessel M, Koval SF** (1997). Function of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 99–149.

**Bhattacharya M, Plantz BA, Swanson-Kobler JD, Nickerson KW.** (1993) Nonenzymatic Glycosylation of Lepidopteran-Active *Bacillus thuringiensis* Protein Crystals. *Appl Environ Microbiol.* 59(8):2666-72.

**Boot HJ, Kolen CPAM, Pouwels PH** (1996). Interchange of the active and silent S-layer protein genes of *Lactobacillus acidophilus* by inversion of the chromosomal *slp* segment. *Mol. Microbiol.* 21:799–809

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

**Broadwell AH, Baumann P** (1987) Proteolysis in the gut of mosquito larvae results in further activation of the *Bacillus sphaericus* toxin. *Appl Environ Microbiol.* 53(6):1333-7.

**Bruins, MR, Kapil S, Oehme FW** (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 45, 198–207

- Calo D, Guan Z Eichler J** (2011). Glyco-engineering in Archaea: differential N-glycosylation of the S-layer glycoprotein in a transformed *Haloferax volcanii* strain. *Microbial Biotechnology* doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00250.x
- Charles JF.** (1987) Ultrastructural midgut events in *Culicidae* larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297 spore/crystal complex. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* 138(4):471-84.
- Charles J-F, Nielsen-LeRoux C, Delécluse A** (1996). *Bacillus sphaericus* toxins; molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.* 41:451–472.
- Chung, L., K. S. Rajan, E. Merdinger, and N. Grecz** (1971). Coordinative binding of divalent cations with ligands related to bacterial spores. Equilibrium studies. *Biophys. J.* 11: 469-482.
- Csonka LN, Hanson AD** (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 569–606.
- Darboux I, Nielsen-LeRoux C, Charles JF, Pauron D** (2001) The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem Mol Biol.* 31(10):981-90.
- Daughney CJ, Fein JB** (1997). The effect of ionic strength on the adsorption of H<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: A surface complexation model. *J. of colloid and interface science.* 198, 53-77.
- Driks A.** (1999). *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 1-20.
- Davidson EW, Titus M.** (1987) Ultrastructural effects of the *Bacillus sphaericus* mosquito larvicidal toxin on cultured mosquito cells. *J Invertebr Pathol.* 50(3):213-20.
- Davidson EW, Urbina M, Payne J, Mulla MS, Darwazeh H, Dulmage HT, Correa JA.** (1984) Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. *Appl Environ Microbiol.* 47(1):125-9.
- de Barjac H, Larget-Thierry I, Dumanoir VC, Ripouteau H** (1985). Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 85-90.
- de Melo JV, Jones GW, Berry C, Vasconcelos RH, Oliveira CM, Furtado AF, Peixoto CA, Silva-Filha, MH.** (2009). Cry48Aa/Cry49Aa toxin from *Bacillus sphaericus* displays cytopathological effects on susceptible and Binary toxin resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4782–4789.
- de Melo JV, Jones GW, Berry C, Vasconcelos RH, Oliveira CM, Furtado AF, Peixoto CA, Silva-Filha MH** (2009). Cry48Aa/Cry49Aa toxin from *Bacillus*

*sphaericus* displays cytopathological effects on susceptible and Binary toxin resistant *Culex quinquefasciatus* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4782–4789.

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

**Dick GJ, Torpey JW, Beveridge TJ, Tebo BM** (2008). Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 1527-1534.

**Egelseer EM, Danhorn T, Pleschberger M, Hotzy C, Sleytr UB, Sára M.** (2001) Characterization of an S-layer glycoprotein produced in the course of S-layer variation of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 and sequencing and cloning of the *sbsD* gene encoding the protein moiety. *Arch Microbiol* 177(1):70-80

**El-Bendary MA** (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *J Basic Microbiol.*;46(2):158-70.

**Engelhardt H.** (2007). Are S-layers exoskeletons? The basic function of protein surface layers revisited. *J. Struct. Biol.* 170, 115–124.

**Engelhardt H, Peters J** (1998). Structural Research on Surface Layers: A Focus on Stability, Surface Layer Homology Domains, and Surface Layer-Cell Wall Interactions. *J. of Structural Biol.* 124, 276-302.

**Erbacher A, Gieseke F, Handgretinger R, Muller I** (2009). Dendritic cells: Functional aspects of glycosylation and lectins. *Human Immunology* 70 308-312.

**Fahmy K, Merroum M, Pollmann K, Raff J, Savchuk O, Henning C, Selenska-Pobell S.** (2006). Secondary Structure and Pd<sup>(II)</sup> Coordination in S-layer Proteins from *Bacillus sphaericus* Studied by Infrared and X-Ray Absorption Spectroscopy. *Biophysical J.* 91, 996-1007.

**Ferner-Ortner J, Mader C, Ilk N, Sleytr UB, Egelseer EM** (2007) High-affinity interaction between the S-layer protein SbsC and the secondary cell wall polymer of *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 determined by surface plasmon resonance technology. *J. Bacteriol.* 189(19):7154-8.

**Fouet A, Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M** (1999). *Bacillus anthracis* surface: capsule and S-layer. *J Appl Microbiol*, 87, 251–255

**Fouet A.** (2009). The surface of *Bacillus anthracis*. *Mol Aspects Med.* 30(6):374-85.

- Frachon E, Hamon S, Nicolas L, de Barjac H** (1991). Cellular fatty acid analysis as a potential tool for predicting mosquitocidal activity of *Bacillus sphaericus* strains, *Appl Environ Microbiol* 57, 3394-3398.
- Francis CA, Casciotti KL, Tebo BM** (2002). Localization of Mn(II)-oxidizing activity and the putative multicopper oxidase, MnxG, to the exosporium of the marine *Bacillus sp.* strain SG-1. *Arch. Microbiol.* 178: 450-456.
- Gander JE** (1984). Gel protein stains: glycoproteins. *Meth. Enzymol.* 104: 447-451)
- Garavaglia L, Cerdeira SB, Vullo DL** (2010). Chromium (VI) biotransformation by beta- and gamma-Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *J. Hazard Mater.* 175: 104-110.
- Garduño RA, Phipps BM, Baumeister W, Kay WW.** (1992) Novel structural patterns in divalent cation-depleted surface layers of *Aeromonas salmonicida*. *J Struct Biol.*109(3):184-95.
- Geer LY, Domrachev M, Lipman DJ, Bryant SH.** (2002), CDART: protein homology by domain architecture. *Genome Res.*12 (10)1619-23
- Gleiser RM, Zalazar LP.** (2010). Distribution of mosquitoes in relation to urban landscape characteristics. *Bull Entomol Res.* 100(2):153-8.
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL** (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol.* 118(3):264-73
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, de Los Angeles Serradell M, Abraham AG, De Antoni GL** (2009). Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *J Dairy Res.* 76(1):111-6.
- He LM, Tebo BM** (1998). Surface charge properties of and Cu(II) adsorption by spores of the marine *Bacillus sp.* strain SG-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1123-1129.
- Hetzer A, Daughney CJ, Morgan HW** (2006). Cadmium Ion Biosorption by the Thermophilic Bacteria *Geobacillus stearothermophilus* and *G. thermocatenulatus*. *Appl. Environ. Microbiol* 72, 4020-4027
- Holtmann G, Bakker EP, Uozumi N, Bremer E.** (2003) KtrAB and KtrCD: two K<sup>+</sup> uptake systems in *Bacillus subtilis* and their role in adaptation to hypertonicity. *J Bacteriol.*185(4):1289-98.

- Horejs C, Pum D, Sleytr UB, Peterlik H, Jungbauer A, Tscheliessnig R.** (2010) Surface layer protein characterization by small angle X-ray scattering and a fractal mean force concept: from protein structure to nanodisk assemblies. *J Chem Phys.* 133:175102
- Horejs C, Pum D, Sleytr UB, Tscheliessnig R** (2008). Structure prediction of an S-layer protein by the mean force method. *J Chem Phys* 128: 065101–065111.
- Huber C, Egelseer EM, Ilk N, Sleytr UB, Sára M** (2006) S-layerstreptavidin fusion proteins and S-layer-specific heteropolysaccharides as part of a biomolecular construction kit for application in nanobiotechnology. *Microelectron Eng.* 83:1589-1593
- Huber C, Ilk N, Rünzler D, Egelseer EM, Weigert S, Sleytr UB, Sára M.** (2005) The three S-layer-like homology motifs of the S-layer protein SbpA of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 are not sufficient for binding to the pyruvylated secondary cell wall polymer. *Mol Microbiol.* 55(1):197-205.
- Hu X, Fan W, Han B, Liu H, Zheng D, Li Q, Dong W, Yan J, Gao M, Berry C, Yuan Z.** (2008) Complete genome sequence of the mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41 and comparison with those of closely related *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 190(8):2892-902.
- Hu X, Li J, Hansen BM, Yuan Z** (2008). Phylogenetic analysis and heterologous expression of surface layer protein SlpC of *Bacillus sphaericus* C3-41. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(5):1257-63.
- Hullo MF, Moszer I, Danchin A, Martin-Verstraete I** (2001). CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *J. Bacteriol.* 183: 5426-5430.
- Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A, Korhonen TK** (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol.* 184(12):3360-7
- Ilk N, Kosma P, Puchberger M, Egelseer EM, Mayer HF, Sleytr UB, Sára M.** (1999) Structural and functional analyses of the secondary cell wall polymer of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 that serves as an S-layer-specific anchor. *J Bacteriol.* 181(24):7643-6.
- Ilk N, Egelseer EM, Sleytr UB** (2011) S-layer fusion proteins--construction principles and applications. *Curr Opin Biotechnol.* 22(6):824-31.
- Jakava-Viljanen M, Avall-Jaaskelainen S, Messner P, Sleytr UB, Palva A** (2002). Isolation of three new surface layer protein genes (*slp*) from *Lactobacillus brevis* ATCC

14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* 184: 6786-6795.

**Jensen MØ, Mouritsen OG.** (2004) Lipids do influence protein function-the hydrophobic matching hypothesis revisited. *Biochim Biophys Acta.* 1666(1-2):205-26.

**Jones GW, Nielsen-Leroux C, Yang Y, Yuan Z, Dumas VF, Monnerat RG, Berry C** (2007). A new Cry toxin with a unique two-component dependency from *Bacillus sphaericus*. *FASEB J.* 21, 4112–4120.

**Jones GW, Wirth MC, Monnerat RG, Berry C.** (2008). The Cry48Aa-Cry49Aa binary toxin from *Bacillus sphaericus* exhibits highly-restricted target specificity. *Environ. Microbiol.* 10, 2418–2424.

**Kainz B, Steiner K, Moller M, Pum D, Schäffer C, Sleytr UB, Toca-Herrera JL.** (2010) Absorption, steady-state fluorescence, fluorescence lifetime, and 2D self-assembly properties of engineered fluorescent S-layer fusion proteins of *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a. *Biomacromolecules.* 11:207-214.

**Kainz B, Steiner K, Sleytr UB, Pum D, Toca-Herrera JL** (2010) Fluorescence energy transfer in the bi-fluorescent S-layer tandem fusion protein ECFP–SgsE–YFP. *J Struct Biol.* 172:276-283.

**Kandiba L, Aitio O, Helin J, Guan Z, Permi P, Bamford DH, Eichler J, Roine E** (2012). Diversity in prokaryotic glycosylation: an archaeal-derived N-linked glycan contains legionaminic acid. *Mol Microbiol.* 84(3):578-93.

**Kasan HC, Baecker, AAW** (1989). Activated sludge treatment of coal-gasification effluent in a petrochemical plant –II. Metal accumulation by heterotrophic bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 21, 297–303.

**Kellen WR, Clark TB, Lindegren JE, Ho BC, Rogoff MH, Singer S.**(1965) *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J Invertebr Pathol.* 7(4):442-8.

**Kelly SD, Boyanov MI, Bunker BA, Fein JB, Fowle DA, Yee N, Kemner KM.** (2001). XAFS determination of the bacterial cell wall functional groups responsible for complexation of Cd and U as a function of pH. *J. Synchrotron Radiat.* 1, 8. 946-948.

**Kern JW, Schneewind O** (2008). BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol.* 68(2):504-15.

**Klein D, Uspensky I, Braun S** (2002). Tightly bound binary toxin in the cell wall of *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 68(7):3300-7.

- Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosić S** (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 94(6):981-7.
- Krych VK, Johnson JL, Yousten AA** (1980). Deoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*, *Int J Syst Bacteriol* 30, 476-484.
- Krywienczyk J, Dulmage HT, Fast PG.** (1978) Occurrence of two serologically distinct groups within *Bacillus thuringiensis* serotype 3 ab var. kurstaki. *J Invertebr Pathol.* 31(3):372-5.
- Kuen B, Koch A, Asenbauer E, Sará M, Lubitz W.** (1997) Molecular characterization of the *Bacillus stearothermophilus* PV72 S-layer gene *sbsB* induced by oxidative stress. *J Bacteriol.* 179(5):1664-70.
- Lacey LA, Singer S.** (1982). Lavicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H-14) against anopheline and culicine mosquitoes. *Mosq. News* 42:537–543.
- Lacey LA, Undeen AH.** (1984) Effect of formulation, concentration, and application time on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* (H-14) against black fly (Diptera: Simuliidae) larvae under natural conditions. *J Econ Entomol.* 77(2):412-8
- Lacey LA, Undeen AH.** (1986). Microbial control of black flies and mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 31:265-96.
- Lee SW, Sabet M, Um HS, Yang J, Kim HC, Zhu W.** (2006) Identification and characterization of the genes encoding a unique surface (S-) layer of *Tannerella forsythia*. *Gene.* 371(1):102-11
- Leung WC, Chua H, Lo W.** (2001). Biosorption of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Biochem. and biotech.* 91, 171-84.
- Li J, Hu X, Yan J, Yuan Z.** (2009) Species-specific cell wall binding affinity of the S-layer proteins of mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41. *Appl Environ Microbiol.* 75(12):3891-5.
- Liu J-W, Porter AG, Wee BY, Thanabalu T** (1996). New gene from nine *Bacillus sphaericus* strains encoding highly conserved 35.8-kilodalton mosquitocidal toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2174–2176.
- Liu M, Li S, Hu S, Zhao C, Bi D, Sun M** (2008). Display of avian influenza virus nucleoprotein on *Bacillus thuringiensis* cell surface using CTC as a fusion partner. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 669-676

- Lo W, Ng LM, Chua H, Yu PH, Sin SN, Wong PK** (2003). Biosorption and desorption of copper (II) ions by *Bacillus sp.* *Appl Biochem Biotechnol* 105 -108:581-591.
- López A, Lazaro N, Priego J, Márquez A.** (2000). Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4K39. *Industrial Microbiol. Biotechnol.* 24, 146-151.
- López C, Heras H, Ruzal SM, Sanchez-Rivas C, Rivas E** (1998). Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium *Current Microbiol* **36**, 55-61
- López CS, Alice A, Heras H, Rivas E, Sánchez-Rivas C.** (2006) Role of anionic phospholipids in the adaptation to high salinity in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **152**,605–616.
- López CS, Heras H, Garda H, Ruzal SM, Sánchez-Rivas C, Rivas E** (2000). Biochemical and biophysical studies of *Bacillus subtilis* envelopes under hyperosmotic stress. *Inter. J Food Microbiol.* **55**,137-142
- Luckevich M D and Beveridge T J.** (1989) Characterization of a Dynamic S Layer on *Bacillus thuringiensis* *J Bacteriol* 171, 6656-6667
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukur PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.** (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*39 (D) 225-9.
- Matias VR, Beveridge TJ.** (2006) Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 188(3):1011-21.
- McDonald KO, Burke WF Jr.,** (1984). Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593. *J. General Microbiology.* 130, 203-208
- McGuckin WF, McKenzie BF** (1958). An Improved Periodic Acid Fuchsin Sulfite Staining Method for Evaluation of Glycoproteins. *Clinical Chemistry* vol. 4 no. 6 476-483
- Mendoza-Cozatl D, Loza-Tavera H, Hernandez-Navarro A, Moreno-Sanchez R.** (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol. Rev.*1.29, 653–671.

- Merroum M, Raff J, Rossberg A, Henning C, Reich T, Selenska-Pobell S** (2005). Complexation of Uranium by Cells and S-layer Sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9): 5532-5543.
- Mesnager S, Mweber-Levy M, Haustant M, Mock M, Fouet A** (1999). Cell Surface-Exposed Tetanus Toxin Fragment C Produced by Recombinant *Bacillus anthracis* Protects against Tetanus Toxin. *Infect Immun.* 67, 4847–4850
- Mesnager S, Tosi-Couture E, Fouet A** (2000). Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase. *Mol Microbiol* 31, 927–936
- Messner P, Steiner K, Zarschler K, Schäffer C** (2008). S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydr. Res.* 343(12):1934-51.
- Mignot T, Mesnager S, Couture-Tosi E, Mock M, Fouet A** (2002). Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* 43: 1615-1627.
- Mobili P, Serradell Mde L, Trejo SA, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, De Antoni GL** (2009) Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 95(4):363-72
- Navarre WW, Schneewind O** (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 174–229.
- Nicolas L, Nielsen-Leroux C, Charles JF, Delécluse A.** (1993) Respective role of the 42- and 51-kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 106(3):275-80
- Ohana B, Margalit J, Barak Z** (1987). Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under Simulated Field Conditions. *Appl Environ Microbiol.* 53(4):828-31.
- Ojeda PV** (2011). Tesis de Licenciatura. Análisis funcional de la proteína S-layer de *Lactobacillus acidophilus*.
- Palomino MM, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM** (2009) High salt stress in *Bacillus subtilis*: involvement of PBP4\* as a peptidoglycan hydrolase. *Res Microbiol.* 160(2):117-24.
- Palomino MM, Allievi MC, Prado-Acosta M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM.** (2010) New method for electroporation of *Lactobacillus* species grown in high salt. *J Microbiol Methods.* 83(2):164-7

- Peña G, Miranda-Rios J, de la Riva G, Pardo-López L, Soberón M, Bravo A.** (2006) A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl Environ Microbiol.* 72(1):353-60.
- Peters J, Baumeister W, Lupas A.** (1996) Hyperthermostable surface layer protein tetrabrachion from the archaeobacterium *Staphylothermus marinus*: evidence for the presence of a right-handed coiled coil derived from the primary structure. *J Mol Biol.* 257(5):1031-41.
- Pfaffl MW.** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 29 (9): 2002-2007.
- Piuri M** (2003). Caracterización de la respuesta a estrés osmótico en *Lactobacillus casei*: Rol del sistema proteolítica. Tesis Doctoral.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM** (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: Role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology* **95**(2)372-379.
- Piuri M, Sanchez-Rivas C, Ruzal SM** (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied Microbiology.* **98**(1):84-95.
- Pleschberger M, Saerens D, Weigert S, Sleytr UB, Muyldermans S, Sára M, Egelseer EM.** (2004) An S-layer heavy chain camel antibody fusion protein for generation of a nanopatterned sensing layer to detect the prostate-specific antigen by surface plasmon resonance technology. *Bioconjug Chem.* 15:664-671
- Pollmann K, Raff J, Schnorpfeil M, Radeva G, Selenska-Pobell S.** (2005) Novel surface layer protein genes in *Bacillus sphaericus* associated with unusual insertion. *Microbiology*, 151, 2961–2973
- Pollmann K, Raff J, Merroun M, Fahmy K, Selenska-Pobell S** (2006). Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. *Biotechnol Adv* 24:58-68
- Pollmann K, Matys S** (2007). Construction of an S-layer protein exhibiting modified self-assembling properties and enhanced metal binding capacities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 1079-1085.
- Poolman B, Glaasker E** (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol. Microbiol.* **29**: 397–407.
- Poolman B** (2002) Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82(1-4):147-64.

- Poolman B, Spitzer JJ, Wood JM.** (2004) Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*. 1666(1-2):88-104.
- Porter AG, Davidson EW, Liu J-W** (1993). Mosquitocidal toxins of bacilli and their genetic manipulation for effective biological control of mosquitoes. *Microbiol. Rev.* 52:838-861.
- Porter AG** (1996). Mosquitocidal toxins, genes and bacteria: the hit squad. *Parasitol Today*. 12(5):175-9.
- Prado Acosta M** (2010). S-layer de *Lactobacillus acidophilus*: caracterización y análisis funcional. Tesis Doctoral.
- Prado Acosta M, Valdman E, Battaglini F, Leite S, Ruzal SM** (2005). Biosorption of copper by *Paenibacillus polymyxa* cells and their exopolysaccharide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1157-1163.
- Prado Acosta M, Palomino MM, Allievi MC, Sanchez Rivas C, Ruzal SM** (2008) Murein Hydrolase Activity in the Surface Layer of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Environ Microbiol.* 74:7824-7827
- Priest FG, Ebdrup L, Zahner V, Carter PE** (1997) Distribution and characterization of mosquitocidal toxin genes in some strains of *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 63(4):1195-8.
- Rathnayake IVN, Megharaj M, Bolan N, Naidu R** (2009). Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. *Engineering and Technology.* 53, 1185-1189
- Rippere KE, Johnson JL, Yousten AA** (1997). DNA similarities among mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *Int J Syst Bacteriol* 47, 214-216.
- Ruzal SM, Sanchez-Rivas C.** (1994). Physiological and genetic characterization of the osmotic stress response in *Bacillus subtilis*. *Can J Microbiol* 40, 140-144.
- Ruzal SM, López C, Rivas E, Sánchez-Rivas C.** (1998) Osmotic strength blocks sporulation at stage II by impeding activation of early sigma factors in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol.* 36(2):75-9.
- Sangthongpitag K, Penfold RJ, Delaney SF, Rogers PL.** (1997) Cloning and expression of the *Bacillus sphaericus* 2362 mosquitocidal genes in a non-toxic unicellular cyanobacterium, *Synechococcus* PCC6301. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47(4):379-84.

**Sára M, Kuen B, Mayer HF, Mandl F, Schuster KC, Sleytr UB** (1996). Dynamics in oxygen-induced changes in S-layer protein synthesis from *Bacillus stearothermophilus* PV72 and the S-layer-deficient variant T5 in continuous culture and studies of the cell wall composition. *J Bacteriol.* 178(7):2108-17.

**Sára M, Sleytr UB** (2000). S-layer proteins. *J Bacteriol.* 182(4),859-868.

**Sára M.** (2001) Conserved anchoring mechanisms between crystalline cell surface S-layer proteins and secondary cell wall polymers in Gram-positive bacteria? *Trends Microbiol. Review.* 9(2):47-9

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

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

**Scholz HC, Riedmann E, Witte A, Lubitz W, Kuen B** (2001). S-layer variation in *Bacillus stearothermophilus* PV72 is based on DNA rearrangements between the chromosome and the naturally occurring megaplasmids. *J. Bacteriol.* **183**:1672–1679.

**Selenska-Pobell S, Panak P, Miteva V, Boudakov I, Bernhard G, Nitsche H** (1999). Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains. *B cereus*, *B megaterium* from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 59-67.

**Servant, P, Rosso ML, Hamon S, Poncet S, Delécluse A, Rapoport G.** (1999). Production of Cry11A and Cry11Ba toxins in *Bacillus sphaericus* confers toxicity towards *Aedes aegypti* and resistant *Culex* populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3021–3026.

**Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF.** (1999) Identification of the receptor for *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*). *Insect Biochem Mol Biol.* 29(8):711-21.

**Singer S.** (1973) Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature.* 244(5411):110-1

**Sleytr UB, Beveridge TJ** (1999) Bacterial S-layers *Trends in Microbiology* 7, 253-260

**Sleytr UB, Messner P, Pum D, Sára M.** (1993) Crystalline bacterial cell surface layers. *Mol Microbiol.* 10(5):911-916.

- Sleytr UB, Sára M, Messner P, Pum D.** (1994) Two-dimensional protein crystals (S-layers): fundamentals and applications. *J Cell Biochem.* 1994 56(2):171-6.
- Sleytr UB, Sára M, Pum D, Schuster B** (2001). Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Progr. Surf. Sci.* 68, 231–278
- Sleytr UB, Sára M, Pum D, Schuster B, Messner P, Schäffer C** (2002) Self assembly protein system: microbial S-layer. In: Steinbüchel A. Fahnstock S. (ed) *Supramolecular polymers*, 2<sup>nd</sup> edn. Taylor and Francis, Boca Raton, Fl, 583-616.
- Sleytr UB.** (1997) I. Basic and applied S-layer research: an overview *FEMS Microbiology Reviews* 20, 5-12
- Smith AW, Cámara-Artigas A, Brune DC, Allen JP** (2005) Implications of high-molecular-weight oligomers of the binary toxin from *Bacillus sphaericus*. *J Invertebr Pathol.* 88(1):27-33
- Srisucharitpanit K, Inchana P, Rungrod A, Promdonkoy B, Boonserm P.** (2012) Expression and purification of the active soluble form of *Bacillus sphaericus* binary toxin for structural analysis. *Protein Expr Purif.* ;82(2):368-72
- Suárez P, Reyes R.** (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para en ambiente. *Interciencia.* 27, 160-164.
- Tandeau de Marsac N, de la Torre F, Szulmajster J** (1987) Expression of the larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Mol Gen Genet.* 209(2):396-8
- Thanabalu, T, Hindley J, Jackson-Yap J, Berry C.** (1991). Cloning, sequencing and expression of a gene encoding a 100-kilodalton mosquitocidal toxin from *Bacillus sphaericus* SSII-1. *J. Bacteriol.* 173:2776–2785.
- Thanabalu, T, Porter AG.** (1996). A *Bacillus sphaericus* gene encoding a novel type of mosquitocidal toxin of 31.8kDa. *Gene* 170:85–89.
- Thiéry I, Hamon S, Delécluse A, Orduz S.** (1998) The introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* Cyt1Ab1 gene results in higher susceptibility of resistant mosquito larva populations to *B. sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 64(10):3910-6.
- Tourney J, Ngwenya BT, Mosselmans JWF Magennis M.** (2009). Physical and chemical effects of extracellular polymers (EPS) on Zn adsorption to *Bacillus licheniformis* S-86. *J. of Colloid and Interface Science* 337, 381-389
- Tschiggerl H, Breitwieser A, de Roo G, Verwoerd T, Schäffer C, Sleytr UB** (2008) Exploitation of the S-layer self-assembly system for site directed immobilization of

enzymes demonstrated for an extremophilic laminarinase from *Pyrococcus furiosus*.(2008) *J Biotechnol.* 133:403-411.

**Tsekova K, Todorova D, Dencheva V, Ganeva S.** (2010). Biosorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol* 101:1727-1731

**van Kooyk Y, Rabinovich GA.** (2008) Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 9(6):593-601.

**Velasquez L, Dussan J.** (2009). Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J Hazard Mater* 167:713-716

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

**Walker SG, Karunaratne DN, Ravenscroft N, Smit J.** (1994) Characterization of mutants of *Caulobacter crescentus* defective in surface attachment of the paracrystalline surface layer. *J Bacteriol.* 176(20):6312-23.

**Williams DD, Turnbough CL.** (2004). Surface layer protein EA1 is not a component of *Bacillus anthracis* spores but is a persistent contaminant in spore preparations. *J. Bacteriol.* 186: 566-569.

**Woodburn, MA, Yousten, AA, Hilu, H.** (1995). Random amplified polymorphic DNA fingerprinting of mosquito-pathogenic and nonpathogenic strains of *Bacillus sphaericus*, *Int J Syst Bacteriol* 45, 212-217.

**Yang Y, Wang L, Gaviria A, Yuan Z, Berry C.** (2007). Proteolytic stability of insecticidal toxins expressed in recombinant bacilli. *Appl Environ Microbiol.* 73(1):218-25.

**Yousten, AA** (1984). Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *J. Invertebr. Pathol.* 43, 124-125

**Yousten, AA.** (1984). *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Processes* 3:315-343.

**Zarschler K, Janesch B, Zayni S, Schäffer C, Messner P.** (2009). Construction of a gene knockout system for application in *Paenibacillus alvei* CCM 2051T, exemplified by the S-layer glycan biosynthesis initiation enzyme WsfP. *Appl Environ Microbiol.* 75(10):3077-8

**Zhang R, Hua G, Urbauer JL, Adang MJ.** (2010). Synergistic and Inhibitory Effects of Aminopeptidase Peptides on *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba Toxicity in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* 8512-19.