



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Proteínas superficiales de bacterias lácticas con
potencialidad biotecnológica: estudios estructurales y
funcionales de las proteínas de capa S de Lactobacillus
kefiri***

Tesista: Lic. Mariano Malamud

Directora: Dra. María de los Ángeles Serradell

Año: 2019

El presente trabajo, para optar por el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue desarrollado en la Cátedra de Microbiología, bajo la dirección de la Dra. María de los Ángeles Serradell.

A continuación se detallan los trabajos científicos que se elaboraron a partir de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral:

1. “*Lactobacillus kefir* shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins”.

Autores: Malamud, Mariano; Carasi, Paula; Bronsoms, Silvia; Trejo, Sebastián A.; Serradell, María de los Angeles (2017). Revista: Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology. DOI: 10.1007/s10482-016-0820-4

2. “A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated”.

Autores: Cavallero, Gustavo; Malamud Mariano; Casabuono Adriana; Serradell María de los Ángeles; Couto Alicia (2017). Revista: Journal of Proteomics <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.007>

3. “S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 enhances macrophages response to LPS in a Ca⁺²-dependent manner”.

Autores: Malamud, Mariano; Carasi, Paula; Freire, Teresa; Serradell, María de los Angeles (2018). Revista: Biochem Biophys Res Commun, 495, 1227-1232. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.127>

4. “S-layer glycoprotein from *Lactobacillus kefir* exerts its immunostimulatory activity through glycan recognition by Mincle”

Malamud Mariano, Carasi Paula, Freire Teresa, Lepenies Bernd, Serradell María de los Ángeles (2019). Frontiers in Immunology. 10:1422.

DOI: 10.3389/fimmu.2019.01422

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que formaron parte de mi trabajo de Tesis Doctoral, sin las cuales esto no hubiese sido posible:

A mi directora, María Serradell, por abrirme las puertas del Laboratorio de Microbiología, por confiar en mi desde estudiante, por apoyarme siempre en cada cosa que intento realizar, por su generosidad y paciencia. Muchas gracias por acompañarme en este camino de crecimiento.

A Paula Carasi, por su ayuda desinteresada, por estar conmigo desde el primer día y bancarme desde ese momento. Gracias por todo lo que me enseñaste, por el cariño y por hacer de cada viaje a Montevideo una experiencia única.

A Teresa Freire, por permitirme ser parte de su Laboratorio y por su valioso aporte a mi trabajo.

A Bernd Lepenies, por abrirme las puertas de su Laboratorio, a su grupo de trabajo, y especialmente a João Monteiro por ayudarme siempre tanto dentro como fuera del laboratorio.

A todas las personas del Laboratorio de Micro, gracias por su tiempo, por ayudarme, por bancarme y hacer todo esto más fácil.

A mis amigos, por todos los momentos compartidos y por acompañarme siempre en cada paso que doy.

A mis papás, por educarme e inculcarme sus valores, por apoyarme siempre, por ser mi modelo a seguir, por darme todo el amor del mundo y creer siempre en mi.

A mis hermanas, por todo el cariño, por estar siempre, por todos los momentos increíbles que pasamos y por haberme regalado dos sobrinos hermosos.

Y en especial a Ro, el amor de mi vida. Gracias por estar siempre conmigo, por entenderme y apoyarme en todo. Por todo tu amor, tu paciencia, tu sonrisa y por alegrarme la vida.

Índice

Índice

Introducción general.....	1
Proteínas de capa S en el género <i>Lactobacillus</i>	5
Materiales y Métodos	9
1. Microorganismos, características principales y condiciones de cultivo	11
2. Células eucariotas y condiciones de cultivo	12
2.1. Línea celular RAW 264.7 (ATCC TIB-71).....	12
2.2. Línea celular THP-1 (ATCC TIB-202).....	13
2.3. Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)	13
2.4. Medios de cultivo celular	14
3. Separación electroforética de proteínas	15
3.1. Separación mediante SDS-PAGE	15
3.2. Revelado con Coomassie coloidal.....	15
3.3. Electrotransferencia	16
4. Cuantificación de proteínas	17
5. Proteínas superficiales de <i>Lactobacillus kefir</i>	17
5.1. Extracción de proteínas superficiales de <i>Lactobacillus kefir</i>	17
5.1.1. Extracción mediante LiCl 5 M.....	17
5.1.2 Tratamiento con Proteinasa K.....	18
5.2. Oxidación de azúcares de las proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	19
6. Análisis proteómico de proteínas de capa S mediante espectrometría de masas	19
6.1. Preparación de muestras de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	19
6.2. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	20
7. Biología molecular.....	21
7.1. Extracción de ADN de microorganismos.....	21
7.2. Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR) de fragmentos de ADN	21
7.3. Secuenciación de fragmentos amplificados por PCR.....	22
7.4. Digestión enzimática de productos de amplificación obtenidas por PCR.....	22
7.5. Extracción de ARN de células eucariotas y reacción de transcripción reversa ...	23
7.6. PCR cuantitativa (qPCR).....	23
8. Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de las proteínas de capa S.....	24
9. Análisis de la glicosilación de proteínas de capa S	25

9.1. β -eliminación de restos glucídicos de las proteínas.....	25
9.2. Hidrólisis ácida	25
9.3. Análisis de la composición de azúcares mediante HPAEC (Cromatografía de alta performance de intercambio aniónico)	26
9.4. Tratamiento con PNGasa F para liberar N-glicanos.....	26
9.5. Digestión de las glicoproteínas de capa S.....	27
9.6. Metilación de oligosacáridos liberados por PNGasa F	27
9.7. Análisis por Espectrometría de masas	28
9.8. Calibración de los espectros	28
9.9. Espectrometría de masas en tándem luego de Disociación Inducida por Láser. 28	
9.10. Análisis de glicopéptidos.....	29
9.11. Interpretación de los datos obtenidos	30
10. Reconocimiento de proteínas de capa S por lectinas	30
10.1. Ensayo tipo ELISA.....	30
11. Reconocimiento de proteínas de capa S por proteínas de fusión CLR-hFc.....	31
12. Propiedades inmunomodulatorias de proteínas de capa S	32
12.1. Ensayos <i>in vitro</i>	32
12.1.1 Marcación fluorescente de proteínas de capa S.....	32
12.1.2. Internalización de proteínas de capa S sobre células RAW 264.7 y BMDCs	33
Ensayo de internalización de proteínas de capa S en presencia de azúcares o agentes quelantes de calcio	34
Visualización en microscopio de fluorescencia.....	34
12.1.3. Ensayos de estimulación sobre células RAW 264.7, THP-1 y BMDCs.....	35
12.1.4 Cuantificación de expresión génica	36
12.2. Ensayos <i>in vivo</i>	36
12.2.1 Animales utilizados y condiciones de alojamiento.....	36
12.2.2. Eutanasia, toma de muestras y modo de conservación.....	37
12.2.3. Protocolos experimentales para estudiar inmunogenicidad de proteínas de capa S.....	38
12.2.3.1. Respuesta humoral.....	38
12.2.3.2. Respuesta celular	39
12.2.4. Protocolo experimental para estudiar capacidad adyuvante de proteínas de capa S.....	39
12.3 Ensayos <i>ex vivo</i>	40

12.3.1 Ensayo de inducción de proliferación de células T	40
12.3.1.1 Ensayo alogénico utilizando células RAW 264.7	40
12.3.1.2 Ensayo singénico utilizando BMDCs	40
12.3.2. Proliferación antígeno específica de células de ganglios inguinales.....	41
12.4 Cuantificación de citoquinas secretadas	41
12.5. Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo.....	42
13. Análisis estadístico	42
14. Buffers y soluciones generales	42
Capítulo 1: Estructura primaria de proteínas de capa S de <i>Lactobacillus kefir</i>	45
Introducción.....	47
Resultados y discusión	51
1.1. Análisis de espectrometría de masas de proteínas de capa S de cepas de <i>L. kefir</i>	51
1.2 Amplificación de genes codificantes de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	57
1.3 Secuencias de aminoácidos de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	66
Conclusiones	79
Capítulo 2: Estructura de azúcares de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	81
Introducción.....	83
2.1 Estructura de azúcares de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 83111	87
2.1.1. Reconocimiento de SLP-83111 por lectinas.....	87
2.1.2. Composición de azúcares presentes.....	88
2.1.3 Análisis de azúcares O-glicanos por MALDI-TOF	89
2.1.4. Análisis de péptidos O-glicosilados por HPLC-ESI	90
2.1.5 Análisis de cadenas N-glicosídicas por HPLC-ESI.	99
2.1.6. Resumen de estructura de glicanos de SLP-83111	102
2.2 Estructura de azúcares de la proteína de capa S de <i>L. kefir</i> JCM 5818.....	104
2.2.1. Reconocimiento de SLP-5818 por lectinas	104
2.2.2 Análisis de cadenas O-glicosídicas de la SLP-5818.....	104
2.2.3. Análisis de cadenas N-glicosídicas de SLP-5818 por HPLC-ESI.	111
2.2.4. Resumen de estructura de glicanos de SLP-5818.....	117
2.3 Estructura de azúcares de proteínas de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 8321 y	118
<i>L. kefir</i> CIDCA 8348.....	118
2.3.1. Reconocimiento de SLP-8321 y SLP-8348 por lectinas	118
2.3.2. Análisis de O-glicanos en SLP-8321 y SLP-8348.....	119

2.3.3. Resumen de estructura de glicanos de SLP-8321 y SLP-8348.....	122
Conclusiones	123
Capítulo 3: Inmunogenicidad y capacidad adyuvante de las proteínas de capa S de <i>L. kefir</i>	125
Introducción.....	127
Resultados y discusión	133
3.1 Propiedades inmunoestimuladoras sobre macrófagos	133
3.2. Rol de los glicanos en las propiedades inmunoestimuladoras de proteínas de capa S.....	142
3.3. Reconocimiento de proteínas de capa S por Receptores de lectina tipo C.....	147
3.4. Propiedades inmunoestimuladoras de proteínas de capa S sobre BMDCs	156
3.5. Estimulación de células presentadoras de antígeno por proteínas de capa S: efecto sobre la activación de células T	163
3.6. Capacidad inmunogénica de la SLP-8348	169
3.7. Capacidad adyuvante de la proteína de capa S de <i>L. kefir</i> CIDCA 8348.....	174
Conclusiones	177
Conclusiones Generales	184
Referencias Bibliográficas	187

Introducción general

Introducción General

En el curso de la evolución, la naturaleza ha desarrollado soluciones simples y fascinantes para enfrentar diferentes desafíos. En este sentido, la mayoría de los microorganismos han tenido que adaptarse para sobrevivir en hábitats altamente competitivos y complejos. En consecuencia, la diversidad observada en la arquitectura molecular de la superficie celular bacteriana, en particular la estructura de la capa más externa, refleja la adaptación evolutiva del organismo a condiciones ecológicas y ambientales específicas.

Una cubierta de proteína rígida, conocida como capa S, se considera la membrana biológica más antigua y se ha mantenido a lo largo de la evolución tanto en *Bacteria* como en *Archaea* (Claus et al. 2005). Esta red macromolecular bidimensional es una estructura proteica similar a un cristal descubierta por Houwink en 1953 en *Spirillum serpens* (Houwink, 1953), pero no fue hasta los años 70 que comenzó a atraer la atención de la comunidad científica.

Estas proteínas representan aproximadamente el 10-15% del total de las proteínas celulares bacterianas, por lo que su síntesis representa un gran esfuerzo para el microorganismo. Dado que la biomasa de microorganismos procarióticos supera la biomasa de los organismos eucarióticos, estas proteínas de superficie pueden considerarse como uno de los biopolímeros más abundantes en nuestro planeta (Sleytr et al. 2014). Teniendo en cuenta la presencia ubicua de microorganismos portadores de capa S y la abundancia de las proteínas de capa S, es evidente que estas estructuras reflejan las adaptaciones evolutivas de los organismos a los hábitats naturales y deben haberles

proporcionado ventajas en condiciones ecológicas y ambientales específicas (Zhu et al. 2017).

La capa S está compuesta por numerosas subunidades de proteínas o glicoproteínas idénticas, de 40 a 200 kDa en peso molecular, que forman una matriz bidimensional, regular y altamente porosa (con tamaños de celdas unitarias en el rango de 3 a 30 nm y grosores de aproximadamente 10 nm) con simetría oblicua (p1, p2), cuadrada (p4) o hexagonal (p3, p6). Las técnicas basadas en microscopía electrónica son los métodos de elección para detectar la presencia de una capa S en la superficie de la célula bacteriana (Figura 1) (Pavkov-Keller et al. 2011). Para obtener información sobre la estructura 3D y la topología superficial de los conjuntos de la capa S, se han aplicado métodos como la microscopía de fuerza atómica (AFM) y la dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS). Sin embargo, dado que los métodos convencionales para el análisis estructural de alta resolución, como la cristalografía de rayos X, no se pueden aplicar fácilmente a las proteínas de capa S debido a su dificultad para ser cristalizadas, hay poca información disponible sobre la estructura atómica de las proteínas de capa S, la disposición espacial de los dominios y los elementos de la estructura secundaria dentro de la capa S (Pavkov-Keller et al. 2011).

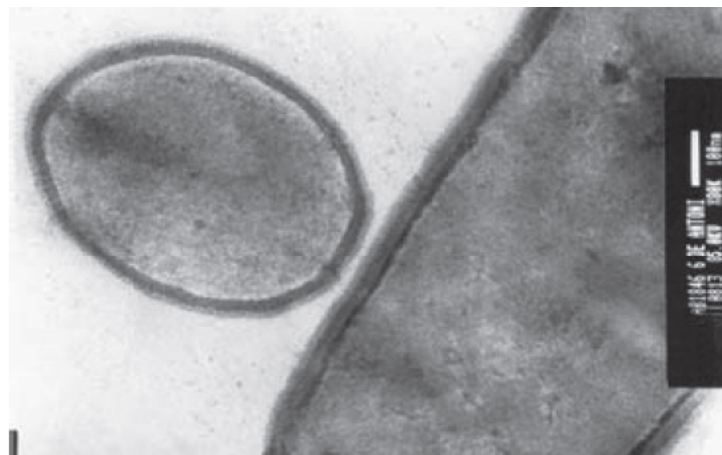


Figura 1: Micrografías obtenidas por transmisión electrónica de una sección delgada de *L. kefir* CIDCA 8321. Adaptada de Garrote y col. (2004).

Las subunidades se mantienen juntas y se unen a la superficie celular subyacente mediante interacciones no covalentes (Hynönen y Palva 2013, Pum et al. 2013). Las estructuras a las cuales se unen las proteínas de capa S varían entre las bacterias Gram negativas y Gram positivas. En el primer grupo de bacterias, la capa S se adhiere al lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa mediante interacciones iónicas, interacciones carbohidratos-carbohidratos, proteínas-carbohidratos y/o proteínas-proteínas. Por otro lado, en bacterias Gram positivas, la unión puede ocurrir a la capa de peptidoglicano o a un polímero de pared celular secundario (SCWP) (Sleytr et al. 2014).

Las proteínas de capa S fueron las primeras glicoproteínas detectadas en procariotas y aún se encuentran entre los ejemplos mejor estudiados de proteínas procariotas glicosiladas. De hecho, la glicosilación es la modificación postraduccional más frecuente de estas proteínas (Ristl et al. 2011). En las bacterias, la N-glicosilación es un evento raro, por lo que las SLP bacterianas se caracterizaron generalmente como O-glicosiladas y el grado de glicosilación varía generalmente entre el 2% y el 10% (p/p) (Messner et al. 2008).

La información sobre las funciones biológicas de las proteínas de capa S se ha incrementado en las últimas décadas. Si bien no ha surgido una función común para todas las capas S, se han propuesto muchas propiedades funcionales diferentes para este tipo de proteínas. Hasta ahora, estas incluyen, por ejemplo, la determinación o el mantenimiento de la forma celular, el funcionamiento como un tamiz molecular, como un sitio de unión para moléculas grandes, iones o fagos, y como un mediador de la adhesión microbiana (Sára y Sleytr 2000); protegen a los microorganismos a condiciones ambientales adversas, contra la presencia de péptidos antimicrobianos (de la Fuente-Núñez et al. 2012), de la exposición a la radiación (Kotiranta et al. 1999), cambios en el pH ambiental (Gilmour et

al. 2000), bacteriófagos (Howard y Tipper 1973), depredadores microbianos bacterianos o eucariotas (Koval y Hynes 1991; Tarao et al. 2009) o enzimas bacteriolíticas (Lortal et al. 1992). Por otro lado, también participan en la modulación de la respuesta inmune (Konstantinov et al. 2008, Sekot et al. 2011, Taverniti et al. 2013, Collins et al. 2014). Además, en las bacterias patógenas, la capa S podría contribuir a la virulencia a través de varios mecanismos que incluyen la adhesión, la coagregación (Shimotahira et al. 2013), la variación antigénica (Spigaglia et al. 2011), la protección contra la lisis por el sistema del complemento o fagocitosis (Thompson 2002) o inmunomodulación (Ryan et al. 2011, Sekot et al. 2011, Settem et al. 2013). Por otro lado, algunas proteínas de capa S han demostrado el potencial de actuar como enzimas (Calabi et al. 2001, Ahn et al. 2006, Prado Acosta et al. 2008), o incluso estar involucradas en la motilidad del microorganismo (McCarren et al. 2005).

La atención especial que estas proteínas han captado por parte de los investigadores en los últimos años se debe a sus excepcionales propiedades físico-químicas, que las convierten en una estructura organizativa única con un alto potencial de aplicación en el campo de la nanobiotecnología moderna. La mayoría de las técnicas para el aislamiento y la purificación de proteínas de capa S implican el uso de detergentes (Triton X100 o dodecilsulfato de sodio) o agentes caotrópicos (como urea, clorhidrato de guanidina o cloruro de litio) (Pum et al. 2013, Schuster & Sleytr 2013). Después de la extracción de la superficie bacteriana, las proteínas de capa S tienen la capacidad intrínseca de formar productos auto-ensamblados flotantes en solución (por ejemplo, láminas planas, tubos, vesículas), de reensamblarse en capas simples y dobles en soportes sólidos, en la interfase aire-agua, en películas lipídicas, y de cubrir liposomas, nanocápsulas y nanopartículas por completo (Figura 2) (Pum et al. 2013). Esta extraordinaria propiedad es una de las

características clave de las proteínas de capa S y, en combinación con la exposición repetitiva y precisa de determinados grupos funcionales, estableció las bases para el desarrollo de *carriers* para biomoléculas, dispositivos de diagnóstico, biosensores, biocatalizadores, etc. (Sleytr et al. 2007, Ilk et al. 2011, Pum et al. 2013, Wang et al. 2015). Por lo tanto, esta capacidad única puede ser explotada en diferentes áreas tales como medicina, farmacología, bioingeniería, industria alimentaria, entre otras.

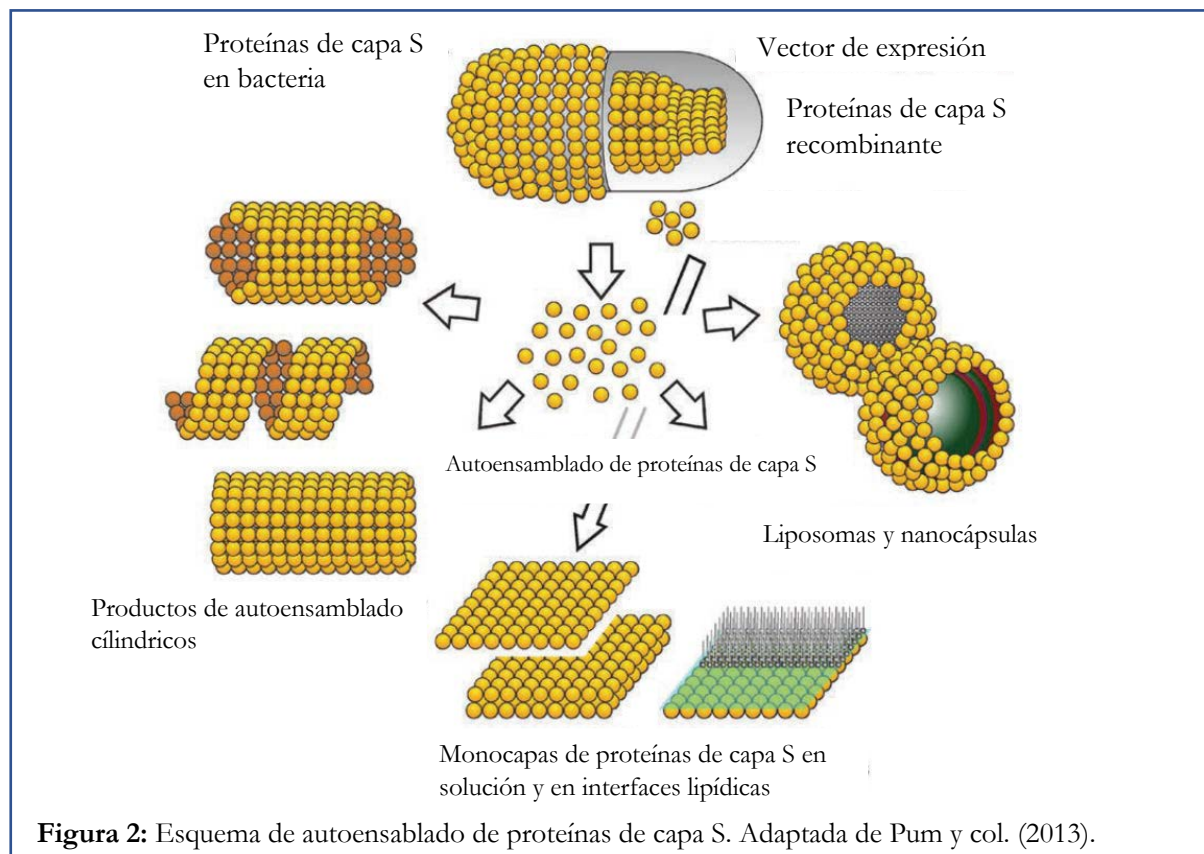


Figura 2: Esquema de autoensamblado de proteínas de capa S. Adaptada de Pum y col. (2013).

Proteínas de capa S en el género *Lactobacillus*

La presencia de la capa S se ha descrito en muchas especies bacterianas, incluyendo algunas del género *Lactobacillus* (Hynönen y Palva, 2013). Para estas bacterias ácido-lácticas, que se encuentran con frecuencia en diferentes ecosistemas naturales como plantas, alimentos, ensilajes, aguas residuales y el tracto gastrointestinal y genital de humanos y

animales (Malamud et al. 2019), la presencia de capa S se convierte en una característica adaptativa relevante para hacer frente a las condiciones adversas de esos ambientes. Además, como la capa S constituye la estructura superficial más externa de estas células bacterianas, podría mediar la interacción de los microorganismos con diferentes células eucariotas (es decir, células epiteliales intestinales, células presentadoras de antígenos), así como con la matriz extracelular y los componentes del mucus, hecho que se ha estudiado particularmente para las cepas de lactobacilos caracterizadas como "probióticos" (Hynönen y Palva, 2013, Fijan 2014).

Los tamaños informados de las proteínas de capa S de lactobacilos varían entre 25 y 71 kDa, y los valores de pI predichos son altos (9.4–10.4) en comparación con las proteínas de capa S de otras bacterias. Sólo se ha descrito la simetría de red de tipo oblicuo o hexagonal para *Lactobacillus* (Lortal et al. 1992, Smit et al. 2001, Åvall-Jääskeläinen & Palva 2005, Anzergruber et al. 2014) y la glicosilación es una modificación post-transduccional que se ha encontrado y caracterizado en solo unas pocas especies (Malamud et al. 2019).

Desde hace poco más de dos décadas, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado líneas de investigación basadas en la caracterización e identificación de bacterias ácido-lácticas y levaduras con propiedades probióticas y potencialidad tecnológicas, aisladas a partir de una leche fermentada artesanal conocida como kefir (Garrote et al. 2001, Hamet et al. 2013). Entre ellas se encuentran varias cepas de *Lactobacillus kefir*, una de las especies predominantes en dicha leche fermentada (Garrote et al. 2005). En estudios previos, nuestro grupo ha demostrado la inocuidad de *L. kefir* (Carasi et al. 2014a), su capacidad de adherir al mucus intestinal (Carasi et al. 2014b) y sus propiedades inmunomodulatorias *in vitro* e *in vivo* (Carasi et al. 2015), así como su capacidad de mantenerse viable luego de ser

sometido a diferentes métodos de preservación como el secado en spray y la liofilización (Golowczyc et al. 2011, Bolla et al. 2011). Más recientemente, la capacidad probiótica de *L. kefir* ha quedado demostrada en dos modelos experimentales diferentes, ya que la administración oral del microorganismo previene, tanto el desarrollo de síndrome metabólico y obesidad en ratones sometidos a una dieta rica en fructosa (Zubiría et al. 2017), como la disbiosis e inflamación del colon en un modelo de inducción química de colitis (Carasi 2014).

Por otro lado, la presencia de proteínas de capa S en cepas de *L. kefir* fue descrita por primera vez por nuestro grupo de trabajo (Garrote et al. 2004). Las proteínas de capa S de *L. kefir* están glicosiladas, presentan diferentes PM relativos por SDS-PAGE (66, 69 y 71 kDa), y han mostrado una gran heterogeneidad entre ellas mediante estudios de espectrometría de masas (MALDI-TOF) (Mobili et al 2009). Desde el punto de vista funcional, se ha demostrado que las proteínas de capa S de *L. kefir* median la inhibición de la invasión de *Salmonella Enteritidis* a células Caco-2 (Golowczyc et al 2007), el antagonismo de las toxinas de *Clostridium difficile* sobre células Vero (Carasi et al 2012) y la interacción de *L. kefir* con levaduras (Golowczyc et al 2009). Además, participan de la adhesión de los lactobacilos al mucus gástrico, intestinal y colónico (Carasi et al 2014) y protegen a las bacterias contra el efecto deletéreo del ión Pb^{+2} (Gerbino et al 2015). Por otro lado, más recientemente, se han empleado proteínas de capa S de *L. kefir* como plantillas en la obtención de nanopartícula de Pt con alta capacidad catalítica (Bolla et al. 2018).

Teniendo en cuenta las características funcionales y estructurales extraordinarias que poseen las proteínas de capa S, así como su alto potencial para el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, el objetivo general de este trabajo de Tesis fue realizar una

Introducción General

caracterización estructural y funcional de las proteínas de capa S de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir*.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

En esta sección se describirán los materiales y las técnicas empleadas durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.

1. Microorganismos, características principales y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se utilizaron cepas de la especie *Lactobacillus kefir* aisladas a partir de gránulos de kefir y cepas de colección. En la tabla M.1 se indican las cepas utilizadas y características relevantes de las mismas.

Tabla M.1. Cepas de *Lactobacillus kefir* utilizadas

Cepas de <i>L.kefiri</i> ^a		Proteínas de capa S	
Código de cepas	Capacidad de agregación ^b	Peso molecular aparente ^c	Glicosilación ^d
Cepas aisladas de la colección de gránulos de kefir del CIDCA			
Gránulo de kefir			
AGK1			
CIDCA 8310	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 8314	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 8315	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 8317	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 83110	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 83111	-	71 KDa	+
CIDCA 83113	-	66 KDa	+
CIDCA 83115	+	66 KDa	+
CIDCA 83116	-	71 KDa	+ ^e
Gránulo de kefir			
AGK2			
CIDCA 8321	+	66 KDa	+
CIDCA 8326	-	71 KDa	+ ^e
Gránulo de kefir			
AGK3			
CIDCA 8332	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 8335	-	66 KDa	+
Gránulo de kefir			
AGK4			
CIDCA 8343	-	71 KDa	+ ^e
CIDCA 8344	-	71 KDa	+
CIDCA 8345	+	66 KDa	+
CIDCA 8347	+	66 KDa	+
CIDCA 8348	+	66 KDa	+
Gránulo de kefir			
AGK8			
CIDCA 8381	- ^e	71KDa ^e	+ ^e

CIDCA 8385	- ^e	71KDa ^e	+ ^e
Cepas de referencia			
JCM 5818	-	69 KDa	+
ATCC 8007	-	71 KDa	+

^a La identidad de las cepas fue demostrada previamente (Garrote et al 2001, Delfederico et al 2006, Hamet et al 2013)

^b Información obtenida de Garrote et al 2004

^c Peso Molecular aparente obtenido de la migración en SDS-PAGE (Garrote et al 2004, Mobili et al 2009)

^d Análisis de glicosilación por tinción PAS (Mobili et al 2009)

^e Análisis de glicosilación por tinción PAS realizado en este trabajo de tesis

Los lactobacilos se cultivaron en caldo MRS (de Man, Rogosa y Sharp, Difco, Detroit, USA) en condiciones aeróbicas, durante 48 horas, a 37°C. La pureza de los cultivos se verificó mediante observación microscópica de preparados, fijados y teñidos mediante la técnica descrita por Gram (Gram 1884). El medio de cultivo utilizado fue esterilizado por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

Las diferentes cepas de *L. kefir* se conservaron a -80°C en leche descremada estéril.

2. Células eucariotas y condiciones de cultivo

Todas las células se mantuvieron utilizando el medio de cultivo adecuado (se indicará para cada línea celular), a 37°C, en estufa con atmósfera controlada (5% v/v de CO₂ - 95% v/v de aire).

2.1. Línea celular RAW 264.7 (ATCC TIB-71)

Es una línea celular de tipo monocito-macrofágo, generada a partir de ratones BALB/c por transformación con el virus de la leucemia murina de Abelson. Fueron adquiridas del banco de células del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata). Se cultivaron en medio DMEM completo (Tabla M2).

2.2. Línea celular THP-1 (ATCC TIB-202)

Es una línea celular monocítica, de origen humano, generada a partir de una leucemia monocítica aguda. Estas células fagocíticas fueron adquiridas del banco de células del IMBICE (Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata). Se cultivaron en medio RPMI completo (Tabla M2).

2.3. Células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs)

Las BMDCs fueron generadas a partir de médulas óseas de ratones C57BL/6 wild type, *Mincle*^{-/-}, *CARD9*^{-/-} o *SignR3*^{-/-}.

Protocolo

1. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se fijaron y se rociaron con etanol al 70%.
2. Se expusieron los fémures y las tibias de ambas patas traseras y se colocaron en medio IMDM completo (Tabla 2) a 4°C.
3. Se separaron los fémures de las tibias, se cortaron ambos extremos y se introdujeron 5 mL de IMDM completo por los huesos, utilizando una aguja 25 G y una jeringa de 5 mL, recogiendo la suspensión celular sobre una placa de Petri.
4. La suspensión celular se filtró a través de un *cell strainer* con tamaño de poro de 40 μm , se centrifugó a 2500 rpm, y el pellet se resuspendió en 5 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (10% 100mM Tris-HCl pH 7.5, 90%160mM NH₄Cl).
5. Luego de 5 minutos a temperatura ambiente, el pellet se resuspendió en 10 ml de IMDM completo y se contaron las células en cámara de Neubauer.

6. $2,5 \times 10^5$ células se colocaron en medio de diferenciación (IMDM completo suplementado al 10% con sobrenadante de células P3-X63, que contiene GM-CSF). El medio se cambió cada 48 horas y las células se recuperaron en el día 8 y se analizaron por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para analizar el grado de diferenciación. Las BMDCs se utilizaron entre el octavo y el décimo día de cultivo, donde más del 80% de la población celular expresaba el marcador CD11c (Monteiro et al. 2019).

2.4. Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo suplementados se esterilizaron por filtración (0,22 μm ; Steritop™, Millipore).

Tabla M.2. Medios de cultivo celular utilizados

Ingredientes	DMEM completo	RPMI completo	IMDM completo
DMEM ^a	1 sobre		
RPMI ^b		1 sobre	
IMDM ^c			440 mL
Penicilina/estreptomina ^d (1000 UI, 1000 μg /mL)	13 mL	13 mL	5 mL
Aminoácidos no esenciales ^e	13 mL	13 mL	
L-glutamina			5 mL
NaHCO ₃	2,0 g	2,0 g	
Suero fetal bovino inactivado ^f	120 mL	180 mL	50 mL
Agua miliQ	1000 mL	1000 mL	
pH	7,5 \pm 0,1	7,5 \pm 0,1	

^aDulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^bRPMI-1640, GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^cSigma-Aldrich, USA; ^dGIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^eNon-essential amino acids solution (100X), GIBCO, Grand Island N.Y., USA; ^fGIBCO, Grand Island N.Y., USA El suero fue inactivado térmicamente, incubándolo 30 minutos a 65 °C.

3. Separación electroforética de proteínas

3.1. Separación mediante SDS-PAGE

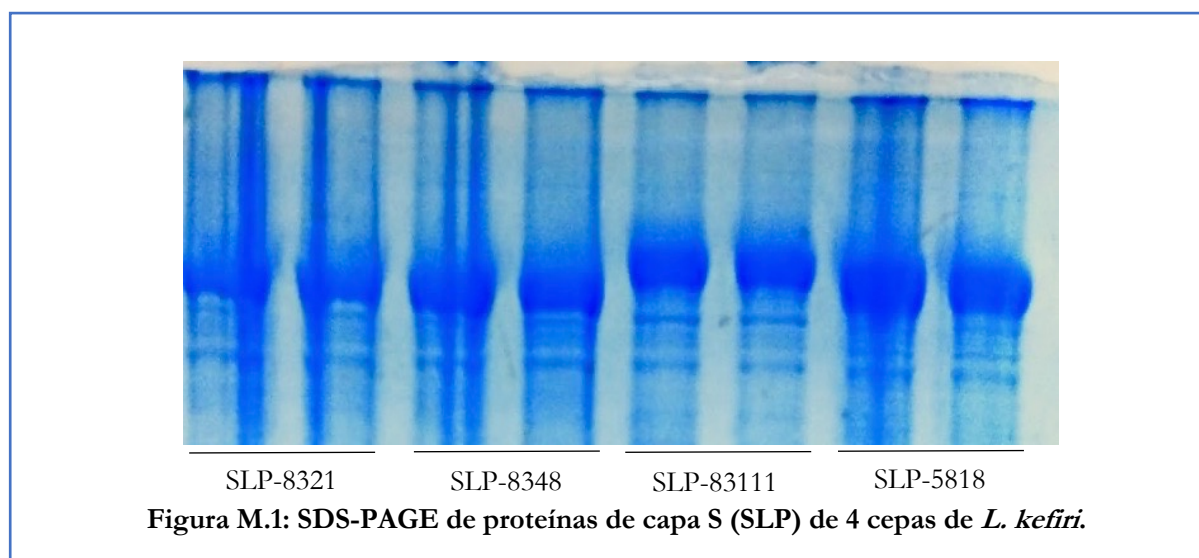
Se utilizó la técnica desarrollada por Laemmli (1970). Los geles se prepararon con una concentración de acrilamida 12 % p/v en el gel separador y 4% p/v en el gel apilador (Manns 2011). Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante, 120 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, en un sistema vertical Bio-Rad Mini Protean III (BioRad Lab, C.A.).

3.2. Revelado con Coomassie coloidal

1. Se colocó el gel en agitación durante 30 minutos en la solución de fijación 1.
2. Se colocó el gel en agitación durante 20 minutos con 100 mL de la solución de fijación 2. Se descartó y se repitió el procedimiento.
3. Se colocó el gel en la solución de coloración durante 30 minutos, en agitación, y luego se agregó 1 mL de Coomassie G250 2 % p/v. Se mantuvo en agitación toda la noche.
4. Al día siguiente, se lavó con agua destilada y se visualizaron las bandas.

Tabla M.3. Soluciones para el revelado con Colloidal Blue

Denominación	Ingredientes	Volumen final
Solución de fijación 1	30 mL de etanol absoluto 2 mL de ácido fosfórico 85 % p/p	100 mL
Solución de fijación 2	4 mL de ácido fosfórico 85 % p/p	200 mL
Solución de coloración	18 mL de etanol absoluto 7 mL de ácido fosfórico 85 % p/p 15 g de (NH ₄) ₂ SO ₄	100 mL
Solución de Coomassie G250	1 g de Coomassie G250	50 mL



3.3. Electrotransferencia

Esta técnica permite transferir proteínas que fueron separadas mediante SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa mediante la aplicación de un campo eléctrico.

Se utilizó el equipo Mini Trans-Blot System (Bio-Rad) y las transferencias se realizaron a corriente constante, 300mA, durante 60 minutos, en un baño de hielo para evitar un aumento excesivo de temperatura. Luego de finalizada la electrotransferencia, las membranas de nitrocelulosa se tiñeron con Rojo Ponceau para evaluar el éxito del procedimiento. Este colorante tiñe de forma reversible las proteínas, por lo que se eliminó mediante lavados de la membrana con TBS (tabla M.12), para realizar el revelado de la membrana por técnicas inmunoquímicas.

Tabla M.4. Soluciones utilizadas para realizar las electrotransferencias

Denominación	Ingredientes	Volumen final
Buffer de transferencia 5X (sin metanol)	15,03 g de TRIS 73,05 g de glicina pH= 8,3	1000 mL
Buffer de transferencia 1X Tris 0,025M, glicina 0,195M, metanol 20% v/v	200 mL Buffer de transferencia 5X 200 mL de metanol	1000 mL

	completar con agua MilliQ hasta volumen final	
Rojo Ponceau 0,5% p/v	0,5 g de rojo ponceau 5,0 mL de ácido acético glacial completar con agua MilliQ hasta volumen final	100 mL

4. Cuantificación de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas se utilizó el método de Bradford (Bradford 1976; Ernst and Zor 2010). Se realizó una curva patrón utilizando un stock comercial de albúmina bovina de 2 mg/mL (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit).

5. Proteínas superficiales de *Lactobacillus kefir*

5.1. Extracción de proteínas superficiales de *Lactobacillus kefir*

Para la extracción de proteínas de superficie se utilizaron las metodologías que se describen a continuación:

5.1.1. Extracción mediante LiCl 5 M

Se utilizó la técnica obtenida por Carasi y col. (2012) con algunas modificaciones para obtener mayor cantidad de proteínas solubles.

Protocolo

1. Se centrifugaron 5 minutos a 10.000 g y 10°C, 50 mL de cultivo de *L.kefir* en fase estacionaria (condiciones de cultivo indicadas en MyM sección 1.1)
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 25 mL de PBS.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en 5 mL de LiCl (JT Baker) 5 M.

4. Se incubó en agitación (Environ shaker, Lab-line instruments Inc. Melrose Park, IL, USA) en baño de hielo y 250 rpm, durante 60 minutos.
5. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C.
6. Se filtró el sobrenadante con filtro de 0,45 µm; se dializó usando una membrana de celulosa (SpectraPor membrane tube, MWCO 10000-14000, Spectrum Medical Industries, California, USA) con agitación suave durante 36 hs contra 15 litros de PBS (3 cambios de 5 L cada uno) a temperatura ambiente.
7. Se centrifugó el dializado a 12.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se determinó proteínas en el sobrenadante mediante el método de Bradford (MyM, sección 4).

5.1.2 Tratamiento con Proteinasa K

Esta metodología se utilizó únicamente para eliminar proteínas de la superficie bacteriana (Carasi et al. 2014) y extraer el ADN de los microorganismos.

Protocolo:

1. Se centrifugaron 5 minutos a 10.000 g y 10°C, 10 mL de cultivo de *L.kefiri* en fase estacionaria
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en 10 mL de una solución de Proteinasa K (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) en PBS a una concentración final de 0,01 % p/v, durante 30 minutos a 37°C.
4. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 10°C y se realizaron dos lavados con 10 mL de PBS.
5. Se separó el pellet para realizar la extracción del ADN de los microorganismos.

5.2. Oxidación de azúcares de las proteínas de capa S de *L. kefir*

Los grupos de azúcares presentes en las glicoproteínas de capa S fueron oxidados con periodato de sodio (10mM) siguiendo el protocolo descrito por Rodriguez y col. (2015). La oxidación se realizó a temperatura ambiente, por 45 minutos en oscuridad, seguido por la reducción de los grupos aldehídos reactivos con borohidruro de sodio (50mM). Las proteínas de capa S oxidadas se refieren como SLPOx. Los controles de la oxidación, SLPB, consisten en proteínas de capa S sometidas al mismo proceso, excepto por la incubación con periodato de sodio. Las proteínas tratadas se dializaron frente a PBS y se filtraron a través de una membrana con 0,45 µm de diámetro de poro.

6. Análisis proteómico de proteínas de capa S mediante espectrometría de masas

Con el objetivo de realizar un análisis comparativo de las proteínas de capa S entre diferentes cepas de *L. kefir*, se realizaron los siguientes procedimientos:

6.1. Preparación de muestras de proteínas de capa S de *L. kefir*

Las bandas de SDS-PAGE correspondientes a las distintas proteínas de capa S de *L. kefir*, fueron desteñidas con 3 lavados consecutivos utilizando una solución de 25 mM de NH_4HCO_3 , con 5% de acetonitrilo pH 8,5, seguido de una reducción utilizando 100µL de DTT en 25mM NH_4HCO_3 por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las piezas de gel fueron alquiladas utilizando 25 mM de iodoacetamida en 25 mM de NH_4HCO_3 por 30 minutos a temperatura ambiente. Se deshidrataron con 100 µL de acetonitrilo 100% por 10 minutos a temperatura ambiente y se rehidrataron con tripsina (Promega Trypsin Gold) en 25mM de NH_4HCO_3 a una relación tripsina/proteína de 1:20. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 3 horas a 37°C y los péptidos se extrajeron del gel usando 100 µL de ácido trifluoroacético 0,2%. Los péptidos eluidos se secaron utilizando una Speed-Vac

y se resuspendieron en 5 μ L de 50% acetonitrilo, 0,1% de ácido trifluoroacético. Todos los ensayos se realizaron utilizando placas de filtro MultiScreen solvinert (Milipore) con un sistema de 96 pocillos MultiScreen Vacuum Manifold (MILIPORE, Billerica, MA).

6.2. Análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF.

El análisis de huella peptídica (PMF) se utilizó para determinar la identidad de las proteínas. Los PMF y los espectros de fragmentación MS/MS fueron adquiridos en un espectrómetro UltrafleXtreme MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en el Servicio de Proteómica SePBioEs (UAB, Barcelona, España), en el marco de una colaboración con la Dra. Silvia Bronsoms y el Dr. Sebastián Trejo. Las muestras fueron incorporadas a una placa para irradiación (Bruker Daltonics) mezclando 0,5 μ L de cada muestra con 0,5 μ L de una solución fresca de α -ciano-4-ácido hidroxicinámico (Bruker Daltonics) a 10 mg/mL en una solución acuosa de 30% de acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético. La calibración se realizó utilizando una mezcla de péptidos estándar comerciales (Bruker Daltonics).

Las masas de los péptidos fueron adquiridas dentro de un rango de m/z de entre 800 y 4000. La identificación proteica se realizó utilizando como motor de búsqueda el software Mascot (Matriz Science Inc, Boston, MA) usando los siguientes parámetros: dos clivajes no realizados, 100 ppm de tolerancia en la masa, modificación por carbamidometilación en la cisteína y oxidación de la metionina. Las búsquedas se realizaron utilizando la base de datos de NCBI nr restringida a *Firmicutes*.

Los espectros de masas en tándem de aquellos péptidos seleccionados fueron analizados manualmente con el objetivo de la secuenciación *de novo*, utilizando una tabla con las masas de los aminoácidos.

7. Biología molecular

7.1. Extracción de ADN de microorganismos

Para la extracción del ADN de las cepas de *L. kefir* se utilizaron los microorganismos previamente desprovistos de proteínas de superficie utilizando Proteinasa K (MyM, sección 5.1.2). Luego, las bacterias se sometieron a un proceso de calentamiento a 100°C durante 5 minutos en agua calidad farmacológica. Se centrifugaron a 12000 rpm durante 5 minutos y se separó el sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano, cuya integridad se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % p/v teñido con bromuro de etidio.

7.2. Amplificación mediante reacción de polimerización en cadena (PCR) de fragmentos de ADN

Esta técnica se utilizó para analizar la presencia de los genes que codifican para las proteínas de capa S en las cepas de *L. kefir*, utilizando ADN extraído de las cepas como molde. Para la preparación de las mezclas de reacción, se utilizaron las concentraciones indicadas en la tabla M.5.

Tabla M.5. Concentración de reactivos en la mezcla de reacción

Componente	Concentración final
Cebadores	0,5 μ M de cada uno
dNTPs	1mM de cada uno
Polimerasa	0,05 U/ μ L PFU
ADN molde	0,5-1 ng/ μ L de mezcla de reacción

A partir del genoma de *L. buchneri* CD034 (Heinl et al. 2012), se diseñaron cebadores específicos localizados dentro (TREG-f, TREG-r, GWIY-f) y fuera (F1, F2, R1) del marco

abierto de lectura para el gen que codifica para la proteína de capa S. Las secuencias se muestran en la tabla M.6.

Tabla M.6. Cebadores utilizados para amplificación del gen que codifica para proteínas de capa S

Código de cebador	Secuencia 5'-3'
TREG-r	AACCCAAAGGTCGCCTTCA
TREG-f	ACCCGTGAAGGCGACCTTTG
GWYIY-f	ACCCGTGAAGGCGACCTTTG
R1	CTCCTGTTTTCTTTTGCATTCAACC
F1	ACGTTGGCCACAGGAAAGAA
F2	GACCATATCGAACTAGTGTTCAAA

Las reacciones de amplificación mediante PCR fueron realizadas de la siguiente manera: un paso a 95°C por 5 min; 35 pasos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 30 segundos y 68° por 3 minutos; un paso final a 68°C por 5 minutos.

7.3. Secuenciación de fragmentos amplificados por PCR

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en la empresa MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur. Brevemente, se utilizó un sistema ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EEUU). Los fragmentos marcados en forma fluorescente se purificaron utilizando el protocolo BigDye® XTerminator™. Las muestras finalmente se resuspendieron en agua destilada y se sometieron a una electroforesis utilizando un secuenciador ABI 3730xl (Applied Biosystems, USA).

7.4. Digestión enzimática de productos de amplificación obtenidas por PCR

Con el objetivo de analizar si existían diferencias en los fragmentos obtenidos por amplificación del gen que codifica para la proteína de capa S, los amplicones obtenidos utilizando los cebadores F1 y R1 (o el amplicón obtenido utilizando la combinación F2/R1 para la cepa *L. kefir* JCM 5818) se clivaron en forma simultánea con las enzimas EcoRI y NcoI (New England BioLabs, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los

fragmentos digeridos de ADN se visualizaron en un gel de agarosa de 1,5% (p/v) teñido con bromuro de etidio.

7.5. Extracción de ARN de células eucariotas y reacción de transcripción reversa

Para la obtención de ARN total de células, se utilizó el kit comercial illustraRNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare, UK) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se cuantificó el ARN en el extracto, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE, USA) y su pureza se analizó a través de la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

Para la realización de determinaciones utilizando PCR cuantitativa, las muestras de ARN obtenidas fueron transcriptas a ADNc utilizando la enzima MMLV-Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) con una cantidad de ARN de 1 µg cada 20µL de mezcla de reacción (Thermo Scientific 2012) y cebadores oligo (dT)15 (GenBiotech, Argentina). Se utilizó el siguiente programa: 50 °C por 30 min, 85 °C 5 min. Los productos obtenidos, se conservaron a -20°C hasta su utilización.

7.6. PCR cuantitativa (qPCR)

Para la cuantificación de expresión génica, se utilizó el sistema de detección iCycler (BioRad, USA). Para las reacciones se utilizó la mezcla SYBR Green™/qPCR SuperMix (Invitrogen, USA), a la cual se adicionaron 0,5 µM de cada cebador y una cantidad estandarizada de ADNc (1µL de ADNc obtenido a partir de 1 µg de ARN en 20 µL de mezcla de reacción para transcripción reversa),. Los cebadores utilizados están detallados en la sección correspondiente.

Para el estudio de la expresión génica, se usó el gen de la fosforilribosiltransferasa (HPRT) como gen normalizador o de referencia. Los resultados se analizaron por el método de C(t) comparativo descrito por Livak y Schmittgen (2001). Brevemente, el C(t) es el ciclo de la PCR en el que se supera un determinado umbral de fluorescencia. A partir de este punto, la fluorescencia es significativamente superior a la del nivel basal. Para comparar entre muestras, para cada una se normaliza el C(t) del gen de interés respecto al gen referencia ($\Delta C(t)$). Luego, se comparan los $\Delta C(t)$ de cada muestra experimental ($\Delta C(t), me$), con el $\Delta C(t)$ de la muestra utilizada como control ($\Delta C(t), c$) para obtener el $\Delta\Delta C(t)$. La cantidad relativa en cada muestra, viene definida por la siguiente fórmula: $2^{-(\Delta C(t), me - \Delta C(t), c)}$.

8. Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de las proteínas de capa S

A partir de los datos de secuencias de ADN obtenidas para los genes que codifican para las proteínas de capa S en las cepas de *L. kefir* analizadas, la secuencia de aminoácidos se dedujo utilizando el software ExPASy Translate Tool (<http://web.expasy.org/translate/>) y la digestión trípica teórica se analizó usando el software ExPASy Peptide Mass (http://web.expasy.org/peptide_mass/), ambos disponibles en el sitio web ExPASy (Artimo et al. 2012). Los perfiles obtenidos fueron comparados en forma manual con los espectros obtenidos en el espectrómetro de masas para cada proteína de capa S (MyM, sección 6.2)

Las propiedades fisicoquímicas teóricas (punto isoelectrico, peso molecular, %Asp-Glu, %Arg-Lys) de las secuencias de aminoácidos fueron predichas utilizando el software ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger et al. 2005).

El software SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011) se utilizó para identificar los péptidos señal de las proteínas de capa S.

9. Análisis de la glicosilación de proteínas de capa S

Estos estudios se realizaron en colaboración con el grupo de investigación dirigido por la Dra. Alicia Couto, del Departamento de Investigación en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina.

Con el objetivo de caracterizar las estructuras de los glicanos presentes en las proteínas de capa S, se seleccionaron las cepas *L. kefir* CIDCA 83111, *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* JCM 5818, y se realizaron los siguientes estudios:

9.1. β -eliminación de restos glucídicos de las proteínas

Una banda de SDS-PAGE (MyM, sección 3.1) correspondiente a cada proteína de capa S se cortó del gel y se trató con 0,05M NaOH/1M NaBH₄ (0,5 mL) a 50°C durante 16 horas. Se separó la solución y se agregó ácido acético hasta alcanzar un pH de 7, para una posterior evaporación con metanol. Las muestras se disolvieron en agua, se desalaron en una columna Dowex 50W (H⁺) (Fluka) y se secaron en SpeedVac.

9.2. Hidrólisis ácida

Los productos de la β -eliminación fueron luego hidrolizados utilizando una solución 2N de ácido trifluoroacético (TFA) por 4 horas a 100°C. El ácido fue eliminado por evaporación y las muestras hidrolizadas se resuspendieron en agua para un posterior análisis mediante HPAEC-PAD.

9.3. Análisis de la composición de azúcares mediante HPAEC (Cromatografía de alta performance de intercambio aniónico)

El análisis fue realizado utilizando un sistema DX-500 Dionex BioLC (Dionex Corp.) acoplado a un detector de pulso amperométrico (PAD). Se utilizaron diferentes condiciones y columnas dependiendo el objetivo final del análisis:

9.3.1 Columna Carbopack PA-1: Se utilizó para separar azúcares neutros y aminos, con un programa isocrático de NaOH 18mM, a un flujo de 0,4 mL/minuto.

9.3.2 Columna Carbopack PA-1: Se utilizó para separar monosacáridos ácidos, con un programa isocrático de NaOH 48mM/acetato de sodio 140mM, a un flujo de 0,4mL/minuto.

9.3.3 Columna CarboPac MA 1: Se utilizó para separar alditoles, con un programa isocrático de NaOH 0,4 M, a un flujo de 0,4mL/minuto.

9.3.4 Columna Carbopack P-100 microbore pre-equipada con una columna P-100: Se utilizó para hacer el análisis de los oligosacáridos, con un gradiente de elución de 100mM NaOH, 70-400mM de acetato de sodio por 45 minutos, a un flujo de 0,25 mL/minuto.

9.3.5 Columna Carbopack P-20 pre-equipada con una columna P-20: Se utilizó para separar el ácido siálico, con un programa isocrático de 50/10 mM de acetato de sodio, a un flujo de 0,4mL/minuto.

9.4. Tratamiento con PNGasa F para liberar N-glicanos

Las bandas de SDS-PAGE correspondientes a las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 83111, *L. kefir* JCM 5818, *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. kefir* CIDCA 8348 se cortaron del gel, se congelaron por 3 horas y se lavaron por 30 minutos con las siguientes soluciones: a) acetonitrilo, b) 20mM de NaHCO₃ pH 7 y c) acetonitrilo. Los pedazos de gel se secaron y los N-glicanos fueron liberados por la incubación con 20 mUI PNGasa F (New England Biolabs Inc, Beverly, MA) durante 16 horas a 37°C en 30 mL de una

solución 20 mM de NaHCO₃ pH 7. Los fragmentos del gel se lavaron en forma vigorosa, se removieron los sobrenadantes. Los glicanos liberados se filtraron a través de un Ultrafree McFilter (masa de corte de 5000), se secaron y resuspendieron en 20 µL de ácido fórmico 0,1 % (v/v) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se secaron y se resuspendieron en agua.

9.5. Digestión de las glicoproteínas de capa S

Las bandas de SDS-PAGE correspondientes a las glicoproteínas de capa S se cortaron del gel y se lavaron con acetonitrilo. Las piezas se redujeron con una solución de DTT 10mM en 50mM de NH₄HCO₃ a 55°C durante 30 minutos. Luego se lavaron con acetonitrilo y se alquilaron con 55mM de iodoacetamida (IAA) en 50mM de NH₄HCO₃ en oscuridad, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavaron con 50mM de NH₄HCO₃ por 10 minutos y acetonitrilo por 5 minutos, y se secaron en el SpeedVac. Los fragmentos de los geles se rehidrataron con 20 ng/µL de tripsina (Sigma-Aldrich) en 40mM de NH₄HCO₃, 9% de acetonitrilo y se incubaron a 37°C durante una noche. En algunos casos, las proteínas fueron sometidas a un proceso sucesivo de digestión utilizando 20ng/µL de proteasa Glu-C (V8, Promega) en 50 mM de NH₄HCO₃, pH 8, a 37°C durante una noche. Luego de las incubaciones con las enzimas, se separaron los sobrenadantes y se secaron.

9.6. Metilación de oligosacáridos liberados por PNGasa F

En el caso de la proteína de capa S de la cepa *L. kefir* JCM 5818, los oligosacáridos liberados por el tratamiento con la enzima PNGasa F fueron metilados utilizando NaOH en DMSO, seguido por la adición de CH₃I utilizando el protocolo descrito por Morelle y col. (2007).

En el caso de las proteínas de capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y *L. kefir* CIDCA 8348, se permetilaron los oligosacáridos enriquecidos y purificados.

9.7. Análisis por Espectrometría de masas

Los oligosacáridos fueron analizados en un espectrómetro de masas Ultraflex II TOF/TOF, equipado con un láser de estado sólido de alta performance (λ 355 nm) y un reflector. El sistema se operó por el software Flexcontrol versión 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). Las muestras fueron irradiadas con un poder de láser entre 25-50% y medidas en modo lineal y reflector, con polaridades de iones positivos y negativos.

9.8. Calibración de los espectros

La calibración fue realizada con reactivos comprados a Sigma-Aldrich (USA). Se utilizaron las proteínas comerciales: bradiquinina 1-7, masa molecular de 757,399; angiotensina I, masa molecular de 1296,685; renina, masa molecular de 1758,933; cadena β de la insulina, masa molecular de 3494,650. La matriz utilizada fue de 2,5-ácido dihidroxibenzoico.

9.9. Espectrometría de masas en tándem luego de Disociación Inducida por Láser.

Se utilizó el espectrómetro Ultraflex II MALDI-TOF/TOF. Para los experimentos que involucraron el uso de un tándem de tiempo de vuelo en modo LIFT, el voltaje de la fuente iónica se fijó a 8,0 kV utilizando un ion precursor con una ventana de 3 Da. El voltaje reflector se fijó en 29,5 kV. La matriz utilizada fue de 2,5-ácido dihidroxibenzoico. Las muestras fueron cargadas en un MTP 384 (Bruker Daltonics, GmbH) para ser

irradiadas utilizando el método sándwich. Los espectros obtenidos fueron la suma de 100-300 disparos individuales, dependiendo las condiciones de las muestras.

9.10. Análisis de glicopéptidos

Los glicopéptidos obtenidos a partir de la digestión por proteasas fueron purificados por HILIC SPE micro tips, de acuerdo al protocolo establecido por Selman y col. (2011). Las fracciones enriquecidas en glicopéptidos se resuspendieron en una mezcla de 50% acetonitrilo-1% de ácido fórmico en agua, 1:1.

Estas fracciones fueron analizadas en un nanoLC 1000 acoplado a un espectrómetro EASYSpray Q Exactive Mass Spectrometer (Thermo Scientific) con un HCD (Disociación Inducida por Colisión) y un analizador Orbitrap. Para realizar la separación, se utilizó una columna Easy Spray PepMap RSLC C18 (50µm x 150mm, tamaño de partícula de 2,0 µm, tamaño de poro 100Å) a 40°C. La separación fue realizada utilizando un gradiente lineal desde 5% a 35% del solvente B desarrollado en 75 minutos, a un flujo de 300nL/minuto (fase móvil A: agua-0,1%ácido fórmico, fase móvil B: acetonitrilo-0,1% ácido fórmico). El volumen de inyección fue de 2 µL. El voltaje de spray (+): 3,5 kV; (-):3,0 kV.

Para el análisis de los oligosacáridos permetilados la separación fue realizada bajo un gradiente lineal, de 5% a 60% de solvente B desarrollada en 75 minutos, con un flujo de 300nL/minuto (fase móvil A: agua-0,1% ácido fórmico, fase móvil B: acetonitrilo-0,1% ácido fórmico). El volumen de inyección fue de 5 µL.

9.11. Interpretación de los datos obtenidos

Los datos obtenidos en los experimentos realizados en nanoHPLC-ESI-Orbitrap fueron analizados en forma manual. La búsqueda automática de péptidos y glicopéptidos fue realizada con el software SequestHT, Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fischer Scientific).

Se seleccionaron tripsina y Glu-C como enzimas utilizadas y se permitió un error de un sitio de clivaje. La tolerancia permitida de la masa se fijó en 10 ppm para los iones precursores. La modificación estática en los residuos de Cys fue la carbamidometilación. HexNAc2; HexNAc2dHex, HexNAc2Hex; HexNAc2Hex3 y HexNAc2Hex3dhex fueron seleccionadas como las modificaciones dinámicas en los residuos de Asn. Se permitió un número máximo de dos modificaciones por péptido. La deconvolución se realizó utilizando el software Xtract de Thermo Xcalibur 3.0.63

10. Reconocimiento de proteínas de capa S por lectinas

Se realizaron ensayos para analizar el reconocimiento de diferentes lectinas sobre las proteínas de capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348, *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818.

Estos ensayos se realizaron durante una estadía en el Laboratorio de Inmunomodulación y desarrollo de Vacunas, Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay, bajo la supervisión de la Dra. Teresa Freire.

10.1. Ensayo tipo ELISA

Placas Nunc microtiter (Sigma-Aldrich, EEUU) fueron sensibilizadas con 1 mg/mL de las proteínas de capa S durante 16 horas y bloqueadas con gelatina 1% (p/v) utilizando

un buffer 100 mM de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ por 1 hora a 37°C. Luego, diferentes concentraciones de lectinas (Tabla M.7) acopladas a biotina se agregaron y se incubaron por 1 hora a 37°C. Para los ensayos de inhibición, las lectinas se incubaron con los monosacáridos que reconocen (50mM) o con EGTA (5mM). Luego de tres lavados, se agregó una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa (HRP, BioLegend, EEUU) y se incubó por 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron y se incubaron con el sustrato cromogénico (OPD, Sigma-Aldrich, EEUU). La reacción se frenó por el agregado de ácido sulfúrico 2N y se llevó a cabo la lectura de absorbancia en un lector de placas Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 492nm.

Tabla M.7. Lectinas utilizadas para el reconocimiento de proteínas de capa S

Lectina	Especificidad
<i>Concavalina A</i> (ConA)	D-Man(α -) > D-Glu(α -)
<i>Triticum vulgare</i> (WGA)	GlcNac β (1,4) GlcNac β (1,4) GlcNac > GlcNac β (1,4) GlcNac > GlcNa
<i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Ácido siálico
<i>Helix pomatia</i> (HPA)	Lactosa > β -D-Galactosa
Jacalin	α -D-Galactosa

11. Reconocimiento de proteínas de capa S por proteínas de fusión CLR-hFc

Con el objetivo de analizar cuáles eran los receptores que reconocen residuos de azúcares presentes en las glicoproteínas de capa S, se realizaron los ensayos tipo ELISA descritos por Mayer y col (2018).

Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Bernd Lepenies, durante una estadía en la Unidad de Inmunología y Centro de Investigación de Infecciones Emergentes y Zoonosis (RIZ) de la Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

Protocolo

Placas de media área (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania) fueron sensibilizadas con 0,25 µg de proteínas de capa S de *L. kefiri* por 16 horas a 4°C y bloqueadas con una solución de BSA 1%p/v (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Alemania) por 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 0,25 µg de cada proteína de fusión formada por el dominio de reconocimiento a carbohidrato de los distintos receptores de lectina tipo C y la porción Fc de la inmunoglobulina humana IgG (CLR-hFc) en buffer de unión a lectinas (50mM HEPES, 5 mM MgCl₂ y 5 mM CaCl₂) por 1 hora a temperatura ambiente. Para los ensayos de inhibición, las CLR-hFc se preincubaron con 5 mM de EGTA (Sigma-Aldrich, USA). Luego de lavar, se agregó anticuerpo anti-IgG humano conjugado a peroxidasa (HRP) (Dianova) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se incubaron con el sustrato cromogénico (tabletas de o-fenilenodiamina disueltas en buffer citrato con H₂O₂). La reacción se frenó por el agregado de ácido sulfúrico 2N y se llevó a cabo la lectura de absorbancia en un lector de placas Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 492nm.

12. Propiedades inmunomodulatorias de proteínas de capa S

12.1. Ensayos *in vitro*

12.1.1 Marcación fluorescente de proteínas de capa S

Para analizar la internalización de proteínas de capa S en células eucariotas, se procedió a marcar las proteínas en forma fluorescente. Para ello, se eligió el reactivo Atto-647-N (Sigma-Aldrich, EEUU) y se marcaron las proteínas siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Protocolo

1. Se dializaron las proteínas de capa S de *L. kefir* JCM 5818, *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 83111 contra NaHCO_3 0,1 M pH=8,3.
2. Se agregaron 10^7 equivalentes de Atto-647/100 μg proteína y se dejaron en agitación durante 24 horas.
3. Se dializaron frente a PBS durante 24 horas y se cuantificó la concentración de proteínas en el sobrenadante.

12.1.2. Internalización de proteínas de capa S sobre células RAW 264.7 y BMDCs

Protocolo

1. Se dispensaron 5×10^5 células RAW264.7 o 5×10^5 BMDCs derivadas de ratones wild-type o ratones deficientes en CLR (MyM, sección 2.3) por fosa en placas de 96 fosas.
2. Se agregaron soluciones de proteínas de capa S con marca fluorescente para obtener concentraciones finales de: 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio completo.
3. Una placa se incubó una hora a 37°C para analizar la internalización activa de las células y la otra placa se incubó una hora a 4°C para analizar la unión de las proteínas a las células y la internalización pasiva (Rodríguez et al. 2015; Rodríguez et al. 2017).
4. Las células se lavaron con PBS-SFB 3 veces y finalmente fueron analizadas en un citómetro de flujo.
5. La internalización se calculó como la diferencia de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células a 37°C y a 4°C . El porcentaje de internalización se normalizó para la condición obtenida para la proteína de capa S marcado con Atto 647-N.

Ensayo de internalización de proteínas de capa S en presencia de azúcares o agentes quelantes de calcio

2. Se agregaron soluciones de proteína de capa S con marca fluorescente previamente incubadas con soluciones de glucosa, manosa o galactosa (50mM) o 5mM de EGTA sobre células RAW 264.7. Las concentraciones finales de las proteínas fueron: 1 µg/mL, 5 µg/mL y 10 µg/mL en medio completo.
3. Una placa se incubó una hora a 37°C para analizar la internalización activa de las células y la otra placa se incubó una hora a 4°C para analizar la unión de las proteínas a las células y la internalización pasiva (Rodríguez et al. 2015; Rodríguez et al. 2017). Las células se lavaron con PBS-SFB 3 veces y finalmente fueron analizadas en un citómetro de flujo BD FACSCalibur.
4. La internalización se calculó como la diferencia de la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células a 37°C y a 4°C. El porcentaje de internalización se normalizó para la condición obtenida para la proteína de capa S marcado con Atto 647-N.

Visualización en microscopio de fluorescencia

Luego de realizar el ensayo de internalización de las proteínas de capa S sobre las células RAW 264.7, las células se lavaron 3 veces con PBS frío y se fijaron con una solución 0,1% de paraformaldehído por 15 minutos a 4°C. Luego, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-CD11c conjugado con FITC por 30 minutos a 4°C. Los núcleos celulares se colorearon con el agregado de ioduro de propidio a 1 mg/mL por 15 minutos. Las células se analizaron en un Microscopio confocal TCS SP5 (Leica Microscopy Systems Ltd. CH Heerbrugg, Switzerland) combinado con el software ImageJ.

12.1.3. Ensayos de estimulación sobre células RAW 264.7, THP-1 y BMDCs

Las células RAW264.7 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) y THP-1 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) fueron distribuidas en placas de 24 fosas (JET BIOFIL, China) y el volumen de medio se ajustó a 0,5mL.

En el caso de las células RAW264.7, las placas se incubaron por 48 horas, luego de lo cual se trataron con las proteínas de capa S ($10 \mu\text{g/mL}$), proteínas oxidadas de capa S (SLPOx) ($10 \mu\text{g/mL}$), y los controles de la oxidación de las proteínas de capa S (SLPB) ($10 \mu\text{g/mL}$) en presencia o ausencia de LPS $0,1 \mu\text{g/mL}$ (LPS de *Escherichia coli* O111:B4, Sigma, EEUU). Para la cuantificación de citoquinas secretadas por las células, la co-incubación se llevó a cabo durante 24 horas, se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Para el análisis de la expresión génica, el ensayo tuvo una duración de 4 horas, las células fueron colocadas en buffer de lisis (GE Healthcare) y los lisados se conservaron a -80°C . Para el análisis de la expresión de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo, las células se incubaron con los estímulos por 24 horas y se analizaron en el citómetro de flujo BD FACSCalibur (MyM sección 12.5).

En el caso de las células THP-1, las proteínas de capa S de las cepas seleccionadas se incubaron en presencia o ausencia de LPS ($1 \mu\text{g/mL}$; $0,5 \mu\text{g/mL}$) (LPS de *Escherichia coli* O111:B4, Sigma, EEUU), FliC ($1 \mu\text{g/mL}$; $0,5 \mu\text{g/mL}$) (flagelina de *Salmonella* Typhimurium) o poly I:C ($50 \mu\text{g/mL}$; $25 \mu\text{g/mL}$), durante 24 horas en medio de cultivo RPMI completo. Se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dra. Agustina Errea y el Dr. Martín Rumbo del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), UNLP-CONICET.

En el caso de los ensayos de inhibición con el agregado de agentes quelantes de calcio (EGTA), este fue adicionado a una concentración final de 5mM.

Los ensayos realizados con BMDCs derivadas de ratones wild-type o ratones deficientes en CLR (MyM, sección 2.3), se realizaron distribuyendo 1×10^5 células/fosa en placas de 96 fosas (Sarstedt, Alemania), y estimulando las células con proteínas de capa S (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en presencia o ausencia de LPS (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. Los sobrenadantes se colectaron para la cuantificación de citoquinas liberadas. Las células se colectaron para el análisis de moléculas co-estimuladoras en superficie a través de un citómetro de flujo Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con duplicados intra-ensayos.

12.1.4 Cuantificación de expresión génica

Luego de extraer ARN de las células y sintetizar el ADNc (MyM, sección 7.1), se comparó la expresión de genes entre los distintos tratamientos mediante qPCR (MyM, sección 7.2). En la tabla M.8, se indican todos los cebadores utilizados.

Tabla M.8. Cebadores utilizados para el análisis de qPCR

Gen de interés	Cebadores	Secuencia 5'-3'
TNF- α	Directo Reverso	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA CCTCCACTTGGTGGTTTGCT
IL-6	Directo Reverso	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
IL-10	Directo Reverso	CATTTGAATTCCCTGGGTGAGA TGCTCCACTGCCTTGCTCTT
HPRT	Directo Reverso	CAATGCAAACITTTGCTTTCC CAAATCCAACAAAGTCTGGC

12.2. Ensayos *in vivo*

12.2.1 Animales utilizados y condiciones de alojamiento

Los protocolos experimentales que serán descriptos en las secciones 12.2.2, 12.2.3 y 12.2.4 se ejecutaron utilizando ratones BALB/c hembras, libres de patógenos específicos (SPF), de seis semanas de edad, obtenidos del Bioterio de Producción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, o del laboratorio DILAVE (Uruguay).

Los ratones transgénicos OT-II (C57BL/6-Tg (TcraTcrb)425Cbn/J), Mincle^{-/-}, CARD9^{-/-} y SignR3^{-/-} se alojaron en el Bioterio de la Universidad de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.

En todos los casos, antes de dar comienzo a los protocolos experimentales, se permitió la adaptación de los animales a los nuevos macro y microambiente, durante una semana. Los animales se mantuvieron en cajas de plástico, con un lecho de viruta esterilizada. Se los alimentó *ad libitum* con una dieta para ratones en forma de pellets, y con libre acceso a agua esterilizada. El ciclo de luz/oscuridad fue de 12/12 horas y la temperatura se fijó en 22 ± 2 °C.

12.2.2. Eutanasia, toma de muestras y modo de conservación

Al finalizar los protocolos experimentales, los animales se sacrificaron por inhalación de CO₂. La disección se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II utilizando material quirúrgico estéril.

Muestras y conservación

1. Sueros para determinación de anticuerpos específicos: Se tomaron muestras de sangre desde la vena mandibular durante el proceso de inmunización y a través de punción cardíaca luego del sacrificio de los ratones. La sangre se dejó a 37°C para permitir el proceso de coagulación, se centrifugó y se separó el suero, que se conservó a -20°C para el análisis de anticuerpos.

2. Ganglios inguinales y bazos: Se colocaron en medio de cultivo celular RPMI completo y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.
3. Médula ósea para la producción de BMDCs: Se colocaron en medio de cultivo IMDM completo, y se conservaron a 4°C hasta el momento de ser procesadas .

12.2.3. Protocolos experimentales para estudiar inmunogenicidad de proteínas de capa S

12.2.3.1. Respuesta humoral

Se trabajó con 4 lotes de 5 ratones de 6 semanas de edad cada uno, a los que se inoculó en forma intraperitoneal 200 µL de la solución indicada en la tabla M.9. de acuerdo al siguiente protocolo experimental:

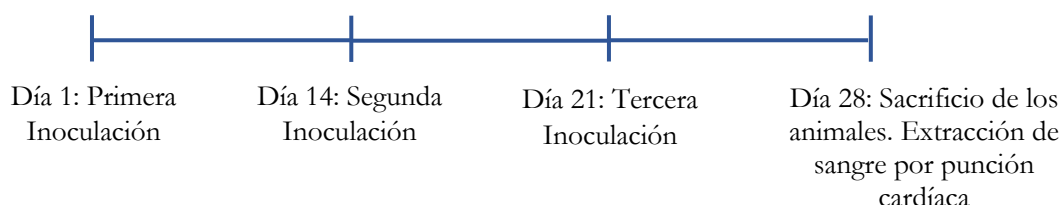


Tabla M.9. Tratamiento recibido por cada lote experimental

Denominación del lote	Solución inoculada/ratón
PBS/IFA ^a	100 µL de PBS + 100 µL de IFA
SLP/IFA	100 µL de SLP (50 µg/mL)+100µL IFA
SLPO _x /IFA	100 µL de SLPO _x (50 µg/mL)+100µL IFA
SLPB/IFA	100 µL de SLPB (50 µg/mL)+100µL IFA

^aIFA : Adyuvante Incompleto de Freund

Se analizó la producción de anticuerpos específicos contra la capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 en un ensayo tipo ELISA. Para ello, se sensibilizó una placa de 96 wells con 100 µL de proteína de capa S (1µg/mL) durante 16 horas a 4°C. Se bloqueó la placa con leche al 3%p/v durante 1 hora a 37°C y luego se agregaron los sueros provenientes de los ratones inmunizados en diluciones seriadas durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa durante 1 hora a 37°C y se

reveló utilizando o-fenilendiamina como sustrato cromogénico. El producto de la reacción se frenó por el agregado de H₂SO₄ y se leyó a 492 nm.

12.2.3.2. Respuesta celular

Se trabajó con 8 lotes de 5 ratones BALB/c de 6 semanas de edad cada uno, a los que se inoculó en forma subcutánea a nivel de la base de cola, 200 µL de la solución indicada en la tabla M.10.

A los 10 días de realizada la inoculación, se procedió al sacrificio de los ratones y la extracción de los ganglios inguinales.

Tabla M.10. Tratamiento recibido por cada lote experimental

Denominación del lote	Solución inoculada/ratón
PBS	200 µL de PBS
PBS/IFA ^a	100 µL de PBS + 100 µL de IFA
SLP	200 µL de SLP (50 µg/mL)
SLP/IFA	100 µL de SLP (50 µg/mL)+100µL IFA
SLPOx	200 µL de SLPOx (50 µg/mL)
SLPOx/IFA	100 µL de SLPOx (50 µg/mL)+100µL IFA
SLPB	200 µL de SLPB (50 µg/mL)
SLPB/IFA	100 µL de SLPB (50 µg/mL)+100µL IFA

^aIFA : Adyuvante Incompleto de Freund

Este esquema experimental se repitió para distintas proteínas de capa S estudiadas en este trabajo de tesis doctoral.

12.2.4. Protocolo experimental para estudiar capacidad adyuvante de proteínas de capa S

Se trabajó con 7 lotes de 5 ratones BALB/c de 6 semanas de edad cada uno, a los que se inoculó en forma subcutánea 200 µL de la solución indicada en la tabla M.11.

A los 10 días de realizada la inoculación, se procedió al sacrificio de los ratones y la extracción de los ganglios inguinales.

Tabla M.11. Tratamiento recibido por cada lote experimental

Denominación del lote	Solución inoculada/ratón
OVA	200 µL de OVA (50 µg/mL)
SLP	200 µL de SLP (50 µg/mL)

SLP/OVA	100 μ L de SLP (50 μ g/mL)+100 μ L OVA(50 μ g/mL)
SLPO _x	200 μ L de SLPO _x (50 μ g/mL)
SLPO _x /OVA	100 μ L de SLPO _x (50 μ g/mL)+100 μ L OVA(50 μ g/mL)
SLPB	200 μ L de SLPB (50 μ g/mL)
SLPB/OVA	100 μ L de SLPB (50 μ g/mL)+100 μ L OVA(50 μ g/mL)

12.3 Ensayos *ex vivo*

12.3.1 Ensayo de inducción de proliferación de células T

12.3.1.1 Ensayo alogénico utilizando células RAW 264.7

Las células RAW 264.7 estimuladas durante 24 horas con las proteínas de capa S, en combinación o no con LPS, fueron lavadas con PBS estéril e incubadas con esplenocitos totales de ratones C57BL/6 naive, previamente marcados con CFSE (Éster de succinimidil-carboxifluoresceína) en relación 2:1 en medio de cultivo DMEM completo. Las células se co-cultivaron 72 horas, se marcaron con anticuerpo anti-CD4 y se analizó la proliferación utilizando el citómetro de flujo BD FACSCalibur. Los sobrenadantes se separaron y se cuantificó la liberación de IFN- γ .

Para la obtención de los esplenocitos totales de ratones C57BL/6, los ratones se sacrificaron por inhalación de CO₂. La disección se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II utilizando material quirúrgico estéril. Los bazo se disgregaron y los glóbulos rojos se lisaron utilizando el buffer de lisis formado por: 10% 100 mM Tris pH 7.5, 90% 160 mM NH₄Cl.

12.3.1.2 Ensayo singénico utilizando BMDCs

Esplenocitos aislados de ratones transgénicos OT-II se resuspendieron en buffer MACS (BSA 0,5% (p/v), EDTA 2mM en PBS) y las células T se aislaron a través de una separación celular activada en forma magnética (MACS), utilizando el kit Pan T cell isolation kit II (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) de acuerdo a las

instrucciones del fabricante. Las células T se marcaron con CFSE (Sigma-Aldrich, EEUU) y se dispusieron en placas de 96 fosas (7×10^4 células T/fosa). Luego de 30 minutos, se agregaron BMDCs previamente estimuladas por 24 horas con OVA (Endograde® Lionex, Alemania) ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) en combinación o no con proteínas de capa S de cepas de *L. kefir* seleccionadas ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$), en relación 2:1 sobre las células T. Las células se co-incubaron durante 72 horas, se marcaron con anticuerpo anti-mouse-CD4 y se analizó la proliferación utilizando el citómetro de flujo Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific). Los sobrenadantes se separaron y se cuantificó la liberación de IL-17 e IFN- γ .

12.3.2. Proliferación antígeno específica de células de ganglios inguinales

Las células de ganglios inguinales de ratones previamente inmunizados (MyM, secciones 12.2.3.2 y 12.2.4) se extrajeron mediante disgregación mecánica de los órganos, se lavaron con PBS-SFB y se recuperaron por centrifugación (5 minutos a 2500 rpm). Se realizó recuento en cámara de Neubauer de las suspensiones obtenidas, se marcaron las células con CFSE y se distribuyeron 5×10^5 células/fosa en placas de 96 fosas. Se agregaron los antígenos de interés a concentración fija ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 72 horas. Los antígenos utilizados serán detallados en las secciones de Resultados correspondientes.

12.4 Cuantificación de citoquinas secretadas

Se cuantificó la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivo de células RAW 264.7 a través de kits comerciales de BD-Pharmingen (San Diego, EEUU). La secreción de IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de BMDCs fueron analizados a través de un ensayo tipo ELISA de PreproTech (EEUU), mientras que la secreción de IFN- γ se cuantificó a través de un kit comercial de BD-Pharmingen (EEUU). Las determinaciones fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

12.5. Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo

La expresión de distintas moléculas co-estimuladoras se estudiaron realizando marcaciones con los anticuerpos que se indican en la tabla M.12. Las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo indicado para cada medición, con su correspondiente programa de análisis de datos.

Tabla M.12. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Clon
anti mouse-CD40	3/23
anti mouse-MHCII	M5/114.15.2
anti mouse-CD86	PO3.1
anti mouse-CD11c	N418
anti mouse-CD16/32	93
anti-mouse CD4	GK1.5

13. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar en los casos en los que la distribución de los datos fue normal y para la evaluación estadística se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un post-test de Bonferroni de comparaciones múltiples, $\alpha = 0,05$. Para datos con distribución no normal, la evaluación estadística se realizó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns, $\alpha = 0,05$. Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism, version 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

14. Buffers y soluciones generales

A menos que se indique, todos los buffers se prepararon en agua destilada y todas las sales y drogas generales empleadas fueron suministradas por Laboratorios Anedra (Argentina).

Tabla M.13. Soluciones buffer utilizadas.

Buffer fosfato salino (PBS)	Buffer Tris salino (TBS)	Buffer TE (5X)	Buffer TAE (50X)
9,0 g de NaCl 0,144 g de NaH ₂ PO ₄ 0,795 g de K ₂ HPO ₄	6,0 g de Tris-Base 5,9 g de NaCl	54,0 g Tris-Base 20 mL EDTA 0,5M 27,5 g Ácido bórico	242,0 g Tris-Base 100,0 mL EDTA 0,5M 57,1 mL ácido acético glacial
pH 7,2 ± 0,1	pH 7,4 ± 0,1	pH 8,0 ± 0,1	pH 8,4 ± 0,1
Vol. Final: 1L	Vol. Final: 1L	Vol. Final: 1L	Vol. Final: 1L

- Solución fisiológica: 0,85 % p/v NaCl
- T-PBS: PBS suplementado con 0,05% v/v de Tween 20 (SIGMA, St. Louis, MO USA).
- T-TBS: TBS suplementado con 0,05% v/v de Tween 20.
- Diluyente anticuerpos para ELISA y Dot-blot: T-TBS suplementado con 3 % p/v de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé).
- Diluyente anticuerpos para citometría (PBS-SFB): T-PBS suplementado con 5 % v/v de suero fetal bovino (Gibco, USA).

Capítulo 1: Estructura primaria de proteínas
de capa S de *Lactobacillus kefir*

Introducción

En el género *Lactobacillus*, la presencia de capa S ha sido descrita en numerosas especies, pero no en todas. Las especies de lactobacilos con una capa S incluyen *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. kisonensis*, *L. otakiensis*, *L. parafarraginis*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. gasserii*, *L. kefiranofaciens*, *L. parakefiri*, *L. kefiri*, entre otros (Hynönen y Palva 2013). Sin embargo, los genes que codifican para estas proteínas no han sido secuenciados en todas las especies (Tabla 1.1), sino que en algunos casos, los métodos de detección utilizados se basaron en el uso de la microscopía electrónica (Pavkov-Keller et al. 2011).

Tabla 1.1. Cepas de *Lactobacillus* con genes codificantes para proteínas de capa S disponibles en bases de datos públicas. Adaptada de Hynönen y Palva (2013) y completada con reportes bibliográficos más recientes.

Género	Cepa	Referencia de Proteína de capa S	Genoma	
			Estado	Referencia
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356 JCM 1038	Boot et al. (2000) AAF6561	Completo	Palomino et al. (2015)
	NCFM 30SC	Buck et al. (2005) Anotación	Completo	Altermann et al. (2005)
	ATCC 4796	Anotación	En desarrollo	Oh et al. (2011)
	ATCC 12046	Lortal et al. (1992)	Completo	Palomino et al. (2018)
<i>L. amylovorus</i>	GRL 1112, GRL 1118	Jakava-Viljanen y Palva (2007)	Completo	Kant et al. (2011a y 2011b)
	GRL 1115	Jakava-Viljanen y Palva (2007)	En desarrollo	
<i>L. brevis</i>	ATCC 8287	Vidgren et al. (1992)	En desarrollo	
	ATCC 144869	Jakava-Viljanen et al. (2002)		
<i>L. buchneri</i>	CD034	Anzengruber et al. (2014)	Completo	Heinl et al. (2012)
	ATCC 11577	Anotación	En desarrollo	
<i>L. crispatus</i>	JCM 5810, LMG 12003	Sillanpää et al. (2000)		
	F 5.7	Mota et al. (2006)		
	ZJ001	Chen et al. (2009)		
	K 2-4-3	Hu et al. (2011)		
	K313	Sun et al. (2012)		

Tabla 1.1. Cepas de *Lactobacillus* con genes codificantes para proteínas de capa S disponibles en bases de datos públicas. Adaptada de Hynönen y Palva (2013) y completada con reportes bibliográficos más recientes.

<i>L. diolivorans</i>	DSM 20176	Anotación	En desarrollo	Sun et al. (2015)
<i>L. gallinarum</i>	D109, D195-2, D256, D109, D255, ATCC 33199, D42, D44-2	Hagen et al. (2005)		
<i>L. helveticus</i>	MIMLh5	Taverniti et al. (2012)		
	DPC4571	Anotación	Completo	Callanan et al. (2008)
	H10	Anotación	Completo	Zhao et al. (2011)
	MTCC5463	Anotación	Completo	Prajapati et al. (2012)
	R0052	Anotación	Completo	Tompkins et al. (2012)
<i>L. keisonensis</i>	JCM 15041	Anotación	En desarrollo	Sun et al. (2015)
<i>L. kefir</i>	JCM 5818	Anotación	En desarrollo	Sun et al. (2015)
<i>L. hilgardii</i>	B706	Dohm et al. (2011)		
<i>L. otakiensis</i>	JCM 15040	Anotación	En desarrollo	Doi et al. (2013)
<i>L. parafarraginis</i>	JCM 14109	Anotación	En desarrollo	Sun et al. (2015)
	F0439	AGEY01000012.1	En desarrollo	

En las proteínas donde se conoce su secuencia aminoacídica se observa que las subunidades proteicas son típicamente ricas en aminoácidos hidrófobos pero bajas en aminoácidos que contienen azufre (Sleytr et al 2014). El análisis de aminoácidos de las proteínas de capa S de organismos de ramas filogenéticas cercanas reveló una composición general bastante similar; sin embargo, a pesar de todas estas características comunes, los estudios comparativos de las proteínas de capa S en microorganismos de diferentes afiliaciones taxonómicas revelaron que las homologías entre organismos no relacionados son muy bajas. Por otra parte, la gran heterogeneidad en la secuencia aminoacídica entre

proteínas de capa S de diferentes especies bacterianas, ha sido observada incluso dentro del mismo género (Hynönen and Palva 2013).

En los últimos años nuestro grupo de investigación ha trabajado en la caracterización de las propiedades probióticas y potencialidad tecnológica de bacterias lácticas y levaduras aisladas a partir de leche fermentada con gránulos de kefir. En particular, en este trabajo de tesis, se estudiaron cepas de *Lactobacillus kefir*. Pese a todas las interesantes propiedades funcionales descritas para estas proteínas (ver Introducción General), hasta el momento de comenzar con este trabajo de Tesis, no existía información acerca de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de capa-S de *L. kefir*. La caracterización estructural de estas proteínas constituye un pilar fundamental para el diseño y desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas basadas en microorganismos no patógenos. Es por ello, que el primer objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral fue secuenciar el o los genes que codifican para las proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir*.

Resultados y discusión

1.1 Análisis de espectrometría de masas de proteínas de capa S de cepas de *L. kefir*

La caracterización estructural de las proteínas de capa S de las cepas de *L. kefir* ha sido tema de estudio en nuestro grupo de trabajo por mucho tiempo. El primer intento para amplificar genes de capa S en *L. kefir* consistió en la utilización de cebadores capaces de amplificar dichos genes en cepas de *L. gallinarum* y *L. brevis* (cepas filogenéticamente relacionadas entre sí, pero no con *L. kefir*). Sin embargo, no se obtuvieron productos de amplificación utilizando el ADN de *L. kefir*. Esto puede ser consecuencia de que, como ya se mencionó, existe una gran heterogeneidad en las secuencias aminoacídicas de proteínas capa S provenientes de especies de un mismo género bacteriano (Hynönen and Palva 2013).

Se decidió entonces realizar un abordaje proteómico, tomando como punto de partida los datos de espectrometría de masas realizados por Mobili y col. (2009), y aumentando el número de proteínas de capa S analizadas. Para ello, se realizaron nuevos espectros de MALDI-TOF (Ionización por láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo), en colaboración con la Dra. Bronsoms y el Dr. Trejo del SePBioEs (IBB, UAB). La identidad de las proteínas de capa S extraídas de *L. kefir* y digeridas por tripsinización se confirmó mediante el análisis de “huella peptídica de masa” (*Peptide Mass Fingerprint*, PMF), encontrando homología con proteínas de capa S de *L. buchneri* CD034 y *L. parafarraginis* F0439. Los PMF representativos de las proteínas de capa S de las cepas de *L. kefir* estudiadas en este trabajo de tesis se muestran en la Figura 1.1. En concordancia con los resultados anteriores (Mobili et al. 2009), las proteínas de capa S de las cepas agregantes mostraron patrones espectrales muy similares (Fig. 1.1, espectros A-D). Por otro lado, se observó un mayor grado de heterogeneidad en el conjunto de espectros

correspondientes a proteínas de capa S de cepas no agregantes (Fig. 1.1, espectros E-S). El uso de los datos obtenidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para las proteínas de capa S ha sido propuesto previamente para tipificar cepas del grupo *L. acidophilus* (Podlesny et al. 2011). En nuestro caso, se ha utilizado para distinguir cepas dentro de la misma especie.

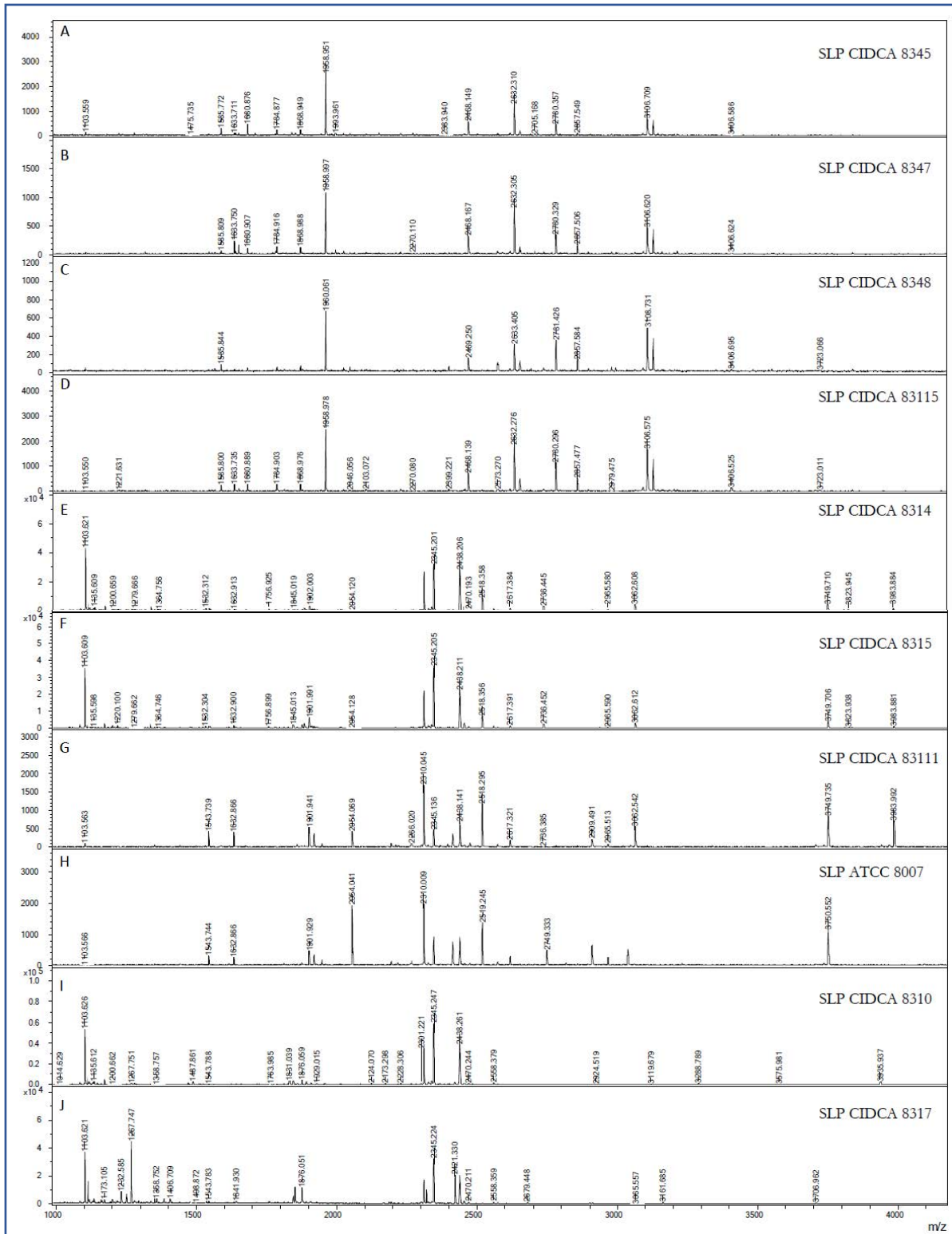


Figura 1.1: PMF representativos de proteínas de capa S de cepas agregantes (A-D) (SLP CIDCA 8345, 8347, 8348* y 83115) y cepas no agregantes (E-S)(SLP CIDCA 8310, 8314, 8315, 8317, 8332, 8335, 8343, 8381, 8385, 83111, 83113*, 83116, ATCC 8007 and JCM 5818*) de *L. kefir*. Se grafica la Intensidad obtenida (en unidades arbitrarias) respecto de la relación masa/carga (m/z). *Espectros de masas de estas cepas fueron reportados previamente por Mobili y col. (2009).

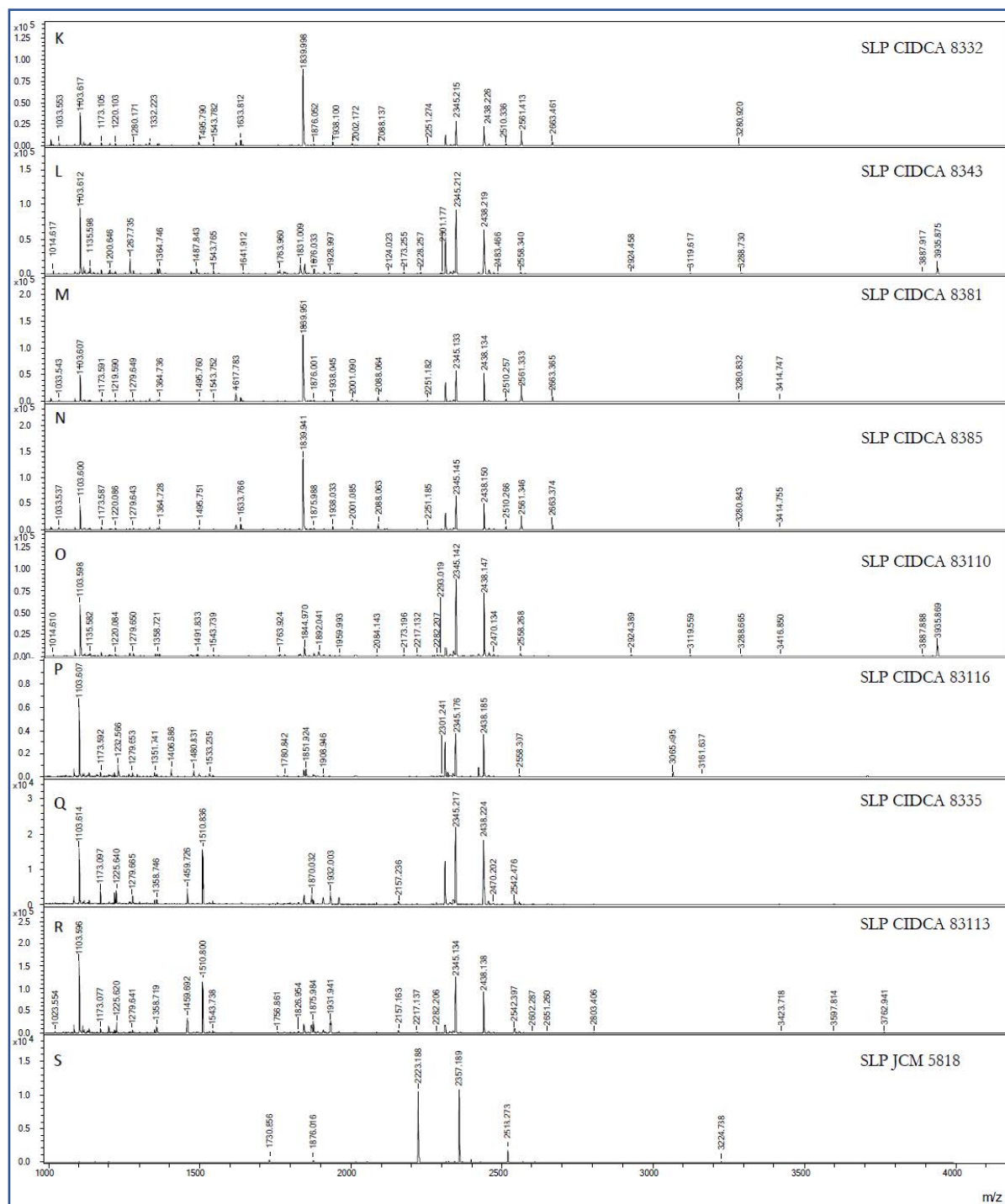


Figura 1.1 (continuación): PMF representativos de proteínas de capa S de cepas agregantes (A-D) (SLP CIDCA 8345, 8347, 8348* y 83115) y cepas no agregantes (E-S) (SLP CIDCA 8310, 8314, 8315, 8317, 8332, 8335, 8343, 8381, 8385, 83111, 83113*, 83116, ATCC 8007 and JCM 5818*) de *L. kefir*. Se grafica la Intensidad obtenida (en unidades arbitrarias) respecto de la relación masa/carga (m/z). *Espectros de masas de estas cepas fueron reportados previamente por Mobili y col. (2009).

Teniendo en cuenta que los datos obtenidos por espectrometría de masas de las proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir* mostraron homología con proteínas de capa S provenientes de *L. buchneri* y *L. parafarraginis* F0439, se decidió completar el análisis realizando digestiones trípticas teóricas de proteínas de capa S provenientes de cepas relacionadas filogenéticamente con *L. kefir* (*L. parafarraginis*, *L. kisonensis*, *L. otakiensis*, *L. parabuchneri*, *L. parakefir*) (Endo y Okada 2007; Watanabe et al. 2009; Oki et al. 2012; Heintz et al. 2012; Sun et al. 2015). Para ello, primero se realizó una búsqueda en la base de datos de proteínas de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) utilizando los términos “S-layer” y “Surface layer”, y restringiendo los resultados a las proteínas provenientes de las cepas pertenecientes al *cluster* *L. buchneri* (Sun et al. 2015). A partir de las mismas, se utilizó el software disponible en el portal ExpASY (http://web.expasy.org/peptide_mass/) para realizar la digestión, ajustando las condiciones de clivado *in silico* a las condiciones en las que se realizaron nuestros experimentos. A continuación, se compararon los fragmentos obtenidos experimentalmente para las proteínas de *L. kefir* con las fragmentaciones teóricas de proteínas de otros lactobacilos. Para realizar las comparaciones, se agruparon los datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF obtenidos a partir de la digestión tríptica de las proteínas de capa-S de diferentes cepas de *L. kefir*, según la capacidad de agregación de las cepas de las que fueron extraídas, y se analizaron aquellos péptidos presentes en todas las cepas. Para considerar que dos fragmentos poseen una relación masa/carga (m/z) similar, se toleró una variación máxima de 0,5.

En la tabla 1.2 se muestran los resultados obtenidos. Los cuatro péptidos que estaban presentes en todas las cepas de *L. kefir* estudiadas, independientemente de su capacidad agregativa (m/z : 949,48; m/z : 1103,56; m/z :1114,61; m/z :1200,64) encontraron fragmentos similares en la digestión tríptica teórica de proteínas de cepas relacionadas.

Estos péptidos se analizaron adicionalmente mediante fragmentación MS/MS y posterior secuenciación *de novo*, y sus secuencias pudieron validarse. Esta secuenciación se realizó utilizando la metodología descrita por el Prof. Donald F. Hunt y col., de la Universidad de Virginia, Estados Unidos, disponible online en: <http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/DeNovoTOC.htm>. Las secuencias obtenidas a través de esta metodología para los péptidos mencionados, coincidieron con las descriptas para las proteínas de cepas relacionadas.

Tabla 1.2. Datos de espectroscopía de masas MALDI-TOF para los péptidos obtenidos a partir de la digestión triptica de las proteínas de capa S de cepas de *L. kefir*. Los valores corresponden a la relación m/z de los iones. Adaptada y completada de Carasi 2014 (Tesis Doctoral, UNLP).

Capa S de cepas de <i>L. kefir</i> , resultados experimentales		Capa S de otros lactobacilos, digestiones tripticas teóricas		
Características de las cepas	Relación m/z	Cepa con fragmento de relación m/z similar a <i>L. kefir</i>	Relación m/z	Secuencia del fragmento
Agregantes y no agregantes	949,48	<i>L. buchneri</i> CD034	949,49	ALTTDATTR
		<i>L. parabuchneri</i>	949,49	ALTTDATTR
		<i>L. farraginis</i> DSM 18382	949,49	ALTTDATTR
Agregantes y no agregantes	1103,56	<i>L. buchneri</i> CD034	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. kisonensis</i> F0435	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. parafarraginis</i> F0349	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. otakiensis</i> JCM 15040	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. parabuchneri</i>	1103,58	TREGDLWVK
		<i>L. parakefir</i>	1103,58	TREGDLWVK
Agregantes y no agregantes	1114,61	<i>L. buchneri</i> CD034	1114,62	VVSFDKTYR
		<i>L. parafarraginis</i> F0349	1114,62	VVSFDKTYR
		<i>L. parabuchneri</i>	1114,62	VVSFDKTYR
Agregantes y no agregantes	1200,64	<i>L. buchneri</i> CD034	1200,64	TYRGWIYGGK
		<i>L. parafarraginis</i> F0349	1200,64	TYRGWIYGGK
		<i>L. parabuchneri</i>	1200,64	TYRGWIYGGK

1.2 Amplificación de genes codificantes de proteínas de capa S de *L. kefir*

Dada la coincidencia entre los péptidos obtenidos por tripsinización para las proteínas de capa S de *L. kefir* con las proteínas de cepas relacionadas, se alinearon las secuencias aminoacídicas de las proteínas de *L. buchneri* CD034, *L. kisonensis* F0435, *L. otakiensis* JCM 15040, *L. parabuchneri* y *L. parafarraginis* F0349 para analizar la localización de estos péptidos, utilizando el software bioinformático Geneious (Biomatters Limited). Como se observa en la Figura 1.2, todos los fragmentos se encuentran localizados en la región N-terminal de las proteínas.

Sobre la base de la alineación, se seleccionaron las regiones que muestran la mayor homología y dada la disponibilidad de la secuencia genómica completa de *L. buchneri* CD034 (Heinl et al. 2012), se diseñó un conjunto de cebadores específicos para la proteína de capa S que se denominaron TREG-r (dentro del péptido de m/z 1103.6) y GWIY-f (dentro del péptido de m/z 1200.6), utilizando el código genético de *L. buchneri* CD034 (Figura 1.2 y MyM sección 7.4). Usando estos cebadores, se obtuvo un amplicón de 340 pb a partir del ADN genómico de todas las cepas de *L. kefir*. Luego se secuenciaron los fragmentos y, al emplear el software disponible en el portal ExPASy (<http://web.expasy.org/translate>), las secuencias de nucleótidos se tradujeron en péptidos. Una comparación entre todos los fragmentos (Figura 1.3) nos permitió clasificar a las cepas en cinco grupos diferentes. Las cinco cepas agregantes (grupo I) no mostraron diferencias en la secuencia de aminoácidos de este fragmento de 106 aminoácidos entre ellas, mientras que las cepas no agregantes podrían separarse en cuatro grupos diferentes: grupo II (cepas CIDCA 8314, 8315, 8326, 83111, ATCC 8007), III (cepas CIDCA 8310, 8317, 8319, 8332, 8343, 8344, 8381, 8385, 83110, 83116), IV (cepas 8335, 83113) y V (cepa JCM 5818).

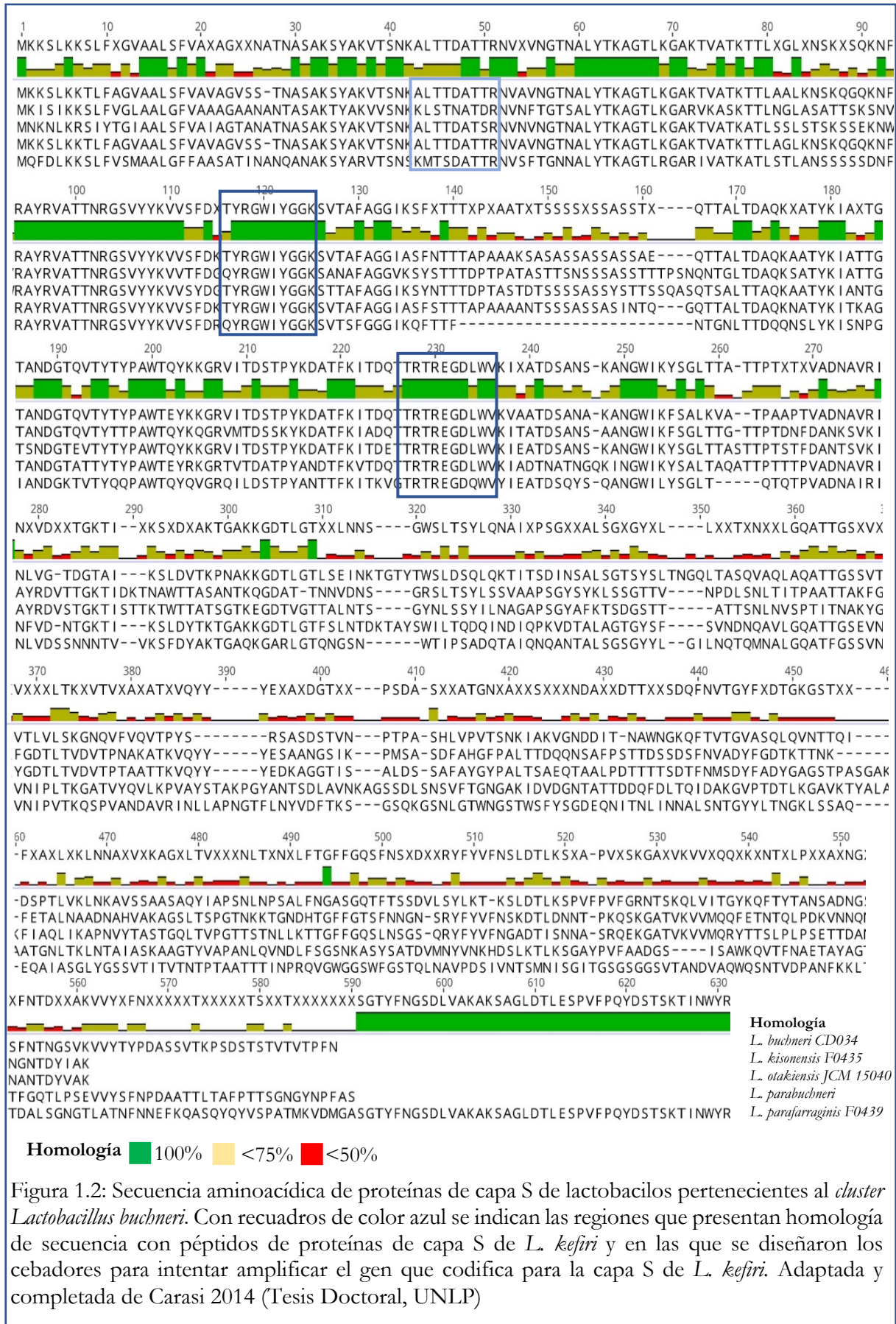


Figura 1.2: Secuencia aminoacídica de proteínas de capa S de lactobacilos pertenecientes al *cluster Lactobacillus buchneri*. Con recuadros de color azul se indican las regiones que presentan homología de secuencia con péptidos de proteínas de capa S de *L. kefir* y en las que se diseñaron los cebadores para intentar amplificar el gen que codifica para la capa S de *L. kefir*. Adaptada y completada de Carasi 2014 (Tesis Doctoral, UNLP)

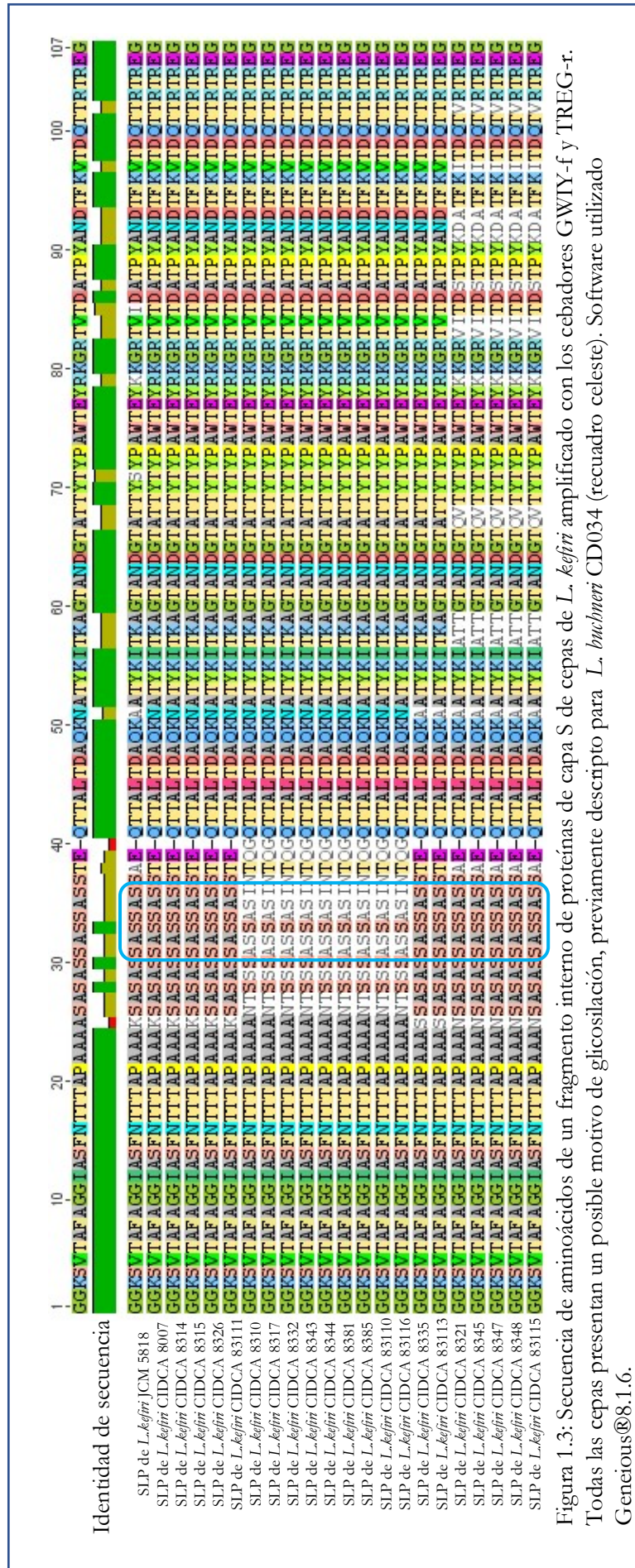
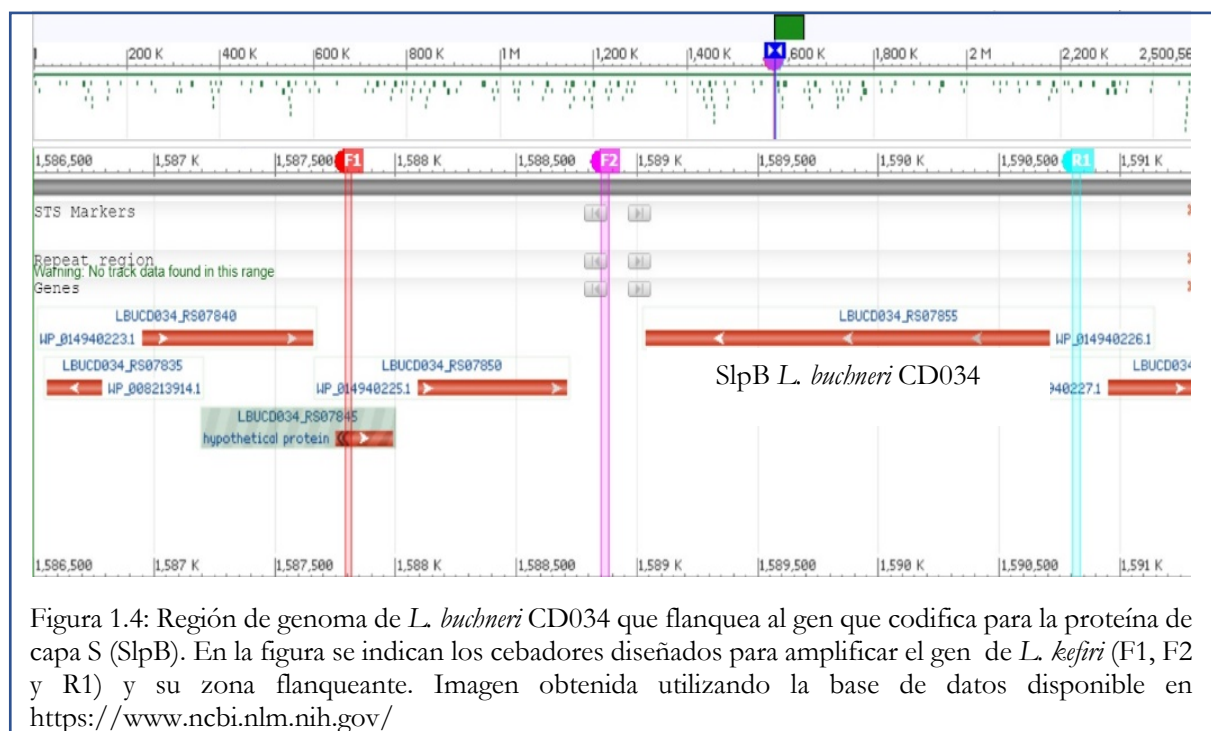


Figura 1.3: Secuencia de aminoácidos de un fragmento interno de proteínas de capa S de cepas de *L. kefir* amplificado con los cebadores GWTY-f y TREG-r. Todas las cepas presentan un posible motivo de glicosilación, previamente descrito para *L. buchneri* CD034 (recuadro celeste). Software utilizado Geneious®8.1.6.

El agrupamiento de las cepas a través de las secuencias obtenidas por secuenciación de los fragmentos mencionados correlaciona perfectamente con lo obtenido al analizar los perfiles peptídicos mediante MALDI-TOF. Además, otro dato importante que se desprende de la secuencia, es la identificación de una región de glicosilación que coincide con la descrita para *L. buchneri* (Anzengruber et al. 2014).

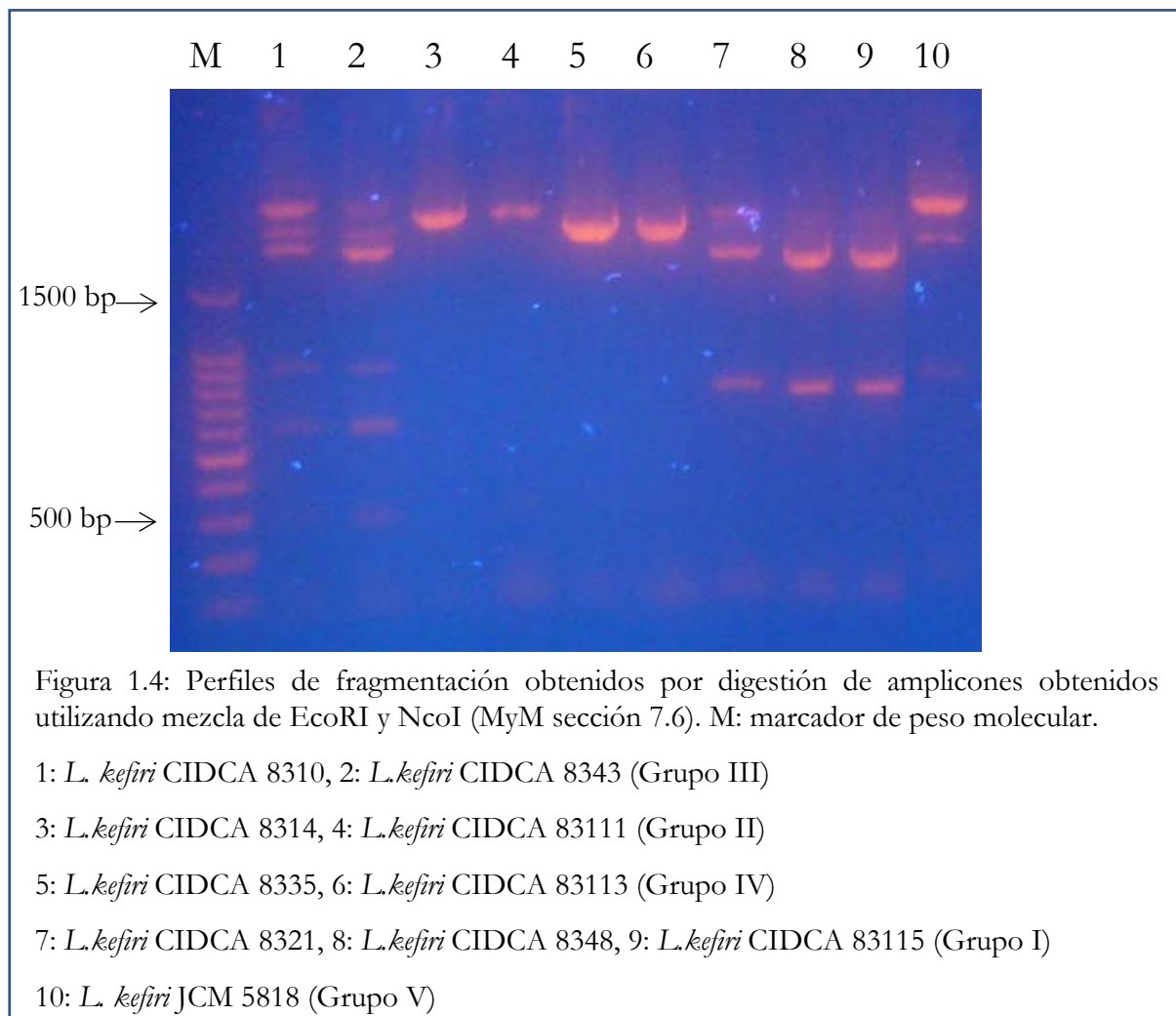
Dado que el objetivo era obtener la secuencia completa del gen que codifica para la capa S de *L. kefir*, se realizaron alineaciones de secuencia de las regiones que flanquean al gen SlpB de *L. buchneri* CD034, cuyo genoma se encuentra secuenciado, con *contigs* de *L. parafarraginis* F0439, *L. kisonensis* F0435 y *L. otakiensis* JCM 15040. Se utilizaron las regiones con alta homología que se encontraron por fuera del gen de capa S de *L. buchneri* para diseñar nuevos cebadores que se utilizarían para amplificar toda la región en la que se encontraría contenido nuestro gen de interés (Figura 1.4). En función de la posición de los cebadores diseñados en el genoma de *L. buchneri* CD034, la utilización del par F1-R1 en esta cepa daría como resultado un fragmento de 3060 pb, mientras que con la combinación de F2 y R1 se obtendría un fragmento de 2000 pb.



Las cepas aisladas por nuestro laboratorio a partir de distintos gránulos de kefir (Garrote et al 2001), amplificaron con el cebador directo F1 pero no se detectó ningún producto de amplificación con el cebador directo F2. Aún con ligeras modificaciones de acuerdo a las cepas, en todos los fragmentos amplificados se observó una migración de alrededor de 500 pb menos de lo esperado, lo que podría explicar la ausencia de la región de complementaria al cebador F2. En el caso de la cepa JCM 5818, presentó amplificación con el cebador directo F2, pero no con F1, y el fragmento obtenido se encuentra cercano al tamaño esperado.

Como se describió anteriormente, el análisis de los datos de espectrometría de masas MALDI-TOF de los péptidos obtenidos por la digestión trípica de las proteínas de capa S mostró que existe una mayor heterogeneidad entre las proteínas provenientes de cepas no agregantes que entre las de cepas agregantes, lo que coincide con lo mostrado por Mobili y col. (2009). Para analizar si estas diferencias se encuentran también a nivel génico,

se utilizaron enzimas de restricción para fragmentar los productos de PCR en los que se encontraría contenido el gen de dichas proteínas. En la figura 1.4 se muestran los perfiles de fragmentación luego del tratamiento de los amplicones obtenidos para diez cepas seleccionadas de *L. kefir* pertenecientes a diferentes grupos, con una mezcla de EcoRI y NcoI. Los resultados obtenidos a nivel génico coinciden con el agrupamiento descrito previamente.



Considerando los resultados obtenidos hasta aquí, se seleccionaron un total de 16 cepas pertenecientes a diferentes grupos y se realizó la secuenciación de los genes completos que codifican para las proteínas de capa S. Las secuencias de ADN parciales

obtenidas con las combinaciones de F1/R1, GWIY-f/TREG-r, GWIY-f/F1 y TREG-r/R1 se ensamblaron para obtener las secuencias completas del gen de la capa S de *L. kefir* CIDCA 8310, 8314, 8315, 8321, 8326, 8332, 8335, 8343, 8344, 8345, 8347, 8348, 83111, 83113 y 83115. Para la amplificación del ADN de *L. kefir* JCM 5818, las combinaciones F1/R1 y GWIY-f/F1 fueron reemplazadas por F2/R1 y GWIY-f/F2 respectivamente. La mayoría de las secuencias de genes de la capa S se depositaron en la base de datos EMBL con los siguientes números de acceso: LT601591, LT601592, LT601593, LT601594, LT601595, LT601596, LT601597, LT601598, LT601599 y LT601600 (Tabla 1.3). El alineamiento de los genes que codifican para la proteína de capa S en cada una de las cepas se muestra en la Figura 1.5. Como se puede observar, existe una mayor identidad de secuencia nucleotídica en la región inicial del gen de todas las cepas analizadas, lo que coincide con lo descrito previamente para las cepas filogenéticamente relacionadas con *L. kefir*.

Tabla 1.3: Números de acceso de los genes que codifican para proteínas de capa S en cada cepa analizada en este trabajo de tesis. La secuencia de nucleótidos fue depositada en la base de datos del EMBL (Laboratorio Europeo de Biología Molecular).

Características de las cepas	Cepa	Número de acceso
Agregantes	<i>L. kefir</i> CIDCA 8321	LT601594
	<i>L. kefir</i> CIDCA 8348	LT601597
	<i>L. kefir</i> CIDCA 83115	LT601600
No agregantes	<i>L. kefir</i> CIDCA 8314	LT601593
	<i>L. kefir</i> CIDCA 83111	LT601598
	<i>L. kefir</i> CIDCA 8310	LT601592
	<i>L. kefir</i> CIDCA 8343	LT601596
	<i>L. kefir</i> CIDCA 8335	LT601595
	<i>L. kefir</i> CIDCA 83113	LT601599
	<i>L. kefir</i> JCM 5818	LT601591

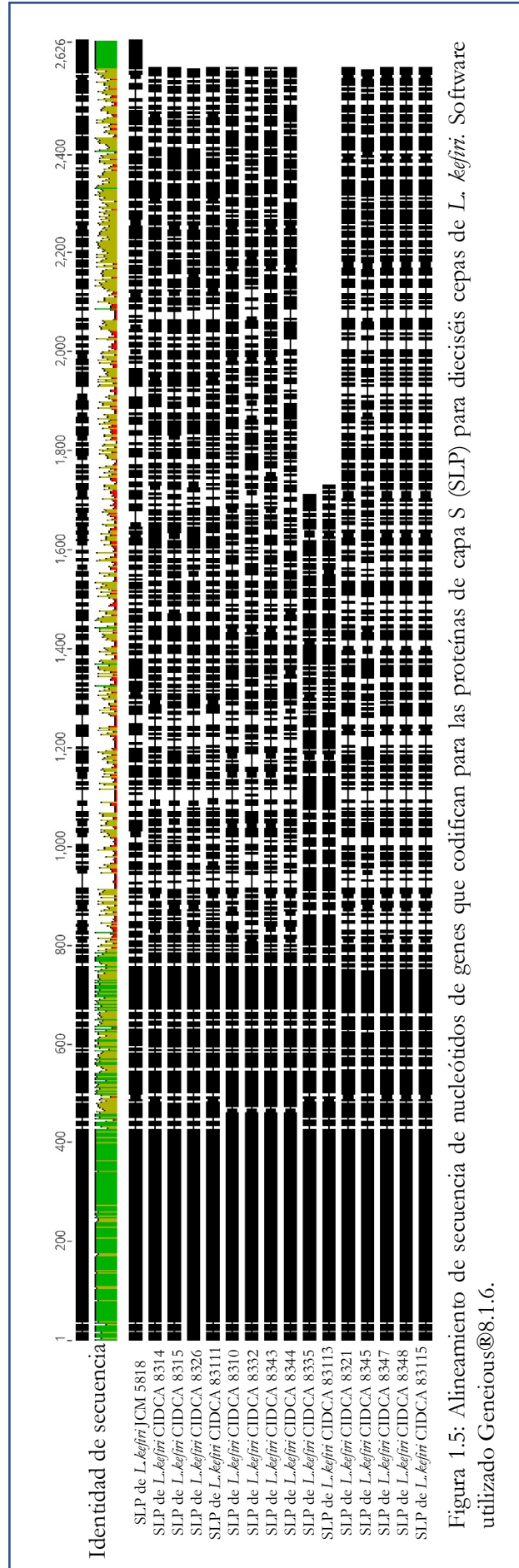


Figura 1.5: Alineamiento de secuencia de nucleótidos de genes que codifican para las proteínas de capa S (SLP) para dieciséis cepas de *L. kefir*. Software utilizado Geneious®8.1.6.

Desde noviembre de 2015, se encuentran disponibles en el sitio de NCBI dos Genome Assemblies (Ensamblajes de genoma) y Annotation Reports (Reporte de Anotación) para *L. kefir* JCM 5818 (Sun et al. 2015). En ellos, se encuentran tres diferentes loci (sitios del cromosoma donde se encuentran genes específicos) que codifican para hipotéticas proteínas de capa S. Uno de ellos muestra 100% de identidad nucleotídica con la secuencia reportada en este trabajo para *L. kefir* JCM 5818 (acceso AYYV01000002.1; locus KRM54156), lo que confirma nuestros resultados.

Los otros dos loci muestran 72% de identidad (acceso AYYV01000 037.1; locus KRM52454) y 60% de identidad (accesión AYYV01000004.1; locus KRM53976) respectivamente. Estos hallazgos sugieren que al menos tres genes codificantes de proteínas de capa S están presentes en el genoma de la cepa de referencia *L. kefir* JCM 5818. El locus KRM52454 codifica un polipéptido de 540 aminoácidos mientras que el locus KRM53976 codifica un polipéptido de 565 aminoácidos. La proteína descrita en este trabajo de Tesis muestra una longitud total de 578 aminoácidos. La presencia de más de un gen que codifica para la proteína de capa S ha sido descrito en diferentes especies de lactobacilos, incluyendo *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 (Jakava-Viljanen et al. 2002); *L. acidophilus* ATCC 4356 (Boot et al.1995; Palomino et al. 2016) y *L. acidophilus* NCFM (Goh et al. 2009). Por otra parte, se ha descrito que el nivel de expresión de diferentes genes que codifican para la proteína de capa S podría estar afectado por las condiciones ambientales en las que se encuentre el microorganismo (Ramiah et al. 2009; Palomino et al. 2016).

Aunque los cebadores ubicados dentro del marco abierto de lectura (TREG-r, GWIY-f) podrían generar productos de amplificación de los tres genes hipotéticos

mencionados, es importante tener en cuenta que los cebadores utilizados para la secuenciación, que se encuentran fuera del marco abierto de lectura (F2 y R1), sólo coinciden con la región flanqueante del locus KRM54156 de *L. kefir* JCM 5818. Este hallazgo nos permite suponer que los amplicones obtenidos corresponden a un gen localizado en esa región del genoma. En este sentido, la secuenciación completa de los genomas en las cepas de *L. kefir* de nuestra colección resulta un tema de estudio sumamente interesante para abordar, teniendo en cuenta la posibilidad de que existan genes que codifiquen para proteínas de capa S distintos al identificado en este trabajo. Sin embargo, la presencia de otros genes que codifiquen para proteínas de capa S en las cepas de *L. kefir* de nuestra colección, así como también el análisis diferencial de los patrones de expresión génica, no fueron abordados en este trabajo de Tesis.

1.3 Secuencias de aminoácidos de proteínas de capa S de *L. kefir*

Los genes que codifican para las proteínas de capa S de las cepas seleccionadas de *L. kefir* fueron traducidos a las secuencias proteicas correspondientes y luego confirmadas por la comparación de cada espectro PMF experimental con la digestión trípica teórica obtenida con la herramienta PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/). A pesar de que no es posible descartar la presencia de otras proteínas contaminantes en la banda de gel utilizada para obtener el PMF, más del 79% de la intensidad total de los espectros experimentales están cubiertos por las secuencias aminoacídicas obtenidas para cada proteína de capa S. Adicionalmente, debido a la presencia de residuos de azúcar, hay algunos picos correspondientes a los glicopéptidos que no pudieron ser asignados en estos análisis. El alineamiento de las secuencias obtenidas de las dieciséis cepas de *L. kefir* se muestra en la Figura 1.6.

CIDCA8335	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYVKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA83113	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYVKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8332	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA	59
CIDCA8344	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8310	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYVKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8343	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA	59
CIDCA8321	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8345	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8348	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA83115	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
CIDCA8347	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTTA	59
JCM5818	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTS DATTRNVAVNGTNA	59
CIDCA8326	MKKVIEKRLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA	60
CIDCA8314	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA	59
CIDCA8315	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA	59
CIDCA83111	MKKS LK - KTLFAGVAALSFVAVAGVSSSTNASAKSYAKVTSNKALTTDATTRNVAVNGTNA *** :: : : :*****.*****.*****.*****.*	59
CIDCA8335	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLSGLKDSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA83113	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLSGLKDSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8332	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8344	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8310	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8343	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8321	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8345	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8348	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA83115	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8347	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
JCM5818	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAGLKNKSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8326	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAALKNSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	120
CIDCA8314	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAALKNSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA8315	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAALKNSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW	119
CIDCA83111	LYTKAGTLKGAKTVATKTTLAALKNSKQGQKNFRAYRVATTNRGSVYKVVVDFDKTYRGW *****.*****.*****.*****.*****	119
CIDCA8335	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAASSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKAATYKITK	178
CIDCA83113	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAASSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKAATYKITK	178
CIDCA8332	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANTSSASSASINTQGQTAL TDAQKNATYKITK	179
CIDCA8344	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANTSSASSASINTQGQTAL TDAQKNATYKITK	179
CIDCA8310	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANTSSASSASINTQGQTAL TDAQKNATYKITK	179
CIDCA8343	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANTSSASSASINTQGQTAL TDAQKNATYKITK	179
CIDCA8321	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
CIDCA8345	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
CIDCA8348	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
CIDCA83115	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
CIDCA8347	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
JCM5818	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSAEQTAL TDAQKAATYKIAT	178
CIDCA8326	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKNATYKITK	179
CIDCA8314	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKNATYKITK	178
CIDCA8315	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKNATYKITK	178
CIDCA83111	IYGGKSVTAFAGGIASFNTTAPAAAANSASAS - SASSASSTEQTAL TDAQKNATYKITK *****.*****.*****.*****.*****	178
CIDCA8335	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	238
CIDCA83113	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	238
CIDCA8332	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	239
CIDCA8344	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	239
CIDCA8310	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	239
CIDCA8343	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	239
CIDCA8321	TGTANDGTQVYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIAATDS	238
CIDCA8345	TGTANDGTQVYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIAATDS	238
CIDCA8348	TGTANDGTQVYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIAATDS	238
CIDCA83115	TGTANDGTQVYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIAATDS	238
CIDCA8347	TGTANDGTQVYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIAATDS	238
JCM5818	AGTANDGTATTYTPAWTEYKGRVITDSTPYKDATFKITDQTVRTREGDLWVKIADTNA	238
CIDCA8326	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	239
CIDCA8314	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	238
CIDCA8315	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA	238
CIDCA83111	AGTANDGTATTYTPAWTEYRKGRTVTDATPYANDTFKVTDTQTRTREGDLWVKIADTNA :*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*	238

Figura 1.6: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas de capa S de dieciséis cepas de *L. kefir*. Programa utilizado: Clustal O(1.2.4). *posiciones donde existe un único residuo conservado entre todas las cepas, `residuos conservados de propiedades fuertemente similares entre grupos, `residuos conservados de débiles características similares.

CIDCA8335	TNGQKINGWIKYSALTAQKPTAPAP--APIADNQVQVTLHDVYTNKDLGSFLLNKATAD	296
CIDCA83113	TNGQKINGWIKYSALTAQKPTAPAP--APIADNQVQVTLHDVYTNKDLGSFLLNKATAD	296
CIDCA8332	TNGQKINGWIKYSALTAQATTP--TTPTQTPVASNAIRLNFVDQSGKSI--ATLDYTKAGTN	297
CIDCA8344	TNGQKINGWIKYSALTATHQTPATT--TPVADNAVVRVNFVDASGKSI--ATLDYVKA--N	294
CIDCA8310	TNGQKINGWIKYSALTATDQTPAKTPAKTPVADNAVLLNFVDASGKTI--KTVTYTKA--N	296
CIDCA8343	TNGQKINGWIKYSALTATDQTPAKTPAKTPVADNAVLLNFVDASGKTI--KTVTYTKA--N	296
CIDCA8321	AN-AKANGWIKFSALKVATPAPTT----TPVADNAVVRINFNDPSGKQI--ATLDYVKS--N	290
CIDCA8345	AN-AKANGWIKFSALKVATPAPTT----TPVADNAVVRINFNDPSGKQI--ATLDYVKS--N	290
CIDCA8348	AN-AKANGWIKFSALKVATPAPTT----TPVADNAVVRINFNDPSGKQI--ATLDYVKS--N	290
CIDCA83115	AN-AKANGWIKFSALKVATPAPTT----TPVADNAVVRINFNDPSGKQI--ATLDYVKS--N	290
CIDCA8347	AN-AKANGWIKFSALKVATPAPTT----TPVADNAVVRINFNDPSGKQI--ATLDYVKS--N	290
JCM5818	TNGQKINGWIKFSALTAQNPTAP--APIADNAVRLNFIDSQGKTV--KSIDYVKT--G	291
CIDCA8326	TNGQKINGWIKYSALTATAQTPATTP--TPVADNAVVRVTVFVDASGKQVSKSFDYAKT--G	296
CIDCA8314	TNGQKINGWIKYSALTATAQTPATTP--TPVADNAVVRVTVFVDASGKQVSKSFDYAKT--G	295
CIDCA8315	TNGQKINGWIKYSALTATAQTPATTP--TPVADNAVVRVTVFVDASGKQVSKSFDYAKT--G	295
CIDCA83111	TNGQKINGWIKYSALTATAQTPATTP--TPVADNAVVRVTVFVDASGKQVSKSFDYAKT--G	295
	:* * *****:***. . :* :*:.* : :. : * : :. :* : .	
CIDCA8335	-----LNANV--TIAHAV--NIDPAADINNSLVALGQAHNVRGYSVSG	335
CIDCA83113	-----LNANV--TIAHAV--NINPAADINNSLVALGQAHNVRGYSVSG	335
CIDCA8332	VQKGTAFGELKADP----SKAIYTWQITDSNALSDELTKINNALAGTYGFDISNDSVAN	353
CIDCA8344	AKKGDITFGSLQVNS----NNTGYTWKFDSTTNVADFQSKIDAALKGTGYAFDVNTN----	346
CIDCA8310	AKKGDITFGSLQVNS----GTSNYAWALSSTD--QSAIQNAIDSALSGTGYSFDLSNT----	347
CIDCA8343	AKKGDITFGSLQVNS----GTSNYAWALSSTD--QSAIQNAIDSALSGTGYSFDLSNT----	347
CIDCA8321	AAKGTLLGSLQPVKNAAGNITGYQWQLDS--S--TSDLQAKVDAALHGTGYAFNVQNN----	344
CIDCA8345	AAKGTLLGSLQPVKNAAGNITGYQWQLDS--S--TSDLQAKVDAALHGTGYAFNVQNN----	344
CIDCA8348	AAKGTLLGSLQPVKNAAGNITGYQWQLDS--S--TSDLQAKVDAALHGTGYAFNVQNN----	344
CIDCA83115	AAKGTLLGSLQPVKNAAGNITGYQWQLDS--S--TSDLQAKVDAALHGTGYAFNVQNN----	344
CIDCA8347	AAKGTLLGSLQPVKNAAGNITGYQWQLDS--S--TSDLQAKVDAALHGTGYAFNVQNN----	344
JCM5818	AKKGDITFGSLTGPKT--GTQDNF SWTLTKVV--ADDLQSKIDNALSGTGYSFNVSOY----	344
CIDCA8326	AAKGTLLGTLST-----VDGSYQWTLTDAQ--KSDLKALINTALDGTGYSFDLNNT----	345
CIDCA8314	AAKGTLLGTLST-----VDGSYQWTLTDAQ--KSDLKALINTALDGTGYSFDLNNT----	344
CIDCA8315	AAKGTLLGTLST-----VDGSYQWTLTDAQ--KSDLKALINTALDGTGYSFDLNNT----	344
CIDCA83111	AAKGTLLGTLST-----VDGSYQWTLTDAQ--KSDLKALINTALDGTGYSFDLNNT----	344
	: : : * . * . . . :	
CIDCA8335	LTDAQSANQTAQFQASASYGKINVTFNVTSVKGTSLFADKTKV-----	376
CIDCA83113	LTDAQSANQTAQFQASASYGKINVTFNVTSVKGTSLFADKTKV-----	376
CIDCA8332	-----KANQSVVAQAKTGET--TNLSLVKGDVTFQKLVQNTYATTDGNA--KAQLATD	402
CIDCA8344	-----ANNQAVIAQAKTGST--VNVVALSKGNTVYQQLSPYAHDTTATNPSTAGDKLTAT	398
CIDCA8310	-----A-NQSVVAQAKTGEA--INVTLTKGATVYQQMAAYSSDITGTFNGG--VLAN-	394
CIDCA8343	-----A-NQSVVAQAKTGEA--INVTLTKGATVYQQMAAYSSDITGTFNGG--VLAN-	394
CIDCA8321	-----QSVLAQSKTGST--ITLSIAKGDVTVYQTLTPTAYNIKTQGGQAQ-----S	386
CIDCA8345	-----QSVLAQSKTGST--ITLSIAKGDVTVYQTLTPTAYNIKTQGGQAQ-----S	386
CIDCA8348	-----QSVLAQSKTGST--ITLSIAKGDVTVYQTLTPTAYNIKTQGGQAQ-----S	386
CIDCA83115	-----QSVLAQSKTGST--ITLSIAKGDVTVYQTLTPTAYNIKTQGGQAQ-----S	386
CIDCA8347	-----QSVLAQSKTGST--ITLSIAKGDVTVYQTLTPTAYNIKTQGGQAQ-----S	386
JCM5818	-----PSTLAQAQTKGAE--VSLPVTKGDVYVYQTLKPYVATKDDVTSTH-----S	386
CIDCA8326	-----ANAAALQAQKTGAE--TKIAVTKGSIVYQQLTPYAQTSASDTSIT-----A	389
CIDCA8314	-----ANAAALQAQKTGAE--TKIAVTKGSIVYQQLTPYAQTSASDTSIT-----A	388
CIDCA8315	-----ANAAALQAQKTGAE--TKIAVTKGSIVYQQLTPYAQTSASDTSIT-----A	388
CIDCA83111	-----ANAAALQAQKTGAE--TKIAVTKGSIVYQQLTPYAQTSASDTSIT-----A	388
	:. . . : * . : : ** :	
CIDCA8335	---LPGIVANNNITDG-----SNGAFSPAGTDYVEVNGTLEQAN--	413
CIDCA83113	---LPGIVANNNITDG-----LNGAFSPAGTDYVEVNGTLEQAN--	413
CIDCA8332	TASR-----AKQDDVAVGKLPTSLFQKVDLPDKTALPTKSSITLDS-----	445
CIDCA8344	SAISPNRAVFTGIPNQF---IQVPAATDIDKNGLT--SAFPVDSLNIITLTSGLDIAALQ	453
CIDCA8310	---PMSNIAADAHNNQVAAGKTATVTKDTANGLN--ADFTFDMTKLLDEKGNANTTAIK	448
CIDCA8343	---PMSNIAADAHNNQVAAGKTATVTKDTANGLN--ADFTFDMTKLLDEKGNANTTAIK	448
CIDCA8321	LKPNPASVV--NTKISKSVLSTKVP-----ADT--TNGTPELDLSLLIDANGA-----	430
CIDCA8345	LKPNPASVV--NTKISKSVLSTKVP-----ADT--TNGTPELDLSLLIDANGA-----	430
CIDCA8348	LKPNPASVV--NTKISKSVLSTKVP-----ADT--TNGTPELDLSLLIDANGA-----	430
CIDCA83115	LKPNPASVV--NTKISKSVLSTKVP-----ADT--TNGTPELDLSLLIDANGA-----	430
CIDCA8347	LKPNPAS--V--NTKISKSVLSTKVP-----ADT--TNGTPELDLSLLIDANGA-----	429
JCM5818	--LTPNSK--SAGAFFKGSFDEGEGP-----KATHIDISQLVHTDSDGKVTDHT	431
CIDCA8326	SKMSPAIANTKNDSVYQGEVNVKQDT-----DNKL--PVGGFTLKLSDFVNADGTFQKDDFK	443
CIDCA8314	SKMSPAIANTKNDSVYQGEVNVKQDT-----DNKL--PVGGFTLKLSDFVNADGTFQKDDFK	442
CIDCA8315	SKMSPAIANTKNDSVYQGEVNVKQDT-----DNKL--PVGGFTLKLSDFVNADGTFQKDDFK	442
CIDCA83111	SKMSPAIANTKNDSVYQGEVNVKQDT-----DNKL--PVGGFTLKLSDFVNADGTFQKDDFK	442

Figura 1.6 (continuación): Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas de capa S de dieciséis cepas de *L. kefir*. Programa utilizado: Clustal O(1.2.4). *posiciones donde existe un único residuo conservado entre todas las cepas, ·residuos conservados de propiedades fuertemente similares entre grupos, ·residuos conservados de débiles características similares.

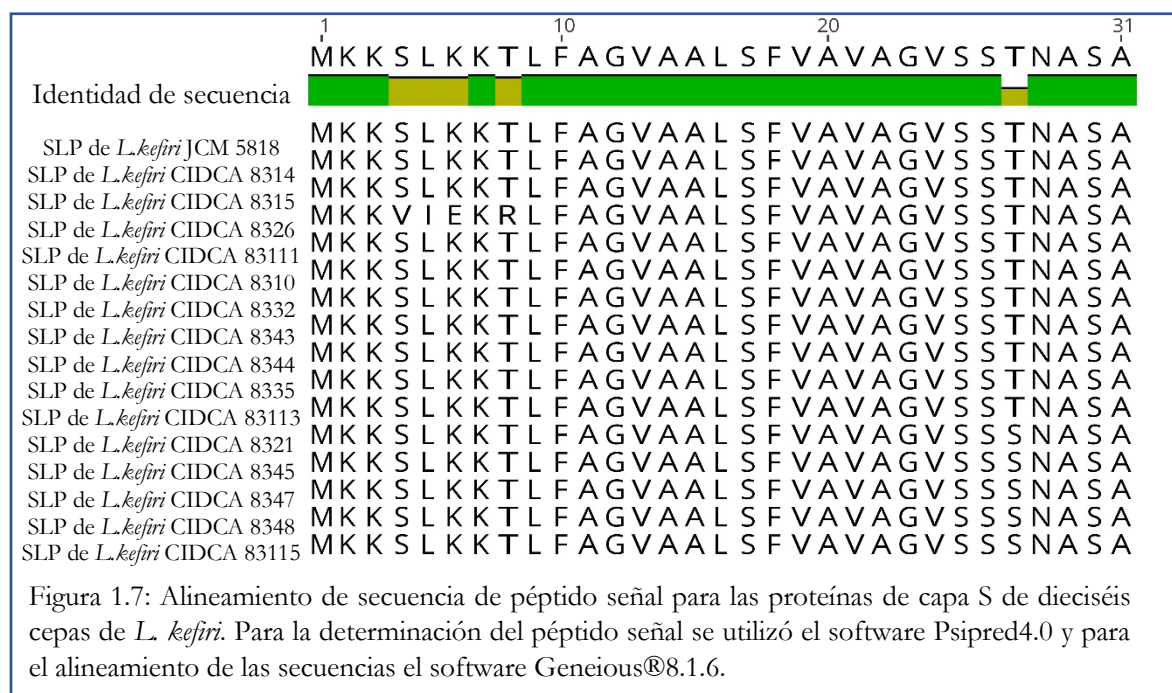
CIDCA8335	-----DLADS-----	418
CIDCA83113	-----DLADS-----	418
CIDCA8332	-----STIDANGALIGST---VKTAVAKAITDGTSLLEEVNNAIEAAAAKYVAPA	492
CIDCA8344	KVYTDLLAALTAQ-----KDSTSDTYKTRGTDLNNAIKAKAASKYVAPA	497
CIDCA8310	TALNNLLAGKQSDGTG-SIGEDLSADVSADATKSAEKTQRVDFNKAIKAASQTFITPA	507
CIDCA8343	TALNNLLAGKQSDGTG-SIGEDLSADVSADATKSAEKTQRVDFNKAIKAASQTFITPA	507
CIDCA8321	----QTNPLKKT-VADYVGT-----DSTQQAKKLQAINDAVATEAAKYVAPIA	473
CIDCA8345	----QTNPLKKT-VADYVGT-----DSTQQAKKLQAINDAVATEAAKYVAPIA	473
CIDCA8348	----QTNPLKKT-VADYVGT-----DSTQQAKKLQAINDAVATEAAKYVAPIA	473
CIDCA83115	----QTNPLKKT-VADYVGT-----DSTQQAKKLQAINDAVATEAAKYVAPIA	473
CIDCA8347	----QTNPLKKT-VADYVGT-----DSTQQAKKLQAINDAVATEAAKYVAPIA	472
JCM5818	NS-----LPT-VKAYIDSVAA-----SDKDAALTSLNNTVKVYAANYLAPA	472
CIDCA8326	DALGTTKPGFKTT-VSNYLNVDTTGKDKTTTSAEVKAARVQDLNNAFATAATTSYIAPA	502
CIDCA8314	DALGTTKPGFKTT-VSNYLNVDTTGKDKTTTSAEVKAARVQDLNNAFATAATTSYIAPA	501
CIDCA8315	DALGTTKPGFKTT-VSNYLNVDTTGKDKTTTSAEVKAARVQDLNNAFATAATTSYIAPA	501
CIDCA83111	DALGTTKPGFKTT-VSNYLNVDTTGKDKTTTSAEVKAARVQDLNNAFATAATTSYIAPA	501
	. . .:	
CIDCA8335	-IAKLGTLYGSNGQTFSGSSVEKAINDANLGTIYFAKNAAGTILSKDQLNALSANSTVNI	477
CIDCA83113	-IAKLGTLYGSNGQTFSGSSVEKAINDANLGTIYFAKNAAGTILSKDQLNALSANSTVNI	477
CIDCA8332	SLNATDLFGGSRNASFSGTDVMM-----YLAKHTTLQT	525
CIDCA8344	NLNVTDLFSGTQGSFSGNDVMT-----YLNKGASLKT	530
CIDCA8310	NLTAADLFSGNQGSYTGTDALN-----FINSRNLKA	540
CIDCA8343	NLTAADLFSGNQGSYTGTDALN-----FINSRNLKA	540
CIDCA8321	NLQATDLFSGSKGSSFSANDVMT-----YINKHSNLQT	506
CIDCA8345	NLQATDLFSGSKGSSFSANDVMT-----YINKHSNLQT	506
CIDCA8348	NLQATDLFSGSKGSSFSANDVMT-----YINKHSNLQT	506
CIDCA83115	NLQATDLFSGSKGSSFSANDVMT-----YINKHSNLQT	506
CIDCA8347	NLQATDLFSGSKGSSFSANDVMT-----YINKHSNLQT	505
JCM5818	NINPSDLFSGTRGSFAFSSQDVLN-----YLAKHSTLNT	505
CIDCA8326	NLSFTDLFSGNNGATYSRNDVAN-----YINGKAQLKT	535
CIDCA8314	NLSFTDLFSGNNGATYSRNDVAN-----YINGKAQLKT	534
CIDCA8315	NLSFTDLFSGNNGATYSRNDVAN-----YINGKAQLKT	534
CIDCA83111	NLSFTDLFSGNNGATYSRNDVAN-----YINGKAQLKT	534
	: . . : * . . . : : . . . : . . . :	
CIDCA8335	VKATLSGVN-----NAYTVGSNPTFSGQYTLNVKNNVIYDKASTLA---SQFAK--	523
CIDCA83113	VKATLSGVN-----NAYTVGSNPTFSGQYTLNVKNNVIYDKASTLA---SQFAK--	523
CIDCA8332	LKSGIYVPVFDKGNIDHFAQLTLNAKNAFGGTFGQQSPVSVVYSYD--APVK-VTFPTAT	582
CIDCA8344	LKSAAYPVFDNNGTV-TWKQFTFTASSANSFGTTPVQVV-YNFNFSNPTLTSGFPAKT	588
CIDCA8310	LKSGAYPVVTVDGTVSGWYEFNLSAASANGGTFGAGKTQVV-YNFNSTNPIKLDAPPTSV	599
CIDCA8343	LKSGAYPVVTVDGTVSGWYEFNLSAASANGGTFGAGKTQVV-YNFNSTNPIKLDAPPTSV	599
CIDCA8321	LNSPVYVFNADGSVAHWQAQFKFTAQTAYAGSFGQTAPVNVLYSYDP--STAVTT----	559
CIDCA8345	LNSPVYVFNADGSVAHWQAQFKFTAQTAYAGSFGQTAPVNVLYSYDP--STAVTT----	559
CIDCA8348	LNSPVYVFNADGSVAHWQAQFKFTAQTAYAGSFGQTAPVNVLYSYDP--STAVTT----	559
CIDCA83115	LNSPVYVFNADGSVAHWQAQFKFTAQTAYAGSFGQTAPVNVLYSYDP--STAVTT----	559
CIDCA8347	LNSPVYVFNADGSVAHWQAQFKFTAQTAYAGSFGQTAPVNVLYSYDP--STAVTT----	558
JCM5818	LKSAIYVFNADGTVKEWDQLNLNATNSANGTFFGSS-PVQVYTYGD--GSAVS-DPFQJ	561
CIDCA8326	LKSSVYVVDSDGNA-TFNQYTFNFSANGGTFGSG-ATRVVYTYGD--PATNVNYPTKT	591
CIDCA8314	LKSSVYVVDSDGNA-TFNQYTFNFSANGGTFGSG-ATRVVYTYGD--PATNVNYPTKT	590
CIDCA8315	LKSSVYVVDSDGNA-TFNQYTFNFSANGGTFGSG-ATRVVYTYGD--PATNVNYPTKT	590
CIDCA83111	LKSSVYVVDSDGNA-TFNQYTFNFSANGGTFGSG-ATRVVYTYGD--PATNVNYPTKT	590
	::: * . . . : . . . : * * :	
CIDCA8335	-----	523
CIDCA83113	-----	523
CIDCA8332	TNNGFSPLA-----	591
CIDCA8344	TPGTTNPF-----	597
CIDCA8310	TSNSVTPF-----	607
CIDCA8343	TSNSVTPF-----	607
CIDCA8321	---ALPTYSPTGYNPFA	573
CIDCA8345	---ALPTYSPTGYNPFA	573
CIDCA8348	---ALPTYSPTGYNPFA	573
CIDCA83115	---ALPTYSPTGYNPFA	573
CIDCA8347	---ALPTYSPTGYNPFA	572
JCM5818	NGSSVNPLTPVPLTPLQ	578
CIDCA8326	VSTTVSPFN-----	600
CIDCA8314	VSTTVSPFN-----	599
CIDCA8315	VSTTVSPFN-----	599
CIDCA83111	VSTTVSPFN-----	599

Figura 1.6 (continuación): Alineamiento de secuencias de aminoácidos de proteínas de capa S de dieciséis cepas de *L. kefir*. Programa utilizado: Clustal O(1.2.4). *posiciones donde existe un único residuo conservado entre todas las cepas, †residuos conservados de propiedades fuertemente similares entre grupos, ‡residuos conservados de débiles características similares.

Respecto a la secuencia completa de las 16 proteínas de capa S analizadas, cabe destacar que las secuencias de aminoácidos de las proteínas pertenecientes a las cinco cepas agregantes (*L. kefir* CIDCA 8321, 8345, 8347, 8348 y 83115) muestran un 100% de identidad de secuencia, aunque esas cepas se aislaron a partir de diferentes gránulos de kefir (MyM, Tabla M.1). Estas observaciones, junto con algunas similitudes encontradas en las proteínas de capa S de cepas no agregantes nos permitieron agrupar las cepas estudiadas a partir de las secuencias aminoacídicas de la siguiente manera: *L. kefir* CIDCA 8321, 8345, 8347, 8348 y 83115 (grupo I); *L. kefir* CIDCA 8314, 8315, 8326 y 83111 (grupo II); *L. kefir* CIDCA 8310, 8332, 8343 y 8344 (grupo III); *L. kefir* CIDCA 8335 y 83113 (grupo IV); y *L. kefir* JCM 5818 (grupo V), coincidiendo así con los grupos antes mencionados (Figuras 1.2 y 1.6).

Como puede observarse en la Figura 1.7, todas las proteínas comienzan con un péptido líder predicho de 31 unidades para la translocación de la membrana, que muestra la misma secuencia de aminoácidos en la mayoría de las cepas analizadas, con la excepción del residuo 27, donde una treonina presente en las cepas no agregantes se cambia por una serina en las cepas agregantes. La cepa *L. kefir* CIDCA 8326 presenta diferencias en los residuos 4 a 6. Además, la secuencia de todos los péptidos señal incluye el motivo A-X-A que precede al sitio de escisión para las peptidasas tipo I que se encuentran comúnmente en las bacterias Gram positivas (van Roosmalen et al. 2004). Las similitudes observadas entre las proteínas de capa S de *L. kefir* y las de *L. buchneri*, *L. parafarraginis*, *L. farraginis*, *L. otakiensis* y *L. kisonensis* entre otros, se correlacionan con la relación filogenética que existe entre estas especies de lactobacilos (Sun et al. 2015). Curiosamente, los análisis de similitud de las secuencias proteicas utilizando la herramienta bioinformática BLAST mostraron que hay casi un 100% de identidad en los péptidos líderes previstos entre las especies

filogenéticamente relacionadas tales como *L. parakefiri*, *L. buchneri*, *L. parabuchneri*, *L. parafarraginis*, *L. farraginis*, *L. sunkii*, *L. kisonensis* y *L. otakiensis*. Adicionalmente, el cambio de treonina a serina en el residuo 27 también fue observado en los péptidos líderes predichos de las proteínas de capa S de las cepas *L. buchneri* CD034 y NRRL B-30929, respectivamente.



La longitud total de las proteínas maduras varía de 492 a 576 aminoácidos, siendo las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8335 y 83113 las más cortas y la proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8310 y 8343 los polipéptidos más largos. Como se esperaba, la cisteína está ausente en todas las proteínas de capa S de *L. kefir* analizadas aquí, y los porcentajes de aminoácidos hidrófobos e hidroxilados varían de 34,9 a 38,4% y de 24,6 a 29,2%, respectivamente, entre las cepas (Tabla 1.4). La cantidad de residuos de aminoácidos cargados positivamente oscila entre 9.5 y 10.5% y siempre es mayor que la cantidad de residuos cargados negativamente (5.7-7.3%), lo que lleva a un punto isoelectrónico calculado entre 9.37 y 9.60 (Tabla 1.4). Todos estos resultados son similares a

los informados para otras proteínas de capa S de lactobacilos (Avall-Jääskeläinen y Palva 2005; Wásko et al. 2014), y solo hay pequeñas diferencias entre las cepas agregantes y no agregantes.

Tabla 1.4: Composición de aminoácidos de las proteínas de capa S de *L. kefir*. Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Lys: lisina; Arg: arginina

Proteína de capa S	PM calculado (kDa)	Longitud (total aminoácidos)	pI	% Asp-Glu	%Arg-Lys	% aminoácidos hidrofóbicos	% aminoácidos con grupos hidroxilos
JCM 5818	57,665	547	9,37	7,3	9,8	36,5	24,6
CIDCA 8314	59,913	568	9,55	6,9	10,6	34,9	29,2
CIDCA 8315	59,446	566	9,67	5,7	9,5	36,6	29,1
CIDCA 8326	59,924	568	9,49	7,1	10,4	35,1	29,4
CIDCA 83111	59,939	568	9,52	7,1	10,6	34,9	29,2
CIDCA 8310	59,974	576	9,50	6,8	9,7	36,6	27,1
CIDCA 8332	58,913	561	9,52	6,9	10,1	36,6	27,3
CIDCA 8343	59,958	564	9,53	6,6	9,7	36,5	26,9
CIDCA 8344	58,446	566	9,67	5,7	9,5	36,0	29,1
CIDCA 8335	51,464	492	9,53	6,3	9,5	36,9	26,6
CIDCA 83113	51,490	492	9,57	6,1	9,5	37,1	26,4
CIDCA 8321	57,039	542	9,60	5,7	9,6	38,4	27,9
CIDCA 8345	57,039	542	9,60	5,7	9,6	38,4	27,9
CIDCA 8347	57,039	542	9,60	5,7	9,6	38,4	27,9
CIDCA 8348	57,039	542	9,60	5,7	9,6	38,4	27,9
CIDCA 83115	57,039	542	9,60	5,7	9,6	38,4	27,9

Al comparar las regiones N- y C-terminal de las proteínas de capa S de *L. kefir*, se encontraron algunas diferencias con respecto a su composición de aminoácidos (Tabla 1.5) y también respecto a la identidad de secuencia entre las cepas (Figura 1.6). En la región N-terminal de las proteínas, el porcentaje de aminoácidos cargados positivamente es casi 2,5 veces más alto que el porcentaje de residuos cargados negativamente, lo que se correlaciona con sus altos valores de pI predichos. Además, la región N-terminal de las proteínas de capa S de *L. kefir* muestra una alta identidad de secuencia entre las cepas estudiadas, lo que

se mantiene incluso cuando se comparan las secuencias obtenidas en este trabajo con aquellas descritas para cepas del *cluster* *L. buchneri*, cepas filogenéticamente relacionadas con *L. kefir* (Figura 1.2)

Por otro lado, la región C-terminal se comporta de manera muy diferente. Los aminoácidos con carga positiva y negativa se distribuyen casi por igual a lo largo de esta región y aparecen en porcentajes muy similares en todas las proteínas de capa S analizadas (Tabla 1.5). Curiosamente, la región C-terminal de las proteínas contiene las principales diferencias en la secuencia de aminoácidos entre todas las cepas estudiadas aquí. Este comportamiento de regiones conservadas dentro de proteínas de capa S entre cepas del mismo género también se describió para *L. acidophilus*, *L. crispatus* y *L. helveticus*, aunque en ellas la zona C-terminal muestra la mayor similitud de secuencia (Aval-Jääskeläinen y Palva 2005).

Tabla 1.5: Composición de aminoácidos de regiones N- y C-terminales de las proteínas de capa S de *L. kefir*. Asp: ácido aspártico; Glu: ácido glutámico; Lys: lisina; Arg: arginina

Proteína de capa S	N-terminal				C-terminal			
	Longitud (total aa)	pI	% Asp-Glu	% Arg-Lys	Longitud (total aa)	pI	% Asp-Glu	% Arg-Lys
JCM 5818	224	10,02	5,3	13,9	323	5,47	8,6	7,1
CIDCA 8314	224	10,02	5,3	13,8	344	8,41	8,2	8,9
CIDCA 8315	224	10,02	5,3	13,8	344	7,58	8,2	8,4
CIDCA 8326	224	10,02	5,3	13,8	344	6,23	8,2	8,2
CIDCA 83111	224	10,02	5,3	13,8	344	7,58	8,2	8,5
CIDCA 8310	225	10	5,3	13,3	351	5,86	7,7	7,4
CIDCA 8332	225	10,05	4,9	13,3	336	6,17	8,3	8,2
CIDCA 8343	225	10,05	4,9	13,3	339	5,86	7,7	7,4
CIDCA 8344	225	10,05	4,9	13,3	341	8,83	6,2	7,1
CIDCA 8335	224	9,94	5,8	13,4	268	6,32	6,7	6,4
CIDCA 83113	224	9,94	5,8	13,4	268	7,02	6,3	6,4
CIDCA 8321	223	10,02	5,3	13,9	319	8,52	5,9	6,6
CIDCA 8345	223	10,02	5,3	13,9	319	8,52	5,9	6,6
CIDCA 8347	223	10,02	5,3	13,9	319	8,52	5,9	6,6
CIDCA 8348	223	10,02	5,3	13,9	319	8,52	5,9	6,6
CIDCA 83115	223	10,02	5,3	13,9	319	8,52	5,9	6,6

Todas las proteínas de capa S de *L. kefir* descritas aquí comparten algunas características específicas con las mismas proteínas de otros lactobacilos, como la ausencia de cisteínas y una mayor proporción de residuos cargados positivamente (Avall-Jääskeläinen y Palva 2005; Hynönen y Palva 2013; Wásko et al. 2014). Estas propiedades dan como resultado la ausencia de enlaces disulfuro intra-catenarios y también un alto punto isoeléctrico predicho, comparable a las proteínas de capa S de otros lactobacilos.

Aunque la mayoría de las proteínas de capa S de lactobacilos se informan como no glicosiladas (Hynönen y Palva 2013), la aparición de glicosilación como una modificación postraducciona ha sido informada previamente por nuestro grupo, para las proteínas de capa S de doce cepas de *L. kefir* (Mobili et al. 2009b). En este sentido, todas las proteínas de capa S de *L. kefir* muestran al menos un sitio de O-glicosilación ubicado en la región N-terminal de las proteínas, que también se ha descrito en las proteínas de capa S de *L. buchneri* 41021/251 (Möschl et al. 1993), *L. buchneri* CD034 y NRRLB-30929 (Anzengruber et al. 2014). Esto concuerda con otras similitudes observadas a nivel de secuencia primaria entre las proteínas de capa S que pertenecen a las especies de *L. kefir* y *L. buchneri*.

La mayoría de las proteínas de capa S muestran dos regiones estructurales, una región involucrada en la unión a pared bacteriana y una región involucrada en el ensamblaje de la capa S. Estas regiones se han caracterizado al menos para siete proteínas de diferentes cepas de lactobacilos pertenecientes a las especies de *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. brevis* y *L. hilgardii* (Hynönen y Palva 2013). La región C-terminal de las proteínas de capa S de *L. acidophilus* y *L. crispatus*, y la región N-terminal de las proteínas de capa S de *L. brevis* y *L. hilgardii* son la parte más conservada de las proteínas y son responsables del anclaje sobre la célula bacteriana. Por otro lado, la parte más variable de la proteína parece estar involucrada en el autoensamblaje de los monómeros de las proteínas de capa S en la superficie bacteriana (Smit et al. 2001; Antikainen et al. 2002; Ävall-Jääskeläinen et al. 2008; Dohm et al. 2011; Hu et al. 2011; Sun et al. 2013). Estos hallazgos, junto con la ausencia de investigaciones realizadas en especies de lactobacilos filogenéticamente más relacionadas con *L. kefir*, ponen de relieve la necesidad de estudios adicionales que utilicen proteínas truncadas para caracterizar estas regiones en las proteínas de capa S de cepas agregantes y no agregantes de *L. kefir*.

Nuestros resultados muestran que, a diferencia de la alta identidad a nivel de secuencia de aminoácidos observada en la región N-terminal de las proteínas de capa S entre las cepas de *L. kefir*, la parte C-terminal de las proteínas muestra diferencias más evidentes entre las cepas. Sin embargo, incluso al concentrarnos solo en los fragmentos GWIY-f/TREG-r ubicados en las regiones N-terminales de todas las proteínas estudiadas, algunas diferencias particulares nos permitieron distinguir cinco grupos diferentes entre nuestras cepas: un grupo constituido por las cepas agregantes (grupo I), y los otros cuatro grupos que contienen todas las cepas no agregantes (grupos II a V). Estos grupos también se pueden distinguir en base a las secuencias de aminoácidos completas de las proteínas de capa S de dieciséis cepas representativas (Figura 1.6). Cabe señalar que el análisis de las similitudes observadas en los espectros PMF (Figura 1.1) nos permitió extender esta clasificación a todas las proteínas de capa S de *L. kefir* estudiadas aquí, y los resultados fueron consistentes con los provenientes de los análisis de secuenciación. Curiosamente, las proteínas de capa S de las cinco cepas agregantes (*L. kefir* CIDCA 8321, 8345, 8347, 8348 y 83115) comparten la misma secuencia de aminoácidos, aunque las cepas se aislaron de una fuente natural diferente (gránulos de kefir AGK2 (8321) AGK4(8345, 8347, 8348) y AGK1(83115)). Este resultado sugiere fuertemente que algunas características estructurales comunes de estas proteínas podrían ser responsables, al menos en parte, de la capacidad agregativa de la bacteria entera. Se necesitarán más estudios para dilucidar los dominios específicos de las proteínas de capa S involucrados en este fenómeno.

Dado que los monómeros que forman las proteínas de capa S tienden a autoensamblarse cuando están en solución, los métodos usualmente utilizados para el análisis estructural de alta resolución, como la cristalografía de rayos X, no son fácilmente aplicables a estas proteínas. Es por ello, que la información disponible sobre la disposición

espacial de los dominios de estructura secundaria en las proteínas de capa S es escasa (Pavkov-Keller et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, se realizó una predicción de la estructura secundaria de la proteína de capa S de *L. kefir* utilizando el software Psipred (Tabla 1.2). No hay grandes diferencias entre las cepas, excepto para las proteínas de las cepas *L. kefir* CIDCA 8335 y CIDCA 83113 que mostraron un mayor porcentaje de α -hélice y menor porcentaje de espiral al azar que las otras proteínas. Nuestros resultados son similares a los obtenidos para las proteínas de capa S de *L. buchneri* CD034 utilizando el mismo software. Por otro lado, no se observaron diferencias en el contenido de la hoja β entre cepas agregantes y no agregantes, en desacuerdo con los resultados reportados previamente por Mobili y col. (2009), quienes habían utilizado espectroscopia FTIR para el estudio de las proteínas de capa S de las cepas CIDCA 8321, 8344, 8348, 83113 y JCM 5818. Esta discrepancia podría explicarse teniendo en cuenta que los residuos de glicanos (que no fueron incluidos en nuestro análisis predictivo) podrían influir en la estructura secundaria de toda la proteína.

Tabla 1.6: Predicción estructura secundaria de proteínas de capa S de *L. kefir*

Proteína de capa S	Estructura secundaria		
	% α -hélice	% hoja β	% espiral al azar
JCM 5818	11,6	28,20	60,20
CIDCA 8314	11,00	28,55	60,45
CIDCA 8315	11,97	24,11	63,92
CIDCA 8326	11,79	24,11	64,10
CIDCA 83111	11,00	27,90	61,10
CIDCA 8310	10,70	25,20	64,10
CIDCA 8332	9,80	24,95	65,25
CIDCA 8343	11,00	24,90	64,10
CIDCA 8344	12,72	21,90	65,38
CIDCA 8335	14,15	26,96	58,89
CIDCA 83113	15,30	28,88	55,82
CIDCA 8321	10,00	29,60	60,40
CIDCA 8345	10,00	29,60	60,40
CIDCA 8347	10,00	29,60	60,40
CIDCA 8348	10,00	29,60	60,40
CIDCA 83115	10,00	29,60	60,40

Conclusiones

El objetivo de esta sección fue secuenciar el o los genes que codifican para las proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir*. Utilizando abordajes proteómicos y genómicos, se pudieron determinar las secuencias de aminoácidos de las glicoproteínas de capa S de 16 cepas de *L. kefir*, y las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para dichas proteínas.

La longitud total de las proteínas maduras varía de 492 a 576 aminoácidos, siendo las proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8335 y 83113 las más cortas y la proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8310 y 8343 los polipéptidos más largos. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas pertenecientes a las cinco cepas agregantes (*L. kefir* CIDCA 8321, 8345, 8347, 8348 y 83115) muestran un 100% de identidad de secuencia aunque esas cepas se aislaron a partir de diferentes gránulos de kefir. En todas las proteínas, la cantidad de residuos de aminoácidos cargados positivamente siempre es mayor que la cantidad de residuos cargados negativamente, lo que lleva a un punto isoeléctrico calculado entre 9.37 y 9.60.

La región N-terminal está relativamente conservada entre las cepas, mostrando una baja variabilidad de secuencia dentro de las especies en esta porción de las proteínas de capa S. En esta zona, todas las proteínas presentaron una zona de O-glicosilación descrita previamente las proteínas de capa S de *L. buchneri* 41021/251 (Möschl et al. 1993), *L. buchneri* CD034 y NRRLB-30929 (Anzengruber et al. 2014).

Con el fin de analizar más en detalle la funcionalidad biológica de las regiones N- y C-terminal de las proteínas de capa S de *L. kefir*, se vuelve necesaria la realización de estudios utilizando proteínas truncadas, de manera de obtener información respecto a las

zonas involucradas en el anclaje a la pared bacteriana y en el ensamblaje de los monómeros proteicos. De la misma manera, la secuenciación de los genomas de las cepas pertenecientes a cepas de *L. kefir* de nuestra colección de microorganismos, nos permitirá obtener información respecto a la posibilidad de que exista más de un gen que codifique para estas proteínas, como sucede en *L. kefir* JCM 5818.

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de capa S de diferentes cepas de *L. kefir* proporciona información relevante tanto para una mejor comprensión de los mecanismos implicados en la funcionalidad de estas proteínas, así como también contribuye al desarrollo de productos de interés biotecnológico a partir de bacterias ácido lácticas.

Capítulo 2: Estructura de azúcares de
proteínas de capa S de *L. kefir*

Introducción

La habilidad de modificar proteínas por el agregado de carbohidratos, proceso denominado glicosilación, fue considerada una propiedad exclusiva de las células eucariotas hasta la aparición de estudios sobre proteínas de capa S, que fueron las primeras glicoproteínas descritas en procariontes (Mescher et al. 1974, Sleytr et al. 1976, Schaffer et al. 2004).

En forma similar a lo que ocurre en eucariotas, la unión de los azúcares a las proteínas bacterianas se puede dar de dos maneras diferentes: N- u O-glicosilación. En la primera, los oligosacáridos se unen al nitrógeno amida de la cadena lateral de la asparagina (Asn) dentro de la secuencia de consenso Asn-Xxx-Ser/Thr (AXS/T), en la que Xxx es cualquier aminoácido, excepto la prolina. En la O-glicosilación, los oligosacáridos están unidos al oxígeno hidroxilo de las cadenas laterales de serina (Ser) o treonina (Thr) (Han y Costelo, 2013). Sin embargo, en contraste a lo que ocurre en la glicosilación de los eucariotas, donde los N-glicanos son preensamblados en un *carrier* lipídico antes de ser transferidos a la proteína aceptora y los O-glicanos se sintetizan directamente en las proteínas aceptoras, la glicosilación en bacterias es más diversa, tanto en los mecanismos de glicosilación como en las estructuras de los carbohidratos descritas (Latousakis and Juge, 2018).

La caracterización estructural de los glicanos no solo contribuye a determinar el rol funcional que los carbohidratos puedan tener en una glicoproteína, sino que es un paso fundamental para el diseño y obtención de glicoconjugados con funciones definidas (glicoingeniería). Durante mucho tiempo se han utilizado lectinas para reconocer motivos de carbohidratos en distintas proteínas, y a través de esta interacción poder aislar

glicoconjugados de una muestra compleja. Una de las principales ventajas del uso de las lectinas para el análisis de glicanos es la diversidad de motivos de carbohidratos que estas moléculas son capaces de reconocer (Iskratsch et al. 2009). Si bien se han caracterizado las especificidades de unión de las lectinas usadas más frecuentemente, es importante destacar que no siempre las lectinas se unirán a una glicoproteína que presente el azúcar que reconoce, dado que es importante tener en cuenta tanto la interacción proteína-proteína, como la orientación del glicano en relación a la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína en la que se encuentra (Alley et al. 2013).

La técnica analítica más utilizada en el análisis de la glicosilación es la espectrometría de masas (MS), ya sea mediante ionización por láser asistida por matriz (MALDI-MS) o por electronebulización (ESI-MS), dado que brinda información sobre la masa del oligosacárido, su composición en monosacáridos y detalles estructurales de la molécula (Cremata et al. 2014). En ambas técnicas, los glicanos libres se detectan como aductos metálicos (usualmente con sodio) si la medición se realiza en modo positivo, y como especies desprotonadas o aductos de aniones si la medición se realiza en modo negativo (Han y Costello 2013). Tanto MALDI como ESI son técnicas de ionización suaves, dado que el proceso de ionización ocurre a través de un leve exceso de energía, lo que genera pocos o ningún fragmento de los glicanos, permitiendo observar los iones moleculares intactos. Otra técnica muy importante en la caracterización peptídica es la MS en tándem, en la que se fragmentan los glicopéptidos o aductos obtenidos por MALDI-MS o ESI-MS. Estas fragmentaciones MS/MS (MS^2), generadas por CID (Disociación inducida por colisión) generan iones fragmentos específicos que son importantes para conocer las características estructurales de los glicanos (Alley et al. 2013). En forma general, las fragmentaciones de los carbohidratos inducida por CID involucran la ruptura de los enlaces

entre los monosacáridos adyacentes, lo que da información respecto a la composición y la secuencia, o la ruptura de los anillos, lo que aporta información de los diferentes tipos de enlaces (Han y Costello 2013).

Aunque se han identificado estructuras de glicanos a partir de las proteínas de capa S (SLPs) de varias bacterias Gram positivas, la mayoría de las SLPs de lactobacilos parecen estar no glicosiladas. Sin embargo, hasta ahora, la naturaleza glicoproteica de las SLPs de lactobacilos se ha informado para las cepas de *L. buchneri* CD034 y NRRLB-30929, *L. helveticus* ATCC 12046, *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. plantarum* 41021/252 y varias cepas de *L. kefir* (Möschl et al., 1993; Mozes and Lortal, 1995; Konstantinov et al., 2008; Mobili et al., 2009a; Anzengruber et al., 2014; Fina Martin et al. 2019). Hasta el momento de comenzar a desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral, las estructuras detalladas de glicanos en las proteínas de capa S se habían determinado solo para dos cepas: *L. buchneri* 41021/251 y CD034 (Anzengruber et al., 2014). En ambas especies se han encontrado estructuras O-glicosídicas. Con respecto a estas cadenas, la SlpB de *L. buchneri* CD034 y SlpN de *L. buchneri* NRRL B-30929 están glicosiladas en cuatro residuos de serina dentro de la secuencia S¹⁵²-A-S¹⁵⁴-S¹⁵⁵-A-S¹⁵⁷ con un promedio de siete residuos de Glc (α 1-6), cada uno (Anzengruber et al., 2014).

Teniendo en cuenta que se ha encontrado una alta identidad en la secuencia de aminoácidos entre *L. buchneri* CD034 y las cepas de *L. kefir*, principalmente en la zona de O-glicosilación descrita para la primera (Figura 1.2), y que han sido descritas diferencias en las estructuras de azúcares unidas a proteínas incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie (Ristl et al. 2011), nos propusimos como objetivo determinar las estructuras

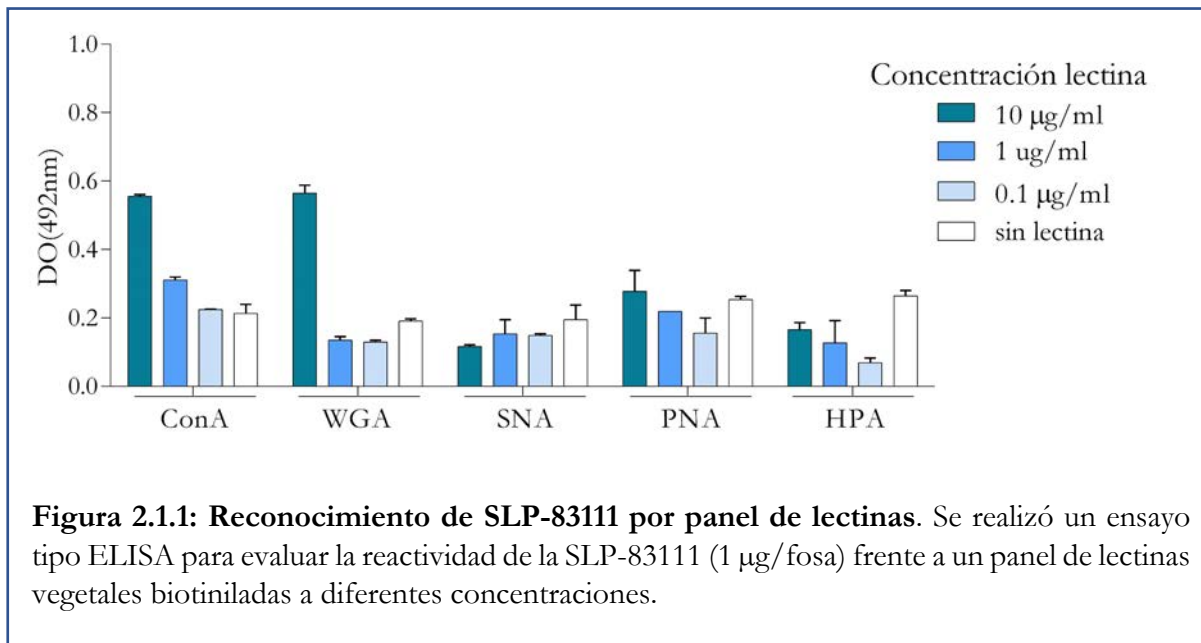
Capítulo 2

de azúcares de proteínas de capa S de cuatro cepas de *L. kefir*: *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348, *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818 (Figura M.1).

2.1 Estructura de azúcares de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 83111

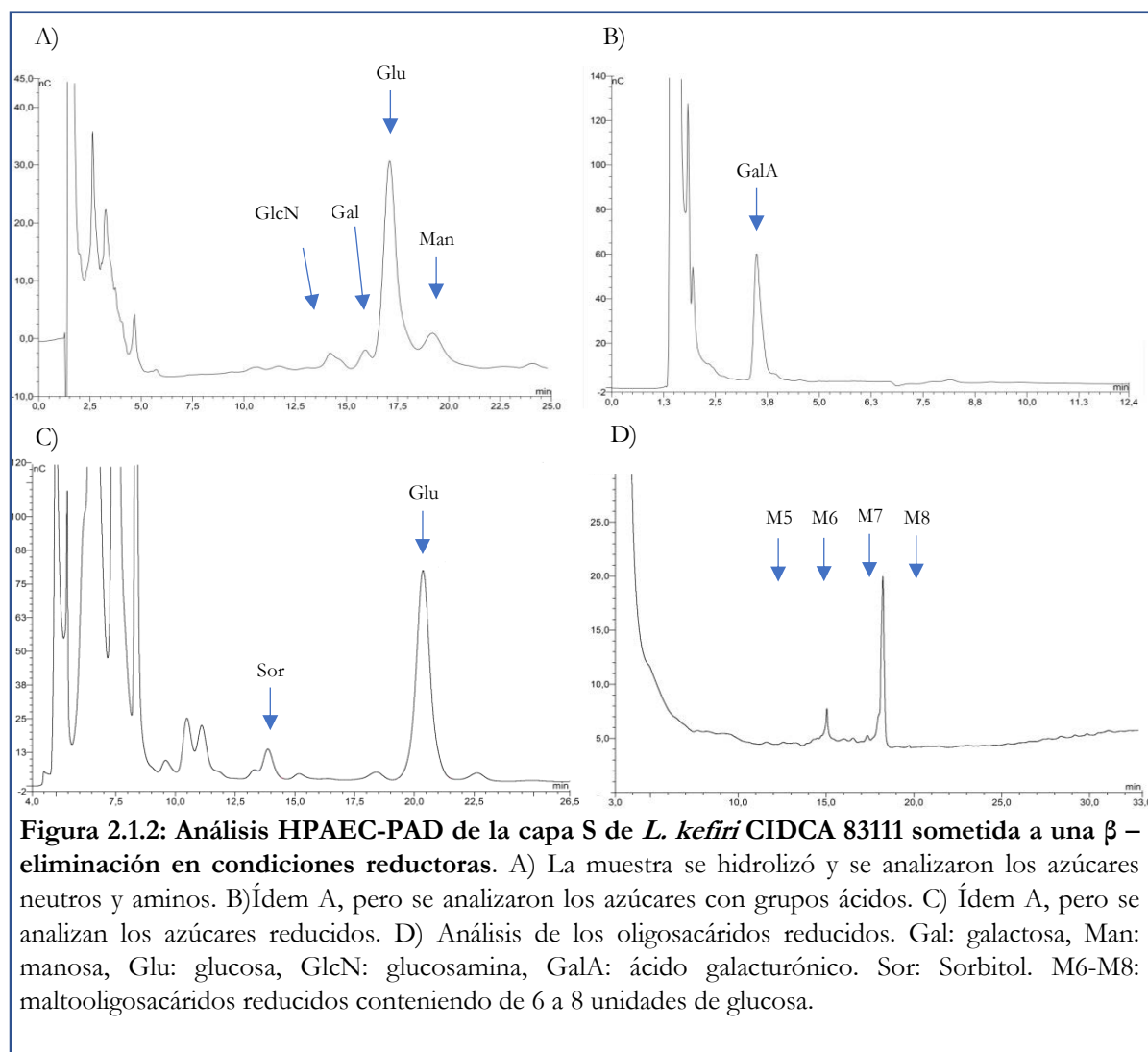
2.1.1. Reconocimiento de SLP-83111 por lectinas

La naturaleza glicosídica de la proteína de la capa S extraída de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111 (SLP-83111) fue informada previamente por la tinción PAS (Mobili et al 2009). Con el fin de aproximarnos a la identificación de los carbohidratos presentes en la SLP-83111, en primer lugar se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento por un panel de diferentes lectinas vegetales comerciales. Los glicoconjugados presentes en SLP-83111 fueron reconocidos por las lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA) y *Triticum vulgaris* (WGA), revelando la presencia de manosa o glucosa, y N-acetil-glucosamina (GlcNAc) respectivamente (Figura 2.1.1).



2.1.2. Composición de azúcares presentes

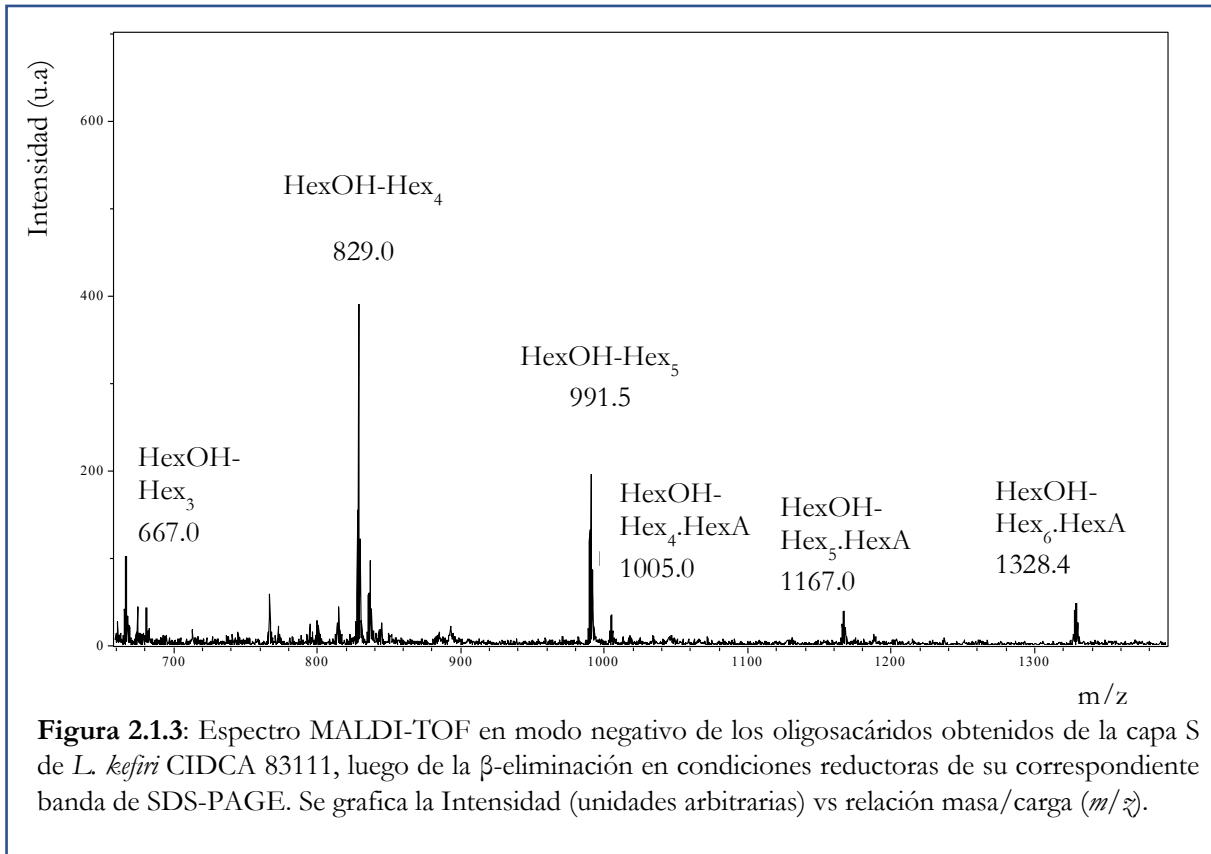
Para confirmar lo observado a partir de los ensayos por reconocimiento de lectinas y determinar los azúcares que componen esta proteína de capa S, la banda de gel de un SDS-PAGE se escindió y se sometió a una β -eliminación en condiciones reductoras. Cuando la muestra resultante se sometió a una hidrólisis ácida total y se analizó mediante HPAEC-PAD bajo condiciones donde se separan los azúcares neutros y los azúcares con grupos aminos, se observó la presencia de un pico principal correspondiente a la glucosa (Figura 2.1.2.A). También se evidenciaron picos menores coincidentes con glucosamina, galactosa y manosa. La misma muestra fue analizada más a fondo bajo condiciones donde se separan los azúcares ácidos (Figura 2.1.2.B). Curiosamente, se detectó un pico coincidente con un estándar de ácido galacturónico. Además, cuando se realizó un análisis de alditoles (Figura 2.1.2.C), se detectó un pico coincidente con sorbitol, lo que indica que la glucosa es el azúcar que une la cadena de glicanos a través de un átomo de Oxígeno con el péptido (O-glicosilación). Para completar el análisis cromatográfico, se analizó la muestra β -eliminada bajo condiciones donde se separan los oligosacáridos (Figura 2.1.D). En estas condiciones, se determinaron picos correspondientes a maltooligosacáridos reducidos entre 5 y 8 unidades de glucosa. Hasta este punto, se aseguró la presencia de cadenas O-glicosídicas con unidades de glucosa.



2.1.3 Análisis de azúcares O-glicanos por MALDI-TOF

Para profundizar en la estructura de los O-glicanos, la fracción obtenida por β -eliminación se sometió a un análisis a través de una espectrometría de masa MALDI-TOF en el modo negativo utilizando 2,5-ácido dihidroxibenzoico como matriz (Figura 2.1.3). Un ion principal a m/z 829.0 (m/z calculada de 829.2903 $C_{30}H_{53}O_{26}^-$) corresponde al oligosacárido reducido que contiene cinco unidades de hexosa. Una señal menor a m/z 667.0 (m/z calculada de 667.2297, $C_{24}H_{43}O_{21}^-$) corresponde al oligosacárido reducido constituido por cuatro unidades de hexosa. Por otro lado, el ion en m/z 991.5 (m/z calculada de 992.3432; $C_{36}H_{63}O_{31}^-$) corresponde a seis unidades de hexosa y los iones m/z

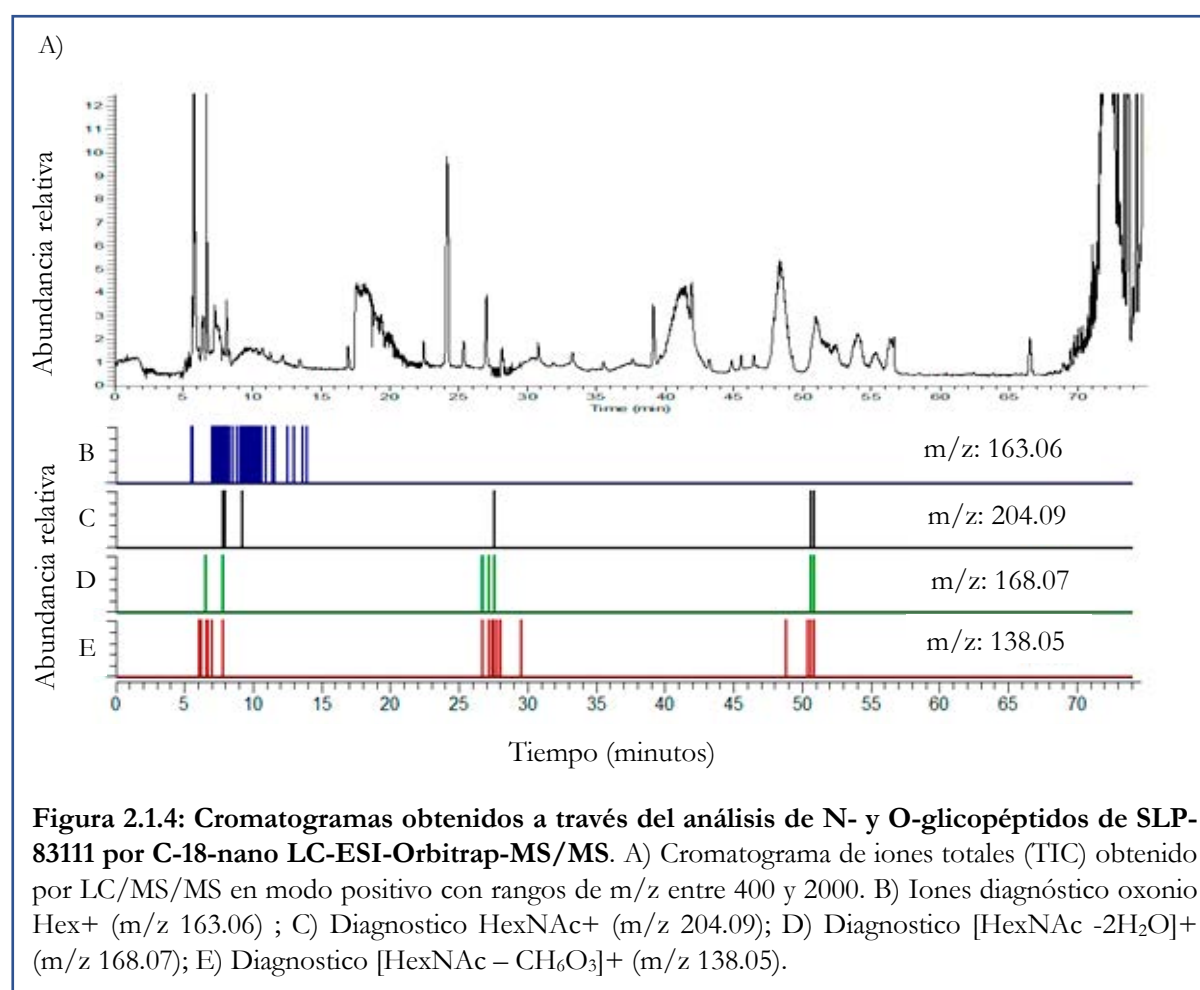
1005.0 (m/z calculada de 1005.3151; $C_{36}H_{61}O_{32}$), a una estructura reducida de Hex₅HexA (cinco unidades de hexosa y una unidad de una hexosa con un grupo ácido). También fueron detectadas dos señales adicionales a m/z 1167.0 (m/z calculada de 1167.3680; $C_{42}H_{71}O_{37}$) y m/z 1328.4 (m/z calculada de 1329.4208; $C_{48}H_{81}O_{42}$) correspondientes a Hex₆HexA y Hex₇HexA respectivamente.



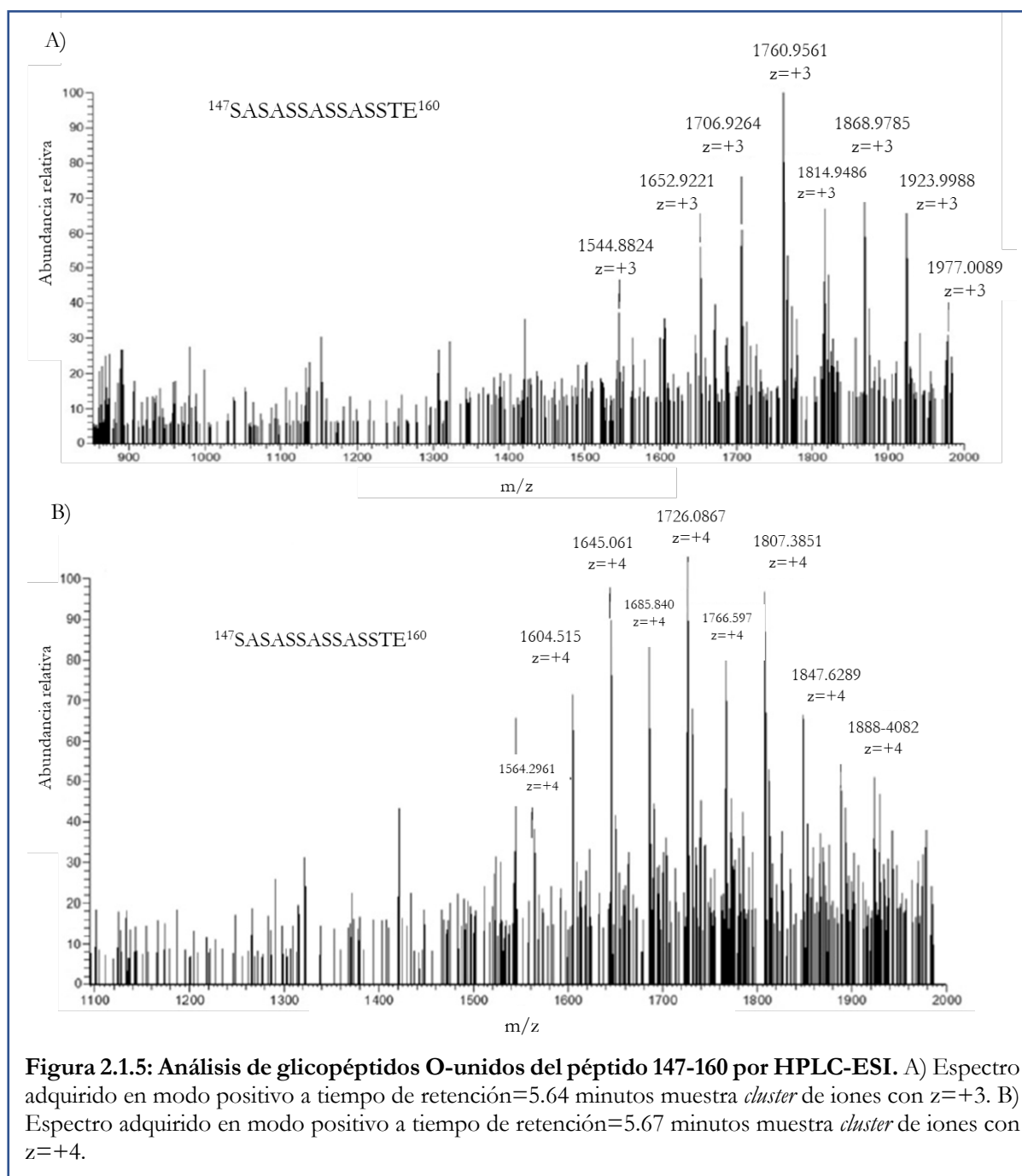
2.1.4. Análisis de péptidos O-glicosilados por HPLC-ESI

El siguiente paso consistió en determinar el sitio de enlace de los oligosacáridos a la proteína. Para ello, se realizó una digestión enzimática secuencial con tripsina y Glu-C de la banda extraída del gel correspondiente a la SLP-83111 y luego de una cromatografía de interacción hidrofílica, se obtuvo una fracción enriquecida en glicopéptidos. Esta fracción se analizó adicionalmente por HPLC-ESI. La Figura 2.1.4 muestra el cromatograma de iones totales (TIC) obtenido por LC/MS/MS en modo de ion positivo con rango de MS

m/z 400-2000 (panel A). Para ubicar los picos de glicopéptidos y determinar la relación m/z y el estado de carga, se tomó como referencia la intensidad generada por el ion oxonio Hex⁺ (m/z 163.06) (panel B) expuesto en un cromatograma extraído. La ubicación del ion oxonio Hex⁺ en el cromatograma extraído sugiere la presencia de estructuras O-glicosídicas en los minutos iniciales de la corrida en el HPLC.



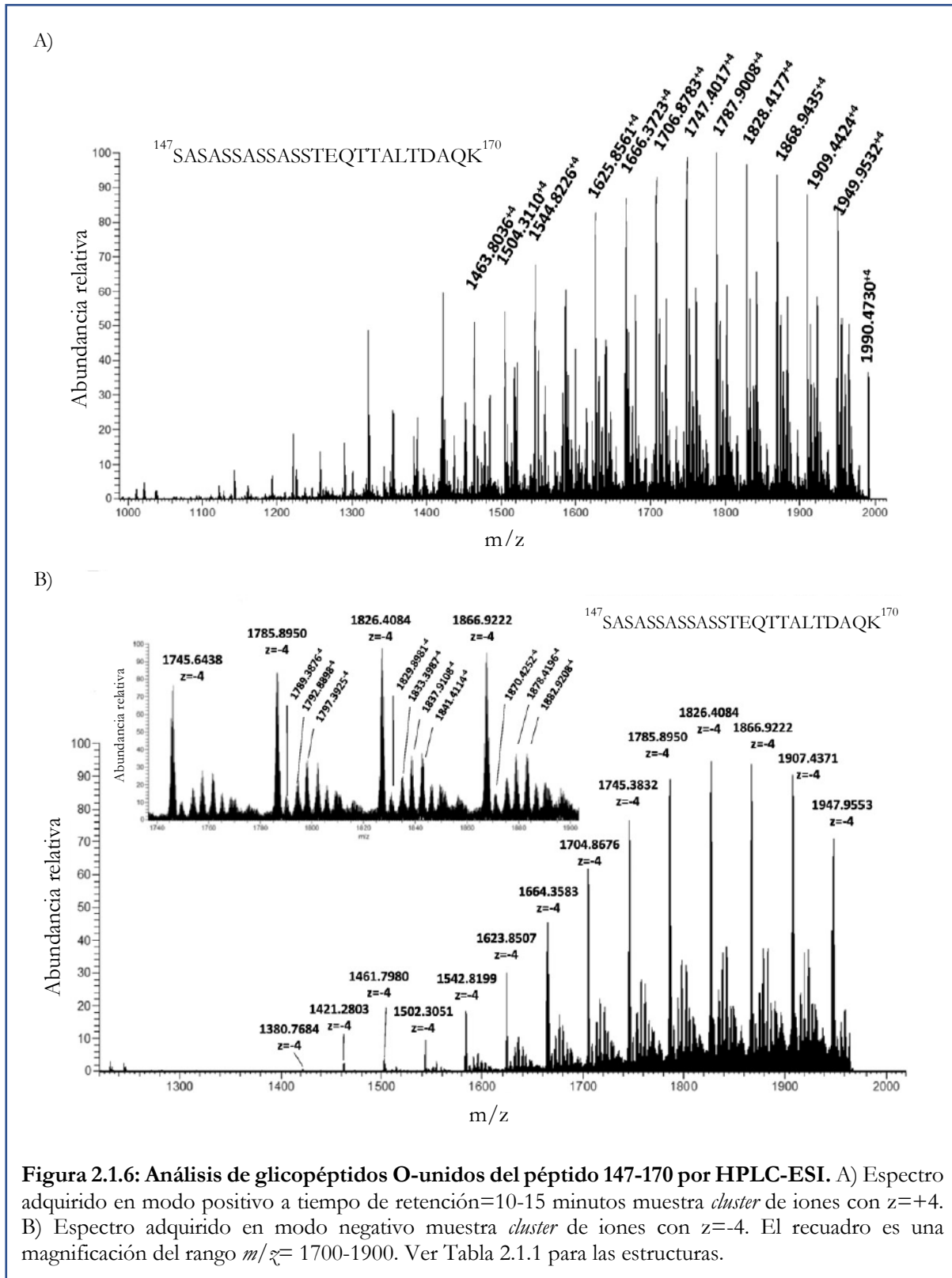
En la búsqueda de glicopéptidos en el análisis nanoHPLC-ESI adquirido en el modo positivo, a los 5.64 min se encontró una familia de glicopéptidos con $z=+3$ (m/z 1544.8824; 1652.9221; 1706.9264; 1760.9561; 1814.9486; 1868.9785; 1922.9988; 1977.0089) (Figura 2.1.5A). La deconvolución de estos iones conduce al péptido $^{147}\text{SASASSASSASTETE}^{160}$ sustituido con 21 a 29 unidades de hexosa. Además, también se detectó una familia de iones $z = +4$ (m/z 1564.2961; 1604.5615; 1645.0615; 1685.8400; 1726.0867; 1766.5977; 1807.3851; 1847.6289; 1888.4052). En este caso, se detectó el mismo péptido 147-160 pero sustituido con 31-39 unidades de hexosa. (Figura 2.1.5B). La Tabla 2.1.1 muestra las estructuras de glicoformas correspondientes al péptido, masas calculadas, masas experimentales y errores.



Además, en el tiempo de retención=7.51 min, se observó otro grupo de iones cargados con $z=+4$ (m/z 1463.8036; 1504.3110; 1544.8226; 1625.8561; 1666.3723; 1706.8783; 1747.4017; 1787.9008; 1828.4177; 1868.9435; 1909.4424; 1949.9532; 1990.4730). La deconvolución de estos iones señalan el péptido $^{147}\text{SASASSASSTETEQT}^{\text{TAL}}\text{TDAQK}^{170}$, que contiene el péptido anterior con un corte

enzimático no realizado, sustituido con 23-35 unidades de hexosa. (Figura 2.1.6A). También se detectaron señales menores con $z = +5$. Entre ellos, el glicopéptido más grande detectado (m/z 1981.9026) cuenta con 47 unidades de hexosa.

Un patrón de O-glicosilación similar ha sido descrito en la secuencia S-S¹⁵²-A-S¹⁵⁴-S¹⁵⁵-A-S¹⁵⁷-S-A en cepas de *L. buchneri* (Anzengruber et al 2014). Cuando se buscaron las señales análogas en el análisis de HPLC-ESI realizado en el modo negativo (Figura 2.1.6B) se detectó un grupo similar de iones con $z = -4$. Los picos principales (m/z 1380.7684; 1421.2803; 1461.7980; 1502.3051; 1542.8199; 1623.8507; 1664.3583; 1704.8676; 1745.3832; 1785.895; 1826.4084; 1866.9222; 1907.4371; 1947.9553) corresponden al péptido 147-170 cargado con 20 a 34 unidades de hexosa. Sin embargo, en este caso, fue interesante observar que entre las señales principales, se mostró otro grupo de iones menores. Las diferencias de masas con las señales principales indican la presencia de estructuras Hex₂₈₋₃₀HexA₁₋₃. Estos resultados están de acuerdo con el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF de los O-glicanos de la muestra obtenida por β -eliminación previamente descritos. La Tabla 2.1.1 muestra las estructuras correspondientes a cada péptido, masas calculadas, masas experimentales y errores.



Por otro lado, entre los 5.14-5.45 min del análisis nanoHPLC-ESI adquirido en el modo positivo, se detectó otro grupo de iones con $z = +2$ (m/z 845.7368; 926.7651; 1007.7856; 1088.8151) (Figura 2.1.7A). La deconvolución de estos iones señaló el péptido glicosilado $^{469}\text{DKTTTSAE}^{476}$ con una estructura $\text{HexA}_2\text{Hex}_{3-8}$. En este caso la baja abundancia de estas señales impidió la determinación correcta del valor monoisotópico experimental, lo que llevó a un mayor error en los valores de las masas (Tabla 2.1.1). Para verificar la presencia de este glicopéptido, se realizó otro experimento en el HPLC-ESI adquirido en el modo de ión negativo. Aunque el glicopéptido descrito anteriormente no pudo detectarse, fue posible determinar en la misma región, la presencia de un grupo de señales con $z = -2$ (m/z 796.2504; 877.278; 958.2607; 1039.2854; 906.2847; 987.3111) (Figura 2.1.7B). En este caso, la deconvolución de estos iones apuntaron al péptido $^{471}\text{TTTSAE}^{476}$, el mismo péptido determinado en el modo positivo pero con una escisión, glicosilado con una estructura $\text{HexA}_{1-2}\text{Hex}_{5-8}$.

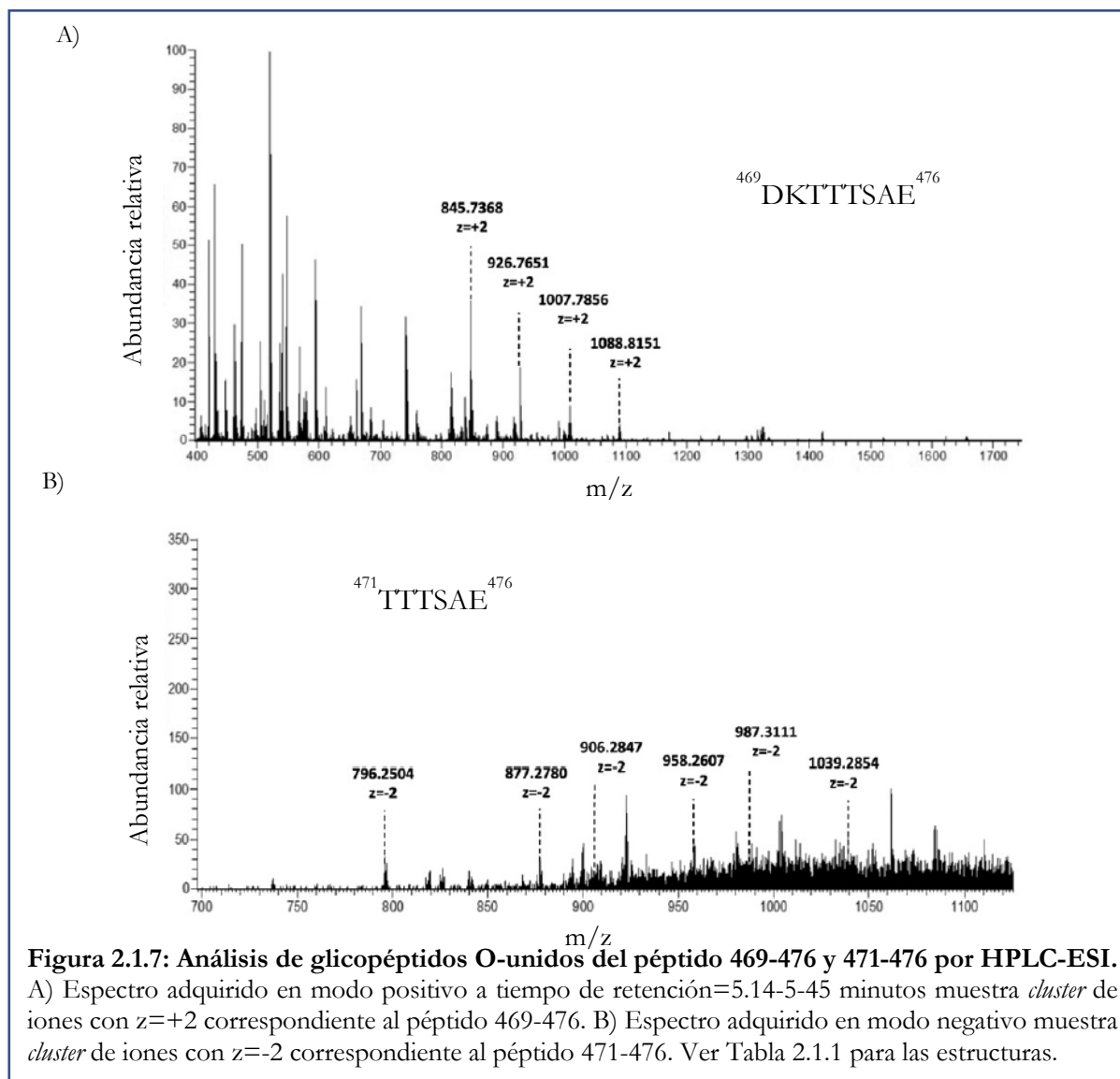


Tabla 2.1.1: Péptidos O-glicosilados detectados en SLP-83111 por HPLC-ESI

Péptido	Modificación	Carga	m/z calculada	m/z experimental	Error (ppm)
$^{147}\text{SASASSASSASSTE}^{160}$	Hex20	+3	1490.8611	1490.8721	7.37
	Hex21		1544.8787	1544.8824	2.37
	Hex23		1652.9139	1652.9221	4.94
	Hex24		1706.9315	1706.9264	-3.01
	Hex25		1760.9491	1760.9561	3.96
	Hex26		1814.9667	1814.9486	10.51
	Hex27		1868.9843	1868.9785	-3.12
	Hex28		1923.0019	1922.9988	-1.63
	Hex29		1977.0195	1977.0089	-5.38
$^{147}\text{SASASSASSASSTE}^{160}$	Hex31	+4	1564.042875	1564.2961	161.90
	Hex32		1604.556075	1604.5615	3.38
	Hex33		1645.069275	1645.0615	-4.73
	Hex34		1685.582475	1685.84	152.78

	Hex35 Hex36 Hex37 Hex38 Hex39		1726.095675 1766.608875 1807.122075 1847.635275 1888.148475	1726.0867 1766.5977 1807.3851 1847.6289 1888.4082	-5.2 -6.33 145.55 -3.45 137.56
¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTAL TDAQK ¹⁷⁰	Hex20 Hex21 Hex22 Hex23 Hex24 Hex26 Hex27 Hex28 Hex29 Hex30 Hex31 Hex32 Hex33 Hex34 Hex35	+4	1382.7828 1423.2960 1463.8092 1504.3224 1544.8356 1625.8600 1666.3752 1706.8884 1747.4016 1787.9148 1828.4280 1868.9412 1909.4544 1949.9676 1990.4808	1382.7823 1423.2928 1463.8036 1504.311 1544.8226 1625.8561 1666.3723 1706.8783 1747.4017 1787.9008 1828.4177 1868.9435 1909.4424 1949.9532 1990.473	-0.34 -2.23 -3.81 -7.56 -8.40 -2.41 -1.73 -5.90 0.07 -7.82 -5.62 1.24 -6.27 -7.37 -3.91
¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTAL TDAQK ¹⁷⁰	Hex20 Hex21 Hex22 Hex23 Hex24 Hex26 Hex27 Hex28 Hex29 Hex30 Hex31 Hex32 Hex33 Hex34	-4	1380.7682 1421.2814 1461.7946 1502.3078 1542.8210 1623.8454 1664.3606 1704.8738 1745.3870 1785.9002 1826.4134 1866.9266 1907.4398 1947.9530	1380.7684 1421.2803 1461.798 1502.3051 1542.8199 1623.8507 1664.3583 1704.8676 1745.3832 1785.895 1826.4084 1866.9222 1907.4371 1947.9553	0.16 -0.76 2.34 -1.76 -0.70 3.25 -1.37 -3.62 -2.16 -2.90 -2.72 -2.34 -1.40 1.19
¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTAL TDAQK ¹⁷⁰	Hex29HexA Hex28HexA ₂ Hex28HexA ₂ +H ₂ O Hex30HexA Hex29HexA ₂ Hex29HexA ₂ +H ₂ O Hex28HexA ₃ + H ₂ O Hex31HexA Hex30HexA ₂ Hex30HexA ₂ + H ₂ O	-4	1789.3950 1792.8898 1797.3925 1829.9082 1833.4030 1837.9057 1841.4005 1870.4214 1878.4189 1882.9208	1789.3876 1792.8851 1797.3877 1829.8981 1833.3987 1837.9108 1841.4114 1870.4252 1878.4196 1882.9182	-4.13 -2.63 -2.65 -5.52 -2.36 2.79 5.92 2.03 0.39 -1.36
⁴⁶⁹ DKTTTSAE ⁴⁷⁶	Hex ₃ HexA ₂ Hex ₄ HexA ₂ Hex ₅ HexA ₂ Hex ₆ HexA ₂	+2	845.8219 926.8386 1007.865 1088.8914	845.7368 926.7651 1007.7856 1088.8151	89.74 79.29 78.77 70.06
⁴⁷¹ TTTSAE ⁴⁷⁶	Hex ₅ HexA Hex ₆ HexA Hex ₇ HexA Hex ₈ HEXA Hex ₅ HexA ₂ Na ₂ Hex ₆ HexA ₂ Na ₂	-2	796.2734 877.2998 958.3262 1039.3526 906.27174 987.29814	796.2504 877.278 958.2607 1039.2854 906.2847 987.3111	-28.88 -24.85 -68.35 -64.66 14.30 13.13

2.1.5 Análisis de cadenas N-glicosídicas por HPLC-ESI.

Un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo demostró que la presencia de tunicamicina, un antibiótico que inhibe la N-glicosilación de las proteínas, no modifica el patrón de corrida de la SLP-83111 (Mobili et al. 2009). Sin embargo, teniendo en cuenta que la secuencia peptídica de la SLP-83111 muestra diez secuencias consensos para una probable N-glicosilación (N-X-S/T) (Figura 2.1.8), realizamos una digestión con PNGasa de la banda de gel correspondiente a la SLP-83111 para analizar la presencia de N-glicanos en esta proteína.

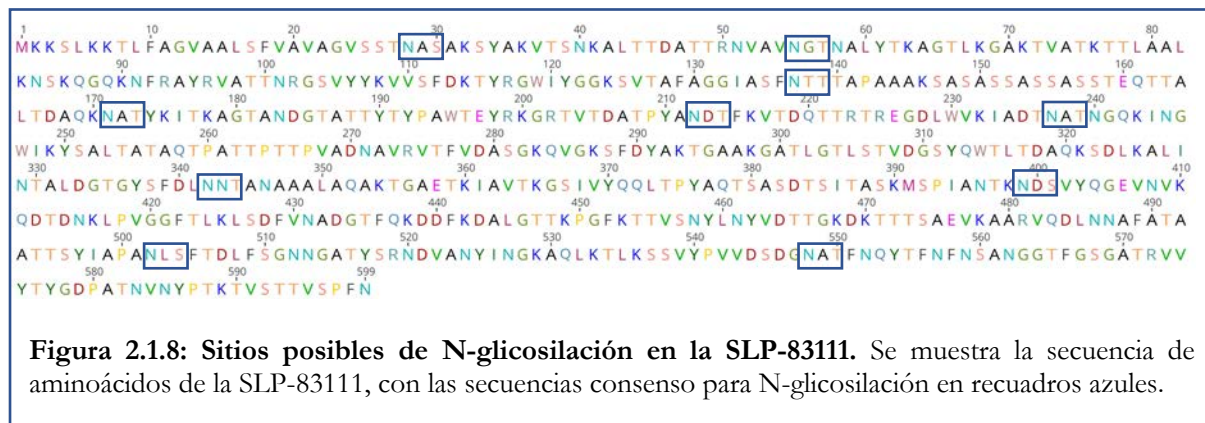


Figura 2.1.8: Sitios posibles de N-glicosilación en la SLP-83111. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la SLP-83111, con las secuencias consenso para N-glicosilación en recuadros azules.

El análisis del material liberado por HPAEC-PAD (Figura 2.9A) mostró un oligosacárido principal que migra muy cerca del núcleo N-glicosídico clásico (GlcNAc₂Man₃). También se detectaron picos de menor intensidad correspondientes a estructuras más grandes. El siguiente paso consistió en buscar en el análisis de glicopéptidos realizado por HPLC-ESI, la intensidad de los iones reporteros de oxonio HexNAc⁺ (m/z 204.09) (Figura 2.1.3, panel C), [HexNAc-2H₂O]⁺ (m/z 168.07) (Figura 2.1.3, panel D) y [HexNAc-CH₆O₃]⁺ (m/z 138.05) (Figura 2.1.3, panel E) característica de los restos N-glicosídicos. En particular, se observaron tres regiones definidas en la corrida de HPLC que contienen estos iones reporteros: 5-8 min; 26-30 min y 48-55 min. Teniendo en cuenta

que los glicopéptidos pueden adquirir múltiples cargas y que en el modo positivo estos pueden estar protonados y/o con iones Na^+ , lo que a veces complica el análisis de espectrometría de masas, decidimos realizar primero una inspección manual de los espectros adquiridos en el modo negativo. Como se esperaba, a un tiempo de elución de 7.58 min, fue fácil detectar una señal de m/z 1130.5466 con $z = -1$ y la señal correspondiente, de m/z 564.7698 con $z = -2$, atribuido al péptido $^{233}\text{IADTN}^{237}\text{ATNGQK}^{243}$ que contiene un sitio de N-glicosilación (Figura 2.1.9B). Junto a estas señales, se observó una mezcla de estructuras glicosiladas con $z = -2$ que coincide con la sustitución en ^{237}N . La señal en m/z 921.9228 corresponde al péptido que tiene una estructura $\text{HexNAc}_2\text{HexdHex}$; el ion m/z 1296.0752 corresponde a la adición de dos hexosas a la estructura anterior; el siguiente ion a la adición de dos unidades de HexNAc más y el ion con m/z 1319.0042 coincide con la estructura de $\text{HexNAc}_2\text{Hex}_5\text{dHex}_2$. Curiosamente, el hecho de que también se encontró el péptido no glicosilado sugiere que sólo existe una ocupación parcial de este sitio de N-glicosilación. En el análisis HPLC-ESI adquirido en el modo positivo, solo se pudieron asignar dos señales en esta región: una correspondiente al péptido desnudo con $z = +2$ (m/z 566.7837) y uno correspondiente al mismo péptido sustituido con dos unidades HexNAc más H_2O (m/z 778.8825). Sin embargo, después del uso del algoritmo SequestH, se identificó que el péptido $^{233}\text{IADTN}^{237}\text{ATNGQKINGWIK}^{249}$ llevaba una estructura de azúcares $\text{HexNAc}_2\text{dHex}$ con un tiempo de elución de 56.51 min. La inspección manual de esta región mostró una señal con $z = +3$ en m/z 804.7286 que coincide con el péptido nombrado que lleva una estructura $\text{HexNAc}_2\text{Hex}$ y la señal con m/z 873.4028 asignado a $\text{HexNAc}_2\text{Hex}_2$.

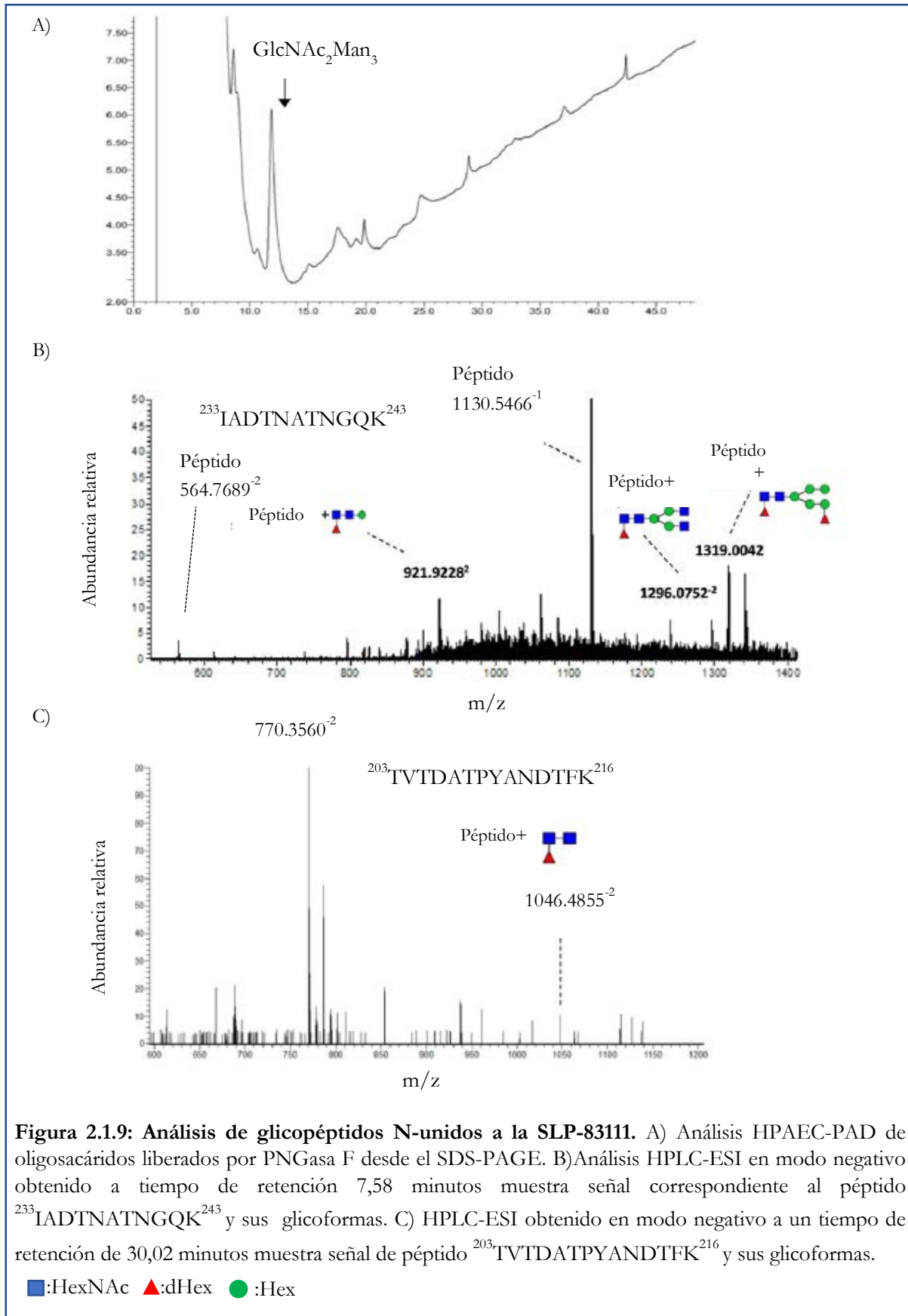


Figura 2.1.9: Análisis de glicopéptidos N-unidos a la SLP-83111. A) Análisis HPAEC-PAD de oligosacáridos liberados por PNGasa F desde el SDS-PAGE. B) Análisis HPLC-ESI en modo negativo obtenido a tiempo de retención 7,58 minutos muestra señal correspondiente al péptido $^{233}\text{IADTNATNGQK}^{243}$ y sus glicofomas. C) HPLC-ESI obtenido en modo negativo a un tiempo de retención de 30,02 minutos muestra señal de péptido $^{203}\text{TVTDATPYANDTFK}^{216}$ y sus glicofomas.

■:HexNAc ▲:dHex ●:Hex

Mirando hacia la segunda región del HPAEC-PAD, a un tiempo de retención de 30,02 min, se detectó una señal con $z = -2$ (m/z 770.3560) correspondiente al péptido $^{203}\text{TVTDATPYAN}^{212}\text{DTFK}^{216}$. Cerca de allí, una señal con m/z 1046.4855 se asignó al péptido 203-216 sustituido con una estructura HexNAc₂dHex (Figura 2.1.9C). Para asegurar la estructura del glicopéptido, se realizó el análisis en modo positivo. Como era de esperar, se detectaron las señales correspondientes con $z = +2$ (m/z 772.0980 y m/z 1048.4679).

Finalmente, en la tercera región, a un tiempo de elución de 52,77 min, la búsqueda automática encontró el péptido $^{125}\text{SVTAFAGGIASFNTTTAPAAAK}^{146}$ glicosilado con HexNAc₂dHex pero, la baja abundancia de las señales correspondientes impidió la detección de los fragmentos diagnósticos en el MS/MS.

2.1.6. Resumen de estructura de glicanos de SLP-83111

La estructura de azúcares de la capa S de la cepa *L. kefir* CIDCA 83111 está formada por:

- O:glicanos: Dos péptidos sustituidos con restos que contienen en promedio ocho unidades de glucosa y que están decorados con ácido galacturónico.
- N-glicanos: Dos péptidos diferentes sustituidos con estructuras cortas
 - GlcNAc₄Man₃dHex
 - GlcNAc₂dHex

En la Tabla 2.1.2 se muestra un resumen de la estructuras descritas en esta sección para la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 83111

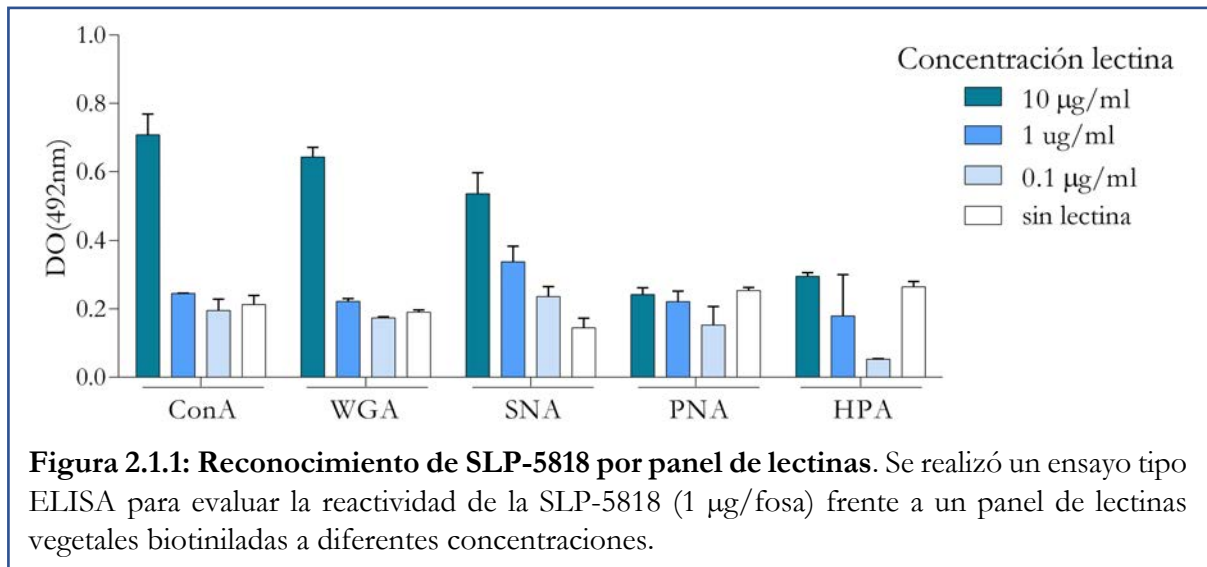
Tabla 2.1.2: Resumen de las glicoformas de la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 83111

	Glicopéptido		Oligosacárido	Secuencia péptido
	Tiempo de retención	Carga	Modificación	
O-glicosilación	5.14-5.45	+2	Glc ₃₋₆ GalA ₂	⁴⁶⁹ DKTTTSAE ⁴⁷⁶
	5.14-5.45	-2	Glc ₅₋₈ GalA ₁₋₂	⁴⁷¹ TTTSAE ⁴⁷⁶
	5.64	+3	Glc ₂₀₋₂₉	¹⁴⁷ SASASSASSASSTE ¹⁶⁰
	5.64	+4	Glc ₃₁₋₃₉	¹⁴⁷ SASASSASSASSTE ¹⁶⁰
	7.51	+4	Glc ₂₀₋₄₇	¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTALT DAQK ¹⁷⁰
	7.51	-4	Glc ₂₀₋₃₄ GalA ₀₋₃	¹⁴⁷ SASASSASSASSTEQTALT DAQK ¹⁷⁰
N-glicosilación	7.58	-2	GlcNAc ₂ ManHex GlcNAc ₄ Man ₃ dHex GlcNAc ₂ Man ₅ dHex ₂	²³³ IADTNATNGQK ²⁴³
	7.58	+2	GlcNAc ₂	²³³ IADTNATNGQK ²⁴³
	54.33	+3	GlcNAc ₂ Man GlcNAc ₂ Man ₂	²³³ IADTNATNGQKINGWIK ²⁴⁹
	30.02	-2	GlcNAc ₂ dHex	²⁰³ TVTDATPYANDTFK ²¹⁶
	30.02	+2	GlcNAc ₂ dHex	²⁰³ TVTDATPYANDTFK ²¹⁶

2.2 Estructura de azúcares de la proteína de capa S de *L. kefir* JCM 5818

2.2.1. Reconocimiento de SLP-5818 por lectinas

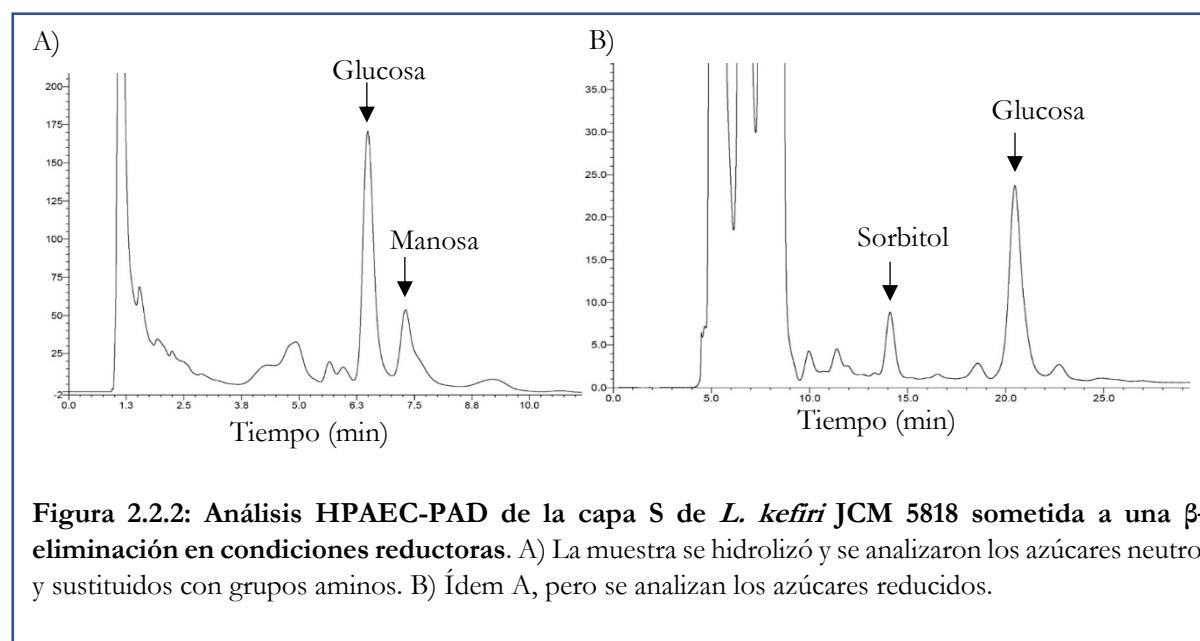
La naturaleza glicosídica de la proteína de la capa S extraída de la cepa *L. kefir* CIDCA 5818 (SLP-5818) fue informada previamente por la tinción PAS (Mobili et al 2009). Para aproximarnos a la identificación de los carbohidratos presentes en la SLP-5818, se llevó a cabo un ensayo de reconocimiento por un panel de diferentes lectinas vegetales comerciales. Los glicoconjugados presentes en SLP-5818 fueron reconocidos por las lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Triticum vulgaris* (WGA) y *Sambucus nigra* (SNA), revelando la presencia de manosa o glucosa, N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y ácido siálico respectivamente (Figura 2.2.1).



2.2.2 Análisis de cadenas O-glicosídicas de la SLP-5818

Con el objetivo de realizar un análisis de los azúcares componentes de la SLP-5818, se escindió una banda de SDS-PAGE de la glicoproteína y se sometió a una β-eliminación en condiciones reductoras. Los oligosacáridos liberados por este método se analizaron por

HPAEC-PAD y se determinaron los monosacáridos y los alditoles componentes (Figura 2.2.2). Se observa que la glucosa es el principal componente (Figura 2.2.2.A) y dentro de los alditoles se detectó solo sorbitol, lo que indica que la glucosa es el residuo a través del cual se unen los glicanos al péptido (Figura 2.2.2.B).



Con el objetivo de localizar los sitios de O-glicosilación para la SLP-5818, se realizó una digestión con tripsina en la banda del SDS-PAGE correspondiente a la proteína, seguida de un paso de enriquecimiento de los glicopéptidos utilizando una cromatografía de intercambio aniónico (HILIC). Esta fracción enriquecida en glicopéptidos se sometió a una nanoHPLC-ESI-Orbitrap usando una disociación inducida por colisión de alta energía (HCD) para inducir fragmentación MS².

El análisis de los iones extraído del cromatograma obtenido por nanoHPLC-ESI-Orbitrap mostró una región de O-glicosilación, donde se detectan señales correspondientes a iones oxonio de uno a cuatro unidades ($m/z=163.06$; 325.11, 487.16, 649.21) (Figura 2.2.3). La deconvolución de estos iones permitió la atribución de las señales que eluyeron a tiempo de retención entre 10 y 14 minutos al péptido ¹⁴⁷SASASSASSASSAEQTTALTDQK¹⁷⁰

conteniendo de 10 a 35 hexosas.

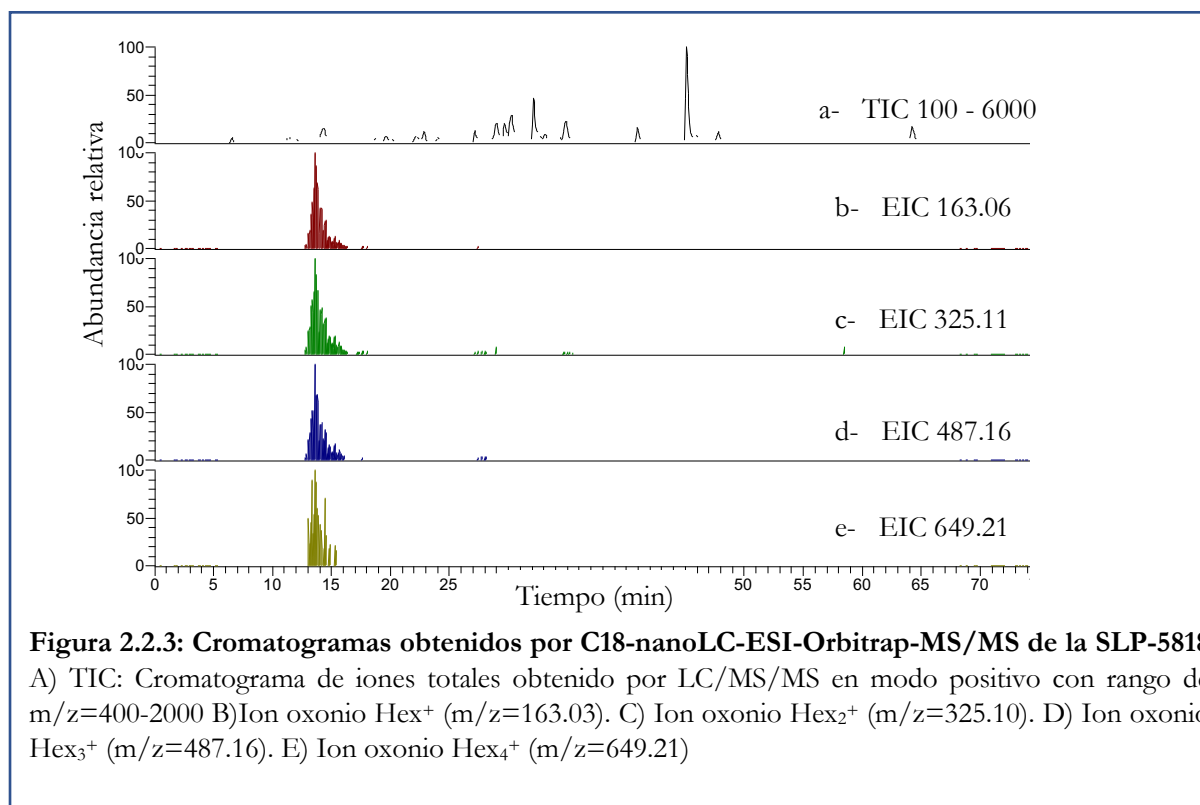
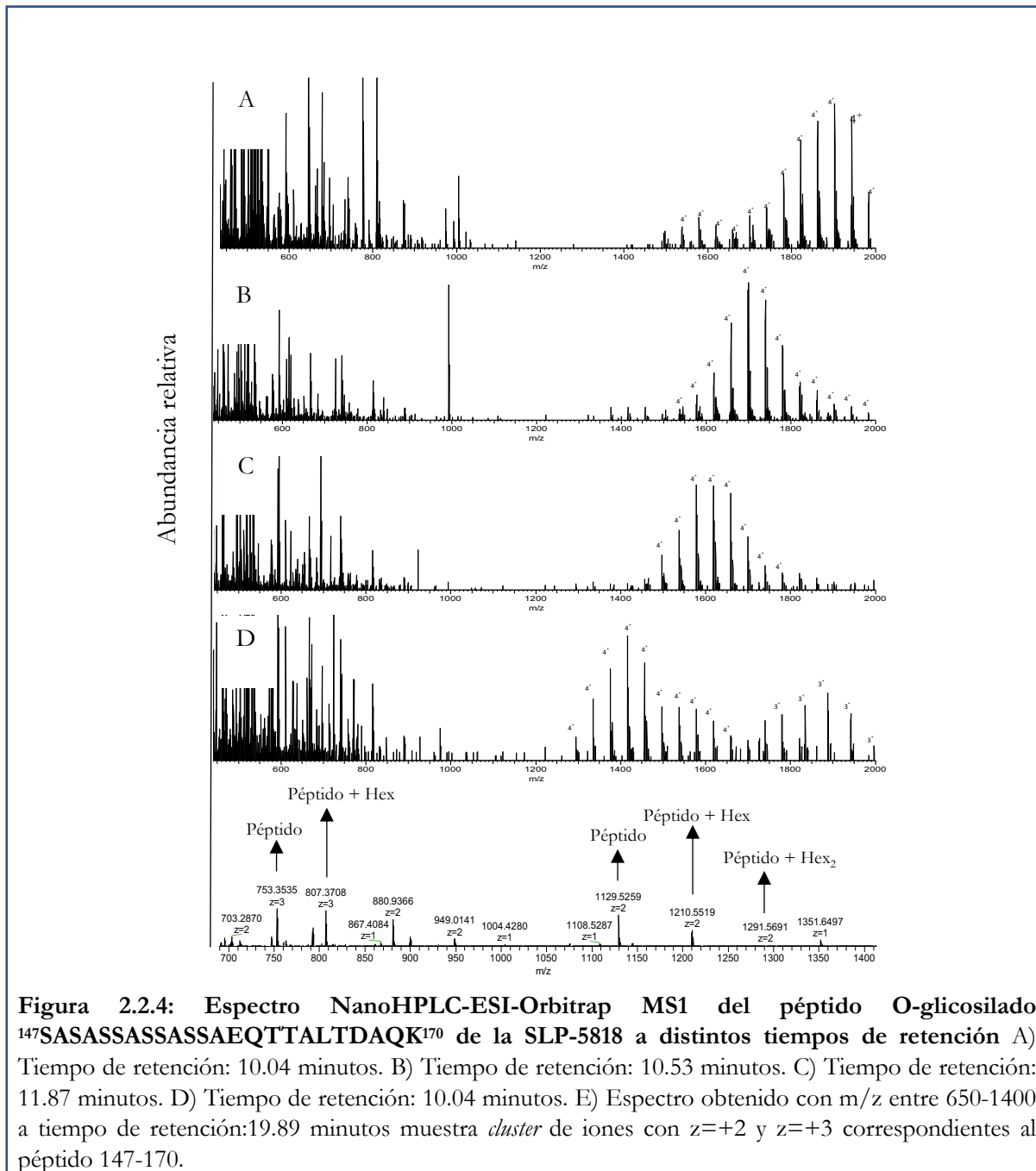


Figura 2.2.3: Cromatogramas obtenidos por C18-nanoLC-ESI-Orbitrap-MS/MS de la SLP-5818
A) TIC: Cromatograma de iones totales obtenido por LC/MS/MS en modo positivo con rango de $m/z=400-2000$ B) Ion oxonio Hex^+ ($m/z=163.03$). C) Ion oxonio Hex_2^+ ($m/z=325.10$). D) Ion oxonio Hex_3^+ ($m/z=487.16$). E) Ion oxonio Hex_4^+ ($m/z=649.21$)

La elución cromatográfica de los O-glicopéptidos utilizando RP nanoHPLC (cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa) está basada en la naturaleza hidrofílica de los glicanos unidos, lo que genera una elución decreciente en función del tamaño del glicopéptido (Figuras 2.2.4 A-D)



Además, fue posible detectar la glicosilación de solo una unidad de hexosa coeluyendo con el péptido no modificado (Figura 2.2.4.E), lo que indica que este sitio de O-glicosilación no está completamente ocupado en esta proteína. La identificación del péptido O-glicosilado se confirmó por dos métodos adicionales. Si bien los datos del espectro de masas de MS1 mostraron errores por debajo de 5 ppm (Tabla 2.2.1), dado que existe más de una combinación de péptidos-glicanos que podrían presentar errores de masa

aceptables bajo el poder de resolución de Orbitrap, esto no es suficiente para identificar las modificaciones postraduccionales. La identificación de los iones reporteros de hexosas ($m/z = 127.04; 145.05; 163.06; 325.11$) en el espectro MS^2 nos permitió confirmar los glicanos que conforman el péptido O-glicosilado (Figura 2.2.5A)

El otro método utilizado consistió en la identificación de los fragmentos de péptidos HCD para confirmar la identidad del glicopéptido. Se sabe que las fragmentaciones de glicanos son más lábiles que las fragmentaciones de péptidos bajo la disociación de HCD, por lo que a veces sólo se detectan los fragmentos de glicanos. Sin embargo, en este caso, se obtuvo una cobertura del 50% de la fragmentación de péptidos a partir de los iones peptídicos b- e y- detectados en los espectros MS^2 (Figuras 2.2.5.A y 2.2.5.B). También se detectaron fragmentos de péptido-glicano (iones y) y se pudo detectar un ion correspondiente al péptido desnudo. En conclusión, estos datos nos permitieron asignar el resto O-glicosídico unido al péptido 147-170.

En relación al cromatograma de iones extraído de los fragmentos diagnósticos $m/z = 163.06$ y 325.11 (Figura 2.2.3), se observan claramente dos regiones cromatográficas donde eluyen glicopéptidos. El primer grupo de señales corresponde al glicopéptido descrito para el péptido 147-170, y la segunda región corresponde al péptido 125-170, un péptido no clivado del anterior. Este péptido más grande se identificó también por la serie de iones b- e y- en el HCD/ MS^2 (Figura 2.2.5.C)

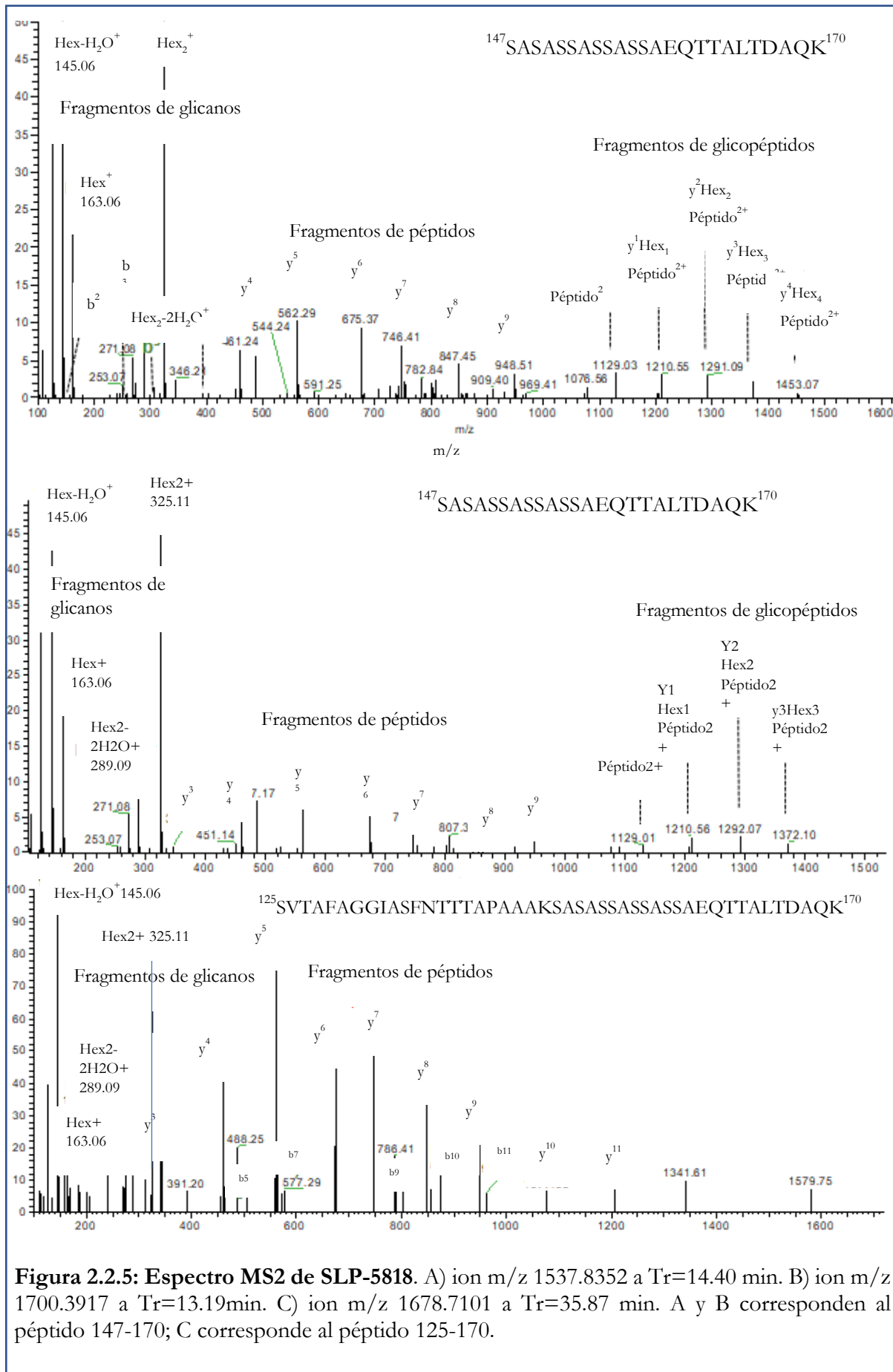


Figura 2.2.5: Espectro MS2 de SLP-5818. A) ion m/z 1537.8352 a $Tr=14.40$ min. B) ion m/z 1700.3917 a $Tr=13.19$ min. C) ion m/z 1678.7101 a $Tr=35.87$ min. A y B corresponden al péptido 147-170; C corresponde al péptido 125-170.

Tabla 2.2.1: Péptidos O-glicosilados detectados en SLP-5818 en péptido 147-170 por HPLC-ESI

Péptido	Modificación	m/z M ⁺ ₃ (calc.)	m/z M ⁺ ₃ (exp.)	error (ppm)
¹⁴⁷ SASASSASSASSAEQTTALTD ¹⁷⁰ AQK	Hex ₁	807.0367	807.0370	-0.41
	Hex ₂	861.0543	861.0551	-0.97
	Hex ₃	915.0719	915.0724	-0.58
	Hex ₄	969.0895	969.0895	-0.03
	Hex ₅	1023.1071	1023.1075	-0.42
	Hex ₆	1077.1247	1077.1252	-0.50
	Hex ₇	1131.1423	1131.1429	-0.56
	Hex ₈	1185.1599	1185.1581	1.49
	Hex ₉	1239.1775	1239.1770	0.38
	Hex ₁₀	1293.1951	1293.1959	-0.64
	Hex ₁₁	1347.2127	1347.2139	-0.92
	Hex ₁₂	1401.2303	1401.2311	-0.59
	Hex ₁₃	1455.2479	1455.2474	0.32
	Hex ₁₄	1509.2655	1509.2646	0.57
	Hex ₁₅	1563.2831	1563.2825	0.36
	Hex ₁₆	1617.3007	1617.3018	-0.70
	Hex ₁₇	1671.3183	1671.3114	4.11
	Hex ₁₈	1725.3359	1725.3359	-0.02
	Hex ₁₉	1779.3535	1779.3544	-0.52
	Hex ₂₀	1833.3711	1833.3687	1.29
	Hex ₂₁	1887.3887	1887.3909	-1.18
	Hex ₂₂	1941.4063	1941.4103	-2.08
	Hex ₂₃	1995.4239	1995.4330	-4.58

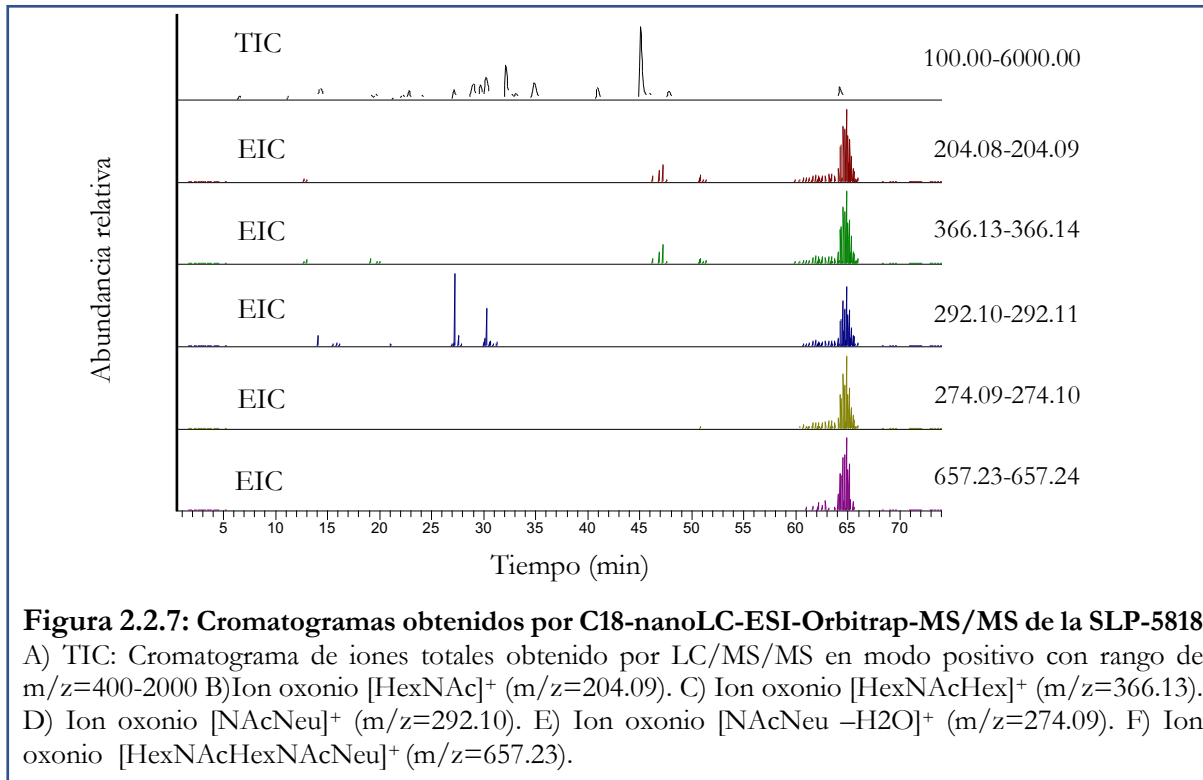
2.2.3. Análisis de cadenas N-glicosídicas de SLP-5818 por HPLC-ESI.

Un trabajo publicado en el año 2016 por Prado-Acosta y col. determinó que el tratamiento de la proteína de capa S de la cepa *L. kefir* JCM 5818 con PNGasa F, modifica sus propiedades biológicas (Prado-Acosta et al. 2016). Dicha enzima, es un amidasa que cliva el enlace entre la Asparagina y el residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) covalentemente unido al aminoácido, generando como resultado de la reacción dos productos: el péptido o la proteína, y el glicano libre. El clivaje por esta enzima se impide si el residuo de GlcNAc está fucosilado en posición $\alpha(1-3)$. Esta información, junto con el hecho de haber encontrado N-glicanos en la capa S de *L. kefir* CIDCA 83111, la presencia de GlcNAc como carbohidratos componentes de la SLP-5818, y siete sitios posibles de N-glicosilación (Figura 2.2.6), nos llevó a buscar directamente N-glicanos en esta proteína.



Figura 2.2.6: Sitios posibles de N-glicosilación en la SLP-5818. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la SLP-5818, con las secuencias consenso para N-glicosilación en recuadros azules.

Primero, se realizó la búsqueda en el cromatograma de iones extraído (EIC) de los iones diagnósticos de m/z 204.09 $[\text{HexNAc}]^+$, m/z 138.05 $[\text{HexNAc} - \text{CH}_6\text{O}_3]^+$ y m/z 366.14 $[\text{HexNAcHex}]^+$, que suelen indicar N-glicosilación. La Figura 2.2.7 muestra una región específica del cromatograma TIC entre 60 y 65 minutos donde se detectan los tres iones diagnósticos mencionados, lo que sugiere la presencia de N-glicopéptidos.



Específicamente, a tiempo de retención=64.21 min, el ion m/z 1234.9413, de $z=+5$, y sus correspondientes $z=+4$ (m/z 1544.6748), y $z=+6$ (m/z 1030.1190) (Figura 2.2.8.A), se observan iones que presentan motivos glicosilados. El espectro HCD/MS² muestra un ejemplo del ion m/z 1234.9413 con señales correspondientes a los azúcares descriptos. También se detectaron los iones b- e y- correspondientes al resto peptídico. Estas señales permiten asegurar que el péptido ³²⁸IDNALS³⁶³GTGY³⁶³SNVSQY³⁶³PSTLAQAQTGSTVSLPVT³⁶³K³⁶³, que contiene la secuencia de consenso NXS/T, está sustituido con una estructura de N-glicano compleja. También se detectaron iones de m/z 292.10 $[\text{NAcNeu}]^+$ y m/z 274.09 $[\text{NAcNeu} -\text{H}_2\text{O}]^+$, precursores característicos del ácido siálico.

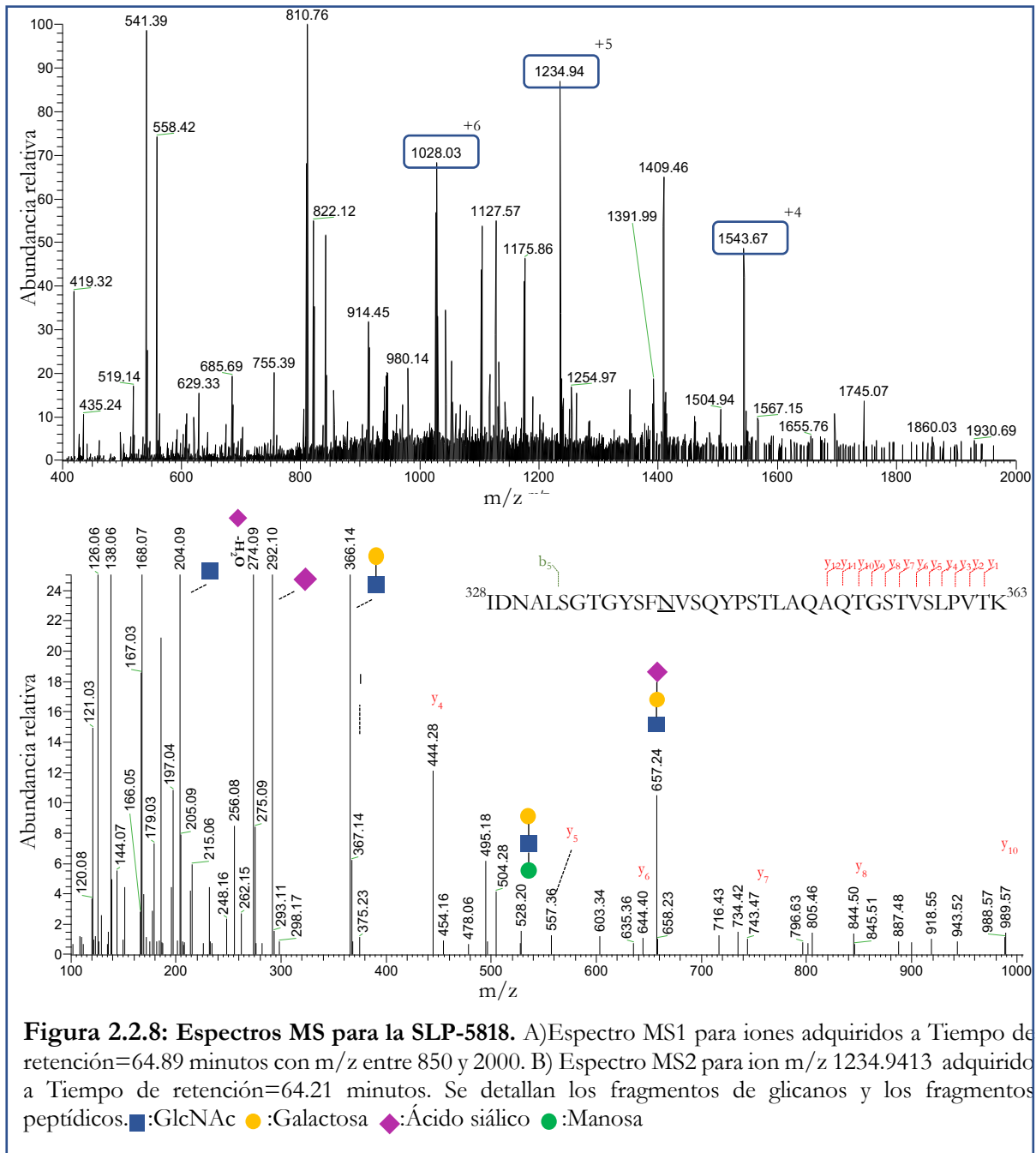


Figura 2.2.8: Espectros MS para la SLP-5818. A) Espectro MS1 para iones adquiridos a Tiempo de retención=64.89 minutos con m/z entre 850 y 2000. B) Espectro MS2 para ion m/z 1234.9413 adquirido a Tiempo de retención=64.21 minutos. Se detallan los fragmentos de glicanos y los fragmentos peptídicos. ■:GlcNAc ●:Galactosa ◆:Ácido siálico ●:Manosa

Se ha demostrado que algunos patógenos bacterianos como la *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Haemophilus influenzae*, *H. ducreyi*, *Pasteurella multocida*, *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Campylobacter jejuni* y *Streptococcus agalactiae*, agregan ácido siálico en sus superficies con el objetivo de evadir el sistema inmune del huésped. Estos patógenos

obtienen ácido siálico mediante diferentes mecanismos que incluyen la biosíntesis de novo (*E. coli*, *N. meningitidis*), el *scavenging* del ácido siálico (*N. gonorrhoeae*) o el *scavenging* de precursores (*H. influenzae*) (Almagro-Moreno et al 2009, Parsons et al 1988, Vimr et al 1995, Vimr et al 2000, Vogel et al 1999). Sin embargo, en las bacterias ácido-lácticas, la aparición de ácido siálico sólo ha sido descrita en *L. plantarum* y su ubicación en la superficie de la bacteria sólo fue sugerida (Sakellaris et al 1988). Por lo tanto, para asegurar la presencia de ácido siálico en la SLP de *L. kefir* JCM 5818, se realizó una digestión con PNGasa F de la SLP-5818 y los glicanos liberados se analizaron mediante HPAEC-PAD. La hidrólisis adicional mostró una señal con un tiempo de retención coincidente con una muestra de ácido N-acetil neuramínico (NANA) que asegura su presencia como componente de las cadenas N-glicosídicas (Figura 2.2.9).

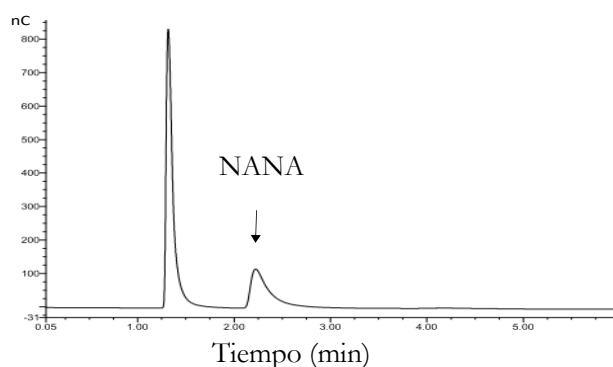
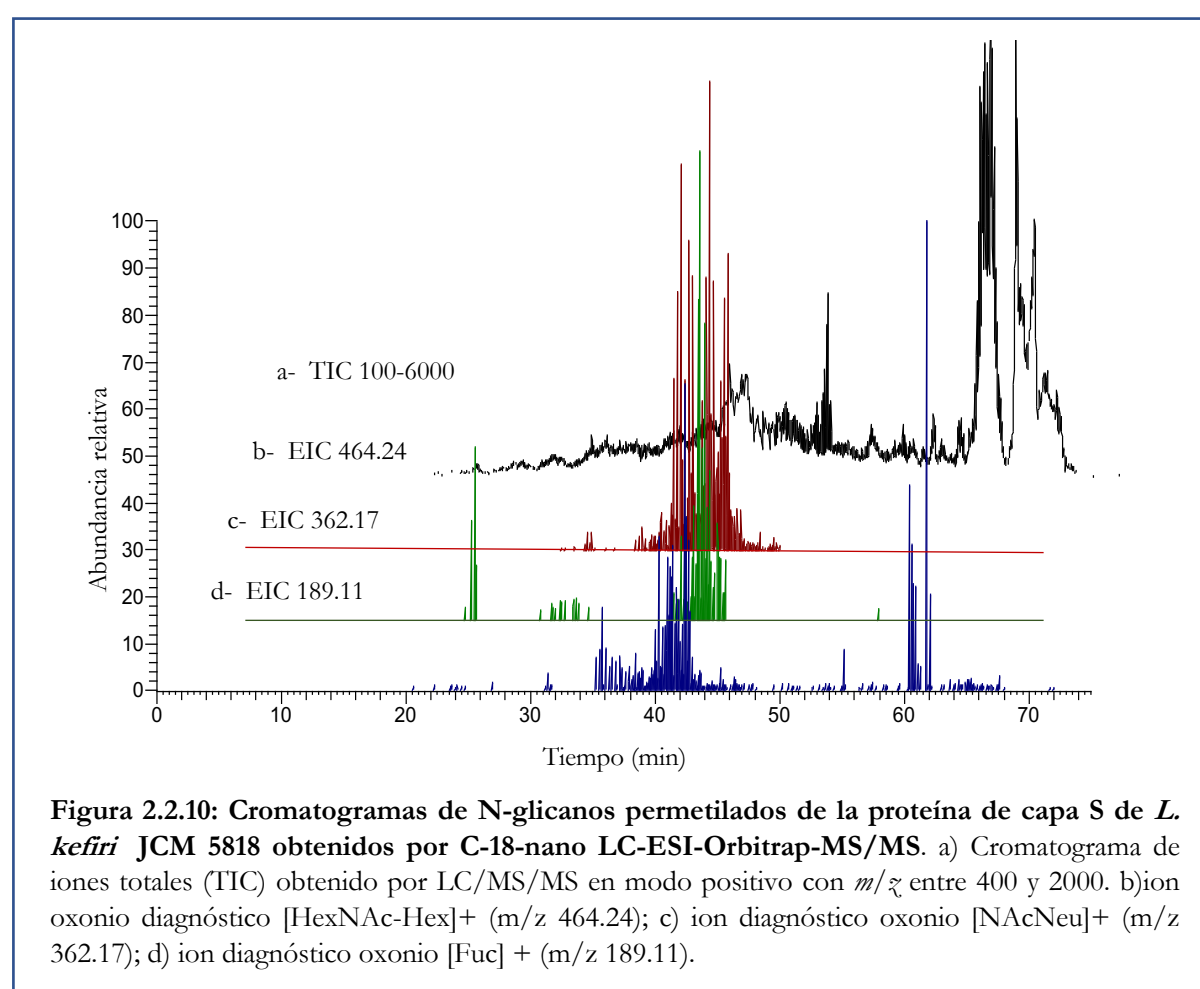


Figura 2.2.9: Análisis HPAEC-PAD de SLP-5818 sometida a una β -eliminación en condiciones reductoras tratada con PNGasaF. La SLP-5818 se trató con PNGasa F y el material liberado se hidrolizó y se analizaron los componentes ácidos. NANA: ácido N-acetil neuramínico.

Para determinar las estructuras de N-glicanos, los oligosacáridos liberados por el tratamiento con PNGasa, se purificaron y se permetilaron (adición de grupos $-\text{CH}_3$ a todos los grupos hidroxilos, grupos N-acetilos y función carboxilo sobre el ácido siálico), para su posterior análisis mediante nanoHPLC-ESI (Figura 2.2.10). Para confirmar la presencia de las estructuras sialiladas sugeridas por el análisis de glicopéptidos, se utilizaron los

cromatogramas de iones extraídos correspondientes a m/z 464.24 (HexNac-Hex⁺), m/z 362.17 (Sial⁺) y m/z 189.11 (dHex⁺). Estos datos permitieron detectar una familia de N-glicanos complejos que eluyen a tiempos de retención entre 40-45 min. Las estructuras principales, m/z y errores de masa se detallan en la Tabla 2.2.2. La Figura 2.2.11 muestra un ejemplo de un espectro MS² de un ion seleccionado que confirma las estructuras determinadas.



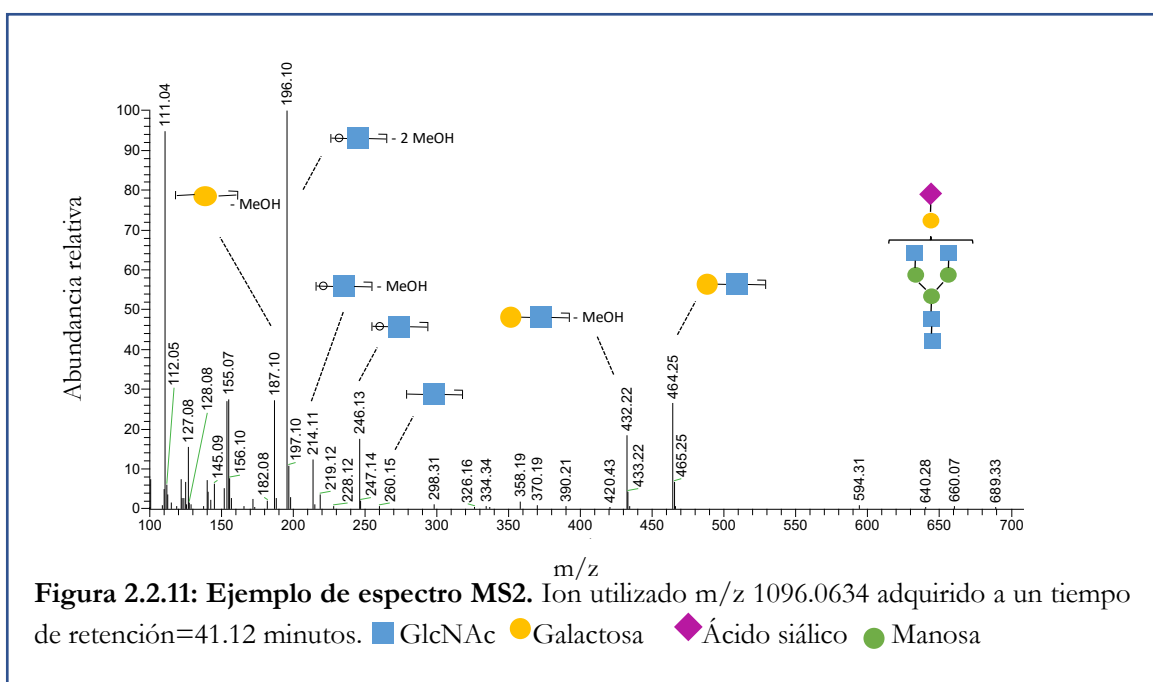


Tabla 2.2.2: N-glicanos permetilados determinados en SLP-5818

N-glycan	m/z M ⁺² (calc.)	m/z M ⁺² (exp.)	Error (ppm)
HexNac ₄ -Hex ₅ -NacNeu-dHex	1285.1539	1285.1525	1.09
HexNac ₄ -Hex ₄ - NacNeu -dHex	1183.1040	1183.1055	1.27
HexNac ₃ -Hex ₄ - NacNeu -dHex	1060.5408	1060.5398	0.99
HexNac ₄ -Hex ₅ - NacNeu	1198.1093	1198.1073	1.67
HexNac ₄ -Hex ₄ - NacNeu	1096.0594	1096.0607	1.19
HexNac ₃ -Hex ₃ - NacNeu	973.4962	973.4987	2.52
HexNac ₄ -Hex ₅ -dHex	1111.5749	1111.5746	0.27
HexNac ₄ -Hex ₄ -dHex	1009.525	1009.5243	0.69
HexNac ₃ -Hex ₄ -dHex	886.9618	886.9620	0.17
HexNac ₄ -Hex ₃ -dHex	907.4751	907.4769	1.98
HexNac ₄ -Hex ₅	1024.5303	1024.5303	0.00
HexNac ₄ -Hex ₄	922.4804	922.4775	3.14

2.2.4. Resumen de estructura de glicanos de SLP-5818

La estructura de azúcares de la capa S de la cepa *L. kefir* JCM 5818 está formada por:

- O:glicanos: Un péptido sustituido por restos neutros que contienen en promedio ocho unidades de glucosa.
- N-glicanos: Un péptido sustituido con estructura compleja y con ácido siálico
 - HexNac4-Hex5- NacNeu

Esto constituye la primera descripción de la presencia de ácido siálico en las cadenas N-glicosídicas de las glicoproteínas de capa S bacterianas.

2.3 Estructura de azúcares de proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8321 y

L. kefir CIDCA 8348

2.3.1. Reconocimiento de SLP-8321 y SLP-8348 por lectinas

La naturaleza glicosídica de la proteína de la capa S extraída de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 (SLP-8321) y *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) fue informada previamente por la tinción PAS (Mobili et al 2009). Realizando un ensayo de reconocimiento por lectinas vegetales comerciales, determinamos que los glicoconjugados presentes en SLP-8321 y SLP-8348 fueron reconocidas por lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), revelando la presencia de manosa o glucosa (Figuras 2.3.1A y 2.3.1.B).

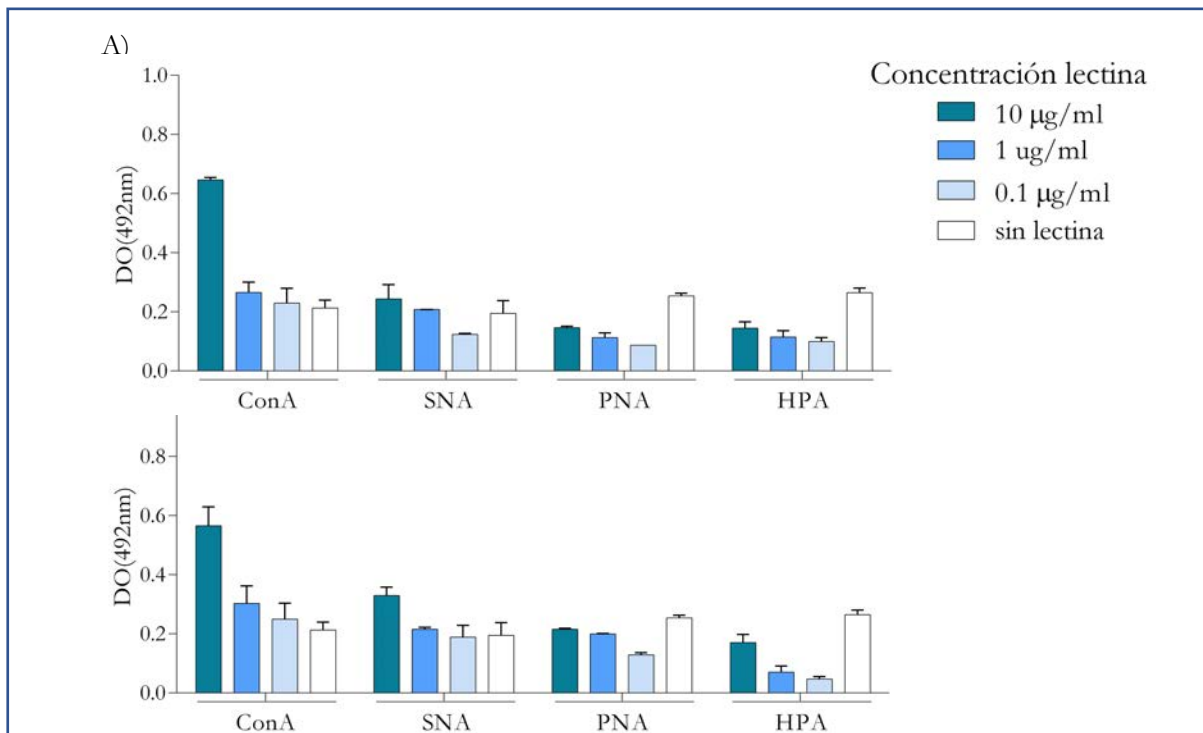
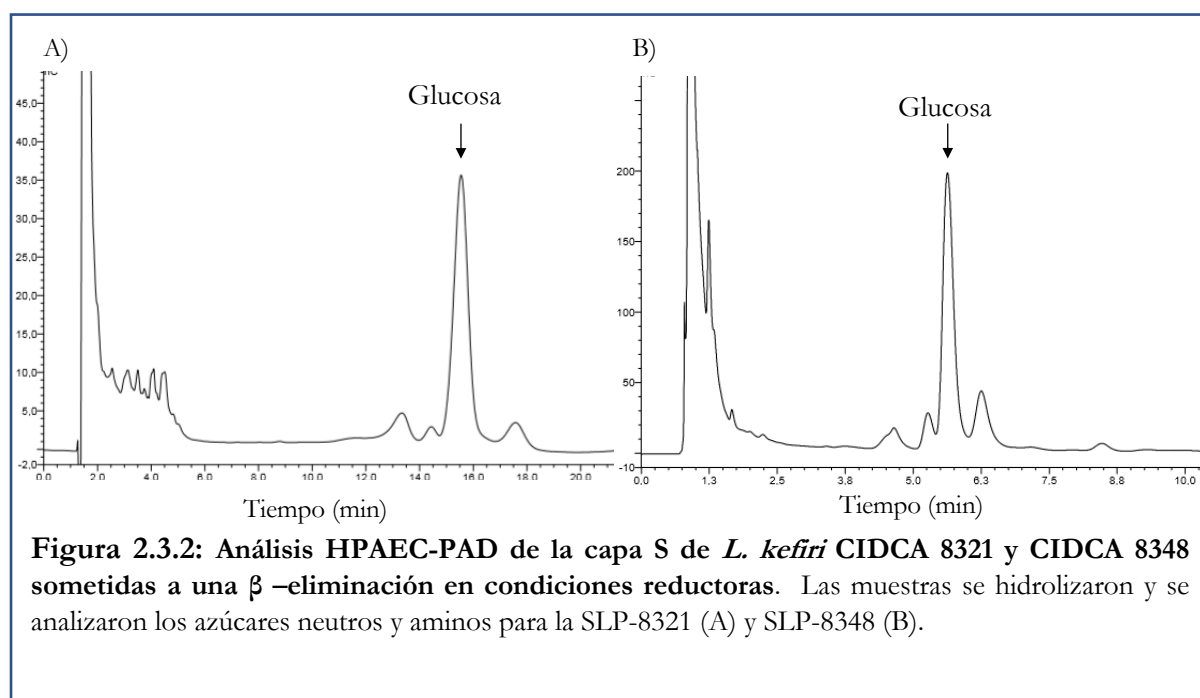


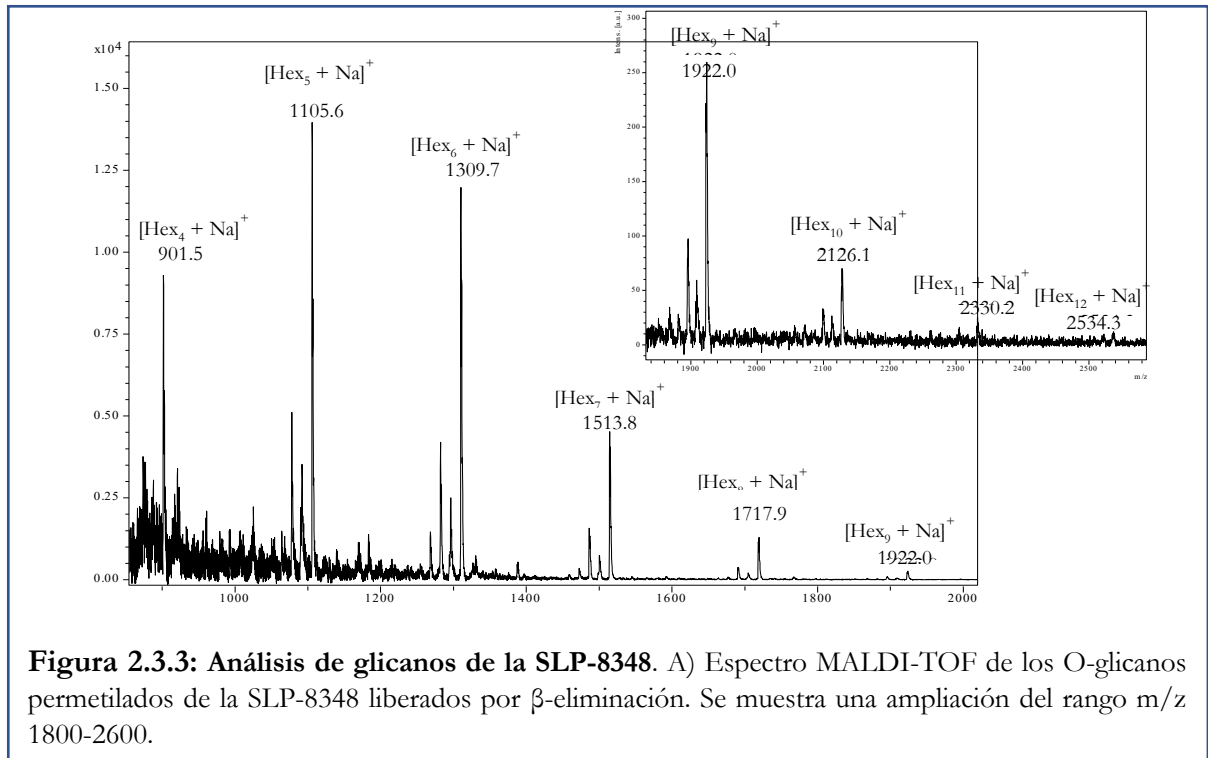
Figura 2.1.1: Reconocimiento de SLP-8321 y SLP-8348 por panel de lectinas. Se realizó un ensayo tipo ELISA para evaluar la reactividad de SLP-8321 (A) y SLP-8348 (B) (1 µg/fosa) frente a un panel de lectinas vegetales biotiniladas a diferentes concentraciones.

2.3.2. Análisis de O-glicanos en SLP-8321 y SLP-8348

Con el objetivo de determinar los azúcares que componen las SLP-8321 y SLP-8348, se escindieron las bandas de gel de un SDS-PAGE y se sometieron a una β -eliminación en condiciones reductoras. Luego de realizar una hidrólisis ácida total, las muestras se analizaron mediante HPAEC-PAD bajo condiciones donde se separan los azúcares neutros y los azúcares con grupos aminos, y se observó para ambas proteínas la presencia de un pico principal correspondiente a la glucosa, lo que indica que este es el monosacárido componente de estas glicoproteínas (Figura 2.3.2).



Las estructuras de los O-glicanos para ambas glicoproteínas se analizaron utilizando los oligosacáridos β -eliminados por MALDI-TOF previamente permitilados. Tanto en la SLP-8321 como en la SLP-8348 se determinaron glicoformas que contenían desde 4 a 12 unidades de glucosa. En la Figura 2.3.3 se muestran los resultados obtenidos para la SLP-8348.



El análisis glicoproteómico de las SLP-8321 y SLP-8348 fue realizado por nanoHPLC-ESI-Orbitrap-HCD, luego de una digestión con tripsina de las bandas de SDS-PAGE y un paso de purificación por cromatografía HILIC. Como se muestra en la Figura 2.3.4A, en la SLP-8348 se pudieron detectar grupos de iones con carga +4, +5, +6 y +7 correspondientes al péptido 125-170, que presentaron hasta 22 unidades de hexosas. Este péptido contiene la secuencia SSASSASASA, al igual que las proteínas SLP-83111 y SLP-5818 descritas anteriormente. En la Figura 2.3.4B se muestra un ejemplo de espectro MS/MS del ion m/z 1119.8097⁺⁶.

Si bien las SLP-8321 y SLP-8348 presentan 4 sitios potenciales de N-glicosilación (Figura 2.3.5), a diferencia de las SLPs previamente estudiadas, no se detectó la presencia de N-glicanos en el análisis nanoHPLC-ESI-Orbitrap-HCD.

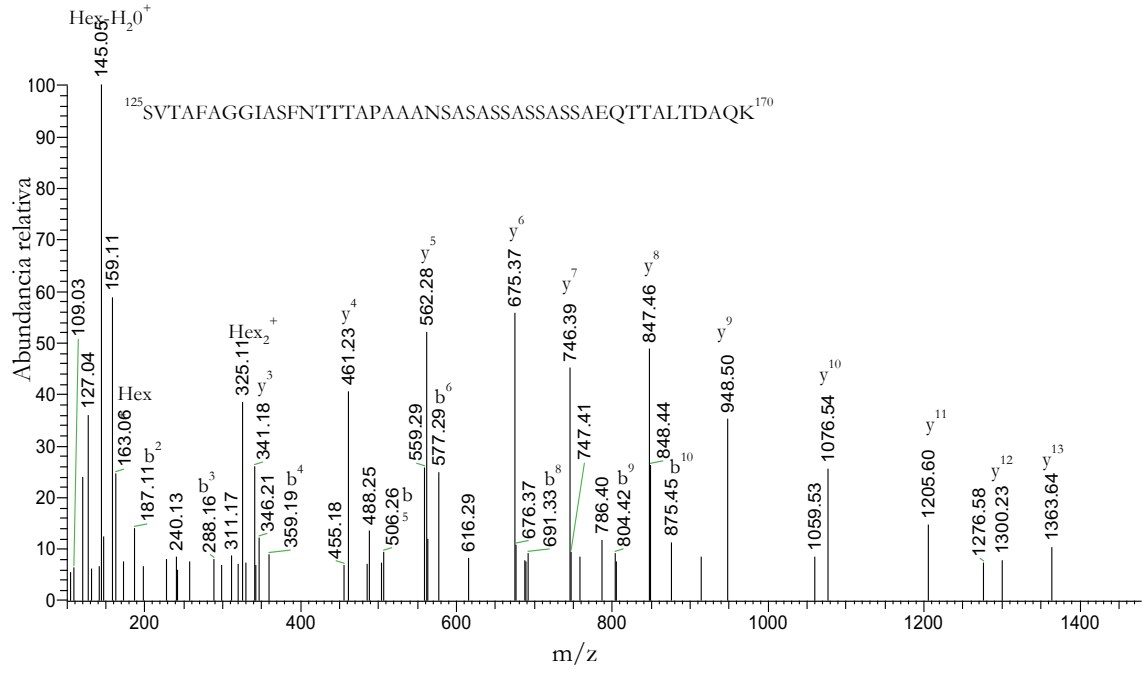
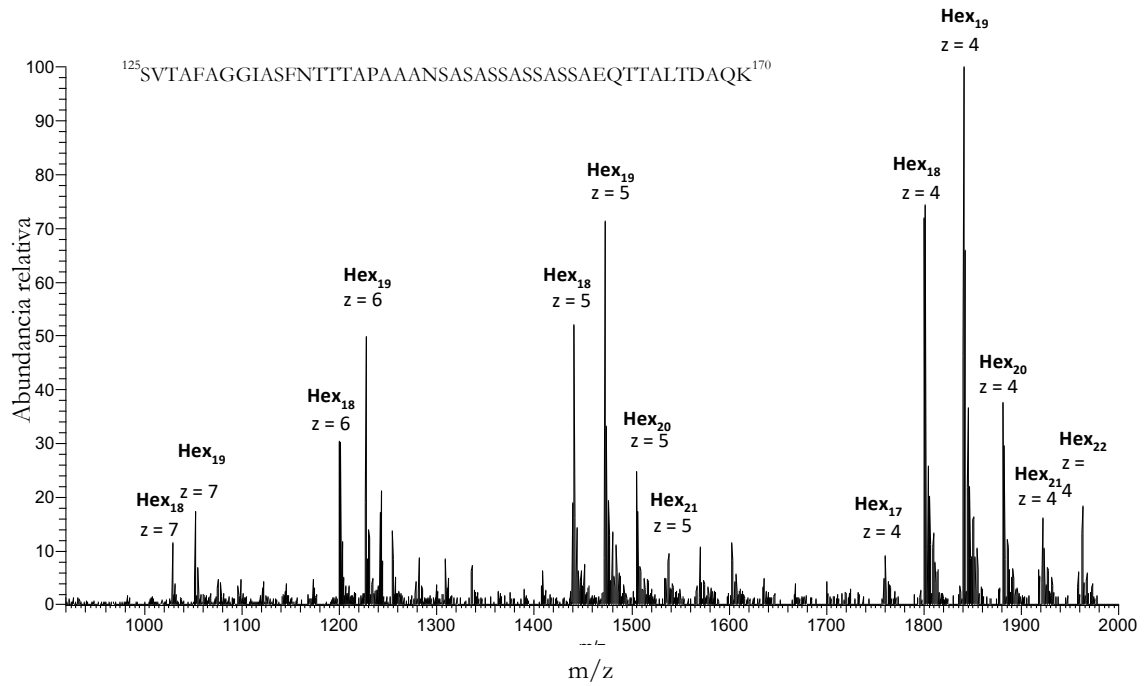


Figura 2.3.4: Análisis de los glicopéptidos de la capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 por ESI-Orbitrap. A) Espectro MS de glicoformas con múltiples cargas que modifican residuos de serina en péptido 147-170. B) Espectro MS2 del glicopéptido m/z 1119.8097⁺⁶.



2.3.3. Resumen de estructura de glicanos de SLP-8321 y SLP-8348

Las estructuras de azúcares de las proteína de capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y CIDCA 8348 están formadas por:

- O:glicanos: Un péptido sustituido por restos neutros que contienen en promedio cinco unidades de glucosa.

Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue determinar las estructuras de azúcares de las proteínas de capa S de cuatro cepas de *L. kefir*: CIDCA 83111, JCM 5818, CIDCA 8321 y CIDCA 8348.

Todas las proteínas analizadas presentan dentro de la secuencia de aminoácidos, el fragmento ¹⁵¹SSASSASSA¹⁵⁹, identificado también como motivo de O-glicosilación en *L. buchneri*, una especie filogenéticamente relacionada con *L. kefir*, sin embargo, se observaron algunas diferencias entre las cepas.

En las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y CIDCA 8348 se encontraron, dentro de la misma secuencia peptídica, O-glicanos formados únicamente por glucosa, sustituidos en promedio por cinco unidades de glucosa. Por lo tanto, la SLP-8321 como la SLP-8348 presentan la misma estructura primaria, tanto a nivel de aminoácidos (como se describió en el Capítulo 1) como de estructura de glicanos.

En las cepas *L. kefir* CIDCA 83111 y JCM 5818, la secuencia peptídica SSASSASSA está sustituida con restos que en promedio contienen ocho residuos de glucosa, y que en el caso de la SLP-83111, se encuentran decorados con ácido galacturónico. A su vez, en la SLP-83111 también se determinó otro sitio O-glicosilado, el péptido 471-476, sustituido con una estructura Glc₅₋₈GalA₂.

Por otro lado, en estas últimas dos proteínas, fue posible determinar la presencia de N-glicanos. A través de un análisis glicoproteómico de los fragmentos liberados por tratamiento con PNGasa F, se detectaron dos péptidos N-sustituidos con estructuras cortas: GlcNAc₄Man₃Hex y GlcNAc₂Hex en la SLP-83111. En cambio, la SLP-5818

cuenta con un N-glicano de estructura compleja y con ácido siálico presente en su estructura, lo que constituye la primera descripción de este monosacárido en cadenas de N-glicanos de glicoproteínas de capa S bacterianas.

El conocimiento del tipo y los sitios de glicosilación en las glicoproteínas de capa S de *L. kefir* constituyen un paso fundamental para el estudio detallado de la relación entre la estructura de los glicanos y su actividad biológica.

Capítulo 3: Inmunogenicidad y capacidad
adyuvante de las proteínas de capa S de

L. kefir

Introducción

El estudio de las aplicaciones biotecnológicas de las proteínas de capa S, considerada como uno de los biopolímeros más abundantes en nuestro planeta (Sleytr et al. 2014) ha ido aumentando en los últimos años. Dado que la capa S constituye la estructura superficial más externa en aquellos microorganismos donde está presente, puede mediar la interacción de las células bacterianas con el hospedador. Esto, sumado a la habilidad de auto-ensamblaje y sus propiedades físico-químicas únicas, genera que las proteínas de capa S sean una herramienta muy atractiva para su uso como *carrier* de antígenos, como adyuvantes o como parte de vehículos vacunales (Sleytr et al. 2014). Por lo tanto, entender cómo las proteínas de capa S interactúan con el sistema inmune es un paso crítico para su utilización en el desarrollo de nuevas vacunas.

Luego del reconocimiento de antígenos no propios a través de diferentes receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), en las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y los macrófagos se inicia una cascada de transducción de señales que conduce a la maduración celular, con aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y producción de diferentes quimoquinas y citoquinas. Existen diferentes clases de familias de PRR, incluidas las proteínas transmembrana, como los receptores tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina de tipo C (CLR) (Takeuchi et al. 2010).

Los TLR son una familia de proteínas transmembrana que reconocen principalmente componentes microbianos altamente conservados y que cumplen funciones esenciales en los microorganismos (patrones moleculares asociados a microorganismos) (Kawasaki et al. 2014). En humanos, existen 10 receptores caracterizados (TLR1-TLR10) mientras que en ratones se conocen 12 receptores (TLR1-TLR9, TLR-11,

TLR-13). La clasificación principal de estos receptores se basa en la localización celular: pueden estar en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10) o ser intracelulares, ubicándose en endosomas (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12, y TLR13) (Kawai et al. 2010, Celhar et al. 2012). Las interacciones moleculares entre los TLRs y sus ligandos se han caracterizado en forma precisa en un gran número de casos. Los TLRs de superficie celular reconocen principalmente moléculas derivadas de la superficie de microorganismos (Kawai y Akira 2009; Kumar et al. 2009), y los TLRs intracelulares reconocen mayoritariamente ácidos nucleicos derivados de bacterias y virus (Blasius et al. 2010). Cada TLR se compone de un ectodominio con zonas repetidas de alto contenido de leucina (LRR: *Leucine-Rich Repeats*), que media la interacción con el antígeno, un dominio transmembrana y un dominio Toll intracitoplasmático (TIR). Luego del reconocimiento antigénico, los TLRs reclutan proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR, como MyD88 (proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide) y TRIF (proteína que contiene dominios TIR inductora de IFN- β), lo que inicia una cadena de transducción de señales que culmina con la activación del factor de transcripción NF- κ B, y la regulación de la expresión de citoquinas proinflamatorias (Kawasaki et al. 2014).

El término Receptores de lectina tipo C (CLRs) se introdujo inicialmente para distinguir un grupo de proteínas que reconocían carbohidratos (lectinas) de manera dependiente de Ca^{+2} . Estos receptores comparten al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), una estructura globular compacta formada por dos *loops* proteicos estabilizados en la base de cada uno por dos puentes disulfuro, que contiene motivos de residuos conservados y determina la especificidad del carbohidrato (Sancho y Reis e Sousa 2012). Sin embargo, no todos los CLRs reconocen carbohidratos, sino que se incluye en

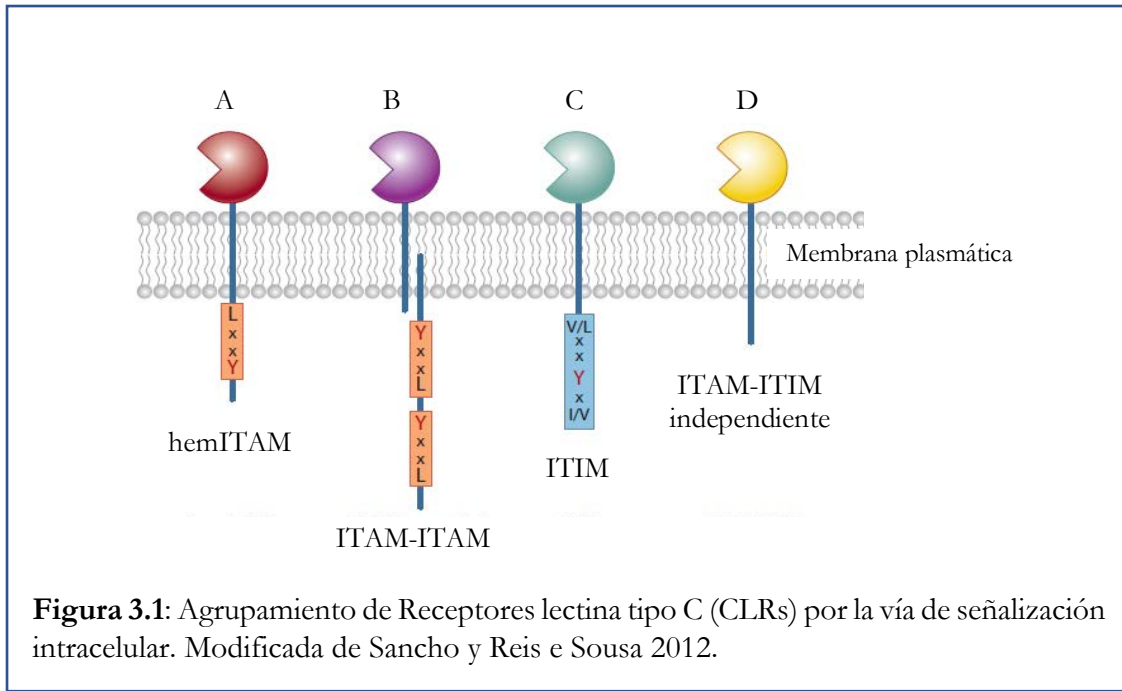
esta familia a todos aquellos receptores que tengan uno o más dominios homólogos a un CRD (Zelensky et al. 2005).

Se han propuesto dos formas de clasificar a los CLR's presentes en las células mieloides (monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas): a través de la estructura del CLR o de los motivos de señalización citoplasmática (Sancho y Reis e Sousa 2012). Teniendo en cuenta la primer variable, existen tres grupos posibles, denominados grupos II, V y VI:

- Grupo II: formado por receptores transmembrana que contienen una cola citoplasmática corta y una zona extracelular que presenta un único CRD que une carbohidratos en forma dependiente de Ca^{+2} .
- Grupo V: formado por receptores transmembrana, que presentan una estructura similar a los del grupo anterior pero el reconocimiento de carbohidratos se produce en forma independiente de Ca^{+2} .
- Grupo VI: formado por receptores transmembrana, caracterizados por una zona extracelular que presenta 8-10 CRDs.

En función de la señalización intracelular utilizada, los CLR's de las células mieloides se agrupan de la siguiente manera (Figura 3.1):

- hemITAM: Señalizan directamente via Syk (tirosina quinasa de bazo) a través de un motivo de activación basado en tirosina presente en la cola citoplasmática del CLR (Rogers et al. 2005) (Figura 3.1 A).
 - Grupo II: SIGN-R3
 - Grupo V: Dectin-1, CLEC-2



- ITAM-ITAM: Señalizan a través de Syk, pero requieren de moléculas adaptadoras que unan al CLR con la quinasa. Estos adaptadores pueden ser FcR γ (fragmento cristalizable del receptor γ) o la molécula DAP12 (Figura 3.1 B).
 - Grupo II: Mincle
 - Grupo V: Dectin-2
- ITIM: Son receptores que poseen un dominio de inhibición y señalizan a través de fosfatasas, como SHP-1 o SHP-2, modulando la activación de otros receptores acoplados a Syk (Figura 3.1 C).
 - Grupo II: DCIR
 - Grupo V: MICTL, CLEC12B
- ITAM-ITIM independientes: No contiene una vía de señalización clara a través de ITAM o ITIM. Si bien su activación en forma individual no genera

una maduración de la célula mielóide, puede modular la señalización de otros receptores (Figura 3.1 D).

- Grupo II: DC-SIGN, SIGN-R1, Langerin
- Grupo V: CLEC-1

La vía de señalización de los CLR's luego de la activación de Syk culmina, al igual que la vía de los TLR's, en la activación del factor de transcripción canónico NF- κ B. Dado que tanto los TLR's como los CLR's comparten la vía de señalización intracelular, el reconocimiento de ligandos por ambos tipos de receptores puede potenciar, inhibir o modular la respuesta inmune generada (Thaiss et al. 2016). Es por ello, que en función de cuáles son los receptores involucrados en el reconocimiento de los antígenos a los cuales se enfrentan, las células presentadoras de antígeno, muestran diferentes estados de maduración y producen diferentes mediadores inflamatorios que impactan en las siguientes respuestas celulares y humorales (Gornati et al. 2018, Itano et al. 2013).

Distintos estudios han demostrado que luego de la interacción con lactobacilos, las células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas desarrollan un programa de maduración celular, caracterizado por un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) y en la producción de citoquinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IL-12) (Konstantinov et al. 2008; Braat et al. 2004, Carasi et al. 2015; Foligne et al. 2007; Jorjao et al. 2015). Estas respuestas inmunes son estimuladas no sólo por las bacterias enteras, sino también por alguno de sus componentes, como fracciones de paredes celulares y proteínas de capa S (Wells 2011).

Como ha sido descrito en el capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral, la glicosilación es la modificación post-traducciona l más frecuente de las proteínas de capa S.

Algunos estudios han demostrado que los carbohidratos presentes en las proteínas de capa S de ciertas especies de *Lactobacillus* tienen un papel fundamental en sus propiedades inmunomodulatorias. En este sentido, Konstantinov y col. (2008) han demostrado que la proteína de capa S de *L. acidophilus* NCFM se une en forma específica al receptor DC-Specific ICAM-3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), generando una modulación de la respuesta generada por el LPS en un modelo de células dendríticas inmaduras. Por otro lado, Gao y col. (2016) demostraron que la presencia de la proteína de capa S de *L. acidophilus* ATCC 4356 compite con el virus H9N2 por la unión a DC-SIGN, lo que impide su unión a células dendríticas. Esta proteína de capa S también inhibe el ingreso del virus Junín a células 3T3 que expresan en forma estable el receptor DC-SIGN (Martínez et al. 2012). Además, este reconocimiento de proteínas de capa S por DC-SIGN se ha demostrado también para proteínas tipo capa S de *L. plantarum* (Liu et al. 2011) y fue recientemente sugerido para *L. kefir* JCM 5818 (Prado Acosta et al. 2016).

Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo así como también resultados expuestos en este trabajo de Tesis Doctoral, han demostrado la glicosilación de las proteínas de capa S en distintas cepas de *L. kefir* (Mobili et al. 2009). Sin embargo, el rol de los glicanos en las propiedades inmunomodulatorias de las proteínas de capa S no han sido estudiados. En este capítulo se describirán los resultados de los ensayos realizados con el objetivo de analizar las propiedades inmunomodulatorias de las proteínas de capa S, los receptores celulares involucrados, y el rol de los azúcares en estas propiedades.

Resultados y discusión

3.1 Propiedades inmunoestimuladoras sobre macrófagos

El estudio de los glicanos, denominado glicómica, involucra tres etapas diferentes: caracterizar estructuralmente los carbohidratos unidos a las proteínas, comprender la interacción glicano-proteína y determinar a través de sistemas *in vitro* e *in vivo* las funciones biológicas de glicanos específicos (Han y Costello 2013). Dado que en el capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral se pudieron estudiar y caracterizar los glicanos pertenecientes a las glicoproteínas de capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348, *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818, nos propusimos analizar el rol funcional de los carbohidratos sobre los efectos biológicos de estas proteínas.

Comenzamos seleccionando la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) para estudiar la capacidad de internalización de macrófagos murinos de la línea RAW264.7. Para ello, se marcó la SLP-8348 con Atto-647, siguiendo las instrucciones del fabricante (MyM, sección 12.1.1), y se las expuso a los macrófagos durante 1 hora en medio completo, tanto a 4°C para analizar la unión de la proteína a las células, como a 37°C para analizar la unión y la internalización (MyM, sección 12.1.2). Como se muestra en las Figuras 3.2A y 3.2B, la SLP-8348 interactúa y es internalizada en forma activa por las células RAW264.7. Se puede observar también que la internalización (calculada como la diferencia entre la MFI a 37°C y a 4°C) es un proceso dosis-dependiente.

Con el objetivo de analizar si los carbohidratos presentes en la SLP-8348 participan en la unión o la internalización de la proteína por macrófagos, estos ensayos fueron realizados utilizando manosa y glucosa, azúcares componentes de la estructura glucídica de la SLP-8348, así como también galactosa, un azúcar no relacionado. La internalización

activa de la proteína se redujo aproximadamente un 50% en presencia de manosa o glucosa, pero no en presencia de galactosa, lo que indica que dicho proceso depende del reconocimiento de los glicanos presentes en la cadena proteica (Figuras 3.2A y 3.2B). Además, la presencia de EGTA, un agente quelante de iones Ca^{+2} , generó una reducción significativa en la internalización de la SLP-8348, sugiriendo la participación de un receptor dependiente de Ca^{+2} en este proceso. Por otro lado, ninguno de los competidores utilizados fue capaz de afectar la unión de la SLP-8348 a los macrófagos de manera significativa, lo que sugiere la participación de otros receptores en este proceso. Esta interacción entre SLP-8348 y los macrófagos fue analizada también a través de un microscopio confocal, donde se observa la internalización de la proteína, que se visualiza de color rojo en el interior de un macrófago (Figura3.2.C). Es importante destacar, que según nuestro conocimiento, es la primera descripción de la internalización de una proteína de capa S por macrófagos.

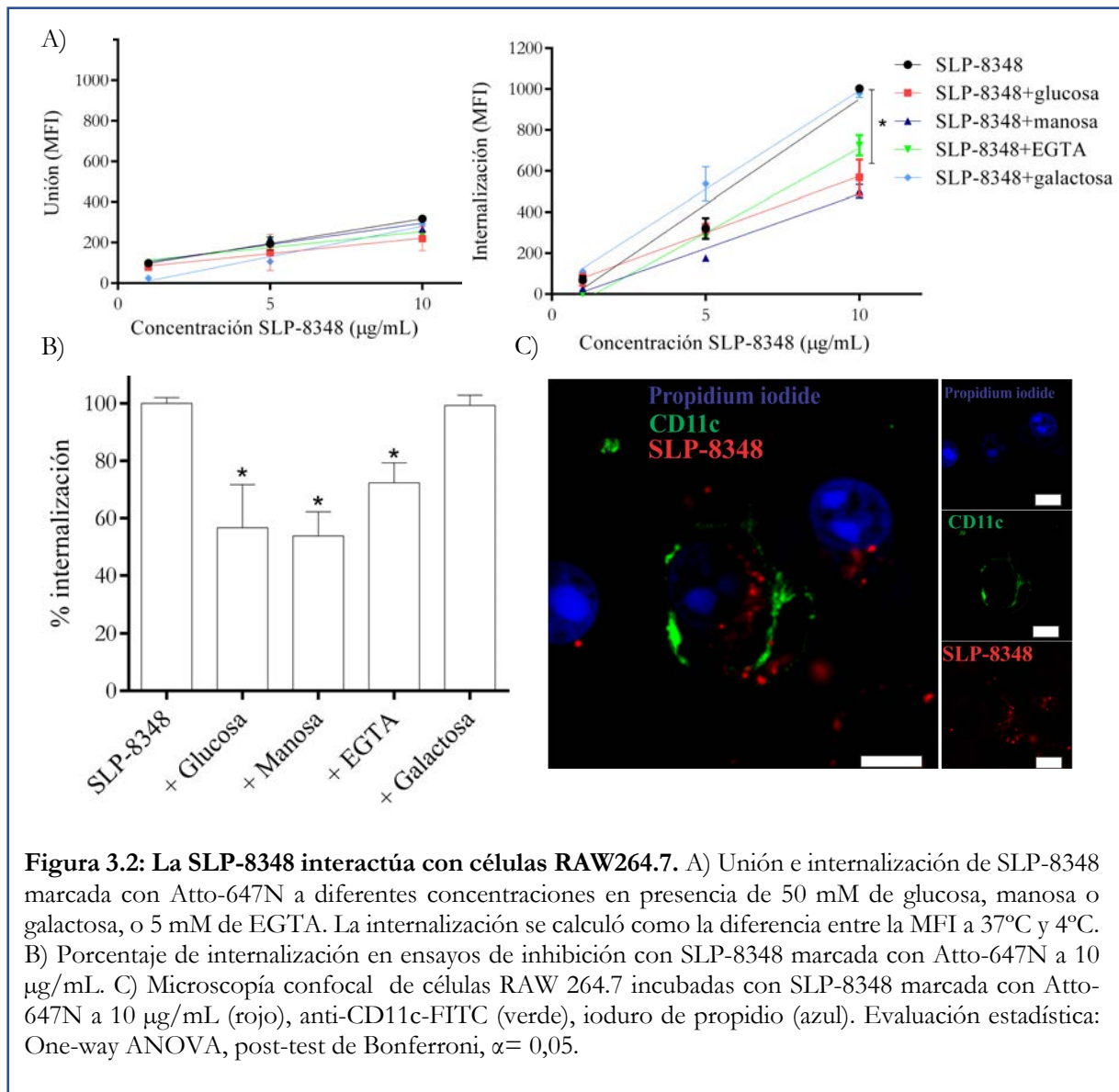
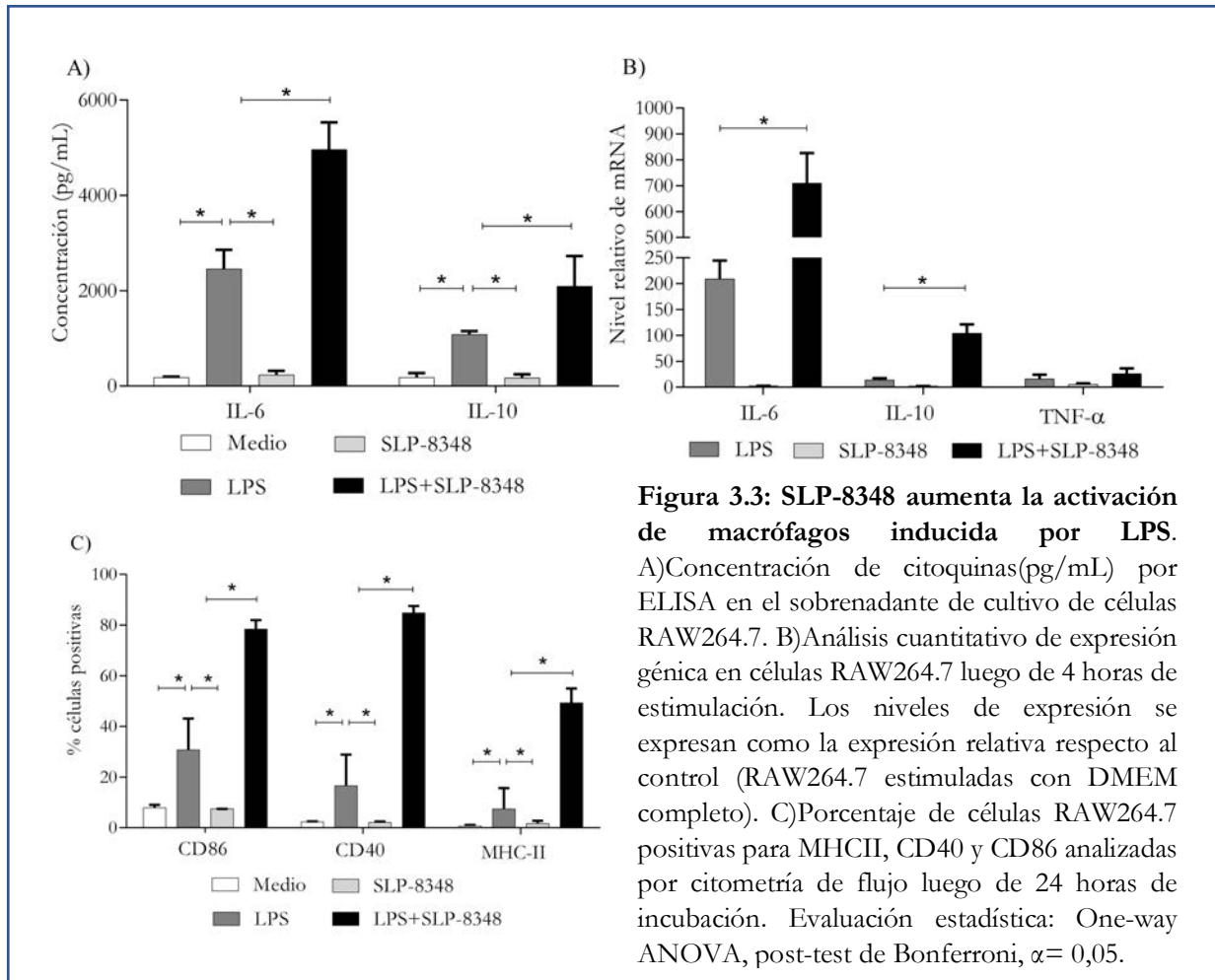


Figura 3.2: La SLP-8348 interactúa con células RAW264.7. A) Unión e internalización de SLP-8348 marcada con Atto-647N a diferentes concentraciones en presencia de 50 mM de glucosa, manosa o galactosa, o 5 mM de EGTA. La internalización se calculó como la diferencia entre la MFI a 37°C y 4°C. B) Porcentaje de internalización en ensayos de inhibición con SLP-8348 marcada con Atto-647N a 10 µg/mL. C) Microscopía confocal de células RAW 264.7 incubadas con SLP-8348 marcada con Atto-647N a 10 µg/mL (rojo), anti-CD11c-FITC (verde), ioduro de propidio (azul). Evaluación estadística: One-way ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$.

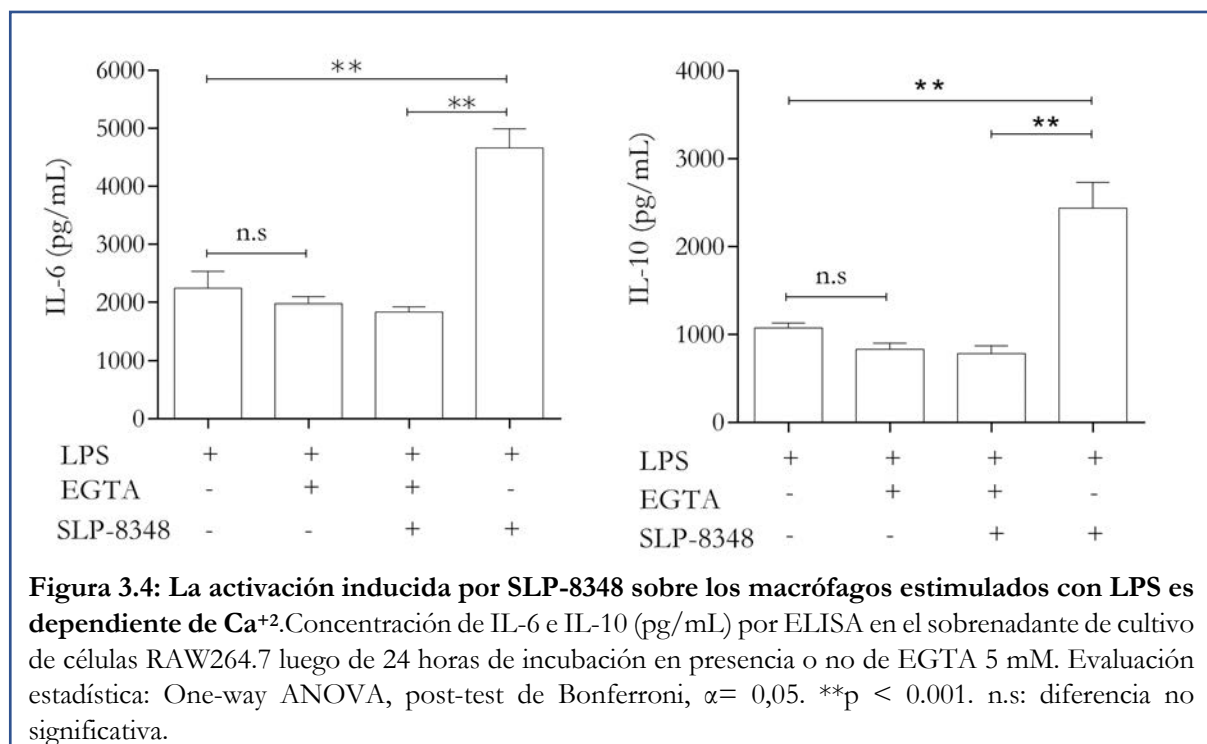
Una vez establecido que la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 es internalizada en forma activa por macrófagos murinos, se procedió a analizar si dicha interacción es capaz de generar una activación celular. Para ello, primero se evaluó la expresión y secreción de IL-6 e IL-10 por parte de las células RAW264.7, así como también la expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie celular luego de la incubación con la proteína durante 24 horas.

Como se ve en la Figura 3.3, la SLP-8348 no indujo una activación celular de los macrófagos, dado que su presencia no afectó la expresión ni secreción de IL-6 o IL-10, ni la expresión de CD40, CD86 o MHC-II en la superficie celular de las RAW264.7. Estos resultados coinciden con los reportados por Konstantinov y col. (2008), quienes demostraron que la unión de la proteína de capa S A (SlpA) de *L.acidophilus* NCFM a las células dendríticas no es suficiente para inducir una fuerte maduración celular.

Sin embargo, la SLP-8348 fue capaz de aumentar la respuesta celular a la estimulación con LPS (agonista TLR-4). En este sentido, macrófagos expuestos a la incubación simultánea con LPS y SLP-8348, mostraron una mayor expresión y secreción de IL-6 e IL-10 (Figura 3.3A y 3.3.B), así como también una mayor expresión de CD40, CD86 y MHC-II (Figura 3.3.C). Estos resultados sugieren que a pesar de los distintos perfiles de estimulación que presentan la SLP-8348 y el LPS, la combinación de los dos resulta en un efecto sinérgico de la respuesta inflamatoria generada por el LPS. Estos hallazgos coinciden parcialmente con los reportados por Konstantinov y col. (2008), quienes demostraron que la estimulación de células dendríticas con la combinación de la SlpA de *L.acidophilus* NCFM y LPS genera una mayor secreción de IL-10 comparado con la estimulación del LPS, sin afectar la secreción de IL-6 o TNF- α , aún ensayando la misma relación de concentración SlpA/LPS que utilizamos en nuestros ensayos. Sin embargo, el aumento de la respuesta de los macrófagos al LPS no es una regla general para las proteínas de capa S de los lactobacilos. De hecho, Taverniti y col. (2013) han reportado que la proteína de capa S A (SlpA) de *L.helveticus* MIMLh5 inhibe la respuesta proinflamatoria generada por el LPS sobre macrófagos humanos.



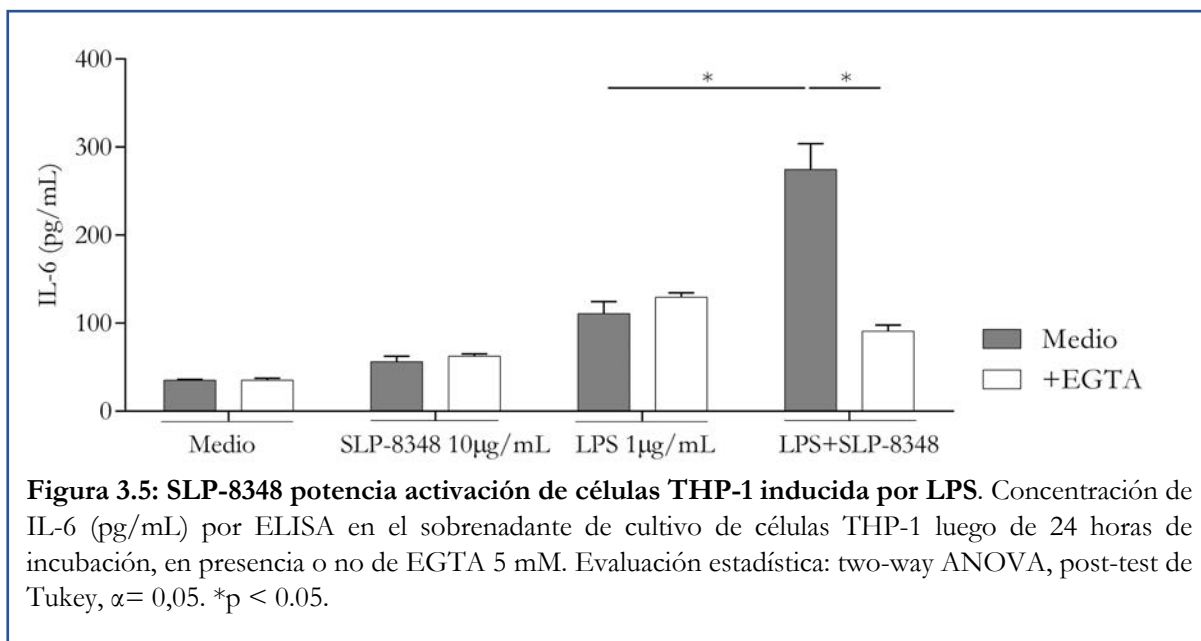
Cuando el EGTA fue agregado a la combinación de la SLP-8348 y LPS en los ensayos de estimulación celular, los niveles de IL-6 e IL-10 secretados por los macrófagos disminuyeron hasta aquellos correspondientes a la estimulación con LPS (Figura 3.4), indicando que la interacción entre la SLP-8348 y los macrófagos activados con LPS es mediada por un receptor dependiente de Ca^{+2} . Cabe destacar, que en las condiciones ensayadas, la presencia de EGTA no afectó la respuesta proinflamatoria de las células RAW264.7 al LPS (Figura 3.4).



Para identificar el rol de los azúcares de la SLP-8348 en la potenciación del efecto del LPS, se realizaron ensayos de inhibición en presencia de glucosa y manosa, monosacáridos que inhibieron la internalización de la SLP-8348 por las células RAW264.7. La estimulación combinada con LPS y los carbohidratos modificó la producción de IL-6 e IL-10 respecto a las células tratadas sólo con LPS, por lo que estos ensayos no fueron útiles para determinar el papel biológico de los glicanos de la SLP-8348.

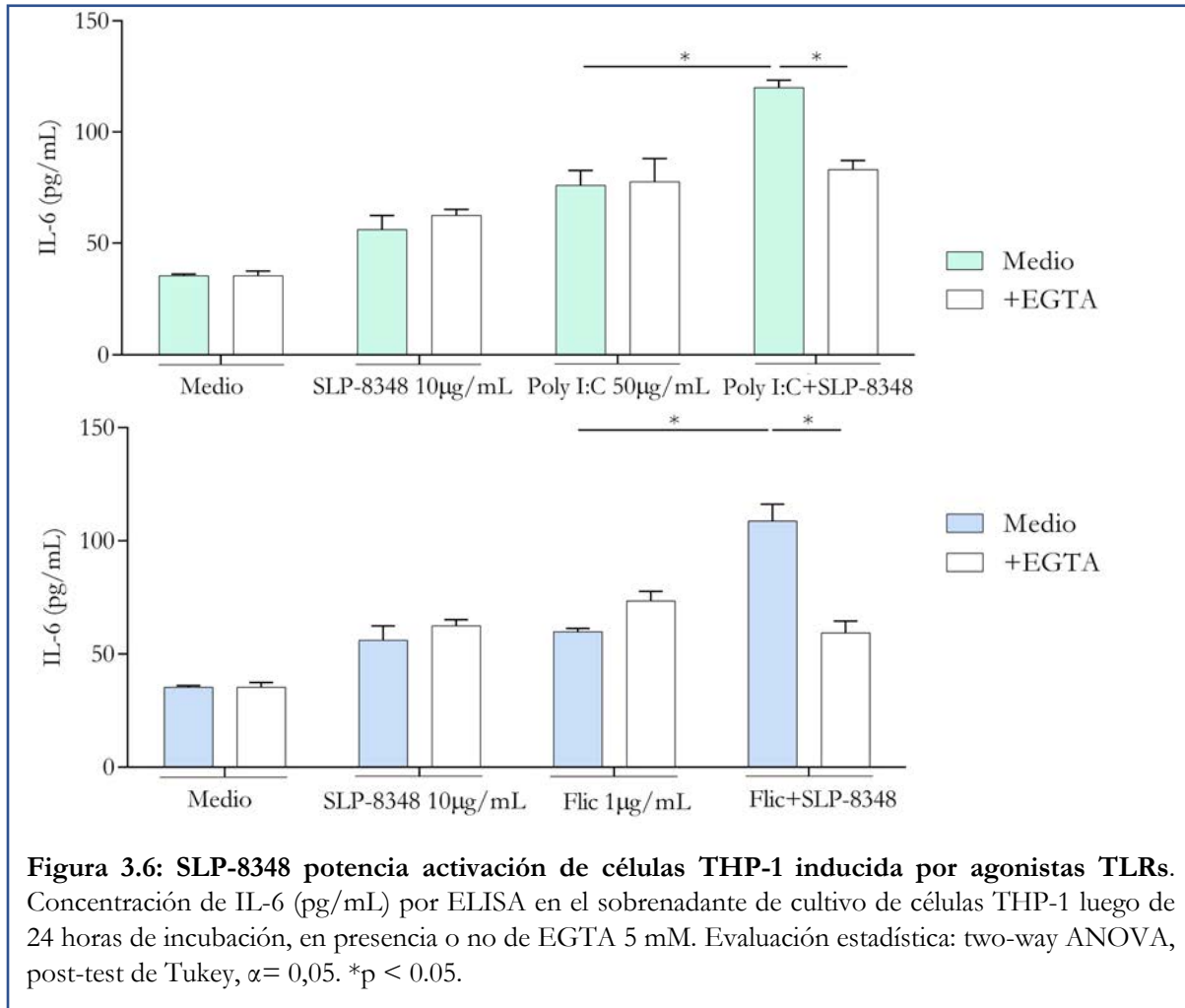
Por otro lado, los ensayos de estimulación celular con SLP-8348, en presencia o no de LPS, también fueron realizados utilizando macrófagos intraperitoneales de ratones BALB/c, pero, lamentablemente, los resultados obtenidos no fueron reproducibles por lo que no se muestran en este capítulo.

Con el objetivo de analizar si las propiedades inmunoestimuladoras observadas para la SLP-8348 sobre las células RAW264.7 también se observaban utilizando macrófagos humanos, se cuantificó la producción de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de la línea celular THP-1 estimuladas con SLP-8348 y LPS. Como se muestra en la Figura 3.5, nuevamente la SLP-8348 no generó una producción significativa de IL-6 respecto al control con medio de cultivo, pero la estimulación combinada con LPS, aumentó la activación celular respecto a la estimulación solo con LPS. De manera similar a lo observado en las células RAW264.7, este efecto sinérgico en la secreción de IL-6 se inhibió completamente con la presencia de EGTA en el medio de cultivo, lo que indica nuevamente que el efecto generado por la SLP-8348 está mediado por un receptor dependiente de Ca^{+2} (Figura 3.5).



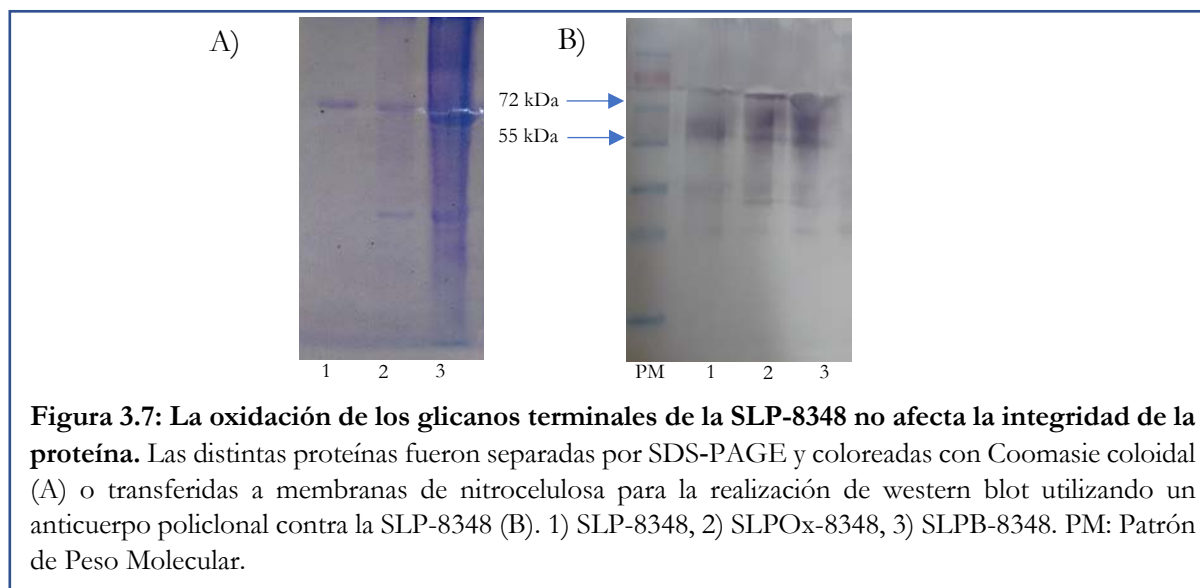
Hasta el momento, los resultados sugieren la participación de un CLR en el reconocimiento de la SLP-8348. Pese a que dicha interacción no fue capaz de inducir una activación de los macrófagos, cuando se combinó con un agonista TLR-4 como el LPS, la activación de las células fue mayor que con el LPS. Distintos estudios han demostrado que existe una interacción entre las respuestas generadas por un agonista TLR y un agonista CLR (Bergman et al. 2004, Thaiss et al. 2015, del Fresno et al. 2018). Geijtenbeek y col. (2009) han concluido que esta interacción depende de la activación inicial de NF- κ B por el agonista TLR, y por lo tanto, todo ligando que señalice a través de un TLR podría sufrir una modificación de su respuesta en presencia de otro ligando reconocido por un CLR. Para analizar si la potenciación de la respuesta celular al LPS generada por la SLP-8348 también se observaba al estimular con otros agonistas TLRs, se realizaron estudios estimulando células THP-1 con la SLP-8348 combinada con flagelina de *Salmonella typhimurium* (FliC:agonista TLR-5) o poly I:C (agonista TLR-3). Nuevamente, la presencia de la SLP-8348 aumentó la secreción de IL-6 por parte de las células THP-1 respecto de las estimuladas sólo con los agonistas TLRs (Figura 3.6). La presencia de EGTA eliminó el efecto sinérgico generado por la SLP-8348, sin afectar la activación generada por FliC o poly I:C.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que la SLP-8348 es reconocida por un receptor dependiente de Ca^{+2} , y tiene un efecto sinérgico en la activación de los macrófagos por diferentes agonistas TLR.

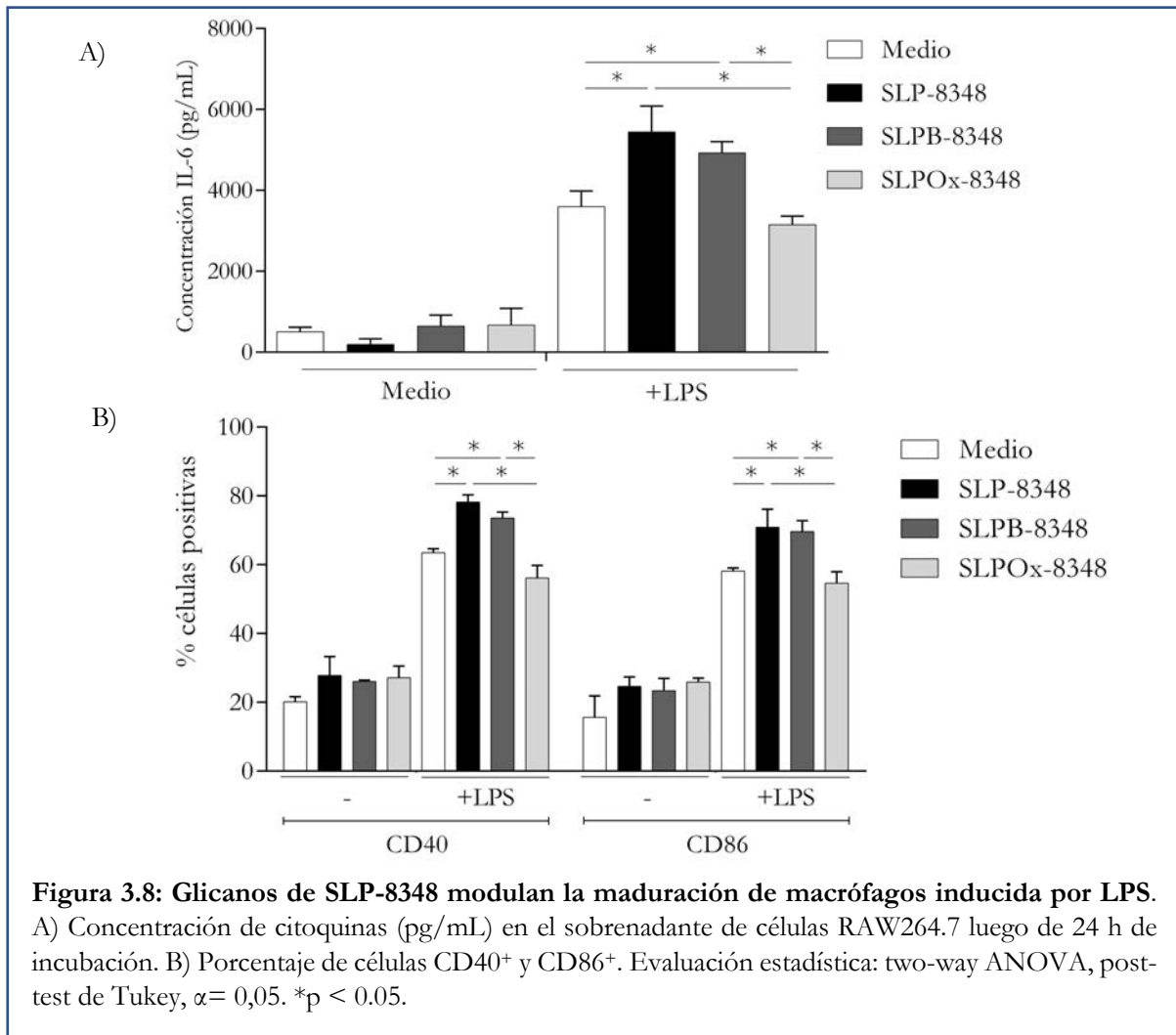


3.2. Rol de los glicanos en las propiedades inmunoestimuladoras de las proteínas de capa S

Si bien los ensayos de estimulación realizados en presencia de EGTA sugieren fuertemente la participación de los restos de glicanos de las SLP en su capacidad inmunoestimuladora, la imposibilidad de recurrir a las pruebas de inhibición con azúcares (tal como se hizo en los ensayos de internalización), nos llevó a emplear una estrategia alternativa. Por ello, con el fin de demostrar si los carbohidratos presentes en la SLP-8348 participan en la potenciación de la activación de los macrófagos por diferentes agonistas TLR, se estimularon células RAW264.7 con proteínas de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 previamente oxidadas con m-periodato de sodio (SLPOx-8348), una técnica usada habitualmente para evaluar el rol funcional de glicoconjugados. Durante este proceso los grupos dioles vecinales presentes en los glicanos son oxidados a grupos aldehído, que son posteriormente reducidos por borohidruro de sodio. Esto conduce a una pérdida de la estructura tridimensional de los carbohidratos, por lo que todo proceso que depende de ella, se verá abolido (Rodríguez et al. 2015). Es importante destacar que el tratamiento no afecta la integridad de la SLP-8348, ya que no modifica la movilidad electroforética de las proteínas ni se pierde el reconocimiento por un suero policlonal anti-SLP (Figura 3.7).

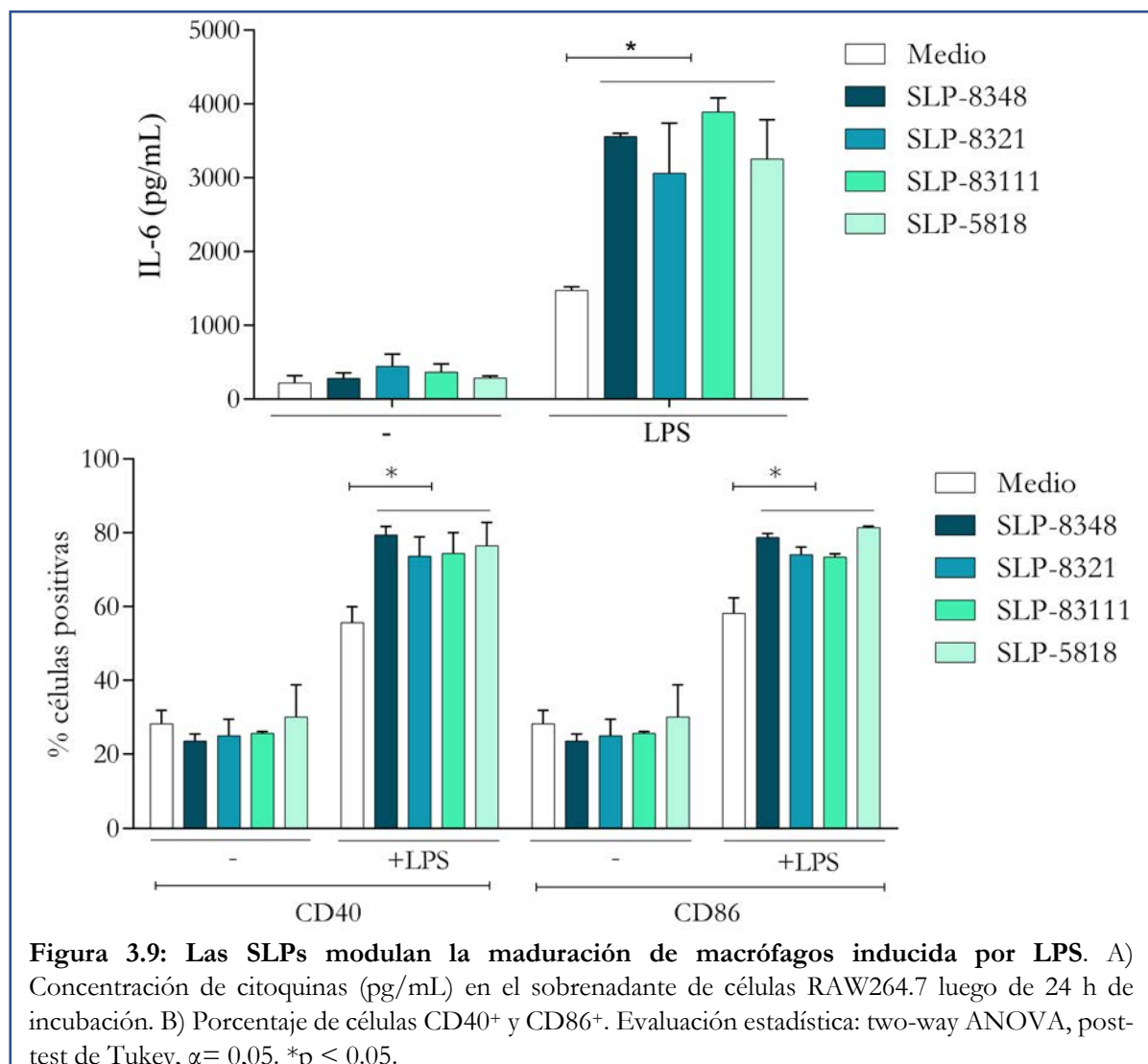


Los macrófagos estimulados con la SLPOx-8348 y LPS produjeron niveles de IL-6, y una expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40 y CD86) similares a aquellas células incubadas solo con LPS (Figura 3.8). Los macrófagos incubados con el control SLPB-8348 (SLP-8348 sometido a todo el tratamiento con excepción de la incubación con m-periodato de sodio) y LPS desarrollaron el mismo perfil de estimulación que las células en presencia de LPS y SLP-8348, con mayores niveles de IL-6, CD40 y CD80 en comparación con los macrófagos tratados solo con LPS (Figura 3.8). Estos resultados indican que los glicanos terminales presentes en SLP-8348 determinan la modulación inmune en macrófagos activados con LPS. Por otro lado, nuestros datos muestran que la oxidación química de los carbohidratos terminales es una buena estrategia para estudiar su papel funcional en la SLP-8348.



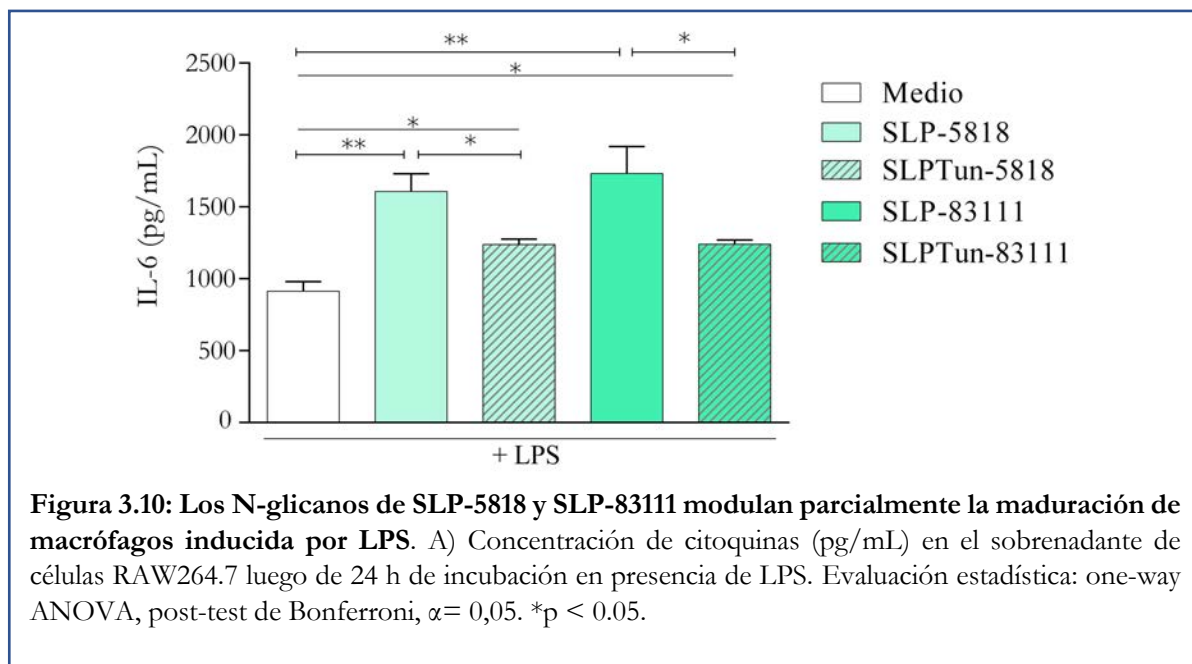
Habiendo demostrado que los carbohidratos presentes en la SLP-8348 determinan la actividad inmunomoduladora sobre macrófagos, nos propusimos a analizar si este efecto potenciador de la respuesta a los agonistas TLR es generado por otras proteínas de capa S cuyos glicanos fueron caracterizados anteriormente: capa S de *L. kefir* CIDCA 8321 (SLP-8321), capa S de *L. kefir* CIDCA 83111 (SLP-83111) y capa S de *L. kefir* JCM 5818 (SLP-5818). Para ello, células RAW264.7 fueron estimuladas con estas glicoproteínas en presencia o ausencia de LPS y se cuantificaron los niveles de IL-6 en el sobrenadante de las células en cultivo. Como se muestra en la Figura 3.9, todas las proteínas de capa S fueron

capaces de potenciar la respuesta al LPS, aumentando la secreción de IL-6 y la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD86) en la superficie celular.



Las proteínas de capa S de las cuatro cepas ensayadas presentan diferentes tipos de glicanos. La SLP-8321 y la SLP-8348 sólo presentan O-glicanos, mientras que la SLP-83111 y la SLP-5818 presentan O- y N-glicanos. Dado que todas generan una potenciación de la respuesta celular al LPS, nos propusimos a analizar si los O-glicanos, presentes en todas las proteínas, eran responsables de dicho efecto. Para ello, se crecieron las bacterias *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818 en presencia de tunicamicina, un antibiótico que inhibe

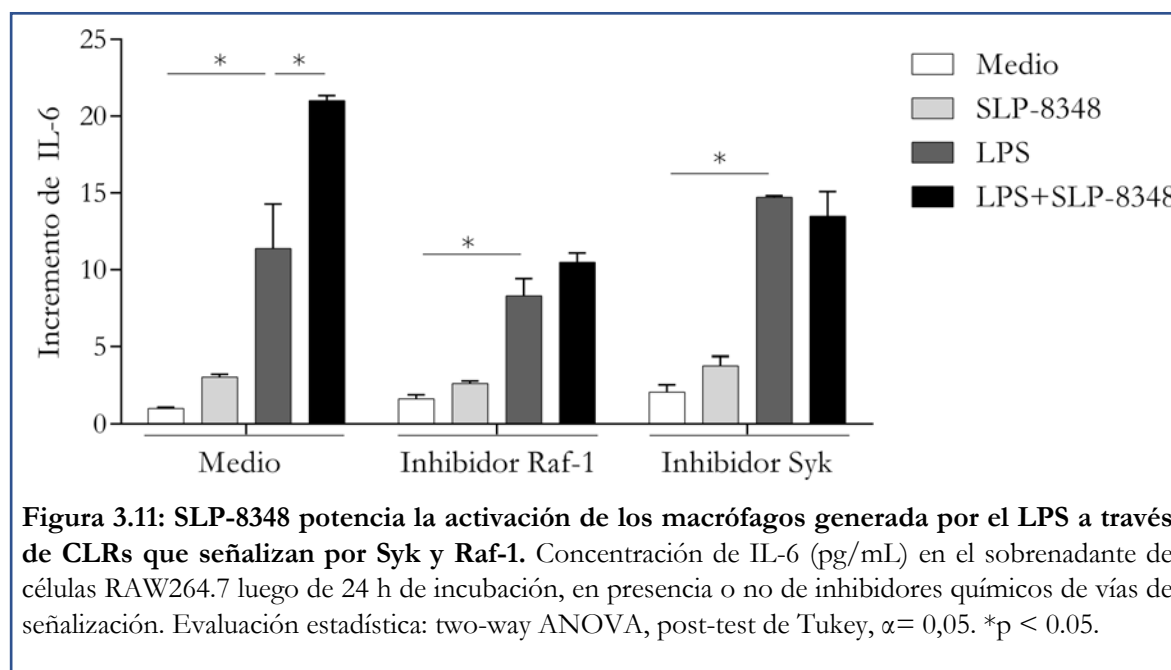
la N-glicosilación de las proteínas al interferir en la transferencia de UDP-N-acetilglucosamina a su transportador durante la biosíntesis de los glicoconjugados (Elbein 1987), y luego se extrajeron las proteínas de capa S (SLPTun-83111 y SLPTun-5818). Al estimular células RAW264.7 con LPS y SLPTun-83111, los niveles de IL-6 secretados fueron menores a los obtenidos utilizando la combinación de LPS y SLP-83111 (Figura 3.10). Sin embargo, la presencia de SLPTun-83111 generó un aumento en la secreción de IL-6 respecto a las células estimuladas solo con LPS. Estos resultados se repiten al analizar el efecto de la estimulación de los macrófagos con la SLP-5818 y SLPTun-5818 (Figura 3.10). Esto indica que tanto los O-glicanos como los N-glicanos presentes en las estructuras glucídicas de las SLP-83111 y SLP-5818 tendrían un rol importante en la inmunoestimulación generada por estas proteínas. Para confirmar estos resultados se están realizando análisis estructurales de los restos de glicanos presentes en las SLPTun-83111 y SLPTun-5818, para asegurar la ausencia de N-glicanos en estas proteínas.



3.3. Reconocimiento de proteínas de capa S por Receptores de lectina tipo C

Teniendo en cuenta que los resultados presentados hasta el momento sugieren un rol crucial de los carbohidratos presentes en las proteínas de capa S en la inmunoestimulación inducida por estas glicoproteínas sobre los macrófagos, nos propusimos identificar los posibles CLRs que reconocen a las SLP-8348, SLP-8321, SLP-83111 y SLP-5818.

Primero se llevaron a cabo cultivos celulares de RAW264.7 con SLP-8348, y LPS en presencia de inhibidores químicos de vías de señalización: ER27319 y GW5074, que inhiben las vías de señalización de Syk y Raf-1 respectivamente. Como se observa en la Figura 3.11, la presencia de los inhibidores de Syk o Raf-1, elimina el efecto sinérgico de la SLP-8348 sobre el LPS, lo que demuestra la participación de diferentes CLRs que señalizan a través de estas vías en el reconocimiento de los glicanos de la SLP-8348.

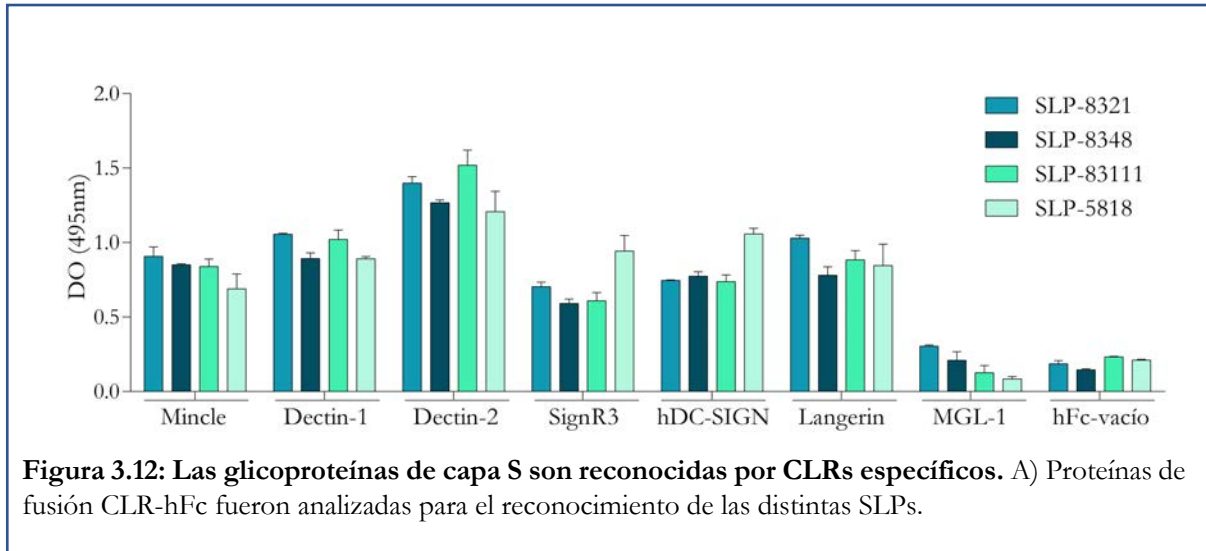


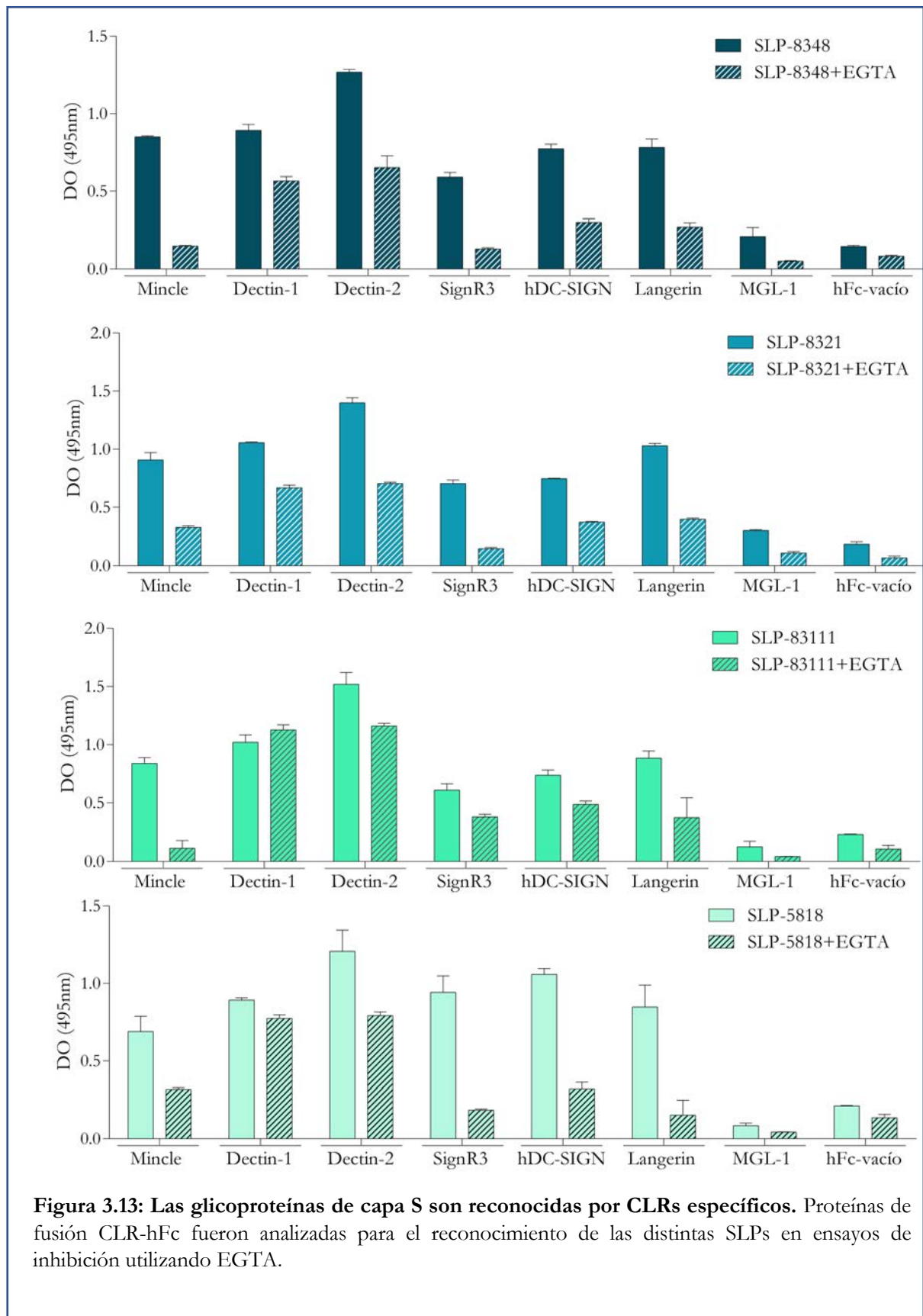
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, podemos suponer que los carbohidratos presentes en la SLP-8348 son reconocidos por CLR que señalizan vía Syk o Raf-1. Con el objetivo de determinar cuáles son los receptores que están involucrados en el reconocimiento de las glicoproteínas de capa S se realizó un método basado en un ensayo tipo ELISA utilizando proteínas de fusión entre la porción CRD de los diferentes CLR, que contiene el sitio de reconocimiento a los carbohidratos, y la porción Fc de la IgG humana (CLR-hFc) (Mayer et al. 2018).

Como se muestra en la Figura 3.12, los glicoconjugados de SLP-8348, SLP-8321, SLP-83111 y SLP-5818 reaccionaron fuertemente con Mincle, Dectin-1 y Dectin-2. Todas las otras proteínas de fusión CLR-hFc probadas (Sign-R3, hDC-SIGN y mLangerin), excepto mMGL-1, mostraron uniones con diferente intensidad a las cuatro proteínas de capa S. Se observa que la SLP-5818 presenta también una fuerte interacción con DC-SIGN y su homólogo murino Sign-R3. Esta interacción entre DC-SIGN y la SLP-5818 ha sido sugerida por Prado Acosta y col. (2016), quienes demostraron que la presencia de la SLP-5818 reduce la unión de la SlpA de *L. acidophilus* a DC-SIGN, posiblemente por la capacidad de este CLR de reconocer a la SLP-5818.

Teniendo en cuenta que a excepción de Dectin-1 y Dectin-2, los CLR probados en este trabajo reconocen las estructuras de glicanos de una manera dependiente de Ca^{+2} , incubamos las proteínas de fusión CLR-hFc con las glicoproteínas de capa S en presencia de EGTA. Se observa que alrededor del 70% de la unión entre las proteínas y estas CLR-hFc fue inhibida por la incubación con EGTA, lo que confirma que los glicanos presentes en las SLPs participan en el reconocimiento por estos CLR de una manera dependiente de

Ca²⁺ (Figura 3.13). Como era de esperar, la presencia de EGTA no modificó significativamente la interacción de las SLPs con Dectin-1 o Dectin-2.



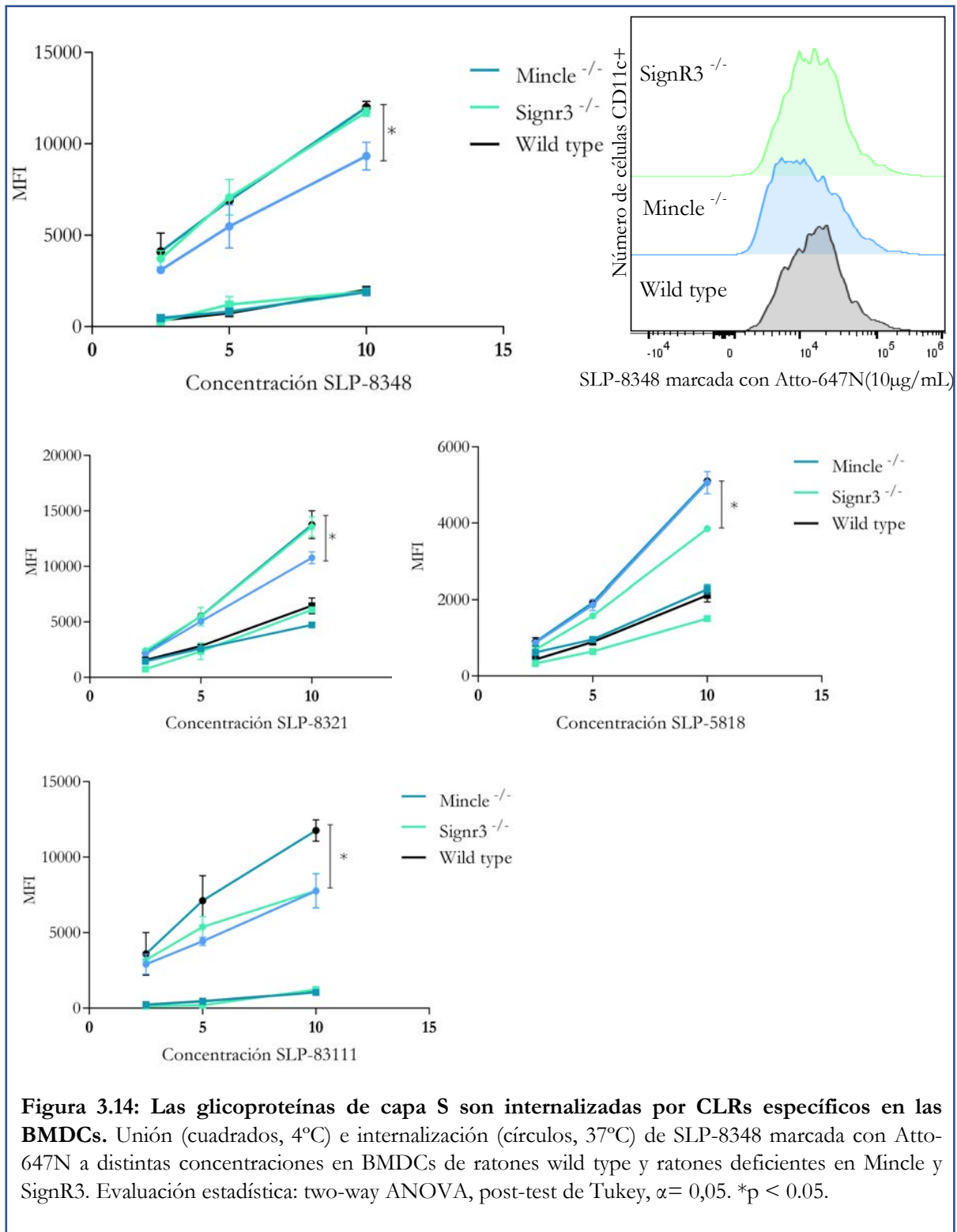


El reconocimiento de proteínas de capa S por diferentes CLR's ha sido informado previamente. En este sentido, Konstantinov y col. (2008) han demostrado que la SlpA de *L.acidophilus* NCFM es reconocida por DC-SIGN en BMDCs humanos, y por Sign-R3 en un modelo murino (Lightfoot et al. 2015). Estos estudios indican que esa unión es la responsable de la inducción de señales inmunomoduladoras por parte de la proteína de capa S de *L.acidophilus* NCFM. Por otro lado, se ha informado que el receptor Mincle está involucrado tanto en el reconocimiento como en la modulación inmune provocada por la proteína de capa S del patógeno oral *Tannerella forsythia* (Chinthamani et al. 2017).

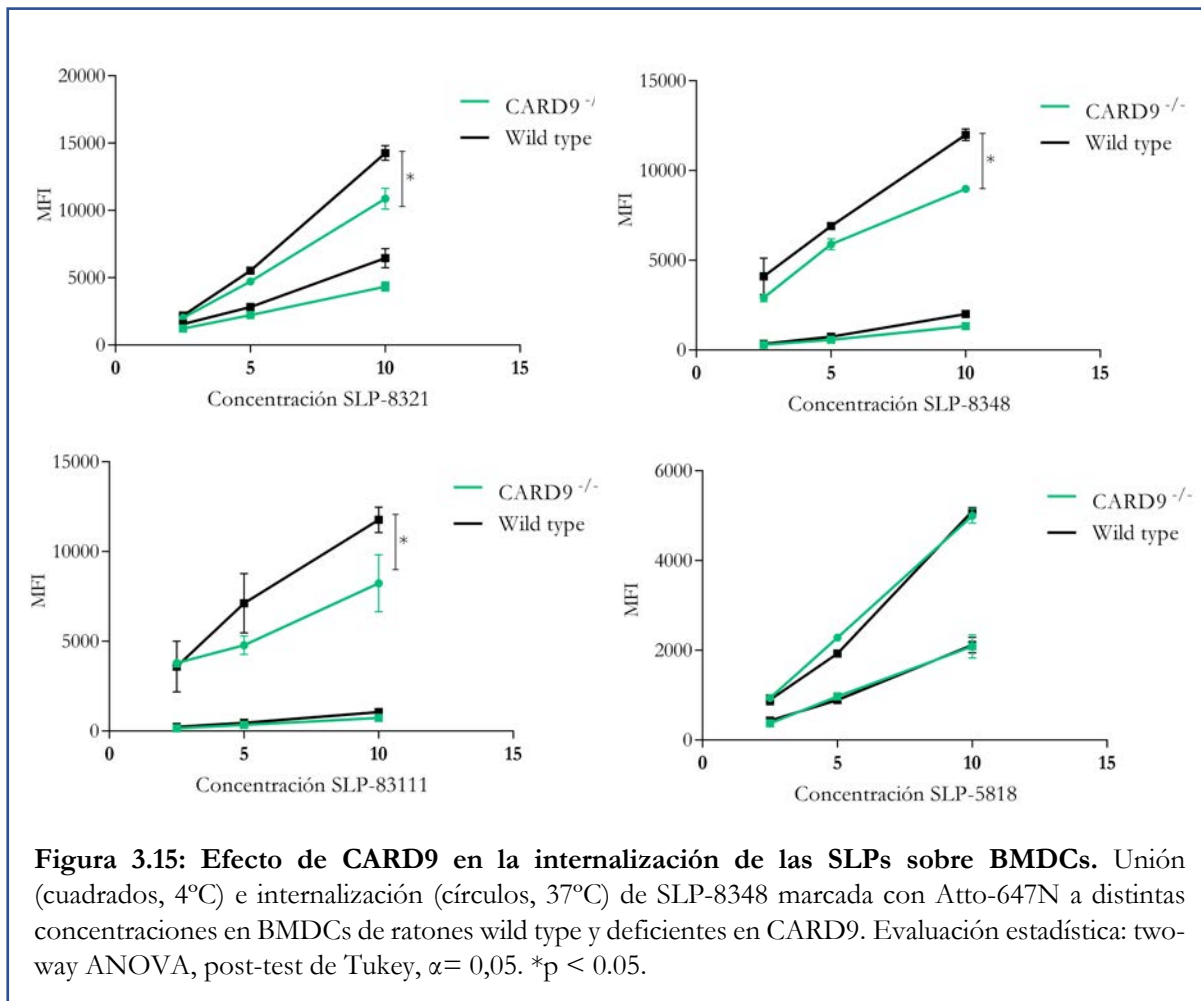
Dado que el método basado en un ensayo tipo ELISA utilizado para detectar la unión de las proteínas de capa S con las proteínas de fusión CLR-Fc puede conducir a resultados falsos positivos, requiere confirmación mediante métodos adicionales (Mayer et al. 2018). Por lo tanto, después de establecer el patrón de reconocimiento de los CLR sobre las SLPs, investigamos si esta unión podría inducir la internalización de las SLPs en BMDCs. Con este fin, las SLPs marcadas previamente con Atto-647 se incubaron con BMDCs provenientes de ratones C57BL/6 *wild type* (*wild type*), ratones deficientes en Mincle o en Sign-R3, tanto a 4°C como a 37°C, y la intensidad de fluorescencia en las células CD11c⁺ se determinó mediante citometría de flujo. Las BMDCs se utilizaron al octavo día de cultivo, donde más del 80% de las células expresaban el factor de diferenciación de células dendríticas CD11c (Monteiro et al. 2019). La elección de los ratones knockout para los distintos CLR's se realizó en función de los animales disponibles en el bioterio de la University of Veterinary Medicine, Hannover.

Como se muestra en la Figura 3.14, todas las SLPs interactuaron y fueron internalizadas por las BMDCs. Además, la internalización de las SLP-8321 y la SLP-8348

se redujo significativamente en BMDCs derivadas de ratones *Mincle*^{-/-} pero no de ratones *SignR3*^{-/-}, lo que indica que la captación de estas proteínas depende parcialmente del reconocimiento de sus glicanos por *Mincle*. Estos resultados son esperables, ya que, como se describió en el Capítulo 2 de este trabajo de Tesis, se ha demostrado que ambas proteínas presentan la misma estructura glicosídica. A modo de ejemplo, se muestran los histogramas obtenidos por citometría de flujo para el caso de la SLP-8348. Utilizando la SLP-5818, la internalización se redujo sólo cuando los animales carecían del receptor *Sign-R3*, lo que coincide con el fuerte reconocimiento de este receptor a la glicoproteína en los ensayos tipo ELISA antes mencionados (Figura 3.14). Para la SLP-83111 tanto la ausencia de *Mincle* como de *Sign-R3* en las BMDCs redujo la internalización de la proteína, lo que sugiere que ambos CLR's estarían implicados en la captación de esta glicoproteína. Esto podría ser consecuencia de la presencia de diferentes restos glucídicos en la estructura de la SLP-83111. La internalización de proteínas de capa S por DCs ha sido recientemente reportada por Taverniti y col. (2019), quienes demostraron que la *SlpA* de la cepa *L. helveticus* MIMLh5 está involucrada además en la internalización de la bacteria, aunque no se ha determinado el o los receptores celulares involucrados en dicho proceso.



En la vía de señalización de los CLR_s acoplados a ITAM de las células mieloides, como lo son Mincle, Dectin-1, Dectin-2 y Sign-R3 participa CARD9, una proteína de señalización que contiene dominios de reclutamiento de caspasa (Ruland 2008). Teniendo en cuenta que estos CLR_s tuvieron un fuerte reconocimiento de las proteínas de capa S en los ensayos tipo ELISA, se realizaron los ensayos de internalización de las SLP_s previamente marcadas con Atto-647 utilizando ratones deficientes para CARD9. Como se muestra en la Figura 3.15, la ausencia de CARD9 redujo significativamente la internalización de las SLP-8321, SLP-8348 y SLP-83111. Estos resultados indican que la ausencia de una molécula adaptadora de la vía de señalización de los CLR_s mencionados tiene un efecto sobre la endocitosis de antígenos que son reconocidos por estos receptores.



En el caso de la SLP-5818, la ausencia de CARD9 no disminuyó la internalización de la proteína. Teniendo en cuenta la participación de Sign-R3 en la endocitosis de la SLP-5818, se hubiese esperado que la ausencia de CARD9, una molécula adaptadora involucrada en la señalización a través de este CLR, también impacte negativamente en la internalización de esta glicoproteína. Estos resultados podrían ser consecuencia de dos factores: CARD9 no participa en la endocitosis mediada por Sign-R3, o la internalización de la SLP-5818 depende de otro CLR cuya endocitosis no depende de la presencia de CARD9. Diversos estudios demuestran que CARD9 no participa en la endocitosis mediada por Dectin-1. Por ejemplo, Goodridge y col. (2009), demostraron que tanto BMDCs como BMMs (Macrófagos derivados de médula ósea) derivados de ratones deficientes en CARD9 no presentan diferencias de internalización de partículas reconocidas por Dectin-1, lo que indica que esta proteína adaptadora no tiene ningún rol en la fagocitosis de estas células a través de este receptor. Estos resultados están en línea con los presentados por Underhill y col. (2005), quienes demostraron que la transfección de Dectin-1 sobre células HEK293, sin la presencia de CARD9, fue suficiente para permitir fagocitosis. Para evaluar la participación de Dectin-1 sobre la internalización de la SLP-5818, deberían realizarse los ensayos sobre BMDCs derivadas de ratones deficientes en este receptor, los que no estaban disponibles en el Laboratorio del Dr. Lepenies al momento de mi estadía. Para demostrar que los resultados obtenidos para la endocitosis de la SLP-5818 son consecuencia de que CARD9 no tiene ningún efecto sobre la internalización de un ligando Sign-R3, se deberían realizar experimentos en líneas celulares transfectadas que expresen Sign-R3 sobre la superficie celular pero que no posean CARD9. Estos ensayos no fueron realizados en este trabajo de Tesis Doctoral.

3.4. Propiedades inmunoestimuladoras de proteínas de capa S sobre BMDCs

Una vez establecido que las BMDCs pueden internalizar las proteínas de capa S de las cuatro cepas estudiadas, nos propusimos a analizar si esto genera una activación celular consistente con lo observado en las células RAW264.7. Para ello, en primer lugar incubamos las SLPs con BMDCs de ratones C57BL/6 *wild type* durante 24 horas. Las SLPs analizadas fueron capaces de inducir una maduración de las células dendríticas, generando un aumento significativo en los niveles secretados de IL-6 y TNF- α , así como en la expresión de CD40 y CD80 (Figura 3.16.A y 3.16.B). El mismo efecto se observó utilizando la combinación de las SLPs con LPS como agonista TLR-4, lo que generó mayores niveles de IL-6 y TNF- α , así como una mayor expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD80 respecto a las BMDCs estimuladas solo con LPS (Figura 3.16.A y 3.16.B). Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos utilizando macrófagos murinos, donde las SLPs no fueron capaces de inducir una activación celular, pero si potenciaron la respuesta a la estimulación con LPS de *E.coli* (Figuras 3.3). En este caso, las SLPs demostraron capacidad de activar células dendríticas, demostrando que los mismos estímulos pueden desencadenar diferentes respuestas dependiendo del tipo celular, su origen o polarización (Hábil et al. 2011). Si bien las BMDCs constituyen una población heterogénea, dado que están formadas por células dendríticas, macrófagos y unos pocos granulocitos (Helft et al. 2015), nuestros estudios se realizaron cuando más del 80% de la población celular expresaba el marcador de superficie CD11c, analizando la expresión de moléculas coestimuladoras en esta población CD11c⁺ (MyM sección 2.3).

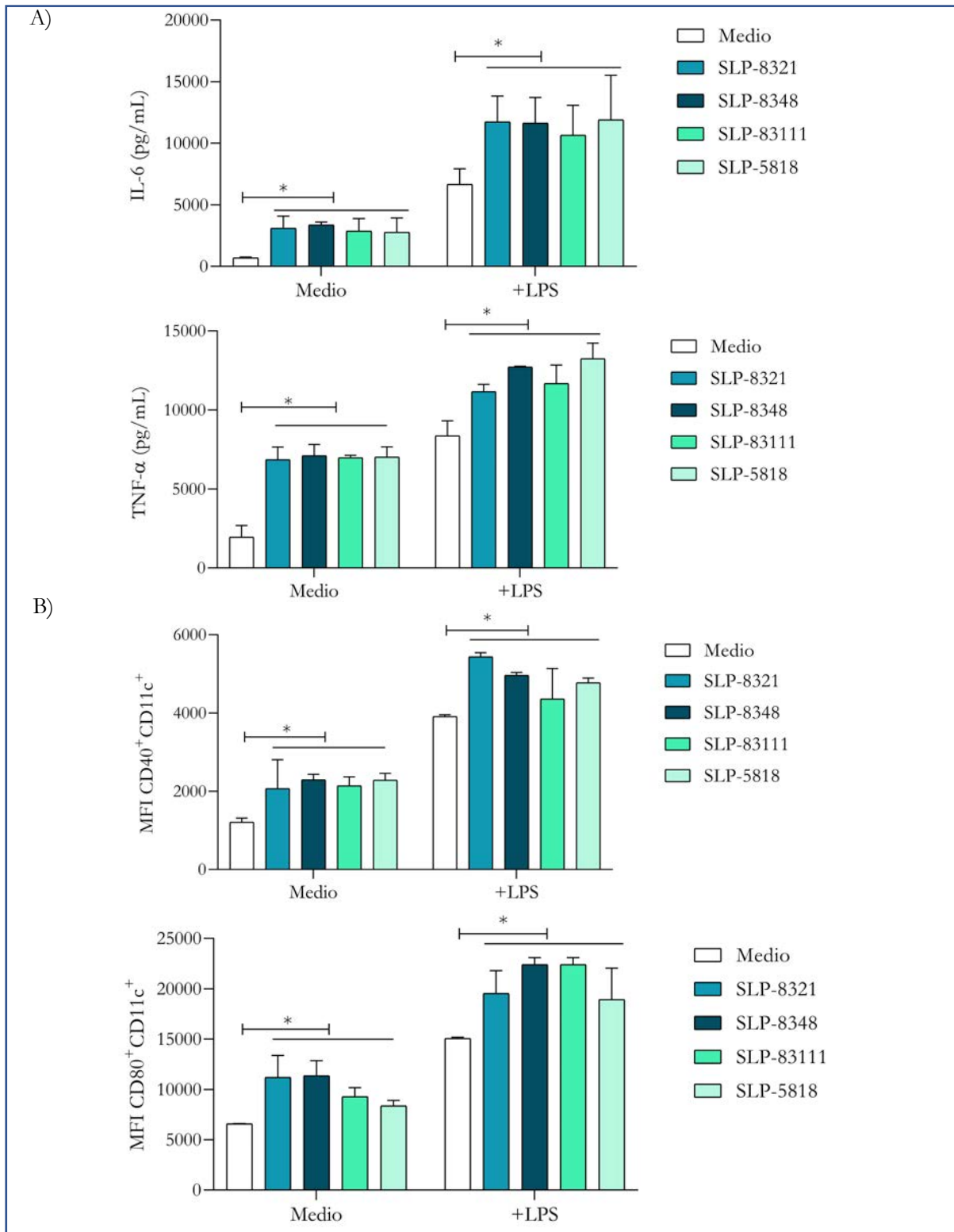


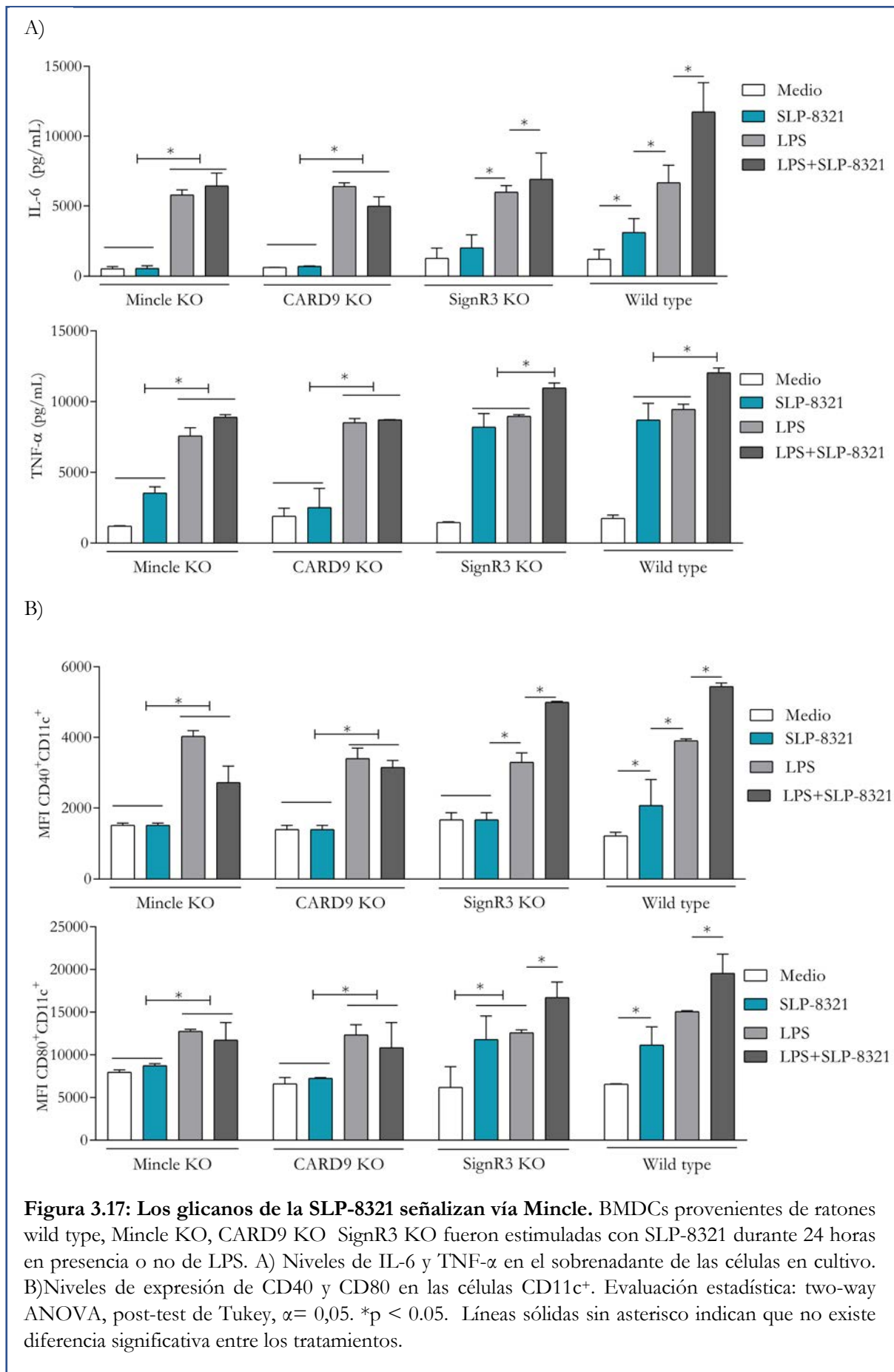
Figura 3.16: Las glicoproteínas de capa S activan las BMDCs. Se incubaron las SLPs con BMDCs durante 24 horas y se cuantificaron los niveles de IL-6 y TNF- α en el sobrenadante de las células en cultivo (A) y los niveles de expresión de CD40 y CD80 en las células CD11c⁺ (B). Evaluación estadística: two-way ANOVA, post-test de Tukey, $\alpha=0,05$. * $p < 0,05$. Líneas sólidas sin asterisco indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

Teniendo en cuenta que la internalización de las glicoproteínas de capa S es un proceso basado en el reconocimiento de sus glicanos por Mincle (SLP-8321, SLP-8348 y SLP-83111) o Sign-R3 (SLP-83111 y SLP-5818), investigamos si estos receptores o su proteína adaptadora CARD9 median la respuesta innata generada por las SLPs sobre las BMDCs. Con este fin, las BMDCs derivadas de ratones C57BL/6 *wild type*, ratones deficientes en Mincle, ratones deficientes en CARD9 y ratones deficientes en Sign-R3 se incubaron durante 16 horas con las SLPs en presencia o no de LPS.

En el caso de las SLP-8321 y SLP-8348, la ausencia de señalización de Mincle o CARD9 en BMDCs resultó en una menor producción de IL-6 y TNF- α , y una menor expresión de CD40 y CD80 en comparación con BMDCs *wild type* o SignR3 deficientes (Figuras 3.17 y 3.18). El mismo efecto se observó utilizando la combinación de LPS con las SLP-8321 o SLP-8348, lo que demuestra que Mincle y su adaptador de señalización CARD9 contribuyen a la estimulación generada por estas proteínas de capa S y a la modulación provocada por esta glicoproteína en el efecto del LPS sobre BMDCs (Figuras 3.17 y 3.18). Distintos estudios han mostrado que el reconocimiento antigénico a través de Mincle conduce a la activación celular. En este sentido, se ha demostrado que la estimulación de macrófagos con el glicolípido micobacteriano trehalosa-6,6'-dimicolato (TDM), un conocido ligando de Mincle, conduce a la activación de NF- κ B a través de la vía FcR γ /Syk/CARD9 y da como resultado producción de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas como TNF- α , CXCL2, CXCL1 e IL-6 (Schoenen et al. 2010; Yamasaki et al. 2008). Además, Shah y col. (2016) demostraron que un glicolípido sintético, análogo al GL1 de *Lactobacillus plantarum* es capaz de señalar a través de Mincle utilizando la línea celular reportera NFAT-GFP.

Para la SLP-5818, la ausencia de SignR3 o su molécula adaptadora CARD9 en BMDCs generó una menor secreción de IL6 y TNF- α , y una menor expresión de CD40 y CD80 en comparación con BMDCs *wild type* o deficientes en Mincle (Figura 3.19). De la misma manera, la potenciación de la respuesta al LPS fue inhibida en las BMDCs derivadas de ratones deficientes en SignR3 o CARD9, lo que indica que la señalización a través de Sign-R3 es responsable del efecto generado por la SLP-5818.

Por otro lado, los resultados obtenidos con la SLP-83111 para la estimulación de BMDCs derivadas de ratones deficientes en Mincle, Sign-R3 o CARD9 no fueron reproducibles y por lo tanto no se muestran en esta sección. Desafortunadamente, estas dificultades inesperadas, ya que los ensayos con las BMDCs deficientes se realizaron simultáneamente con todas las SLP, no han podido ser resueltas hasta el momento.



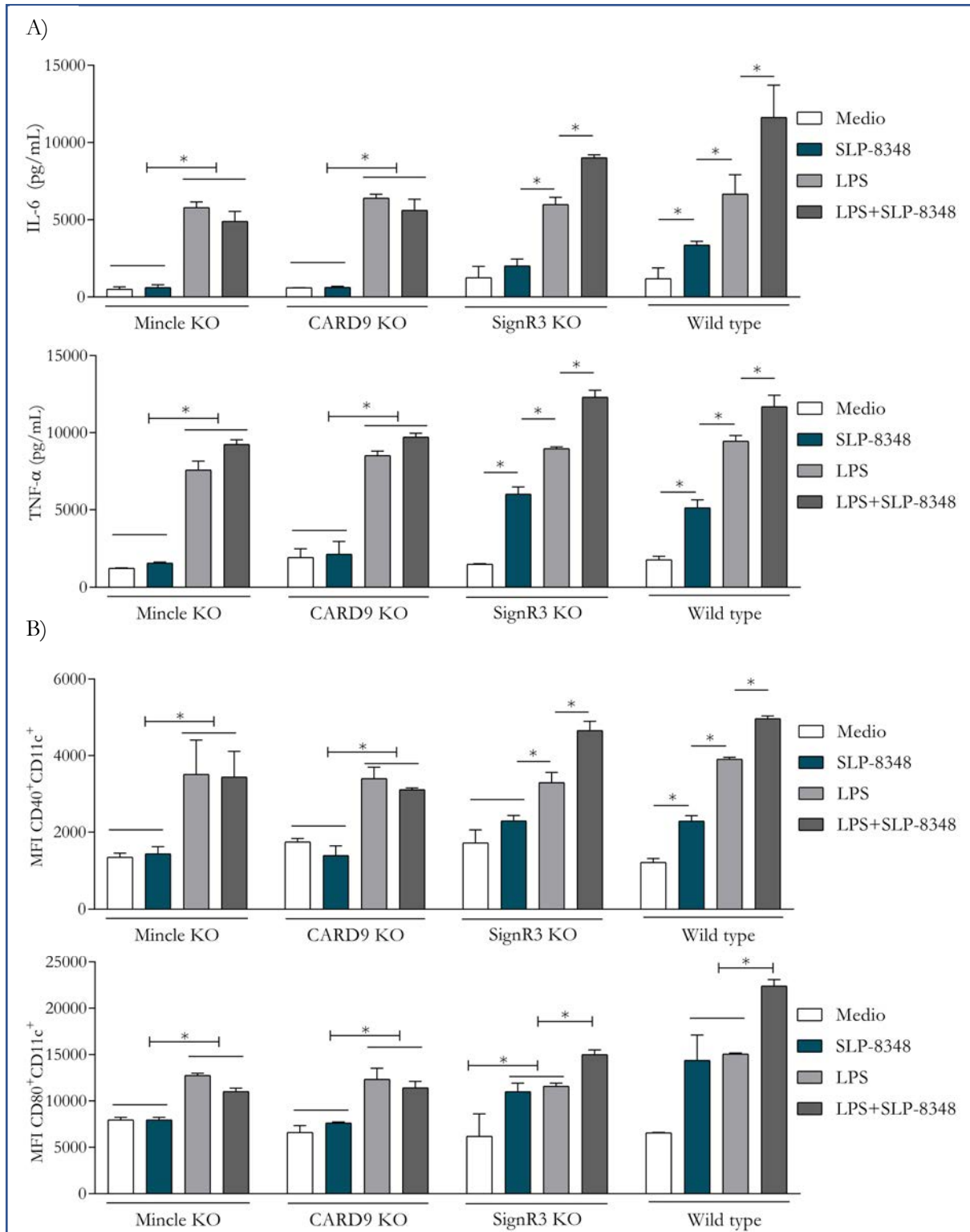
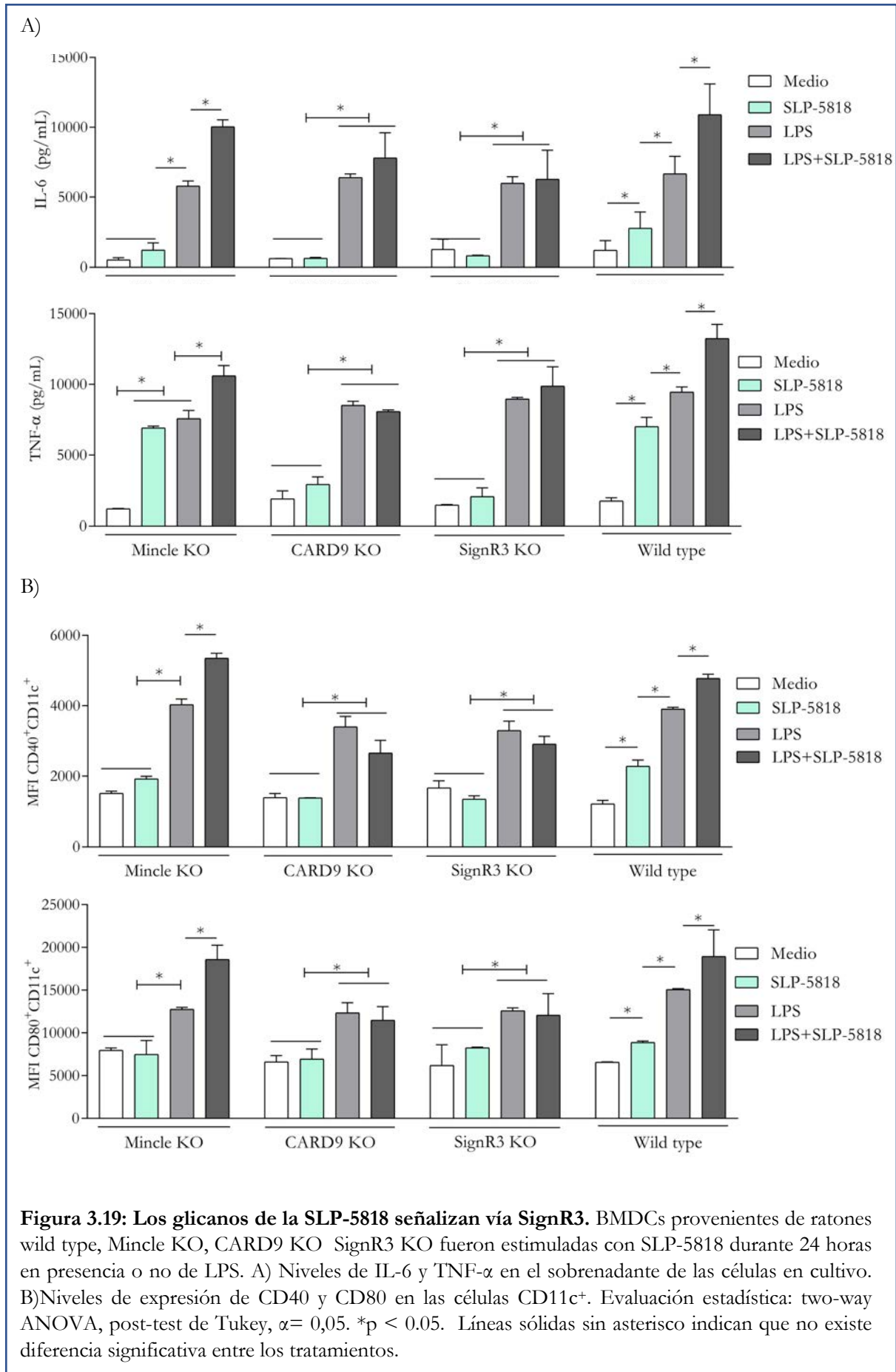


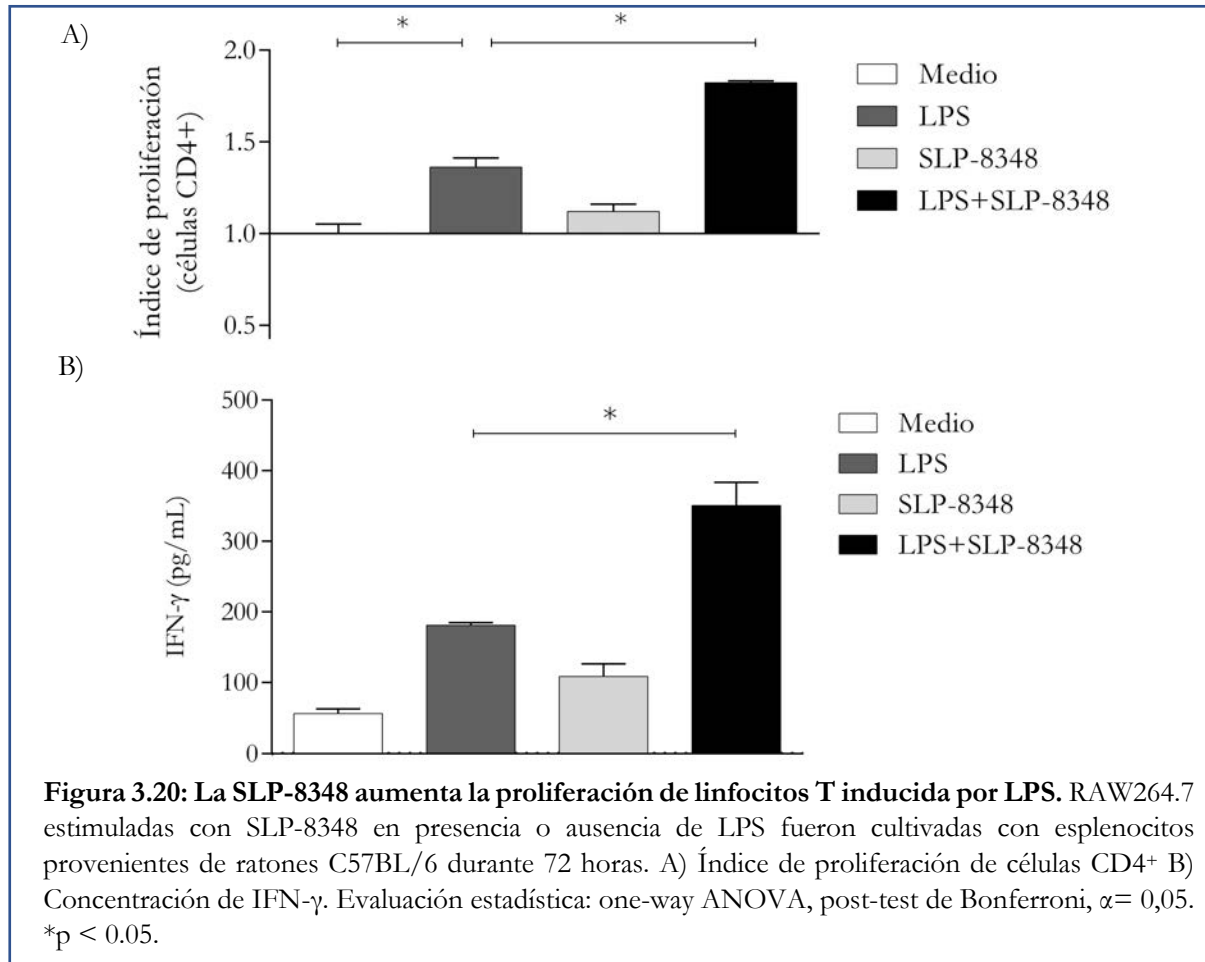
Figura 3.18: Los glicanos de la SLP-8348 señalizan vía Mincle. BMDCs provenientes de ratones wild type, Mincle KO, CARD9 KO SignR3 KO fueron estimuladas con SLP-8348 durante 24 horas en presencia o no de LPS. A) Niveles de IL-6 y TNF- α en el sobrenadante de las células en cultivo. B) Niveles de expresión de CD40 y CD80 en las células CD11c⁺. Evaluación estadística: two-way ANOVA, post-test de Tukey, $\alpha = 0,05$. * $p < 0,05$. Líneas sólidas sin asterisco indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.



3.5. Estimulación de células presentadoras de antígeno por proteínas de capa S: efecto sobre la activación de células T

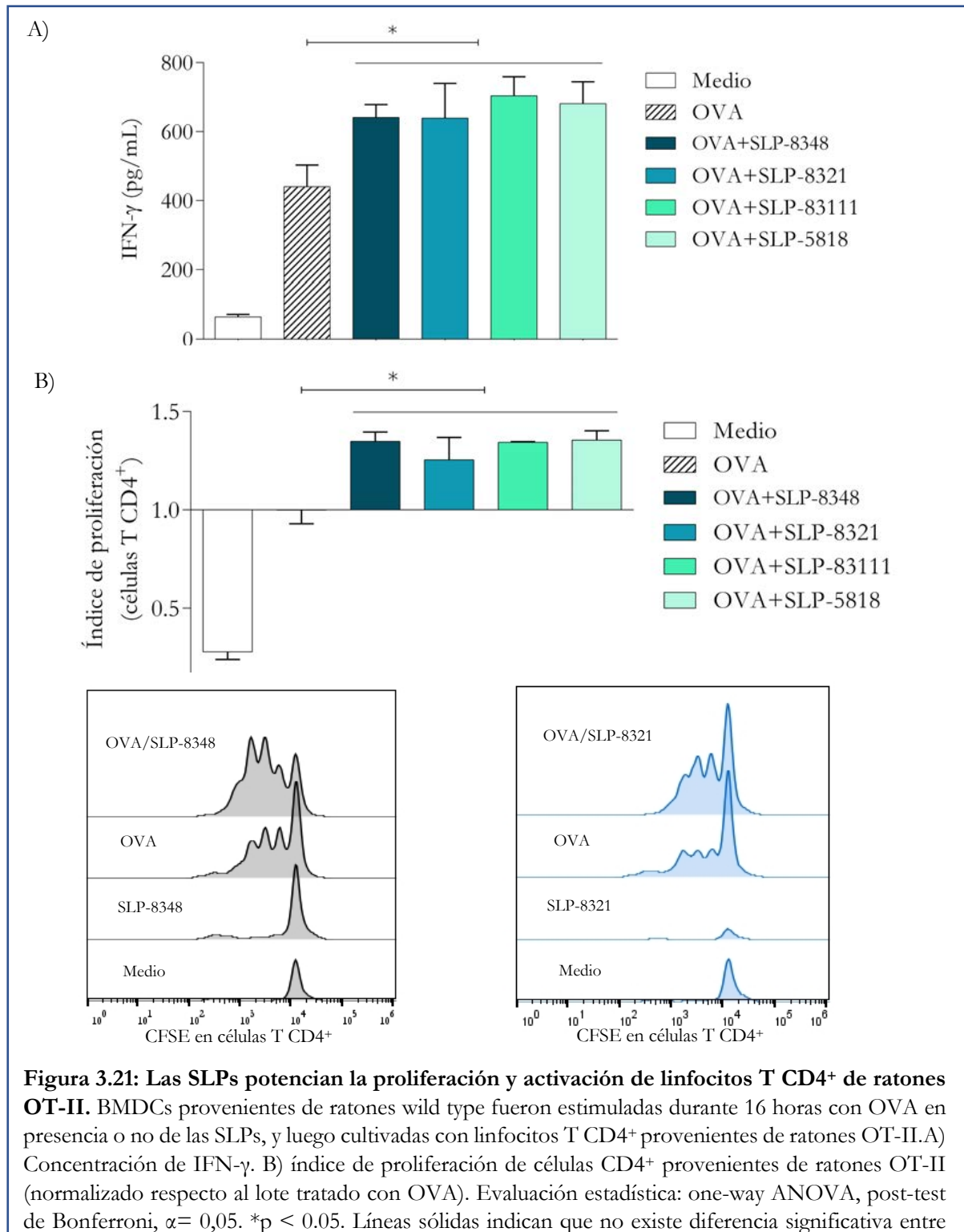
Los resultados presentados hasta ahora muestran que los carbohidratos que forman la estructura de las glicoproteínas de capa S tienen un rol clave en la estimulación de los macrófagos y las células dendríticas. Con el objetivo de analizar si la activación de las células presentadoras de antígenos generada por las proteínas de capa S modificaba su capacidad para estimular células T se realizaron diferentes estudios utilizando la SLP-8348.

En primer lugar, células RAW264.7 tratadas con SLP-8348, en presencia o ausencia de LPS, fueron co-cultivadas con esplenocitos totales de ratones C57BL/6. Dado que se co-cultivan células inmunes alogénicas (de una misma especie, pero con haplotipos diferentes), los linfocitos T CD4⁺ que forman parte de los esplenocitos totales, podrán activarse en respuesta a estas diferencias, proliferando y produciendo citoquinas (principalmente IFN- γ). El LPS genera una maduración de los macrófagos, aumentando la expresión de MHC-II, moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-inflamatorias, lo que permite activar a los linfocitos T. En este caso, el objetivo de nuestro ensayo fue analizar si la mayor activación de los macrófagos estimulados con LPS generada por la SLP-8348, da como resultado una mayor capacidad estimuladora de linfocitos T CD4⁺. Como se puede observar en la Figura 3.20, tanto la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ como la producción de IFN- γ aumenta significativamente cuando las células RAW264.7 estimuladas con LPS se incubaron en presencia de SLP-8348.



En este ensayo se analizó la proliferación policlonal de linfocitos T CD4⁺, dado que luego del cultivo en simultáneo con los macrófagos, las poblaciones celulares que se activan lo hacen en respuesta a la diferencia de haplotipo entre los linfocitos T y los macrófagos. De manera tal de poder restringir la expansión de células T a un antígeno de interés, se utilizaron ratones B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J (OT-II). Estos ratones transgénicos expresan el TCR transgénico OT-II, que reconoce el péptido de ovoalbumina 323-339 presentado en el contexto de una molécula de MHC-II. Se trataron BMDCs derivadas de ratones C57BL/6 *wild type* con OVA durante 16 horas, en presencia o ausencia de SLP-8321, SLP-8348, SLP-83111 o SLP-5818, y se las cultivó posteriormente con células T purificadas de ratones OT-II. Tanto la proliferación de células T CD4⁺ como la secreción

de IFN- γ fueron mayores cuando las BMDCs se estimularon en forma simultánea con OVA y las proteínas de capa S (Figura 3.21). No se observaron diferencias para la expresión de CD69, un marcador de activación presente en la superficie de los linfocitos T.



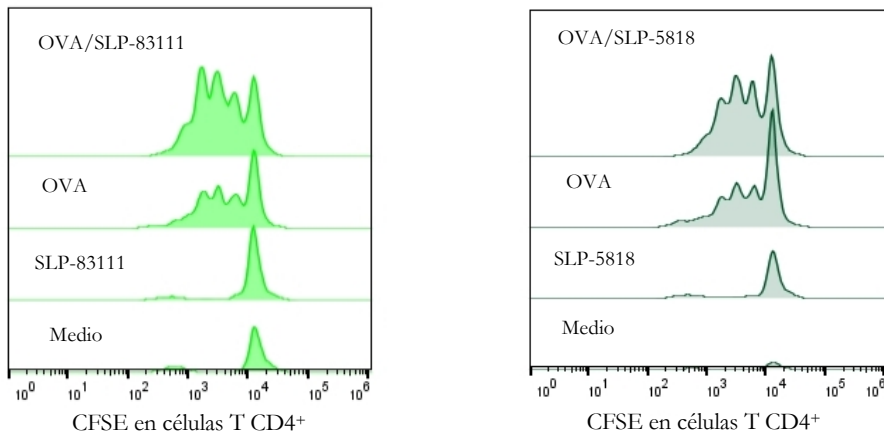


Figura 3.21 (continuación): Las SLPs potencian la proliferación y activación de linfocitos T CD4⁺ de ratones OT-II. BMDCs provenientes de ratones wild type fueron estimuladas durante 16 horas con OVA en presencia o no de las SLPs, y luego cultivadas con linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones OT-II. A) Concentración de IFN- γ . B) Índice de proliferación de células CD4⁺ provenientes de ratones OT-II (normalizado respecto al lote tratado con OVA). Evaluación estadística: ANOVA, post-test de Bonferroni, $\alpha = 0,05$. * $p < 0,05$. Líneas sólidas indican que no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

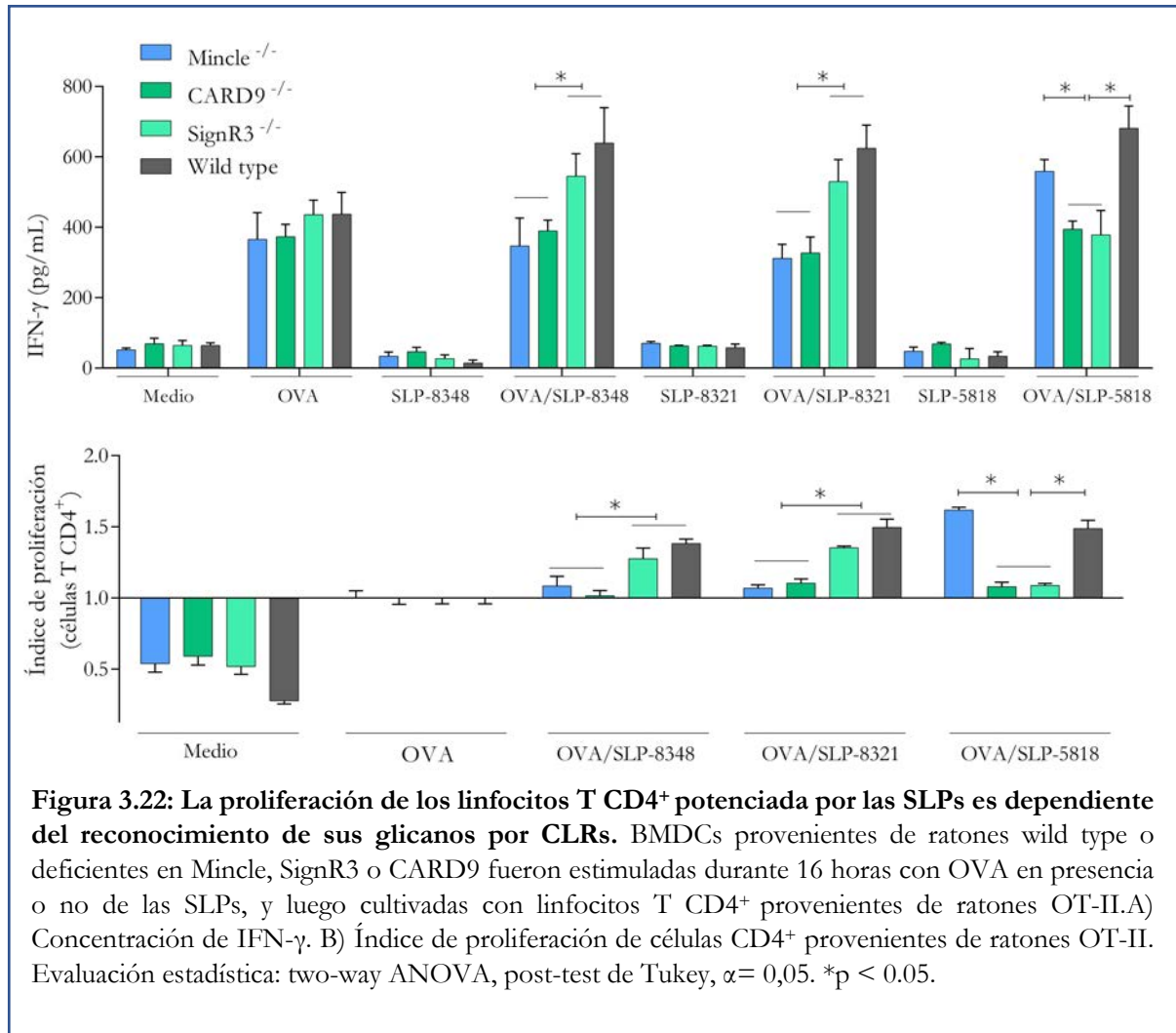
Teniendo en cuenta que el reconocimiento de los carbohidratos presentes en la SLP-8348 por las células presentadoras de antígenos, determina la capacidad de estas células para inducir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺, realizamos los mismos ensayos pero utilizando BMDCs derivadas de ratones deficientes en Mincle, SignR3 o su proteína adaptadora CARD9. Luego de ser estimulados con OVA, en presencia o ausencia de las SLPs, se incubaron con linfocitos T purificados de ratones OT-II.

Como se observa en la Figura 3.22, para la SLP-8321 y la SLP-8348, la ausencia de Mincle o CARD9 en las BMDCs genera una menor proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y una reducción en los niveles secretados de IFN- γ . Esto indica que la señalización por Mincle y CARD9 determina el aumento en la capacidad de presentación antigénica que inducen las SLP-8321 y SLP-8348.

En el caso de la SLP-5818, la señalización por Sign-R3 o CARD9 en las BMDCs es la responsable del aumento en la capacidad de presentación antigénica observado, dado que su ausencia en estas células genera un menor índice de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y una menor secreción de IFN- γ (Figura 3.22).

Dado que los ensayos en los que se analizó el efecto de la SLP-83111 sobre la estimulación de las células dendríticas derivadas de ratones deficientes para Mincle, Sign-R3 o CARD9 no mostraron resultados reproducibles, estas células no fueron utilizadas para realizar los ensayos de proliferación de linfocitos T CD4⁺.

Estos resultados indican que el reconocimiento de los glicanos presentes en las proteínas de capa S determina una mayor activación de las células presentadoras de antígeno, lo que luego se traduce en un aumento de la respuesta antígeno-específica de linfocitos T CD4⁺.

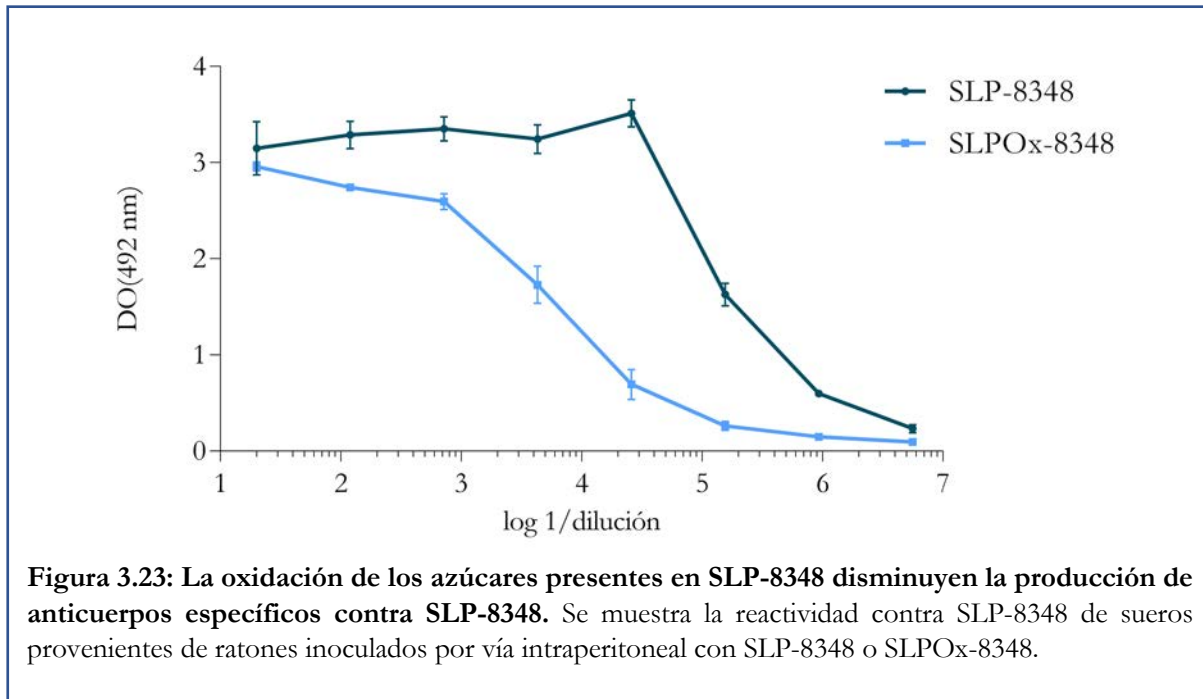


3.6. Capacidad inmunogénica de la SLP-8348

Considerando las propiedades inmunoestimuladoras de las proteínas de capa S en los ensayos *in vitro*, decidimos evaluar la inmunogenicidad, tanto a nivel de la respuesta humoral como celular de la SLP-8348.

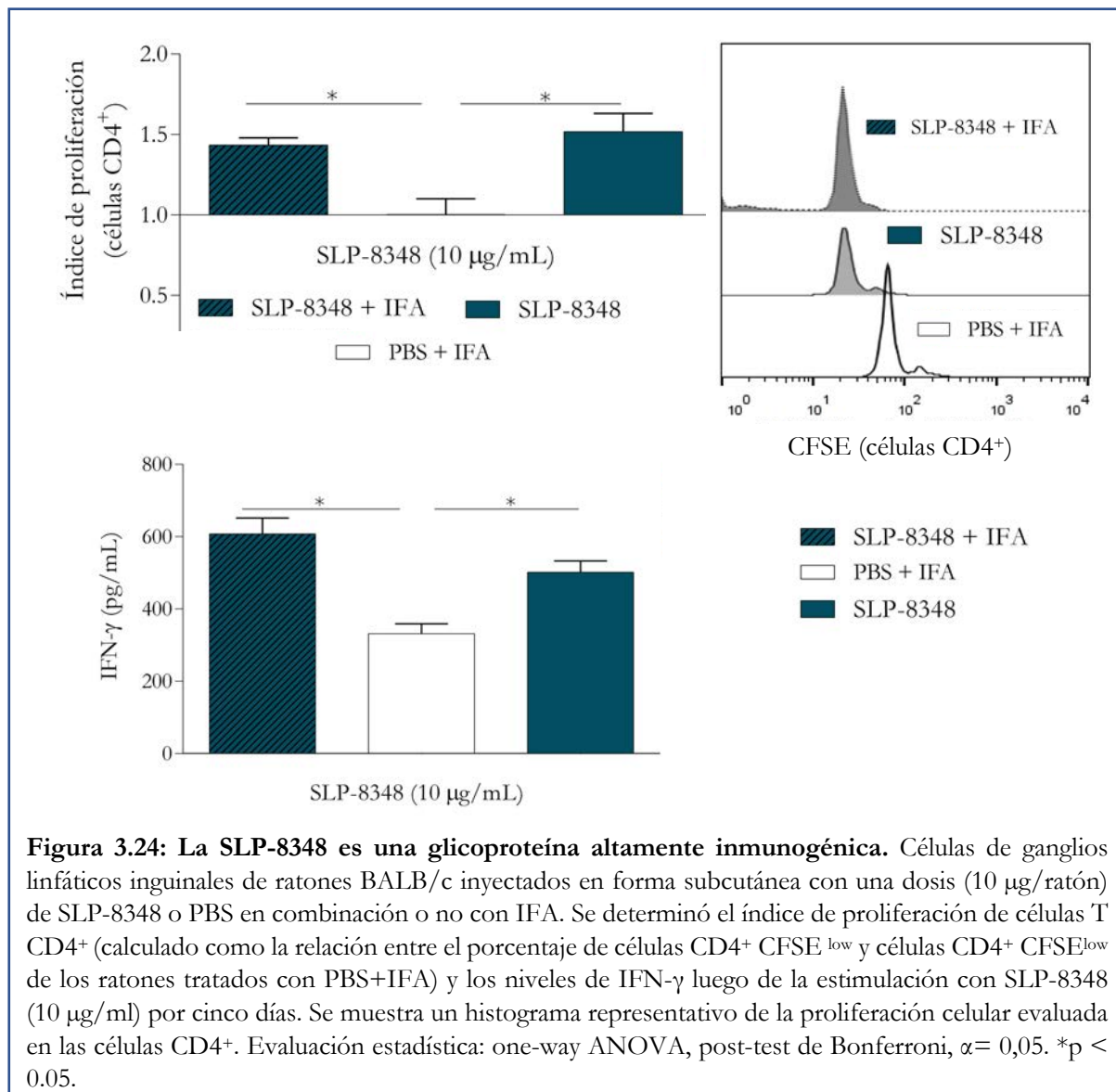
Para analizar la respuesta humoral, se realizaron tres inoculaciones por vía intraperitoneal de SLP-8348 (10 µg/ratón) o SLPOx-8348 en combinación con Adyuvante Incompleto de Freund (IFA) siguiendo un protocolo convencional de seis semanas y se examinó la inmunoreactividad de los sueros contra la SLP-8348 en un ensayo tipo ELISA (MyM sección 12.2.3.1). Como se observa en la Figura 3.23, el grupo de ratones inmunizados con SLPOx-8348 tiene un menor título de anticuerpos específicos contra la SLP-8348 comparados con los ratones tratados con la SLP-8348 nativa. Esto demuestra que la ausencia de actividad biológica de los azúcares terminales disminuye la inmunogenicidad de la SLP-8348. La inmunogenicidad de esta proteína fue demostrada previamente por Mobili y col. (2009), quienes al inmunizar ratones BALB/c por vía intraperitoneal con SLP-8348 en altas dosis combinada con adyuvante incompleto de Freund, pudieron obtener anticuerpos monoclonales contra la SLP-8348. Por otro lado, Kajikawa y col. (2015), demostraron que después de una inmunización intragástrica de ratones en dosis altas y repetidas con *L. acidophilus* NCFM, se generan anticuerpos IgA específicos contra SlpA. Además, Anzenberger y col. (2017) demostraron que una proteína de fusión entre la porción C-terminal de la SlpB de *L. buchneri* CD034 y un péptido derivado del alérgeno de maní Ara h 2, fue capaz de inducir anticuerpos específicos contra la SlpB luego de tres inoculaciones con Adyuvante de Freund en conejos. Si bien se trata en ambos

casos, de proteínas de capa S glicosiladas, no se ha estudiado el eventual papel que puedan cumplir los glicanos en la capacidad antigénica de dichas proteínas.



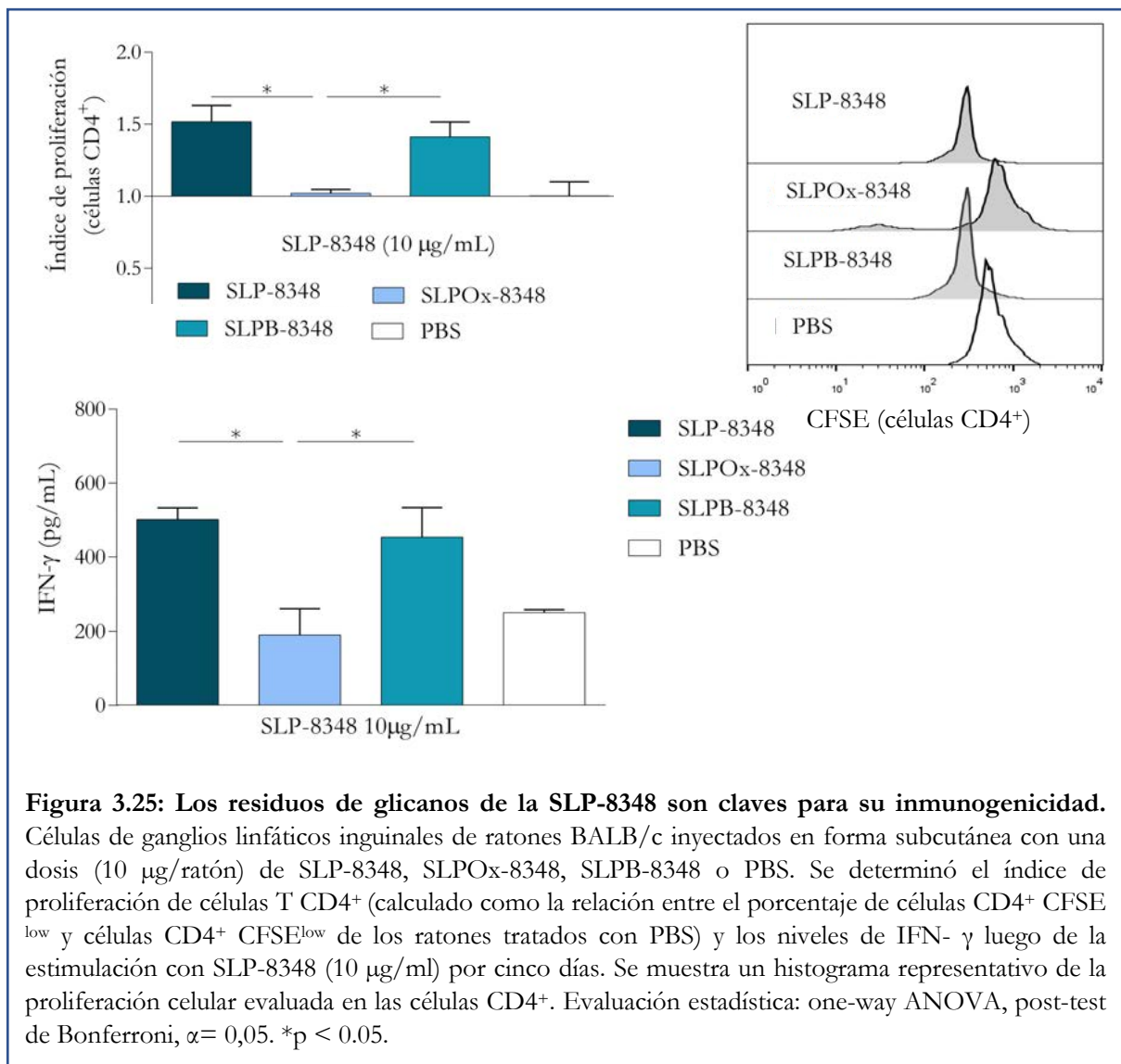
Para analizar si la SLP-8348 es capaz de inducir una respuesta celular *in vivo*, se inoculó una dosis (10 µg/ratón) de SLP-8348 combinada con adyuvante incompleto de Freund (IFA) en ratones BALB/c y se evaluó la proliferación de células T antígeno-específica en los ganglios inguinales 10 días después de la inyección. Después de la estimulación *ex vivo* con SLP-8348, el índice de proliferación de células T CD4⁺ y la secreción de IFN-γ fueron significativamente mayores en el grupo de ratones tratados con SLP-8348/IFA respecto a los ratones tratados con PBS/IFA (Figura 3.24). Sorprendentemente, cuando los experimentos se realizaron en ausencia de IFA, el grupo de ratones tratados solo con SLP-8348 mostró respuestas similares a ratones tratados con SLP-8348/IFA, lo que indica que la SLP-8348 es una glicoproteína altamente inmunogénica capaz de inducir proliferación celular y producción de citoquinas (Figura 3.24). Esto podría deberse a la habilidad de la SLP-8348 de formar agregados, lo que

permite la interacción de esta proteína con las células a través de múltiples receptores, aumentando así su capacidad inmunogénica.

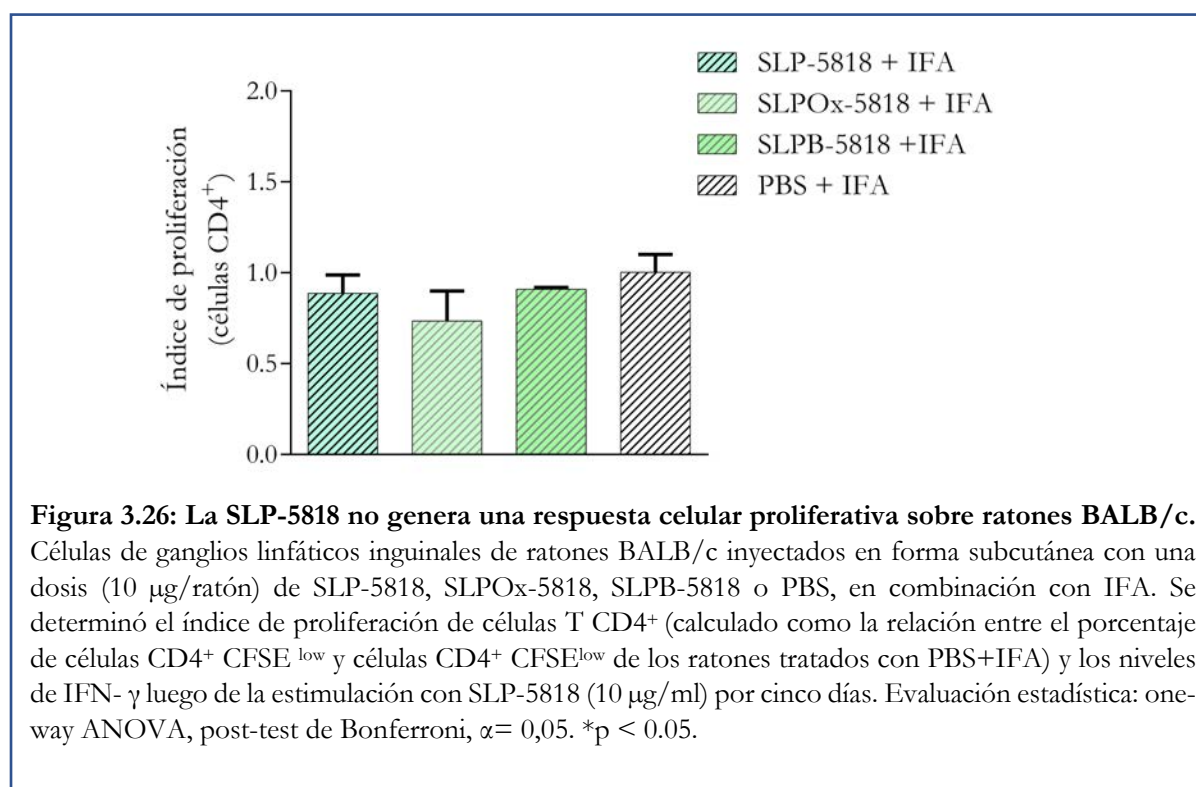


Para establecer si las estructuras de glicanos presentes en SLP-8348 participan en la inducción de una respuesta inmune mediada por células, evaluamos la proliferación de células T en ganglios linfáticos inguinales de ratones inyectados por vía subcutánea con SLP-8348, SLPO_x-8348 o SLPB -8348. El índice de proliferación de células T CD4⁺ y la secreción de IFN-γ fueron significativamente menores en el grupo de ratones tratados con

SLPO_x-8348 en comparación con los ratones tratados con SLP-8348, después de la estimulación *ex vivo* con SLP-8348 (Figura 3.25). El grupo de ratones tratados con SLPB-8348 mostró una respuesta similar a los ratones tratados con SLP-8348. Estos resultados indican que los carbohidratos SLP-8348 desempeñan un rol importante en la estimulación de células T inducida por SLP-8348. El papel de las estructuras de azúcares en las respuestas inmunes provocadas por glicoproteínas bacterianas también ha sido descrito por Horn y col. (1999), quienes demostraron que la estimulación inmune provocada por las proteínas manosiladas Apa de *Mycobacterium spp.* se basa tanto en la presencia de carbohidratos, como en el grado de glicosilación.



Los estudios de respuesta celular antígeno-específica también se realizaron con la SLP-5818, una proteína que posee una estructura primaria diferente de la SLP-8348 tanto a nivel de secuencia aminoacídica como de composición y estructura de los glicanos, y cuyo efecto inmunoestimulador depende del reconocimiento de sus glicanos por Sign-R3. Como se observa en la Figura 3.26, la SLP-5818 no fue capaz de inducir una respuesta inmune celular específica, y la oxidación química de sus glicanos no modificó su inmunogenicidad. Si bien la SLP-5818 fue capaz de activar las BMDCs en ensayos *in vitro*, la falta de activación *in vivo* del sistema inmune por esta proteína podría ser consecuencia de la función regulatoria que presenta SignR3, el receptor que reconoce esta proteína. En este sentido, Lightfoot y col. (2015) demostraron que la SlpA de *L. acidophilus* NCK 2187 se une al receptor SignR3 a nivel intestinal para ejercer señales regulatorias, atenuando la colitis inducida por un modelo de transferencia de células T y protegiendo la funcionalidad de la mucosa gástrica.



3.7. Capacidad adyuvante de la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348

Los adyuvantes de vacunas se han definido tradicionalmente como materiales que mejoran la respuesta inmune a los antígenos de la vacuna (O'Hagan et al. 2017). Más allá del mecanismo de acción, se postula que los adyuvantes activan respuestas inmunes innatas para crear un entorno inmunocompetente en el lugar de la inyección y en los ganglios linfáticos drenantes, lo que es necesario para mejorar la inmunidad adaptativa al antígeno administrado conjuntamente (O'Hagan et al. 2017, Awate et al. 2013). De acuerdo con nuestros resultados, la SLP-8348 fue capaz de generar una respuesta inmune mediada por células en el ganglio linfático drenante después de una inyección subcutánea. Por lo tanto, decidimos evaluar la capacidad adyuvante *in vivo* de la SLP-8348 utilizando OVA como antígeno modelo.

Para evaluar la capacidad adyuvante *in vivo* de SLP-8348, inyectamos subcutáneamente OVA u OVA/SLP-8348 en ratones BALB/c y después de 10 días, las células de los ganglios linfáticos inguinales se estimularon *in vitro* con OVA. El índice de proliferación de células T CD4⁺, así como la secreción de IFN- γ contra OVA fue significativamente mayor en el grupo de ratones tratados con la combinación de SLP-8348 y OVA en comparación con los ratones tratados solos con OVA (Figura 3.27).

Para determinar si los carbohidratos de SLP-8348 participan en la respuesta mejorada contra OVA, realizamos los mismos experimentos utilizando la combinación de SLPOx-8348 y OVA. El índice de proliferación de células T CD4⁺, así como la secreción de IFN- γ contra OVA fue significativamente menor en el grupo de ratones tratados con OVA/SLPOx-8348 en comparación con los ratones tratados con OVA/SLP-8348 (Figura 3.27), lo que indica que la oxidación de glicanos reduce significativamente la capacidad

adyuvante de SLP-8348 contra OVA. Estudios anteriores han demostrado la capacidad adyuvante de las proteínas de capa S de las cepas de *Lactobacillus*. Anzengruber y col. (2017) utilizaron una proteína de fusión entre la porción C-terminal de la SlpB de *L. buchneri* CD034 y un péptido derivado del alérgeno de maní Ara h 2, y obtuvieron anticuerpos específicos (IgG) contra el péptido Ara h 2 y contra la SlpB de *L. buchneri*. Sin embargo, este es el primer resultado que muestra la participación de los carbohidratos en el poder adyuvante de una glicoproteína de capa S, ya que la pérdida de la integridad de los glicanos terminales eliminó completamente el efecto. Por otro lado, se requiere realizar nuevos estudios para analizar si la antigenicidad que pudiera presentar la SLP-8348 al ser administrada por vía subcutánea, puede afectar su capacidad adyuvante.

Estos ensayos de capacidad adyuvante fueron realizados también inoculando OVA por vía subcutánea, en presencia de SLP-5818 y SLPO_x-5818. Teniendo en cuenta que tanto la SLP-5818 como la SLPO_x-5818 no fueron capaces de inducir una respuesta inmune celular específica, como era de esperar, la presencia de estas proteínas no modificó la respuesta obtenida respecto a los ratones tratados solos con OVA (Figura 3.27).

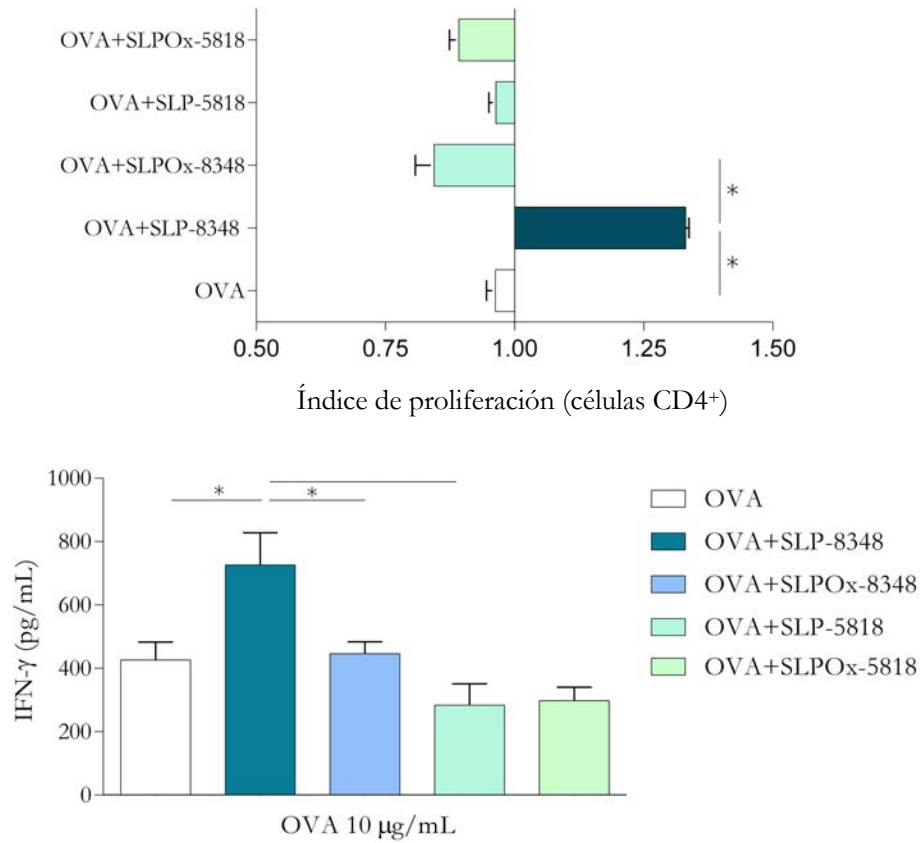


Figura 3.27: La capacidad adyuvante de la SLP-8348 es un proceso mediado por los glicanos. BALB/c fueron inoculados en forma subcutánea con una dosis (10 μg/ratón) de SLP-8348, SLPOx-8348, SLP-5818 o SLPOx-5818 en combinación o no con OVA. Células de ganglios linfáticos inguinales se marcaron con CFSE y se estimularon con OVA(10 μg/ml) por cinco días. Se determinó el índice de proliferación de células T CD4⁺ (calculado como la relación entre el porcentaje de células CD4⁺ CFSE^{low} y células CD4⁺ CFSE^{low} de los ratones tratados con OVA) y los niveles de IFN-γ. Evaluación estadística: one-way ANOVA, post-test de Bonferroni, α= 0,05. *p < 0.05.

Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue analizar las propiedades inmunomodulatorias de las glicoproteínas de capa S de *L. kefir*, y determinar el rol funcional que tienen los glicanos sobre estas propiedades.

Los estudios realizados con la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 (SLP-8348) sobre macrófagos murinos y humanos indican que esta proteína no es capaz de generar una estimulación celular por sí misma, pero potencia la activación celular inducida por agonistas TLR, en forma dependiente de Ca^{+2} . A través de una estrategia de oxidación suave de los glicanos terminales de esta proteína, demostramos que esta potenciación de la respuesta a ligandos TLR es dependiente de la actividad biológica de los O-glicanos de la SLP-8348. Por otro lado, el aumento de la activación de los macrófagos en células estimuladas por LPS también fue generado por las SLP-83111 y SLP-5818, proteínas de capa S que presentan tanto O- como N- glicanos en su estructura. Utilizando un inhibidor de la N-glicosilación sobre *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818 demostramos que ambas estructuras glicosídicas participan en este efecto inmunoestimulador observado para las proteínas de capa S.

Utilizando proteínas de fusión entre la porción de reconocimientos de carbohidratos (CRD) de los CLR y la porción Fc de los anticuerpos IgG humanos, fuimos capaces de determinar el perfil de reconocimiento de los glicanos pertenecientes a las glicoproteínas de capa s de *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348, *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818, cuyas estructuras fueron caracterizadas previamente en el capítulo 2 de este trabajo de Tesis Doctoral. Realizando ensayos en BMDCs provenientes de ratones *wild type* o deficientes en CLR, pudimos identificar los receptores involucrados

en la internalización y el efecto inmunoestimulador de cada proteína de capa S estudiada. Estos estudios indican que tanto la SLP-8321 como la SLP-8348, dos proteínas que presentan igual secuencia de aminoácidos e igual estructura de glicanos, son reconocidas por Mincle y señalizan a través de este receptor, generando una activación de células dendríticas y potenciando el efecto del LPS sobre estas células. La SLP-5818, que presenta una estructura glucídica formada tanto por O- como N-glicanos, es internalizada a través de SignR3, y esta interacción también genera una activación de las BMDCs.

Realizando ensayos de proliferación antígeno-específica, demostramos que la activación de células dendríticas generada por las SLP-8321, SLP-8348 y SLP-5818 produce un aumento en la activación de células T CD4⁺, y que dicho efecto es consecuencia del reconocimiento de los glicanos de las SLPs por los CLRs. En este sentido, las SLP-8321 y SLP-8348 requieren de la presencia de Mincle, mientras que la SLP-5818 requiere la presencia de SignR3 sobre la superficie celular de las BMDCs para generar un aumento en la capacidad proliferativa de células T CD4⁺.

Mediante ensayos *in vivo* hemos podido demostrar que la proteína de capa S de *L. kefir* CIDCA 8348 administrada por vía intraperitoneal es capaz de inducir una respuesta inmune humoral, con un título de anticuerpos IgG que depende del reconocimiento de sus glicanos. Además, la SLP-8348 es capaz de inducir una respuesta inmune celular al ser inoculada en forma subcutánea, generando una respuesta de proliferación de células T CD4⁺ antígeno-específica con aumento de IFN- γ . Esta respuesta es dependiente de la actividad biológica de sus glicanos, dado que el proceso de oxidación de los azúcares, inhibe la proliferación de células T CD4⁺.

Por otro lado, la SLP-8348 posee capacidad adyuvante utilizando OVA como antígeno modelo, dado que pudo aumentar la respuesta inmune celular antígeno-específica frente a OVA, al desencadenar la maduración de las células presentadoras de antígenos. Nuevamente, esta respuesta se dio a través del reconocimiento de sus restos de glicanos.

Con el fin de caracterizar más en profundidad la respuesta inmune generada por la SLP-8348, deberían realizarse nuevos estudios que permitan determinar el perfil de respuesta T CD4⁺ generada, el tiempo durante el cual esta respuesta celular se mantiene y parámetros asociados a la presentación cruzada de antígenos, analizando por ejemplo, la activación de linfocitos T CD8⁺. Por otro lado, estos ensayos deberían realizarse en ratones deficientes de Mincle y CARD9, los que contribuirán a determinar el rol que tiene este CLR y su vía de señalización en la capacidad adyuvante de la SLP-8348.

Estos resultados constituyen una contribución significativa a la comprensión del papel de los glicanos en la inmunomodulación provocada por las proteínas de capa S bacterianas y generan una oportunidad prometedora en la búsqueda de nuevos adyuvantes derivados de microorganismos no patógenos.

Conclusiones Generales

Conclusiones generales

El objetivo general de este trabajo de Tesis Doctoral fue realizar una caracterización estructural y funcional de las proteínas de capa S de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir*.

En cuanto a la caracterización de la estructura primaria, utilizando técnicas proteómicas y genómicas fuimos capaces de determinar las secuencias de aminoácidos de las proteínas de capa S en dieciséis cepas de *L. kefir*, y las secuencias de nucleótidos de los genes que codifican para estas proteínas. De los resultados obtenidos surge que las cepas de *L. kefir* presentes en nuestra colección de microorganismos pueden ser agrupadas en base a la identidad de secuencia de una región corta dentro del fragmento N-terminal de las proteínas de capa S.

Teniendo en cuenta la naturaleza glicoproteica de las proteínas de capa S de *L. kefir*, y que todas las proteínas presentan dentro de la secuencia de aminoácidos el fragmento ¹⁵¹SSASSASSA¹⁵⁹, seleccionamos 4 proteínas de capa S provenientes de diferentes cepas de *L. kefir* y analizamos la estructura de glicanos unidos a estas proteínas. En las cepas *L. kefir* CIDCA 8321 y CIDCA 8348, se encontraron O-glicanos en el mismo motivo de glicosilación descrito para *L. buchneri*, sustituido por hasta 22 unidades de glucosa. La cepa *L. kefir* CIDCA 83111 presenta el mismo glicopéptido, pero sustituido en 4 residuos de serina con un promedio de ocho unidades de glucosa, decoradas con ácido galacturónico. Además, la SLP-83111 cuenta con otro péptido O-glicosilado, con una estructura Glc₅-₈GalA₂, y dos péptidos N-sustituidos con estructuras cortas: GlcNAc₄Man₃dHex y GlcNAc₂dHex. La cepa *L. kefir* JCM 5818 cuenta con un O-glicano en la misma posición mencionada para las otras tres cepas, sustituido en promedio con ocho unidades de glucosa, y un N-glicano de estructura compleja con ácido siálico en su estructura.

Por último, analizamos las propiedades inmunoestimuladoras de las glicoproteínas de capa S de *L. kefir* (SLPs) y el rol funcional que tienen los glicanos sobre estas propiedades. Utilizando líneas celulares de macrófagos demostramos que las proteínas de capa S de las cepas *L. kefir* CIDCA 8321, *L. kefir* CIDCA 8348, *L. kefir* CIDCA 83111 y *L. kefir* JCM 5818, si bien no son capaces de inducir una activación de los macrófagos, potencian la respuesta a un agonista TLR, en un proceso dependiente de la presencia de Ca^{+2} y de la actividad biológica de los glicanos presentes en las glicoproteínas de capa S. Utilizando BMDCs derivadas de ratones deficientes de CLR específicos, pudimos identificar que la SLP-8321 y SLP-8348 son reconocidas y señalizan a través de Mincle, mientras que la SLP-5818 lo hace a través de SignR3. Esta interacción entre las SLPs y BMDCs induce una activación celular que resulta en un aumento en la capacidad estimuladora de células T en ensayos de proliferación antígeno-específico. Finalmente, demostramos que la SLP-8348 posee capacidad adyuvante utilizando OVA como antígeno modelo, y que este efecto depende de la actividad biológica de los glicanos presentes en esta glicoproteína de capa S.

Por lo tanto, el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral nos ha permitido avanzar en el conocimiento de la estructura primaria de las proteínas de capa S de lactobacilos potencialmente probióticos, así como demostrar la capacidad inmunoestimuladora de dichas glicoproteínas y la relevancia que los restos de glicanos tienen en el reconocimiento de las mismas por CLR presentes en las células presentadoras de antígeno. Los resultados obtenidos, en conjunto con las características de autoensamblado propias de este tipo de macromoléculas, convierten a las proteínas de capa S de *L. kefir* en firmes candidatos para el desarrollo de nuevos adyuvantes vacunales y de otras herramientas de interés en diferentes áreas de bionanotecnología.

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

- Alley, W. R., Jr, Mann, B. F., & Novotny, M. V. High-sensitivity analytical approaches for the structural characterization of glycoproteins (2013). *Chemical reviews*, 113(4), 2668–2732. doi:10.1021/cr3003714
- Antikainen J., Anton L., Sillanpää J., Korhonen T.K. Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. (2002) *Mol Microbiol* 46:381-394
- Anzengruber J., Pabst M., Neumann L., Sekot G., Heintl S., Grabherr R., Altmann F., Messner P., Schäffer C. Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. (2014) *Glycoconj J* 31:117-131. doi: 10.1007/s10719-013-9505-7
- Anzengruber J., Bublin M., Bönisch E., Janesch B., Tscheppe A., Braun ML., Varga EM., Hafner C., Breiteneder H., Schäffer C. *Lactobacillus buchneri* S-layer as carrier for an Ara h 2-derived peptide for peanut allergen-specific immunotherapy. (2017) *Mol. Immunol.* 85:81-88. doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.005
- Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechi R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., Stockinger H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. (2012) *Nuclei Acids Res* 41: W597-603. doi: 10.1093/nar/gks400
- Åvall-Jääskeläinen S., Hynönen U., Ilk N., Pum D., Sleytr U.B., Palva A. Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the

Referencias bibliográficas

surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. (2008) BMC Microbiol 8:165. doi: 10.1186/1471-2180-8-165

- Avall-Jääskeläinen S., Palva A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. (2005) FEMS Microbiol Rev 29:511-529

- Awate, S., Babiuk, L., and Mutwiri, G. Mechanisms of action of adjuvants. (2013) Front. Immunol. 4:114. doi: 10.3389/fimmu.2013.00114

- Blasius AL., Beutler B. Intracellular toll-like receptors. Immunity (2010) 32:305–15. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012

- Bolla P., Sanz A., Huggias S., Ruggera J., Serradell M., Casella M. Regular arrangement of Pt nanoparticles on S-layer proteins isolated from *Lactobacillus kefir*: synthesis and catalytic application. (2018).Molecular Catalysis, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2018.12.011>

- Boot H.J., Kolen CP., Pouwels PH. Identification, cloning, and nucleotide sequence of a silent S-layer protein gene of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 which has extensive similarity with the S-layer protein gene of this species. (1995) J Bacteriol 177:7222-7230

- Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976) Anal Biochem. 72:248-54.

- Carasi P., Ambrosio N.M., De Antoni G.L., Bressollier P., Urdaci M.C., Serradell M. de L. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. (2014) J Dairy Res 81:16-23. doi: 10.1017/S0022029913000526

- Carasi P., Díaz M., Racedo SM., De Antoni GL., Urdaci MC., Serradell M de L. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. (2014) Biomed Res Int 2014:208974. doi: 10.1155/2014/208974

Referencias bibliográficas

- Carasi P., Racedo SM., Jacquot C., Romanin DE., Serradell M.A., Urdaci MC. Impact of kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. (2015). *J Immunol Res* 2015:361604. doi: 10.1155/2015/361604
- Carasi P., Trejo FM., Pérez PF., De Antoni GL., Serradell M de L. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonizes *in vitro* cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. (2012). *Anaerobe* 18:135-142. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.11.002
- Celhar T., Magalhaes R., Fairhurst AM. TLR7 and TLR9 in SLE :when sensing self goes wrong (2012). *Immunol Res* 53:58–77. doi:10.1007/s12026-012-8270-1
- Chinthamani, S., Settem, R.P., Honma, K., Kay J.G., and Sharma A. Macrophage inducible C-type lectin (Mincle) recognizes glycosylated surface (S)- layer of the periodontal pathogen *Tannerella forsythia*. *PLoS ONE*. (2017) 12, e0173394. doi: 10.1371/journal.pone.0173394
- Claus H., Akça E., Debaerdemaeker T., Evrard C., Declercq J-P, Harris JR., Schlott B., König H. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. (2005) *Can J Microbiol* 51:731–743
- Comstock and Kasper. Bacterial Glycans: Key Mediators of Diverse Host Immune Responses. (2006) *Cell*. 126: 847-850
- Cremata J., Montesino R., Triguero A., Cabrera G., *Glicómica* (2019). En *Manual de Proteómica*, Sociedad Española de Proteómica. ISBN: 978-84-697-1281-8
- Delfederico L., Hollmann A., Martínez M., Iglesias NG., De Antoni G., Semorile L. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. (2006) *J Dairy Res* 73:20-27

Referencias bibliográficas

- Dohm N., Petri A., Schlander M., Schlott B., König H., Claus H. Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii* B706. (2011) Arch Microbiol 193:251-261. doi: 10.1007/s00203-010-0670-9
- Endo A., Okada S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. (2007) Int J Syst Evol Microbiol 57:708-712
- Francius G., Lebeer S., Alsteens D., Wildling L., Gruber HJ., Hols P., De Keersmaecker S., Vanderleyden J., Dufrêne YF. Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. (2008). ACS Nano; 2(9):1921– 1929.
- Garrote GL., Abraham AG., De Antoni GL. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. (2001). J Dairy Res 68:639–652.
- Garrote GL., Delfederico L., Bibiloni R., Abraham AG., Pérez PF., Semorile L., De Antoni GL. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. (2004) J Dairy Res 71:222-230
- Garrote GL., Serradell MA., Abraham AG., Añón MC., Fossati CA., De Antoni GL. Development of an immunochemical method to detect *Lactobacillus kefir*. (2005) Food Agric Immunol 16:221-233
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins MR., Appel RD., Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. (2005) In Walker JM (ed) The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press Inc, Totowa, NJ, pp 571-607

Referencias bibliográficas

- Gerbino E., Carasi P., Araujo-Andrade C., Tymczyszyn EE., Gómez-Zavaglia A. Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir*. (2015) World J Microbiol Biotechnol 31:583-592. doi: 10.1007/s11274-015-1812-7
- Golowczyc MA., Mobili P., Garrote GL., Serradell ML., Abraham AG, De Antoni GL Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. (2009) J Dairy Res 76:111-116. doi: 10.1017/S0022029908003749
- Golowczyc MA., Mobili P., Garrote GL., Abraham AG., De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. (2007) Int J Food Microbiol 118:264-273
- Goodridge H., Shimada T., Wolf A., Hsu YM., Becker C., Lin X., Underhill D. Differential Use of CARD9 by Dectin-1 in Macrophages and Dendritic Cells. J Immunol January 15, 2009, 182 (2) 1146-1154; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1146>
- Gornati L., Zanoni I., and Granucci F. Dendritic Cells in the Cross Hair for the Generation of Tailored Vaccines. (2018) Front. Immunol. 9:1484. doi:10.3389/fimmu.2018.01484
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, López RA. *New bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI*. (2010) Nucleic Acids Res 38 Suppl: W695-699. doi: 10.1093/nar/gkq313
- Habil, N., Al-Murrani, W., Beal, J., and Foey, A.D. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. (2011) Benef. Microbes 2,283–293. doi:10.3920/BM2011.0027

Referencias bibliográficas

- Hagen KE., Guan LL., Tannock GW., Korver DR., Allison GE. Detection, characterization, and *in vitro* and *in vivo* expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops. *Appl Environ Microbiol* 71:6633-6643
- Han, L., & Costello, C. E. Mass spectrometry of glycans. *Biochemistry*. (2013). *Biokhimiia*, 78(7), 710–720. doi:10.1134/S0006297913070031
- Hamet MF., Londero A., Medrano M., Vercammen E., Van Hoorde K., Garrote GL., Huys G, Vandamme P, Abraham AG Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranoformis* in microbial consortia present in kefir grains. *Food Microbiol* 36:327-334. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.022
- Heintl S, Wibberg D, Eikmeyer F, Szczepanowski R, Blom J, Linke B, Goesmann A, Grabherr R, Schwab H, Pühler A, Schlüter A. Insights into the completely annotated genome of *Lactobacillus buchneri* CD034, a strain isolated from stable grass silage. (2012) *J Biotechnol* 161:153-166. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.007
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., et al. GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+MHCII+ macrophages and dendritic cells. (2015). *Immunity*. 42: 1197–1211. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.018
- Horn, C., Namane, A., Pescher, P., Riviere, M., Romain, F., Puzo, G., Barzu, O., and Marchal, G. Decreased Capacity of Recombinant 45/47-kDa Molecules (Apa) of

Referencias bibliográficas

Mycobacterium tuberculosis to Stimulate T Lymphocyte Responses Related to Changes in Their Mannosylation Pattern J. Biol. Chem. (1999) 274, 32023–32030.

- Hu S, Kong J, Sun Z, Han L, Kong W, Yang P. Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the S-layer protein. (2011) Microb Cell Fact 10:86. doi: 10.1186/1475-2859-10-86

- Hynönen U., Palva A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. (2013) Appl Microbiol Biotechnol 97:5225-5243. doi: 10.1007/s00253-013-4962-2

- Ilk N., Egelseer EM., Sleytr UB. S-layer fusion proteins--construction principles and applications. (2011) Curr Opin Biotechnol 22:824-831. doi: 10.1016/j.copbio.2011.05.510

- Iskratsch T1, Braun A, Paschinger K, Wilson IB. Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. Anal Biochem. 2009 Mar 15;386(2):133-46. doi: 10.1016/j.ab.2008.12.005.

- Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., et al Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. (2009) J Exp Med. 206:2879–2888.

- Itano AA., McSorley S.J., Reinhardt R.L., Ehst B.D., Ingulli E., Rudensky A.Y., et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. (2003) Immunity 19(1):47–57. doi:10.1016/S1074-7613(03)00175-4

- Jakava-Viljanen M, Åvall-Jääskeläinen S, Messner P, Sleytr UB, Palva A. Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and

Referencias bibliográficas

characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions.

(2002) *J Bacteriol* 184:6786–6795

- Kajikawa, A., Zhang, L., LaVoy, A., Bumgardner, S., Klaenhammer, T.R., and Dean, G.A. Mucosal immunogenicity of genetically modified *Lactobacillus acidophilus* expressing an HIV-1 epitope within the surface layer protein. (2015) *PLOS ONE* 10, e0141713. doi:10.1371/journal.pone.0141713

- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors(2010). *Nat Immunol* 11:373–84.doi:10.1038/ni.1863

- Kawasaki T., and Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. (2014) *Front. Immunol.* 5;461. doi:10.3389/fimmu.2014.00461

- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 105, 19474–19479. doi:10.1073/pnas.0810305105

- Kumar H., Kawai T. Akira S.Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 388: 621-625

- Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970). *Nature* 227:680-685

- Lightfoot, Y.L., Selle, K., Yang, T., Goh, Y.J., Sahay, B., Zadeh, M., Owen, J.L., Colliou, N., Li, E., Johannssen, T., et al. SIGNR3-dependent immune regulation by *Lactobacillus*

Referencias bibliográficas

acidophilus surface layer protein A in colitis. (2015) *EMBO J.* 34, 881–895.
doi:10.15252/embj.201490296

- Liu, Z., Ma, Y., Shen, T., Chen, H., Zhou, Y., Zhang, P., Zhang, M., Chu, Z., and Qin, H. Identification of DC-SIGN as the receptor during the interaction of *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1258 and dendritic cells. (2011) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 603–611. doi:10.1007/s11274-010-0495-3

- Lortal S, Vanheijenoort J, Gruber K, Sleytr UB.. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. (1992) *J. Gen. Microbiol.* 138:611–618

- Malamud M., Bolla P., Carasi P., Gerbino E., Gómez-Zavaglia A., Mobili P., Serradell M.. S-Layer Proteins from Lactobacilli: Biogenesis, Structure, Functionality and Biotechnological Applications (2019). En Ruzal, *Lactobacillus* Genomics and Metabolic Engineering. Caister Academic Press, <https://doi.org/10.21775/9781910190890>

- Mayer, S., Moeller, R., Monteiro, J.T., Ellrott, K., Josenhans, C. and Lepenies, B. C-type lectin receptor (CLR)–Fc fusion proteins as tools to screen for novel CLR/bacteria interactions: an exemplary study on preselected *Campylobacter jejuni* isolates (2018). *Front. Immunol.* 9:213. doi: 10.3389/fimmu.2018.00213

- McWilliam H, Li W, Uluda M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, López R. *Analysis tool web services from the EMBL-EBI.* (2013) *Nuclei Acids Res* 41: W597-600. doi: 10.1093/nar/gkt376

- Mescher, M.F., Strominger, J.L., and Watson, S.W. Protein and carbohydrate composition of the cell envelope of *Halobacterium salinarium*(1974). *J. Bacteriol.* 120, 945–954.

Referencias bibliográficas

- Messner P, Schäffer C, Kosma P. Bacterial cell-envelope glycoconjugates. (2013) *Adv Carbohydr Chem Biochem* 69:209–272. doi: 10.1016/B978-0-12-408093-5.00006-X
- Mobili P, Londero A, Maria TMR, Eusébio MES, De Antoni GL, Fausto R, Gómez-Zavaglia A Characterization of S-layer proteins of *Lactobacillus* by FTIR spectroscopy and differential scanning calorimetry. (2009) *Vib Spectrosc* 50:68-77. doi: 10.1016/j.vibspec.2008.07.016
- Mobili P, Serradell M, Trejo SA, Avilés Puigvert FX, Abraham AG, De Antoni GL. Heterogeneity of S-layer proteins from aggregating and non-aggregating *Lactobacillus kefir* strains. (2009) *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:363-372. doi: 10.1007/s10482-009-9322-y
- Monteiro JT, Schön K, Ebbecke T, Goethe R, Ruland J, Baumgärtner W, Becker SC, Lepenies B. The CARD9-Associated C-Type Lectin, Mincle, Recognizes La Crosse Virus (LACV) but Plays a Limited Role in Early Antiviral Responses against LACV. *Viruses*. 2019 Mar 26;11(3):303. doi: 10.3390/v11030303. PubMed PMID: 30917612; PubMed Central PMCID: PMC6466035.
- Möschl A, Schäffer C, Sleytr UB, Messner P, Christian R, Schulz G. Characterization of the S-layer glycoproteins of two lactobacilli (1993). En Beveridge TJ, Koval SF (eds) *Advances in bacterial paracrystalline surface layers*, Plenum Press, New York, pp. 281–284
- Möschl A, Schäffer C, Sleytr UB, Messner P, Christian R, Schulz G. Characterization of the S-layer glycoproteins of two lactobacilli (1993). En: T.J. Beveridge, S.F. Koval, editors. *Advances in bacterial paracrystalline surface layers*. Vol. 252. Plenum Press; New York: 1993. p. 281-284.

Referencias bibliográficas

- O'Hagan, T., Friedland, L., Hanon, E., and Didierlaurent, A. Towards an evidence-based approach for the development of adjuvanted vaccines. (2017) *Current Opinion in Immunology* 47:93–102
- Oki K, Kudo Y, Watanabe K. *Lactobacillus saniviri* sp. nov. and *Lactobacillus senioris* sp. nov., isolated from human faeces. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol* 62:601-607. doi: 10.1099/ijs.0.031658-0
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H . SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. (2011) *Nat Methods* 8:785-786. doi: 10.1038/nmeth.1701
- Podlesny M, Jarocki P, Komon E, Glibowska A, Targonski Z. LC-MS/MS analysis of surface layer proteins as a useful method for the identification of lactobacilli from the *Lactobacillus acidophilus* group. (2011) *J Microbiol Biotechnol* 21:421-429
- Prado Acosta M, Ruzal SM, Cordo SM. S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor (2016). *Int J Biol Macromol* 92:998-1005. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.096
- Rodríguez, E., Kalay, H., Noya, V., Brossard, N., Giacomini, C., van Kooyk, Y., García-Vallejo, J.J., and Freire, T. Fasciola hepatica glycoconjugates immunoregulate dendritic cells through the Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin inducing T cell anergy (2017). *Sci Rep.*; 7: 46748
- Rodríguez, E., Noya, V., Cervi, L., Chiribao M.L., Brossard N., Chiale C., et al. Glycans from Fasciola hepatica Modulate the Host Immune Response and TLR-Induced

Referencias bibliográficas

Maturation of Dendritic Cells (2015) . PLoS Negl. Trop. Dis. 9: e0004234. doi: 10.1371/journal.pntd.0004234.

- Ruland. CARD9 Signaling in the Innate Immune Response. Ann. N.Y. Acad. Sci. (2008) 1143: 35–44. doi: 10.1196/annals.1443.024

- Sancho, D. and Reis e Sousa, C. Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis (2012). Annu. Rev. Immunol. 30:491-529

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

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

- Schoenen, H, Bodendorfer, B., Hitchens, K., Manzanero, S., Werninghaus K., Nimmerjahn F., et al. Cutting edge: Mincle is essential for recognition and adjuvanticity of the mycobacterial cord factor and its synthetic analog trehalose-dibehenate. (2010) J Immunol. 184:2756–2760.

- Selman MH, Hemayatkar M, Deelder AM, Wuhrer M. Cotton HILIC SPE microtips for microscale purification and enrichment of glycans and glycopeptides. Anal. Chem. 2011; 83:2492–2499.

- Shah, S., Nagata, M., Yamasaki, S., Williams, S.J. Total synthesis of a cyclopropane-fatty acid α -glucosyl diglyceride from *Lactobacillus plantarum* and identification of its ability to signal through Mincle. (2016) Chem Commun. 52: 10902-10905. doi: 10.1039/c6cc05631h.

- Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, López R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins D. Fast, scalable generation of high-quality

Referencias bibliográficas

protein multiple sequence alignments using ClustalOmega (2011). Mol Syst Biol 7:539. doi: 10.1038/msb.2011.75

- Sleytr UB, Schuster B, Egelseer E-M, Pum D. S-layers: principles and applications (2014). FEMS Microbiol Rev 38:823-864. doi: 10.1111/1574-6976.12063

- Sleytr, U.B., and Thorne, K.J. Chemical characterization of the regularly arranged surface layers of *Clostridium thermosaccharolyticum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. J. Bacteriol. (1976) 126, 377–383.

- Smit E, Oling F, Demel R, Martinez B, Pouwels PH. The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterization of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. (2001) J Mol Biol 305:245-257

- Sun Z, Harris HM, McCann A, et al. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera (2015). Nat Commun 6:8322. doi: 10.1038/ncomms9322

- Sun Z, Kong J, Hu S, Kong W, Lu W, Liu W. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen(2013) . Appl Microbiol Biotechnol 97:1941-1952. doi: 10.1007/s00253-012-4044-x

- Takeuchi O., and Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell. (2010) 140, 805-820 doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

- Thaïss C., Levy M., Itav S., Elinav E. Integration of Innate Immune Signaling. (2016) Trends Immunol. Feb;37(2):84-101. doi: 10.1016/j.it.2015.12.003

Referencias bibliográficas

- Underhill, D. M., E. Rossnagle, C. A. Lowell, R. M. Simmons. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. 2005. *Blood* 106: 2543-2550.
- van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JDH, Tjalsma H, Dubois JYF, Bron S, van Dijk JM, Anné J. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria(2004). *Biochim Biophys Acta* 1694:279–297
- Waśko A, Polak-Berecka M, Kuzdrałiński A, Skrzypek T. Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains (2014). *Anaerobe* 25:53-60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.11.004
- Watanabe K, Fujimoto J, Tomii Y, Sasamoto M, Makino H, Kudo Y, Okada S. *Lactobacillus kisonensis* sp. nov., *Lactobacillus otakiensis* sp. nov., *Lactobacillus rapi* sp. nov. and *Lactobacillus sunkii* sp. nov., heterofermentative species isolated from sunki, a traditional Japanese pickle(2009). *Int J Syst Evol Microbiol* 59:754–760. doi: 10.1099/ijms.0.004689-0
- Wells, C.A., Salvage-Jones, J.A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R.Z., et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*(2008). *J. Immunol.* 180: 7404–7413.
- Yamasaki, S., Ishikawa, E., Sakuma, M., Hara, H., Ogata, K., Saito, T. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells(2008). *Nat. Immunol.* 9: 1179–1188.
- Yamasaki, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, T. Matsuzawa, E. Ishikawa, M. Sakuma, H. et al. C-type lectin Mincle is an activating receptor for pathogenic fungus, *Malassezia* (2009). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 1897–1902

Referencias bibliográficas

- Zhu C, Guo G, Ma Q, Zhang F, Ma F, Xiao D, Yang X, Sun M. Diversity in S-layers. (2016). *Prog Biophys Mol Biol.* Jan;123:1-15. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2016.08.002
- Zubiría, M.G., Gambaro, S.E., Rey, M.A., Carasi, P., Serradell, M.A., Giovambattista, A. Deleterious effects of high-fructose intake: the preventive effect of *Lactobacillus kefir* administration. (2017) *Nutrients.* 9, 470, doi:10.3390/nu905470.