



ORIGINAL

La deficiencia en el transporte de N-acetilglucosamina en *Lysinibacillus sphaericus* ASB13052 afecta el proceso de esporulación e incrementa la actividad hemolítica de su S-layer



Julián Tarsitano^{a,◇}, Sabrina Sol Bockor^{b,◇}, María Mercedes Palomino^b,
Joaquina Fina Martin^b, Sandra Mónica Ruzal^b y Mariana Claudia Allievi^{b,*}

^a Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

^b Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires - Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUBICEN) - CONICET, Ciudad Universitaria, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 4 de enero de 2024; aceptado el 28 de mayo de 2024

Disponible en Internet el 31 de agosto de 2024

PALABRAS CLAVE

S-layer;
Sistema
fosfotransferasa;
*Lysinibacillus
sphaericus*;
Actividad larvica;
Esporas

Resumen Se considera que *Lysinibacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* son los mejores insecticidas biológicos para controlar larvas de mosquitos y una alternativa ecológica a los insecticidas químicos. *L. sphaericus* se caracteriza por depender de moléculas peptídicas como la N-acetilglucosamina para obtener fuentes de carbono y posee un sistema de transferencia de moléculas orgánicas, conocido como *phosphotransferase system* (PTS) para incorporarlas. Algunas cepas tienen proteínas S-layer, cuya participación en la retención de metales y en la actividad larvica contra mosquitos portadores de enfermedades ya hemos demostrado. Dado que las alteraciones en el sistema de incorporación de aminoazúcares podrían afectar el perfil de proteínas y su funcionalidad, se estudió comparativamente la cepa ASB13052 y una mutante isogénica en el gen *ptsH*, preponderante en la vía de señalización del PTS. Por primera vez, se confirmó la presencia de proteínas S-layer N-glicosiladas en ambas cepas, con una variación en el patrón de su peso molecular según la fase de crecimiento. En fase exponencial, se encontró una proteína S-layer mayor de 130 kDa en la mutante *ptsH*, ausente en la cepa salvaje. La mutante presentó un proceso de esporulación alterado, incompleto y de calidad deficiente. El análisis de hemólisis, asociado a la actividad larvica, mostró que

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: mallievi@qb.fcen.uba.ar, marianaallievi@gmail.com (M.C. Allievi).

◇ Estos autores contribuyeron igualmente a este estudio y les corresponde la primera autoría.

la mutante posee mayor eficiencia de lisis, rasgo correlacionado con la proteína de alto peso molecular. Los resultados permiten proponer cuáles serían los efectos generados por la ausencia del transporte de N-acetilglucosamina sobre la actividad hemolítica, las isoformas de S-layer y la actividad larvica de *L. sphaericus*.

© 2024 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

S-layer;
Phosphotransferase
system;
Lysinibacillus
sphaericus;
Larvicidal activity;
Spores

Deficiency in N-acetylglucosamine transport affects the sporulation process and increases the hemolytic activity of the S-layer protein in *Lysinibacillus sphaericus* ASB13052

Abstract *Lysinibacillus sphaericus* is a bacterium that, along with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, is considered the best biological insecticide for controlling mosquito larvae and an eco-friendly alternative to chemical insecticides. It depends on peptidic molecules such as N-acetylglucosamine to obtain carbon sources and possesses a phosphotransferase system (PTS) for their incorporation. Some strains carry S-layer proteins, whose involvement in metal retention and larvicidal activity against disease-carrying mosquitoes has been demonstrated. Alterations in the amino sugar incorporation system could affect the protein profile and functionality. Strain ASB13052 and the isogenic mutant in the *ptsH* gene, which is predominant in the PTS signaling pathway, were used in this study. For the first time, the presence of N-glycosylated S-layer proteins was confirmed in both strains, with a variation in their molecular weight pattern depending on the growth phase. In the exponential phase, an S-layer protein greater than 130 kDa was found in the *ptsH* mutant, which was absent in the wild-type strain. The mutant strain exhibited altered and incomplete low quality sporulation processes. Hemolysis analysis, associated with larvicidal activity, showed that the *ptsH* mutant has higher lytic efficiency, correlating with the high molecular weight protein. The results allow us to propose the potential effects that arise as a result of the absence of amino sugar transport on hemolytic activity, S-layer isoforms, and the role of N-acetylglucosamine in larvicidal activity.

© 2024 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La bacteria *Lysinibacillus sphaericus*, inicialmente caracterizada como *Bacillus sphaericus*, fue aislada por primera vez en 1904 por Neide y Meyer en ambientes acuáticos⁹ y renombrada tiempo después debido al alto contenido de lisina, alanina, ácido aspártico y ácido glutámico en su peptidoglicano¹. Muchas de las especies del género *Lysinibacillus* poseen una cobertura externa compuesta por proteínas conocidas como S-layer (capa S). Las S-layer son proteínas o glicoproteínas capaces de autoensamblarse para formar rearreglos cristalinos en la envoltura celular de manera de recubrir toda la superficie celular^{15,25}. Estas proteínas, ubicuas en los dominios Bacteria y Archaea, tienen alta tasa de síntesis y, en ocasiones, se las encuentra en el medio extracelular cumpliendo funciones diferentes a las descritas en la fisiología bacteriana. Si bien la funcionalidad de la capa S es variable, se la ha podido relacionar con el mantenimiento de la forma; la estabilización mecánica, osmótica y térmica; el reconocimiento de superficie y la adhesión al sustrato y la patogenicidad^{4,6,14,20,23}. En particular, en cepas filogenéticamente emparentadas con la cepa

ASB13052 de *L. sphaericus*, se las asoció con la capacidad de bioadsorber metales y con la actividad entomopatógena^{3,4}.

Las S-layer mejor caracterizadas, como las de *L. sphaericus* C3-41 y 2362, tienen un peso molecular de 125 kDa^{4,16}. La producción de variantes de S-layer podría modificar la funcionalidad de la capa S²².

L. sphaericus es conocida por su actividad larvica frente a mosquitos, lo que la vuelve una alternativa ecológica frente a los insecticidas químicos. Durante el proceso de esporulación, esta bacteria sintetiza una toxina dimérica compuesta por las proteínas BinA y BinB, las que conforman inclusiones paraesporales conocidas habitualmente como «cristal»⁵. Estas proteínas se encontraron en todas las cepas de *L. sphaericus* con alta capacidad entomopatógena²⁶. Durante la fase de crecimiento vegetativo, esta especie sintetiza otro set de toxinas insecticidas, menos estables, designadas como Mtx y conformadas por las familias Mtx1 y Mtx2. Las Mtx quedan asociadas a la membrana de la bacteria⁵ y son degradadas por las proteasas características del proceso de esporulación bacteriana, por lo que dejan de ejercer su acción en preparaciones de esporas²⁴. Por último, las proteínas S-layer sintetizadas en las distintas

fases de crecimiento, en el caso de las cepas que las portan, contribuyen en la función larvívica confiriendo actividad hemolítica. Las proteínas S-layer, además, permanecen asociadas a las esporas potenciando la actividad de las proteínas del cristal^{4,27}.

Como característica metabólica relevante, *L. sphaericus* es incapaz de utilizar hexosas o pentosas como fuentes de carbono, aunque puede utilizar el aminoazúcar N-acetilglucosamina (GlcNAc), monómero de la quitina, entre otros polisacáridos. Para su utilización, posee un transportador PTS activo (sistema de fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato)². El sistema PTS cuenta con dos enzimas que catalizan el primer paso de la reacción de transferencia y fosforilación: la enzima I (EI) y la proteína termoestable HPr, que se fosforila a expensas de fosfoenolpiruvato. El tercer componente del sistema de transporte son las enzimas II (EII). Las EII son proteínas transportadoras sustrato-específicas que reconocen moléculas orgánicas. Suelen estar compuestas por 3 o 4 subunidades fusionadas que forman parte de un complejo, conformando una cascada de fosforilaciones¹⁷. La N-acetilglucosamina, entonces, es transportada por una enzima II. De este modo, podría funcionar como donador de grupos glicosídicos, sustratos ligados a la glicosilación de proteínas.

En vistas de estos antecedentes, en este trabajo se utilizó la cepa *L. sphaericus* ASB13052 y la mutante isogénica *ptsH* (gen codificante de HPr)² para evaluar si la falla en el transporte de aminoazúcares (donores de grupos glicosídicos) genera modificaciones en el perfil proteico o postraduccionales que ocasionen cambios funcionales.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Se utilizó la bacteria *L. sphaericus* ASB13052 y su mutante isogénica *ptsH* (Pts[−]) con inserción de un casete de resistencia a kanamicina interrumpiendo el gen del transportador de aminoazúcares *ptsH*². Se cultivaron con agitación constante a 30 °C en medio Luria Bertani (LB). Cuando fue necesario, se suplementó con N-acetilglucosamina. Los cultivos en medio mínimo se realizaron en CTB (K₂HPO₄ 70 mM; KH₂PO₄ 30 mM; (NH₄)₂SO₄ 25 mM; MgSO₄ 0,5 mM; MnSO₄ 0,01 mM; citrato de amonio férrico 22 mg/l; tiamina 0,02%; biotina 0,02 µg/ml), utilizando como fuente de carbono N-acetilglucosamina o glutamato, ambas en una concentración final del 1%. La cepa mutante se cultivó en presencia de 15 µg/ml de kanamicina (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.).

Purificación de proteínas S-layer desde cultivos líquidos

La extracción se basó en un método de sustitución catiónica por el agregado de LiCl, tal como fue reportado⁴. Las cepas de *L. sphaericus* se cultivaron en 50 ml de LB el tiempo correspondiente (4, 8, 16 o 96 h). Las células se cosecharon y se lavaron una vez con PBS. Se extrajeron las proteínas S-layer de las células resuspendiendo en 4 ml de LiCl 6 M, realizando 3 min de agitación vigorosa seguido de una incubación con agitación suave a temperatura ambiente por 1 h. Las muestras se centrifugaron a 14000 × g por 15 min; el

sobrenadante se dializó en dos pasos contra CaCl₂ 10 mM a 4 °C. Luego de una centrifugación a 10000 × g durante 20 min, las proteínas se resuspendieron en agua desionizada y se almacenaron a −20 °C. Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford utilizando el kit Quick StartTM Bradford Protein Assay (BioRad, Hercules, California, EE.UU.), según indicaciones del fabricante.

Electroforesis de proteínas y células enteras y tinción con Coomassie blue

Las células enteras crecidas en LB, con o sin suplementar con GlcNAc, fueron hervidas 5 min a 100 °C en loading buffer (10% glicerol, 4% SDS, 4 M urea, 2% beta-mercaptoetanol y 0,05% azul de bromofenol) y las muestras obtenidas se sometieron a una SDS-PAGE con un porcentaje de gel de 7,5%. Los geles se tiñeron con *Coomassie brilliant blue*. Se sembró el mismo material en cada pocillo (10⁷ UFC de células o esporas y 0,5 mg de proteína S-layer).

Western Blot

Para el análisis por Western Blot, los geles se electrotransferieron con un equipo Semi-dry Blotter (Amersham Biosciences, Chicago, EE. UU.) a membranas de PVDF previamente activadas con metanol (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Se reveló con anticuerpo policlonal anti-S-layer preparado en conejo (diluido 1:2000). El revelado se realizó mediante un anticuerpo biotinilado anti-conejo, seguido del conjugado estreptavidina-HRP (Pierce, Rockford, IL, EE. UU.). Para la detección quimioluminiscente, se utilizó como sustrato luminol ECL (Amersham, GE Healthcare, Chicago, EE. UU.) y las imágenes se obtuvieron con un digitalizador Fuji LAS1000 (Fuji Film, Tokyo, Japón).

Tinción de glicoproteínas

Se utilizó el kit PRO-Q EmeraldTM (Invitrogen, Paisley, UK) para detectar bajas concentraciones de glicoproteínas. Se utilizó luego de realizar un SDS-PAGE siguiendo las instrucciones del fabricante para la tinción. La detección es posible luego de una excitación a 280-300 nm en un transiluminador Benchtop 3UVTM (UVP, Inc., Upland, CA, EE.UU.). Como control positivo se utilizó el Candy Cane markerTM.

Preparación de esporas

Se cultivaron ambas cepas de *L. sphaericus* durante 96 h con agitación constante en medio líquido a 30 °C con o sin suplemento de GlcNAc. Se recolectó la masa bacteriana por centrifugación y se lavó con una solución de NaCl 1 M. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14000 × g y se realizaron tres lavados con H₂O milliQ. Finalmente, el cultivo bacteriano enriquecido en esporas fue resuspendido en acetato de sodio 10 mM pH 4,5, para prevenir la germinación, y almacenado a −20 °C.

Observación microscópica de esporas

Se utilizó un microscopio óptico Axio Scope A1 modelo Microphot microscope (Axiostar Plus; Carl Zeiss, Jena, Alemania), con un aumento $\times 1.000$, para observar y fotografiar las preparaciones de esporas en LB. Se cuantificaron los distintos fenotipos observados ($n = 100$) y se evaluó la presencia de diferencias significativas entre cepas ($p < 0,005$).

Análisis de termorresistencia de esporas

Las esporas se calentaron a 70°C durante distintos intervalos de tiempo (5, 10, 15 y 20 min) y posteriormente se realizó un recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas con LB incubando durante 24 h a 30°C . Para cada cepa se realizaron tres experimentos independientes.

Ensayo de hemólisis

Se realizó según Allievi et al.⁴, en un volumen final de 1 ml. Se colocaron 500 μl de glóbulos rojos de carnero estabilizados al 0,05% y se llevó a 1 ml agregando la cantidad necesaria de proteínas y PBS. Luego se incubó por 30 min a 37°C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 405 nm, longitud de onda que corresponde al pico máximo de absorbancia de los grupos hemo procedentes de los glóbulos rojos lisados. La hemólisis total de los glóbulos rojos corresponde a la incubación de los glóbulos rojos con agua destilada mientras que el 0% de hemólisis se corresponde con la incubación con *buffer* fosfato (PBS). Se analizó la capacidad hemolítica de preparaciones de S-layer obtenidas de células en fase vegetativa crecidas en medio líquido, extraídas según lo descripto. Las concentraciones de proteína utilizadas en este ensayo fueron 0,5, 2, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Como control negativo, se utilizó la misma concentración de seroalbúmina bovina. Para analizar la hemólisis de los cultivos esporulados, se realizó el mismo procedimiento agregando cantidades conocidas de esporas.

Análisis estadístico

Se analizó la significación de los resultados de hemólisis mediante la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis de los supuestos y de la varianza se efectuó con el programa InfoStat (Grupo InfoStat, Córdoba, Argentina).

Resultados

En este trabajo se propuso estudiar la influencia de la inactivación del gen *ptsH* en el perfil proteico y funcional de *L. sphaericus* ASB13052, en particular, el efecto sobre la esporogénesis y la actividad larvicida. En primer lugar, se corroboró la inserción del casete de resistencia a kanamicina en el gen *ptsH* (fig. S1A, fig. S1B) en la mutante *ptsH* (fig. S1C), conforme con reportes anteriores².

Luego, se analizó la presencia de proteína S-layer en células enteras de cultivos líquidos en fase exponencial mediante Western Blot, utilizando anticuerpos policlona-

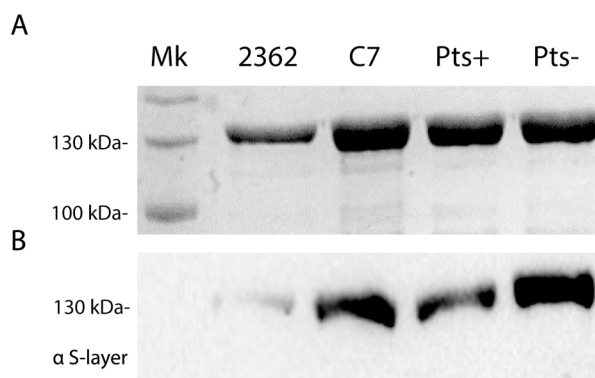


Figura 1 Patrones proteicos de bacterias enteras en fase exponencial cultivadas en LB. A) Tinción con *Coomassie blue* luego de la separación por electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5%). B) Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-S-layer de la cepa *L. sphaericus* 2362. Cepas de *L. sphaericus* empleadas: 2362, C7, ASB13052 Pts+ (cepa salvaje), ASB13052 *ptsH* (cepa mutada Pts–), Mk: marcador de peso molecular.

les anti-S-layer³. En este análisis, se incluyeron dos cepas adicionales: la cepa de referencia *L. sphaericus* 2362 y la cepa *L. sphaericus* C7, cuya S-layer tiene actividad larvicida contra *Aedes aegypti*⁴. Los resultados indican que los perfiles proteicos de la cepa salvaje y de su mutante *ptsH* no presentan diferencias entre sí ni con las cepas de referencia. Se destaca la presencia de una banda proteica mayoritaria, de aproximadamente 130 kDa (fig. 1A), reconocida por los anticuerpos específicos anti-S-layer (fig. 1B).

Debido a que la mutación en el gen *ptsH* afecta el transporte de aminoazúcares, por ejemplo, el de N-acetilglucosamina (GlcNAc), se analizó su posible rol en las modificaciones postraduccionales de la proteína S-layer. Para ello, se realizaron cultivos en LB suplementados o no con N-acetilglucosamina (donor de grupos glucanos) y se analizaron las fracciones proteicas de ambas cepas en la fase exponencial del crecimiento (fig. 2A). No se encontraron patrones de peso molecular de S-layer alterados. Por otro lado, para evaluar el efecto del sustrato, se utilizó un medio con una única fuente de carbono: medio mínimo suplementado con GlcNAc o con glutamato (control) (fig. 2B). La cepa mutante *ptsH* no logró crecer con GlcNAc como única fuente de carbono, tal como se esperaba. La cepa salvaje no mostró diferencias en sus S-layer cuando fue crecida con o sin el aminoazúcar GlcNAc.

A su vez, se realizó una purificación de la proteína S-layer de los cultivos en fase exponencial (fig. 3). Se comprobó la presencia de la misma banda de peso molecular de 130 kDa correspondiente a la S-layer hallada en los extractos proteicos de las bacterias enteras. Además, en la mutante *ptsH*, se detectó una banda de mayor peso molecular (fig. 3A). Se analizó la identidad de dicha banda por Western Blot utilizando anticuerpos específicos anti-S-layer y se comprobó que también esa banda correspondía a una isoforma de S-layer (fig. 3B). Para determinar si la mutación del gen *ptsH* afecta la incorporación de grupos glicosídicos y, por lo tanto, incide en las modificaciones postraduccionales de estas proteínas, específicamente en la glicosilación, se evaluó la

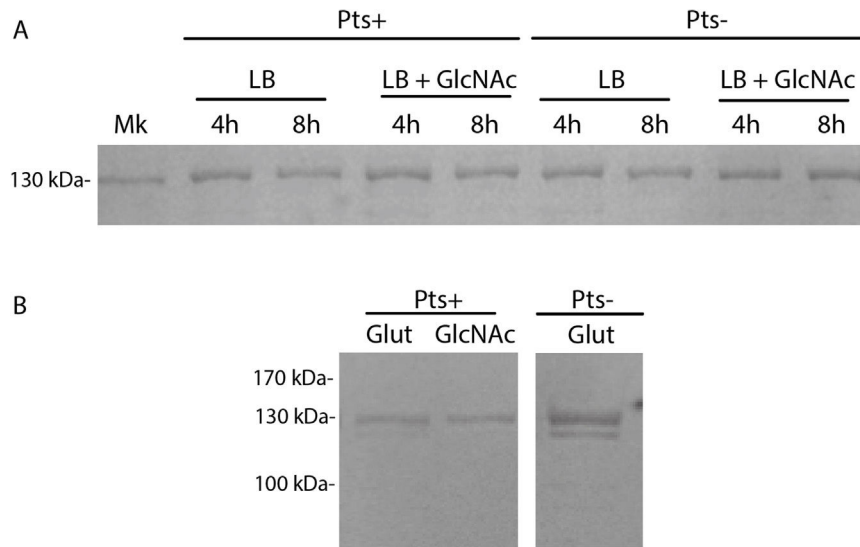


Figura 2 Patrones proteicos en SDS-PAGE. A) La cepa salvaje *L. sphaericus* ASB13052 (Pts+) y su mutante Pts– (*ptsH*) se hicieron crecer durante 4 u 8 h en medio LB, con o sin N-acetilglucosamina (GlcNAc); se observan las bandas correspondientes a proteínas de alto peso molecular. B) Las mismas cepas se hicieron crecer durante 8 h en medio mínimo CTB suplementado con glutamato (Glut) o con N acetilglucosamina (GlcNAc).

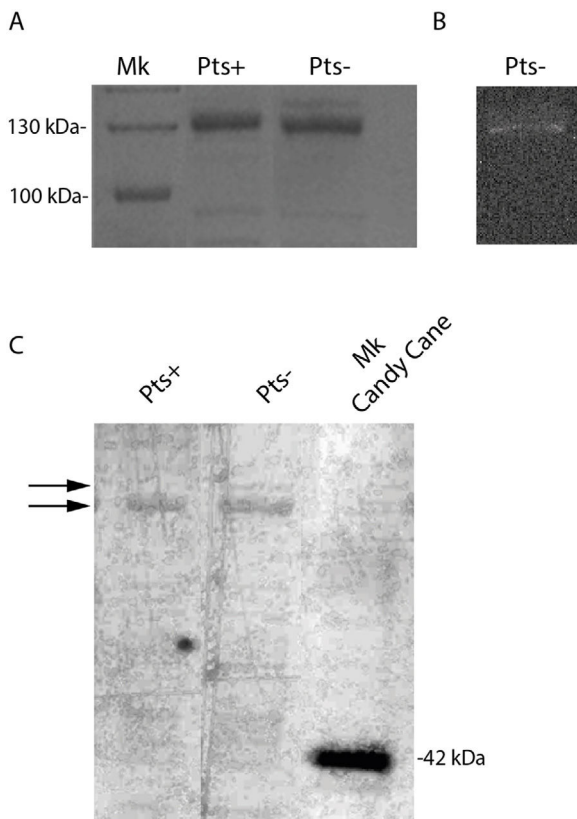


Figura 3 Proteínas S-layer purificadas de cultivos en fase exponencial (16 h). A) Tinción con *Coomassie blue* luego de la electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5%) de las proteínas S-layer de la cepa salvaje (Pts+) y la cepa mutada (Pts–), según se describe en Materiales y métodos. B) Western Blot utilizando anticuerpos policlonales anti-S-layer de *L. sphaericus* 2362. C) Detección de glicoproteínas mediante la utilización de PRO-Q Emerald™; control positivo: marcador Candy Cane (42 kDa). Las flechas indican la ubicación de las isoformas.

N-glicosilación de la proteína S-layer de la cepa salvaje y la mutante *ptsH* utilizando el kit PRO-Q Emerald™ (fig. 3C). Las proteínas S-layer obtenidas de fase exponencial de ambas cepas se tiñeron en esta reacción, por lo que se concluye que la proteína S-layer de la cepa salvaje y ambas isoformas de la cepa *ptsH* se encuentran glicosiladas.

Las esporas de *L. sphaericus* suelen retener sus proteínas S-layer, que luego cumplen funciones específicas³. Por ello, se estudió el patrón de proteínas S-layer provenientes de cultivos enriquecidos en esporas (fig. 4A). En este análisis se observó la presencia de bandas correspondientes a la proteína S-layer con la cepa salvaje y la mutante. Al igual que lo reportado en la cepa 2362³, el peso molecular de las proteínas en estos cultivos fue menor que los observados en los cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento. Asimismo, la cepa *ptsH* presentó dos isoformas de S-layer, frente a las tres isoformas detectadas en la cepa salvaje. Por otra parte, algunas cepas de esta especie se caracterizan por su actividad larvívora, mayormente asociada a proteínas de fase exponencial (Mtx y S-layer) y proteínas Bin de las esporas. Debido a que las proteínas S-layer remanentes en las esporas presentaron diferencias entre cepas (fig. 4A), se evaluó mediante un ensayo de termosensibilidad la calidad del proceso de esporulación para ambas cepas (fig. 4B). La cepa *ptsH*, deficiente en el transporte de aminoazúcares, mostró una sensibilidad térmica mucho mayor, ya detectable después de 5 min de exposición a 70 °C. Estos hallazgos indican que el comportamiento fisiológico de esporulación se encuentra alterado en la cepa mutante.

Para continuar con el estudio del proceso de esporulación, a las 96 h se caracterizaron fenotípicamente los cultivos mediante observación y recuento al microscopio. En las figuras 5A y 5B se muestran las microscopías ópticas de la cepa salvaje y la mutante, respectivamente, utilizadas en el ensayo de termorresistencia. En concordancia con los hallazgos del ensayo de resistencia térmica, se puede observar que la cepa mutante fue incapaz de concluir la

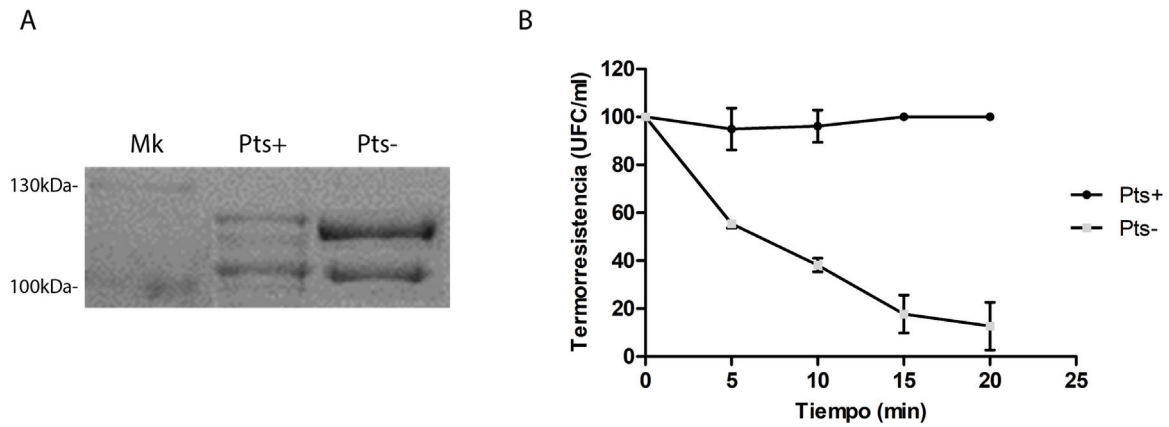


Figura 4 Proteínas S-layer provenientes de cultivos enriquecidos en esporas. A) Identificación de S-layer de cultivos de la cepa salvaje (Pts+) y la cepa mutada (Pts-) enriquecidos en esporas, luego de 96 h de incubación en medio LB. B) Cinética de termorresistencia en incubaciones durante 5, 10, 15 o 20 min a 70 °C.

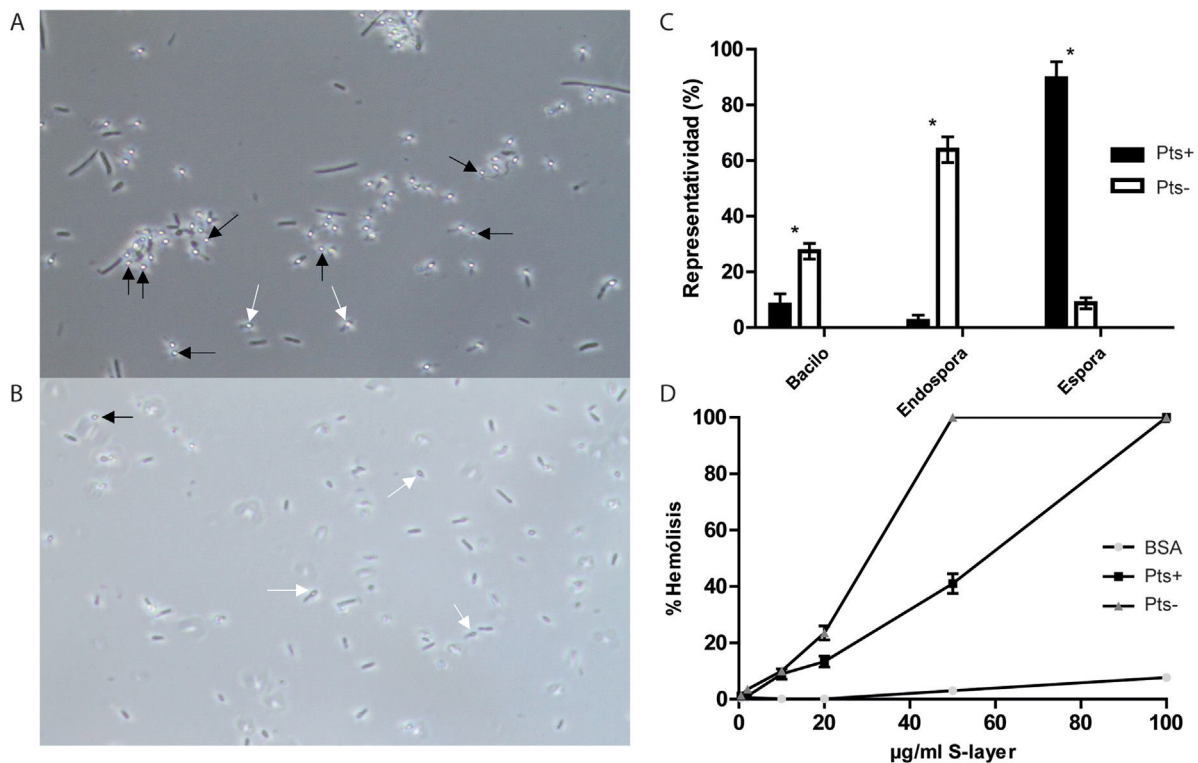


Figura 5 Caracterización fenotípica de cultivos mediante observación por microscopía óptica ($\times 1.000$) y recuento de cultivos esporulados de 96 h de incubación. A) Cepa salvaje (Pts+); B) Cepa mutada (Pts-). Las flechas negras indican esporas refringentes; las flechas blancas indican endosporas deformantes. C) Cuantificación de los fenotipos observados al microscopio en los cultivos esporulados. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$). D) Perfiles hemolíticos de las proteínas S-layer de la cepa salvaje Pts+ ($n = 5$) y la cepa mutada Pts- ($n = 3$). BSA ($n = 3$): control negativo.

esporulación, dando lugar a cultivos con un alto porcentaje de bacilos con endosporas (fig. 5C). Estos resultados indican que la interrupción del gen *ptsH* provoca una disrupción en el proceso de esporulación en medios ricos.

En trabajos anteriores se identificó a la S-layer como un factor de virulencia y se estableció una relación directa entre la capacidad hemolítica de la S-layer de una cepa y su actividad como patógeno de mosquitos⁴. Teniendo en cuenta estos antecedentes, se analizó la capacidad hemo-

lítica de extracciones de S-layer obtenidas de ambas cepas en la fase exponencial de crecimiento (fig. 5D). Las S-layer provenientes de ambas cepas presentaron actividad hemolítica (fig. 5D). Sin embargo, la S-layer de la mutante *ptsH* se asoció con mayores niveles de hemólisis que la S-layer de la cepa salvaje a iguales concentraciones (por debajo del máximo ensayado), en coincidencia con el hallazgo de una mayor proporción de la isoforma de S-layer de alto peso molecular.

Discusión y conclusiones

En este trabajo confirmamos la presencia de proteínas S-layer en *L. sphaericus* ASB13052, las que fueron reconocidas por anticuerpos anti-S-layer generados contra la cepa de referencia 2362. Esto demuestra la similitud antigénica.

Uno de los objetivos principales de esta investigación fue determinar si la presencia de una mutación en el gen *ptsH*, involucrado en el transporte de N-acetilglucosamina al interior celular, podría afectar a los componentes de envoltura, más específicamente, a la S-layer. Se sabe que la N-acetilglucosamina funciona como donador de grupos glicosídicos y que, a su vez, regula procesos de represión catabólica². Si la síntesis y actividad de la S-layer fuesen afectadas por el fenómeno de represión catabólica o la glicosilación, una mutación en un gen clave en estos procesos, como el gen *ptsH*, podría ocasionar la aparición de patrones proteicos diferentes en la cepa que porta la mutación.

En este estudio no se observaron cambios en los patrones proteicos de la cepa mutada comparada con la salvaje al hacerlas crecer por hasta 8 h en medios ricos, suplementados o no con N-acetilglucosamina. Cuando se emplean medios ricos no definidos, cabe esperar que no existan diferencias debido a que moléculas de diversa índole podrían cumplir el papel de intermediarios de reacción en el interior celular. Sin embargo, en esta investigación, tampoco se alteraron los patrones proteicos en bacterias provenientes de medios mínimos. Estos resultados indicarían que la síntesis de la proteína S-layer, al menos la de la asociada a la banda de 130 kDa, ocurre con independencia de la fuente de carbono o del medio de cultivo utilizado.

Se sabe que hay organismos donde la fase de crecimiento altera la composición de la envoltura. En *Bacillus anthracis*, por ejemplo, la entrada en la fase estacionaria provoca el recambio de una proteína de superficie por otra²¹. En la cepa secuenciada *L. sphaericus* C3-41, se encontraron 22 marcos de lectura que podían codificar la S-layer¹⁶.

En otros microorganismos de la misma especie, como la cepa de referencia 2362 (Accession Number CP015224.1), se han identificado al menos 13 genes codificantes de S-layer de distinto peso molecular, y en la cepa JG-B53, 8 genes de expresión alternativa¹⁹. Recientemente, se demostró en la bacteria emparentada *Bacillus cereus* que una modificación de la dinámica de expresión de SL2 y EA1, las dos proteínas S-layer que produce, modifica su abundancia relativa. Esto determina cambios en sus propiedades superficiales, lo cual contribuye a la supervivencia de *B. cereus* en condiciones de inanición⁷. En resumen, en muchas cepas de *L. sphaericus*, no hay una única proteína S-layer y estas pueden sufrir algún tipo de modificación.

En esta investigación, al cultivar durante un período más largo, de 16 h, se observó en la cepa mutante *ptsH* la aparición de una banda de mayor peso molecular que la correspondiente a la S-layer característica, de 130 kDa. Asimismo, a medida que avanzó el proceso de esporulación, se pudieron distinguir tres bandas de menos de 130 kDa en la cepa salvaje y solo dos bandas de menos de 130 kDa en la mutante. Así, nuestros resultados muestran que el patrón proteico de S-layer se modifica conforme cambia el estadio de crecimiento de la bacteria. Futuros ensayos ayudarán a

dilucidar si estas bandas representan el producto de síntesis de un nuevo tipo de S-layer o son la consecuencia de un clivaje proteico, resultado de la acción de las proteasas secretadas en el proceso de esporulación. También será preciso analizar si las distintas bandas observadas corresponden a asociaciones entre la S-layer y las proteínas del cristal (BinA y BinB), tal cual fue demostrado previamente en el laboratorio⁴.

Las glicosilaciones en las proteínas S-layer son las modificaciones postraduccionales más frecuentes en bacterias. Se han encontrado en cepas cercanas a *L. sphaericus*, como *Paenibacillus alvei* o *Lentilactobacillus kefir*, y en *Geobacillus stearothermophilus*^{8,24}. Hasta la fecha, no se han informado glicosilaciones sobre la S-layer de *Lysinibacillus sphaericus*. En este trabajo hemos analizado cualitativamente este punto y verificamos la presencia de grupos glicanos en las S-layer en este microorganismo, con un patrón de glicosilación coincidente en ambas cepas. Por consiguiente, todas las variaciones que se detectaron en el patrón de peso molecular de la S-layer se podrían atribuir a modificaciones que sufre la proteína debido a la transición por distintas fases de crecimiento o a la expresión de otros genes codificantes de proteínas de capa S. Estas hipótesis se basan en hallazgos reportados no solo en el dominio Bacteria, sino también en el dominio Arquea. En este último dominio, se han documentado modificaciones postraduccionales de proteínas S-layer, incluido el clivaje proteolítico por proteasas de membrana o la formación de multímeros¹⁸. En el dominio Bacteria, se ha documentado el recambio de isoformas de S-layer en *B. anthracis*, mientras que en *L. sphaericus* JG-B53 se observó que genes alternativos de S-layer se expresaron parcialmente frente a distintas condiciones, lo que permitiría rápidas adaptaciones en entornos cambiantes^{19,21}.

Los experimentos de resistencia térmica revelaron que la mutación en el gen *ptsH* produce efectos no solo sobre la S-layer, sino también sobre la esporulación, dando lugar a esporulaciones incompletas que afectan la calidad de la forma de resistencia de la cepa. Incluso en cultivos de más de 96 h, la cepa mutante no mostró la completa liberación de esporas y un gran porcentaje de células se presentaban con endosporas. Todo esto indica que la interrupción del gen *ptsH* provoca una disrupción en el proceso de esporulación en medios ricos. Es sabido que el sistema PTS participa en la regulación de muchas funciones celulares importantes para controlar procesos relacionados con la colonización de ambientes, aunque las funciones exactas no han sido dilucidadas. En *B. cereus*, el gen *ptsH* juega un papel importante en la resistencia al estrés oxidativo, la absorción de glucosa (azúcar PTS), la formación de biofilms y el movimiento de *swarming*, eventos característicos de la colonización bacteriana en la rizosfera¹³.

El sistema de transporte de aminoazúcares PTS está directamente relacionado con la represión catabólica por carbono, lo que les permite a las bacterias utilizar más eficientemente las fuentes de carbono y mejorar, así, la tasa de crecimiento y su sobrevivencia en ambientes naturales y en entornos cambiantes¹². En este caso, pudimos comprobar que la disrupción de la función del gen *ptsH* perjudica el proceso de esporulación, estrategia adaptativa de las

bacterias para sobrevivir en condiciones desfavorables. Sin embargo, como este proceso involucra la síntesis y función de múltiples proteasas, una esporulación defectuosa permitiría conservar la actividad de proteínas que hubieran sido degradadas en una cepa salvaje.

Es sabido que la proteína S-layer está directamente relacionada con la virulencia del organismo en bacterias como *Tannerella forsythia*, *B. cereus* y *B. anthracis*^{10,11,28}. En *L. sphaericus*, hemos demostrado que la toxicidad de su S-layer está directamente relacionada con la capacidad hemolítica y que su presencia es sinérgica con su actividad mosquitocida⁴. Los resultados obtenidos en este trabajo indican un mayor potencial hemolítico en la cepa mutante, coincidente con la aparición de una isoforma de la proteína S-layer de mayor peso molecular. La diferencia entre estas isoformas podría deberse a la ausencia de clivaje (por menor actividad de proteasas en la mutante) del péptido líder de características hidrofóbicas hacia el extremo amino terminal, de aproximadamente 7,2 kDa, en *L. sphaericus* 2362. Una versión de la S-layer portadora de una región altamente hidrofóbica podría interactuar más fácilmente con la membrana de los glóbulos rojos y perturbarlos en mayor medida. Otra posibilidad que justificaría el mayor grado de hemólisis es que la proteína Mtx (cuyo peso molecular es similar al de la S-layer) permanezca asociada a la S-layer en la mutante, mientras que, en condiciones normales, en la cepa salvaje dicha proteína es fácilmente degradada hacia el final de la fase exponencial de crecimiento³⁰. Una tercera posibilidad es que, al ser incapaz de esporular eficientemente con la correspondiente batería de proteasas preponderantes, las células de la cepa mutante retuvieran las toxinas Mtx. La sinergia entre las toxinas Bin (o Cry de *Bacillus thuringiensis*) y las toxinas Mtx ya ha sido documentada, también se ha determinado que la combinación de toxinas Cry y Mtx es capaz de anular la resistencia a las preparaciones esporales por parte de los mosquitos²⁹. Sería interesante realizar experimentos con preparaciones mixtas (toxinas Cry, Mtx y S-layer) con el fin de evaluar el efecto conjunto en cepas defectuosas en esporulación, como la empleada en este trabajo.

Financiación

El estudio fue financiado con fondos provenientes de subsidios UBACyT (20020220400185BA) y ANPCyT (PICT 2020 N.º 1445).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación por el financiamiento. MCA agradece al sistema científico argentino y a la educación pública de calidad.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2024.05.006](https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.05.006).

Bibliografía

- Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2007;57:1117–25, <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63867-0>.
- Alice AF, Pérez-Martínez G, Sánchez-Rivas C. Phosphoenolpyruvate phosphotransferase system and N-acetylglucosamine metabolism in *Bacillus sphaericus*. Microbiology. 2003;149:1687–98, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26231-0>.
- Allievi MC, Sabbione F, Prado Acosta M, Palomino MM, Ruzal SM, Sanchez C. Metal biosorption by surface-layer proteins from *Bacillus* species. J Microbiol Biotechnol. 2011;21:147–53, <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1009.09046>.
- Allievi MC, Palomino MM, Prado Acosta M, Lanati L, Ruzal SM, Sánchez-Rivas C. Contribution of S-layer proteins to the mosquitocidal activity of *Lysinibacillus sphaericus*. PLoS One. 2014;9:e111114, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0111114>.
- Berry C. The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen. J Invertebr Pathol. 2012;109:1–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2011.11.008>.
- Bharat TAM, von Kügelgen A, Alva V. Molecular logic of prokaryotic surface layer structures. Trends Microbiol. 2021;29:405–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2020.09.009>.
- Boutonnet C, Lyonais S, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Château A, Duport C. Dynamic Profile of S-Layer Proteins Controls Surface Properties of Emetic *Bacillus cereus* AH187 Strain. Front Microbiol. 2022;13, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.937862>, 937862.
- Cavallero GJ, Malamud M, Casabueno AC, Serradell MLÁ, Couto AS. A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. J Proteomics. 2017;162:20–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.04.007>.
- Claus D, Fritze D. Taxonomy of *Bacillus*. En: Harwood CR, editor. *Bacillus*. Biotechnology Handbooks, 2. Boston, MA: Springer; 1989. p. 5–26, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1.2>.
- Fioravanti A, Van Hauwermeiren F, Van der Verren SE, Jonckheere W, Goncalves A, Pardon E, Steyaert J, De Greve H, Lamkanfi M, Remaut H. Structure of S-layer protein Sap reveals a mechanism for therapeutic intervention in anthrax. Nat Microbiol. 2019;4:1805–14, <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-019-0499-1>.
- Friedrich V, Gruber C, Nimeth I, Pabinger S, Sekot G, Posch G, Altmann F, Messner P, Andrukhov O, Schäffer C. Outer membrane vesicles of *Tannerella forsythia*: Biogenesis, composition, and virulence. Mol Oral Microbiol. 2015;30:451–73, <http://dx.doi.org/10.1111/omi.12104>.
- Fujita Y. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem. 2009;73:245–59, <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.80479>.
- Gao T, Ding M, Yang CH, Fan H, Chai Y, Li Y. The phosphotransferase system gene ptsH plays an important role in MnSOD production, biofilm formation, swarming motility, and root colonization in *Bacillus cereus* 905. Res Microbiol. 2019;170:86–96, <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2018.10.002>.

14. Grosu-Tudor SS, Angelescu IR, Brînzan A, Zamfir M. Characterization of S-layer proteins produced by lactobacilli isolated from Romanian artisan fermented products. *J Appl Microbiol.* 2023;134, <http://dx.doi.org/10.1093/jambio/lxac063>, lxac063.
15. Herdman M, von Kügelgen A, Kureisaite-Ciziene D, Duman R, El Omari K, Garman EF, Kjaer A, Kolokouris D, Löwe J, Wagner A, Stansfeld PJ, Bharat TAM. High-resolution mapping of metal ions reveals principles of surface layer assembly in *Caulobacter crescentus* cells. *Structure.* 2022;30:215–28, <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2021.10.012>, e5.
16. Hu X, Li J, Hansen BM, Yuan Z. Phylogenetic analysis and heterologous expression of surface layer protein SlpC of *Bacillus sphaericus* C3-41. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72:1257–63, <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70747>.
17. Joyet P, Bouraoui H, Aké FM, Derkaoui M, Zébré AC, Cao TN, Ventroux M, Nessler S, Noirot-Gros MF, Deutscher J, Milohanic E. Transcription regulators controlled by interaction with enzyme IIB components of the phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834:1415–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.004>.
18. Kandiba L, Eichler J. Archaeal S-layer glycoproteins: Post-translational modification in the face of extremes. *Front Microbiol.* 2014;5:661, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00661>.
19. Lederer FL, Weinert U, Günther TJ, Raff J, Weiß S, Pollmann K. Identification of multiple putative S-layer genes partly expressed by *Lysinibacillus sphaericus* JG-B53. *Microbiology (Reading).* 2013;159 Pt 6:1097–108, <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.065763-0>.
20. Martínez MG, Prado Acosta M, Candurra NA, Ruzal SM. S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* inhibits JUNV infection. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;422:590–5, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.031>.
21. Mignot T, Mesnage S, Couture-Tosi E, Mock M, Fouet A. Developmental switch of S-layer protein synthesis in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol.* 2002;43:1615–27, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02852.x>.
22. Palomino MM, Waehner PM, Fina Martin J, Ojeda P, Malone L, Sánchez Rivas C, Prado Acosta M, Allievi MC, Ruzal SM. Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:8475–84, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7698-y>.
23. Ravi J, Fioravanti A. S-layers: The Proteinaceous Multifunctional Armors of Gram-Positive Pathogens. *Front Microbiol.* 2021;12, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.663468>, 663468.
24. Silva-Filha MHNL, Romão TP, Rezende TMT, Carvalho KDS, Gouveia de Menezes HS, Alexandre do Nascimento N, Sobrón M, Bravo A. Bacterial Toxins Active against Mosquitoes: Mode of Action and Resistance. *Toxins (Basel).* 2021;13:523, <http://dx.doi.org/10.3390/toxins13080523>.
25. Sleytr UB, Schuster B, Egelseer EM, Pum D. S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38:823–64, <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12063>.
26. Tangsongcharoen C, Chomanee N, Promdonkoy B, Boonserm P. *Lysinibacillus sphaericus* binary toxin induces apoptosis in susceptible *Culex quinquefasciatus* larvae. *J Invertebr Pathol.* 2015;128:57–63, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2015.04.008>.
27. Viersanova A, Purwanto H. Genome analysis of *Lysinibacillus sphaericus* isolate 6.2 pathogenic to *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae). *Biodiversitas J. Biol. Divers.* 2021;22:5211–22, <http://dx.doi.org/10.13057/biodiv/d221160>.
28. Wang YT, Oh SY, Hendrickx AP, Lunderberg JM, Schneewind O. *Bacillus cereus* G9241 S-layer assembly contributes to the pathogenesis of anthrax-like disease in mice. *J Bacteriol.* 2013;195:596–605.
29. Wirth MC, Berry C, Walton WE, Federici BA. Mtx toxins from *Lysinibacillus sphaericus* enhance mosquitoicidal cry-toxin activity and suppress cry-resistance in *Culex quinquefasciatus*. *J Invertebr Pathol.* 2014;115:62–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2013.10.003>.
30. Yang Y, Wang L, Gaviria A, Yuan Z, Berry C. Proteolytic stability of insecticidal toxins expressed in recombinant bacilli. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:218–25, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01100-06>.