



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de la actividad lítica de la proteína similar a transportador ABC en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Sergio Carlos Matamoros Ortega

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amelia Ma. de Guadalupe Farrés González-Saravia
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Y ENTIDAD O INSTITUCIÓN DE ADSCRIPCIÓN

Dra. Herminia Loza Tavera
Facultad de Química

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología

MÉXICO, D. F. Junio, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González-Saravia.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología, UNAM

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM

VOCAL: Dra. Yolanda López Vidal
Facultad de Medicina, UNAM

VOCAL: Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Facultad de Química, UNAM

VOCAL: Dr. Carlos Alberto Eslava Campos
Facultad de Medicina, UNAM

SECRETARIO: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Facultad de Química, UNAM

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (Beca de Maestría no. 53437).

ASESOR

Dra. Amelia Farrés González-Saravia

SUSTENTANTE

Q.A. Sergio Carlos Matamoros Ortega

CONTENIDO

RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	5
1.1.1 Compuestos inhibitorios generados por BAL	7
1.2 PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS	10
1.2.1 Características estructurales.....	15
1.3 TRANSPORTADORES ABC	18
1.3.1 Características estructurales y dominios accesorios.....	20
1.4 APLICACIONES DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS	22
II. ANTECEDENTES	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
IV. OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
V. METODOLOGÍA	31
5.1 MEDIOS DE CULTIVO	31
5.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>P. ACIDILACTICI</i> ATCC 8042.....	32
5.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 110 KDA.....	32
5.4 CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 110 KDA.....	33
5.4.1 Construcción del plásmido TOPO-110.....	33
5.4.2 PCR de colonia	34
5.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	34
5.5.1 Construcción del plásmido pET-110	34
5.5.2 Expresión en <i>E. coli</i> BL21	36
5.6 INMUNOANÁLISIS	38
5.7 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PEPTIDOGLUCANO	39

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN	41
6.2 CLONACIÓN	43
6.3 EXPRESIÓN	44
6.3.1 Construcción del vector de expresión	44
6.3.2 Expresión de la proteína recombinante.....	52
6.4 ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PEPTIDOGLUCANO	54
VII. CONCLUSIONES	66
VIII. PERSPECTIVAS	66
IX. BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen la microbiota dominante en la mayoría de los alimentos fermentados a nivel mundial, debido a que están ampliamente distribuidas en el ambiente y producen diversos metabolitos que contribuyen al aroma, textura y conservación de alimentos. Entre ellas está el género *Pediococcus*.

En la cepa *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 se han identificado dos proteínas que conjuntamente muestran un amplio espectro antibacteriano. Presentan actividad lítica sobre peptidoglucano, copurifican en una preparación de 94.5 % de pureza, con masas moleculares de 99 kDa y 110 kDa, respectivamente. El análisis de las secuencias permitió identificar a estos péptidos como proteínas putativas reportadas en el genoma de *P. acidilactici* 7_4. La proteína de 99 kDa corresponde a una *N*-acetilmuramidasa, de acuerdo a la información obtenida en las bases de datos; por otra parte la característica más relevante de la proteína de 110 kDa es que posee una región conservada homóloga a un transportador ABC (ATP-Binding Cassette).

Con el fin de determinar si la proteína de 110 kDa presentaba realmente actividad lítica o si la banda observada era debido a alguna interacción producto de la copurificación de la proteína de 99 y 110 kDa, se decidió clonar y expresar el gen correspondiente que codifica a la proteína de 110 kDa en *Escherichia coli*. El gen se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042. Se evaluaron diversos vectores y cepas hospederas y finalmente se logró la expresión y detección de una banda con actividad lítica sobre peptidoglucano en las cepas *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pLysS usando el vector pET-22b(+) y una concentración de inductor (IPTG) de 1 mM. La actividad lítica se manifestó también como halos de inhibición en cultivo de los microorganismos de prueba *Micrococcus lysodeikticus* y *Staphylococcus aureus*. Las actividades detectadas en zimogramas indican que la enzima recombinante sufre un proceso de degradación y los fragmentos resultantes que actúan sobre cada microorganismo tienen diferente peso molecular.

El comportamiento es diferente al obtenido en paralelo por García-Cano (comunicación personal) para la proteína de 99 kDa. Por lo tanto, se iniciaron los trabajos bioinformáticos para analizar la secuencia de la proteína de 110 kDa con la finalidad de dilucidar por qué una proteína que no tiene reportes de dominios líticos presenta dicha actividad. Los primeros resultados indican que el efecto podría deberse a la conformación transmembranal de la proteína, hipótesis que deberá ser corroborada en trabajos posteriores.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BALs) son un grupo de bacterias que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Son bacterias Gram-positivas, que pertenecen al grupo de los Firmicutes (bacterias Gram-positivas con bajo contenido de GC), cocos o bacilos habitualmente anaerobios pero aerotolerantes, no esporulan, ácido tolerantes, no formadoras de pigmentos, catalasa positivas, con necesidades complejas de factores de crecimiento, por lo que a nivel laboratorio se deben emplear medios selectivos que poseen algunas de estas características para su aislamiento (Salminen *et al.*, 2004; Cabeza-Herrera, 2006).

Son un grupo destacado de microorganismos en la tecnología alimentaria porque constituyen la microbiota dominante en la mayoría de las fermentaciones de alimentos y bebidas a nivel mundial. Presentan un metabolismo variado, de acuerdo al cual se pueden clasificar en homofermentativas y heterofermentativas. En las homofermentativas el producto principal es ácido láctico al seguir una fermentación a través de la vía de la glucólisis. En las heterofermentativas se lleva a cabo una fermentación a través de la vía de las pentosas y se generan además de ácido láctico, cantidades bajas de etanol, ácido acético y CO₂ (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Los géneros más representativos de las BAL son: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Weisella*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Figura 1) (Salminen *et al.*, 2004).

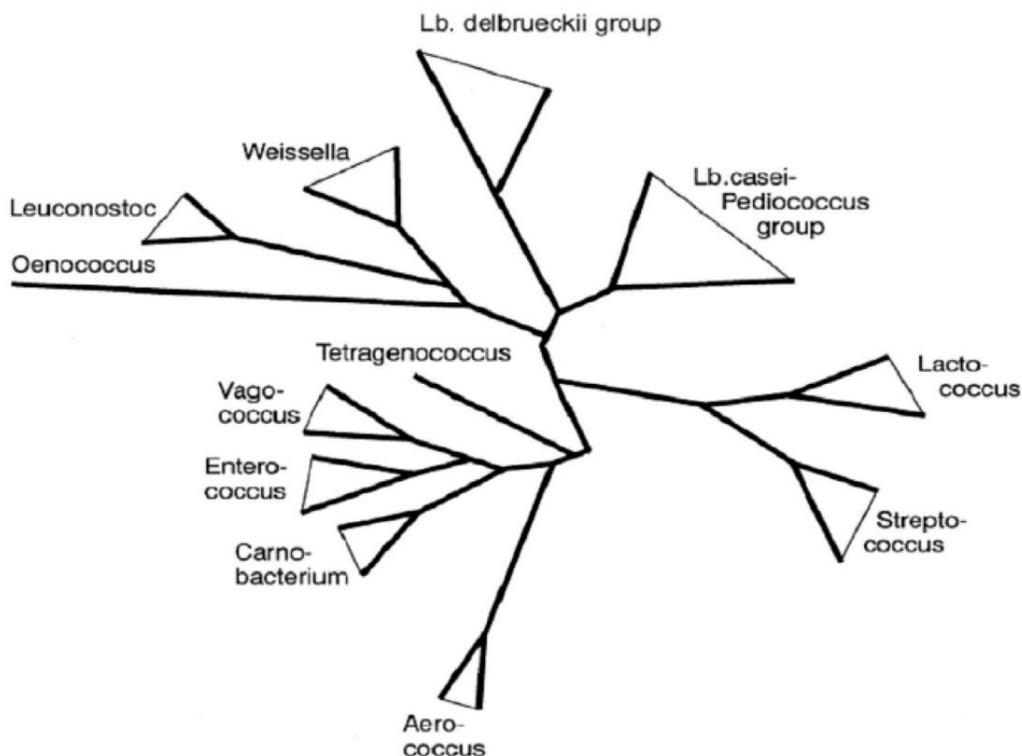


Figura 1. Esquema filogenético de bacterias ácido lácticas (tomado y modificado de Salminen *et al.*, 2004)

Por su metabolismo y su denominación GRAS (Generally Recognized As Safe) este grupo de bacterias se ha empleado desde hace varios años en la elaboración de productos fermentados, regularmente utilizados como cultivos iniciadores (Savijoki *et al.*, 2006). Especies tales como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, son de las más empleadas en fermentación de vegetales, carne, pescado, bebidas alcohólicas, productos de panadería y principalmente, productos lácteos (McKay y Baldwin, 1990).

Una característica fundamental de las BAL que les permite ser utilizadas en una gran gama de procesos biotecnológicos es la diversidad de sistemas enzimáticos y compuestos que producen en función del medio donde se desarrollan, además de que algunos de ellos presentan actividad inhibitoria hacia otros microorganismos (McKay y Baldwin, 1990; Karska-Wysocki *et al.*, 2010).

1.1.1 Compuestos inhibitorios generados por BAL

En las fermentaciones producidas por las BAL se consumen de carbohidratos disponibles y se producen a su vez ácidos orgánicos que disminuyen el pH del medio, además de compuestos como el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y otras moléculas de bajo peso molecular con actividad inhibitoria sobre bacterias, hongos y/o levaduras (Magnusson, 2003). Algunos de los compuestos más representativos son:

- a) Ácidos orgánicos. Se ha observado que ácidos débiles tienen una mayor actividad antibacteriana a bajo pH que a un pH neutro. El ácido acético tiene un amplio espectro de acción, ya que inhibe levaduras, hongos y bacterias, mientras que el ácido propiónico ejerce un fuerte efecto sobre levaduras y hongos, seguidos por el ácido láctico. La forma no disociada de los ácidos es la forma tóxica, ya que se difunde a través de la membrana al ser liposoluble y dependiendo del pH intracelular puede disociarse en mayor o menor medida acidificando el citoplasma. El efecto inhibitorio es mayor a valores de pH por debajo del pKa del ácido (Magnusson, 2003; Salminen *et al.*, 2004).
- b) Peróxido de hidrógeno. En presencia de oxígeno, algunas BAL pueden generar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a través de la acción de las oxidasas y superóxido dismutasas. El efecto bactericida del peróxido de hidrógeno es atribuido a un fuerte efecto oxidativo en la célula bacteriana, principalmente sobre las proteínas y lípidos de la membrana. La actividad hacia bacterias Gram-positivas es generalmente bacteriostática, mientras que para muchas Gram-negativas es bactericida (Wood, 1992).
- c) Dióxido de carbono. Se forma principalmente durante la fermentación heteroláctica. Tiene un efecto antibacteriano dual, dado que su formación crea un ambiente anaeróbico y por sí mismo tiene actividad antibacteriana. El mecanismo que se ha sugerido es que las descarboxilaciones enzimáticas son inhibidas y esta acumulación de CO_2 en la bicapa lipídica causa disfunción en la permeabilidad de la membrana. Se

ha reportado que las bacterias Gram-negativas son más sensibles al CO₂ que las bacterias Gram-positivas (Salminen *et al.*, 2004).

- d) Diacetilo (2,3-butanodiona). Es responsable del aroma y el sabor en la mantequilla. Es producido por especies y cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, entre otros. Puede ser sobreproducido si el citrato es metabolizado y convertido vía piruvato en diacetilo y su actividad antibacteriana aumenta a pH menores a 7.0. Es más activo contra bacterias Gram-negativas, levaduras y hongos que contra bacterias Gram-positivas, porque se piensa que el diacetilo reacciona con la proteína de unión a arginina que se acopla a un transportador ABC, por lo que la célula no puede internalizar a la arginina interfiriendo con la utilización de este aminoácido. Sin embargo, las cantidades necesarias para que se presente actividad antibacteriana son tan altas que afectarían drásticamente el aroma y el sabor de los productos (Wood, 1992; Magnusson, 2003).
- e) Bacteriocinas. Son polipéptidos de bajo peso molecular sintetizados por BAL. Las bacteriocinas pueden ser reconocidas como antibióticos y las características principales son: (a) se sintetizan en el ribosoma, (b) la célula productora es inmune a éstas y (c) tienen un reducido espectro bactericida, por lo que sólo es posible que maten bacterias relativamente cercanas a la cepa productora (Cotter *et al.*, 2005).

En general, las bacteriocinas son polipéptidos catiónicos con tendencia a adoptar estructuras helicoidales anfífilas (Nes *et al.*, 1996). Una de sus ventajas es que pueden limitar el uso de antibióticos en cierto grado y retrasar así la evolución de la resistencia a antibióticos (Nagel, 2007). Las bacteriocinas pueden dividirse principalmente en tres clases (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Clases de bacteriocinas producidas por BAL (Mora *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005).

Clasificación	Descripción	Ejemplos
Clase I. Bacteriocinas que contienen lantionina	También denominados lantibióticos, son péptidos pequeños (de 19 a 38 aa) que contienen residuos de lantionina o B-metil lantionina, los cuales forman “anillos” con otros residuos presentes. Existen más de 11 subclases.	Nisina, Citolisina, Lacticina 481
Clase II. Bacteriocinas que no contienen lantionina	Es una clase heterogénea de péptidos pequeños; incluye los tipos pediocina, de dos péptidos, cíclicas y no-pediocinas de péptidos lineales	Pediocina PA1, Pediocina AcH/PA-1, Enterocina AS48
Clase III. Bacteriolisinas. Proteínas líticas no-bacteriocinas	Proteínas termolábiles y de masa molecular alta	Enterolisina A

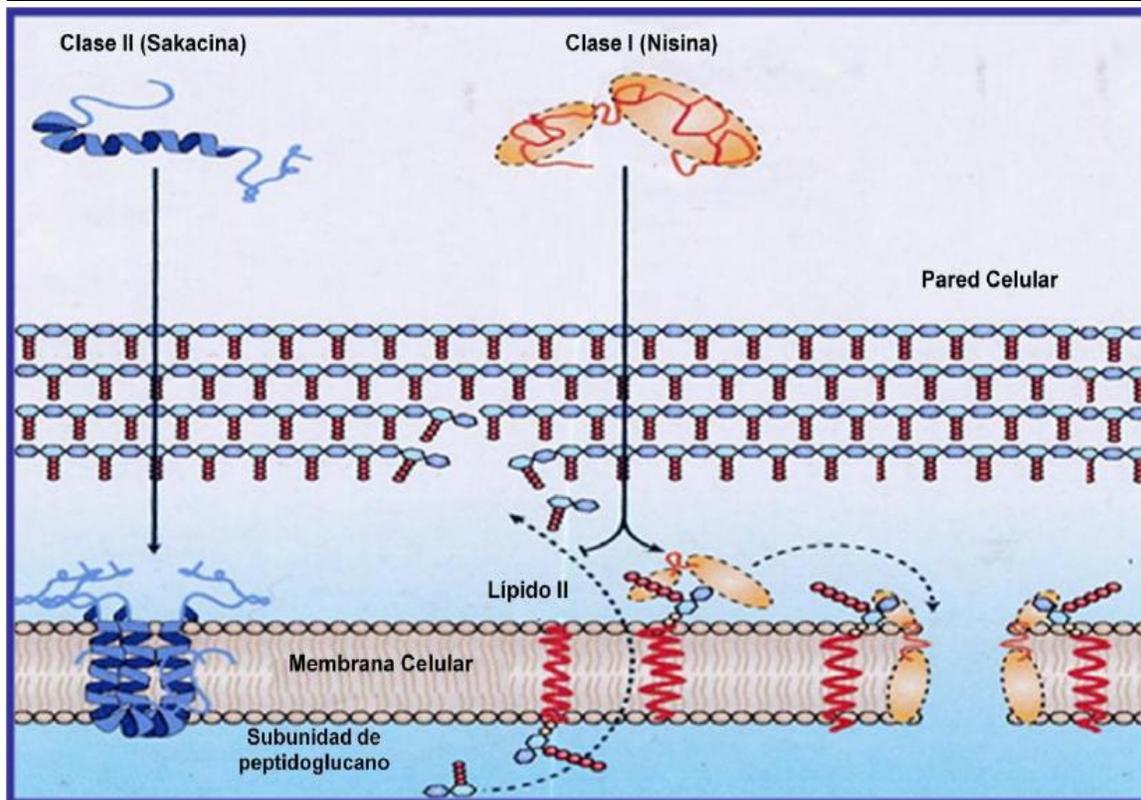


Figura 2. Clasificación y mecanismo de acción de las bacteriocinas. Las bacteriocinas de la clase I pueden unirse al lípido II, que es el principal transportador de unidades de peptidoglicano del citoplasma a la pared celular, afectando la correcta síntesis de esta pared conduciendo a la lisis y muerte celular. En general las bacteriocinas de la clase II tienen una estructura anfifílica lo que les permite insertarse en la membrana de la célula blanco, conduciendo a la despolarización de la membrana y la muerte celular (tomado y modificado de Cotter *et al.*, 2005).

- f) BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances). Son sustancias antibacterianas de naturaleza proteínica, las cuales no están completamente definidas en una clasificación o cumplen sólo con algunos criterios de la definición de bacteriocina. Las BLIS por lo general tienen un espectro más amplio de actividad que las bacteriocinas, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos y levaduras (Atanassova *et al.*, 2003).

Otros compuestos de interés que no son exclusivos de las bacterias ácido lácticas y de las que se tienen reportes de actividad antibacteriana son las peptidoglucano hidrolasas (PGH).

1.2 PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

El peptidoglucano es una estructura rígida compuesta de cadenas lineales de glucano unidas por entrecruzamiento de oligopéptidos que engloban a la célula, que permite preservar la integridad celular al ser partícipe del control de la presión osmótica interna. Está involucrado en los procesos de división celular y es en parte responsable de mantener la forma de la célula. El peptidoglucano de la pared celular bacteriana es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de las células en las condiciones normalmente hostiles en que proliferan las bacterias (Roger *et al.*, 1996; Sitkin *et al.*, 2003). Este polisacárido se conforma de unidades alternadas de ácido-1,6-anhidro-*N*-acetilmurámico (conocido comúnmente como ácido *N*-acetilmurámico, MurNAc) y β -1,4-*N*-acetilglucosamina (conocido como *N*-acetilglucosamina, GlcNAc) (Vollmer y Bertsche U. 2008a). Los aminoácidos tipo diamino: lisina, ácido dibásico meso-diaminopimélico (m-A₂pm), ácido diaminopimélico y ácido diaminobutírico que figuran en la tercera posición de la estructura, son esenciales para el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano (Figura 3). La rigidez de la estructura de peptidoglucano depende del número de entrecruzamientos y de su longitud (Roger *et al.*, 1996).

En las bacterias Gram-positivas, el peptidoglucano forma capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida. Pueden tener

asociados otro tipo de constituyentes, como ácidos teicoicos y lipoteicoicos y/o polisacáridos. Por el contrario, el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada y no contiene ácidos teicoicos, ni lipoteicoicos (Roger *et al.*, 1996; van Heijenoort, 2001).

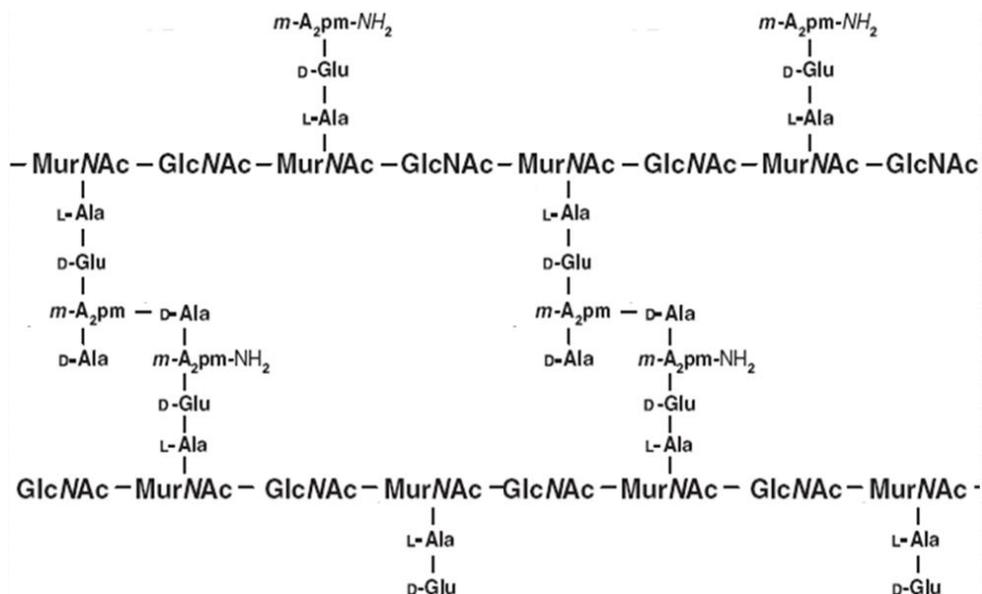


Figura 3. Estructura del peptidoglucano. Pared celular de *B. subtilis* (tomado y modificado de Vollmer *et al.*, 2008b).

La biosíntesis de peptidoglucano es similar, en términos generales, en bacterias Gram-positivas y en Gram-negativas (van Heijenoort, 2001). Inicia en el citosol con la reacción del MurNAc con trifosfato de uridina (UTP) para formar difosfato de uridina-ácido *N*-acetilmurámico (UDP-MurNAc). Posteriormente, se da la adición uno a uno de los aminoácidos al UDP-MurNAc para formar el UDP-MurNAc-pentapéptido y cada paso es catalizado por sintetetas altamente específicas. En la cara interna de la membrana citoplasmática el UDP-MurNAc-pentapéptido se une por un enlace pirofosfato al transportador denominado bactoprenol de la membrana citoplasmática para formar el lípido II y se libera monofosfato de uridina (UMP). El lípido II es translocado a través de la membrana por proteínas. Estas reacciones son catalizadas por proteínas de unión a penicilina (Penicilin-Binding Protein, PBPs) de alta masa molecular o por transglicosilasas monofuncionales (van Heijenoort, 2001; Murray *et al.*, 2006; Olrichs *et al.*, 2011).

Las enzimas involucradas en la degradación de peptidoglicano son las peptidoglicano hidrolasas (PGH), llamadas también autolisinas (Deng *et al.*, 2005). Las PGH hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos del peptidoglicano de la pared celular de bacterias. Dependiendo del tipo de enlace del peptidoglicano que hidrolicen, las PGH se pueden clasificar en: *N*-acetilmuramidasa (Muramidasa), *N*-acetilglucosaminidasas (Glucoamidasa), *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (Amidasa) y Endopeptidasas (Lortal y Chapot-Chartier, 2005) (Figura 4 y Tabla 2). Se ha reportado que algunas bacterias poseen autolisinas con más de un tipo de actividad o diferentes autolisinas con la misma actividad (Østlie *et al.*, 2007).

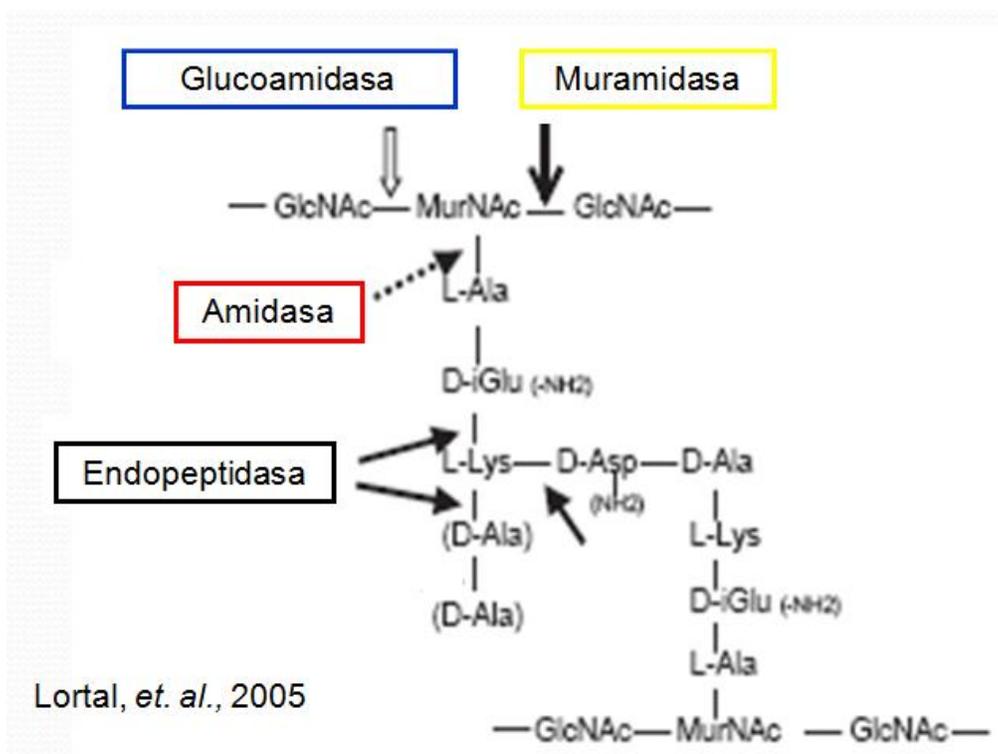


Figura 4. Estructura de la pared celular de bacterias que contiene peptidoglicano. Las flechas indican los diferentes sitios de corte de las PGH: Muramidasa, Glucoamidasa, Amidasa y Endopeptidasas (tomado y modificado de Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Tabla 2. Tipos de peptidoglucano hidrolasas reportadas en bacterias (tomado de Vollmer *et al.*, 2008b).

Tipo	Nombre	Microorganismo
N-acetilmuramidasa	SF muramidasa	<i>Enterococcus hirae</i> ATCC9790
	Pesticina	<i>Yersinia pestis</i>
	Cellosyl	<i>Streptomyces coelicolor</i>
	LytC	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
N-acetilglucosaminidasa	AcmA, AcmB, AcmC, AcmD	<i>Lactococcus lactis</i>
	AtlA	<i>Enterococcus faecalis</i>
	Acd	<i>Clostridium difficile</i>
	LytD, LytG	<i>Bacillus subtilis</i>
	LytB	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Amidasa	AmiA, AmiB, AmiC, AmiD	<i>Escherichia coli</i>
	PlyA	Fago PSA de <i>Bacillus polymyxa</i>
	AmpD	<i>Citrobacter freundii</i>
Endopeptidasa	MepA, MpaA	<i>Escherichia coli</i>
	CwIK, LytH	<i>Bacillus subtilis</i>
	AepA	Fago A500 de <i>Listeria monocytogenes</i>
	CwIS, CwIO, LytE, LytF	<i>Bacillus sphaericus</i>

La actividad de las PGH puede ser regulada por mecanismos tales como el control de expresión genética, de biogénesis de las enzimas, de localización de las enzimas, de acceso al peptidoglucano y alteración química del peptidoglucano (Sugai, 1997). Por ejemplo, en el control por alteraciones químicas se incluyen cambios conformacionales y modificaciones covalentes. La presencia o ausencia de ciertos compuestos químicos que se encuentran en la pared celular tales como ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos, inhiben la actividad de las PGH de muchas especies Gram-positivas (Vollmer *et al.*, 2008b). Estas enzimas están involucradas en un gran número de funciones celulares (Tabla 3), que requiere la pared celular como el crecimiento, división celular (Smith *et al.*, 2000), reproducción y muerte celular, a través de la inserción de nuevos monómeros, remodelación y recambio del peptidoglucano.

Aunque la pared celular es una estructura generalmente rígida, debe permitir su expansión durante la elongación celular y esto supone la hidrólisis de ciertos enlaces para el ensamble del nuevo material con el preexistente mediante nuevas uniones. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en el crecimiento de la pared celular se producen dos tipos de

procesos: la expansión de esa pared y la septación (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Murray *et al.*, 2006).

Tabla 3. Funciones de las peptidoglucano hidrolasas (tomado y modificado de Vollmer *et al.*, 2008b).

Función	Observaciones
Regulación del crecimiento celular de la pared	Remoción del exceso de pentapéptidos en el nuevo peptidoglucano
Ampliación del peptidoglucano	Ruptura de enlaces para permitir la expansión del peptidoglucano durante el crecimiento
Recambio del peptidoglucano	Desarrollo de fragmentos solubles de peptidoglucano durante el crecimiento
Producción de moléculas de señalización	Inducción de la β -lactamasa por productos de recambio del peptidoglucano
Productos del recambio de reciclaje del peptidoglucano	Ruptura de productos de recambio para reutilizarlos en la síntesis del peptidoglucano
Separación celular durante y antes de la división celular	Ruptura de la pared celular durante la división celular en bacterias Gram-negativas Ruptura del entrecruzamiento después de la división en bacterias Gram-positivas
Lisis de células	Secreción de peptidoglucano hidrolasas para degradar el peptidoglucano de células blanco
Formación de biopelículas	Las peptidoglucano hidrolasas son necesarias para la construcción inicial de células con superficies hidrofóbicas
Interacción patógeno-hospedero	Desarrollo de fragmentos de peptidoglucano que son reconocidos por el hospedero

El crecimiento y septación del peptidoglucano se basan en la actividad controlada y localizada en puntos determinados de una gama de autolisinas, especialmente las dotadas de actividad transglucosidasa y/o transpeptidasa, en tanto que las endopeptidasas y carboxipeptidasas son las responsables de la hidrólisis de los entrecruzamientos durante la elongación de la red de peptidoglucano (Lortal *et al.*, 1997; Navarre y Schneewind, 1999).

Por ejemplo, en la división celular de *S. aureus* se requiere la hidrólisis del peptidoglucano para sintetizar una nueva pared celular y permitir la separación de las células hijas, lo cual depende de la enzima Atl, que es la principal autolisina de *S. aureus*. Mutantes de *atl* no presentan autólisis y/o presentan defectos en la división celular tales como conglomerados de la pared celular anormales de una incompleta separación celular (Oshida *et al.*, 1995; Schlag *et al.*, 2010; Frankel *et al.*, 2011).

Por otra parte existen peptidoglucano hidrolasas que no son propias de bacterias, sino de bacteriófagos las cuales son denominadas endolisinas. Las endolisinas son sintetizadas en la fase de la multiplicación viral porque permiten a los virus escapar de las bacterias. Su acción está regulada fuertemente por holinas, por retención en la membrana y por la conversión de su forma inactiva a activa (Loessner, 2005).

Con algunas excepciones, las endolisinas no tienen péptido señal, así que no pueden ser translocadas a través de la membrana citoplasmática para actuar sobre el peptidoglucano, por lo que dependen de las holinas (Wang *et al.*, 2000). Las holinas son proteínas hidrofóbicas pequeñas que son codificadas por el fago e insertadas dentro de la membrana citoplasmática (Loessner, 2005). Las peptidoglucano hidrolasas de bacteriófagos y bacterias comparten algunas características estructurales.

1.2.1 Características estructurales

Las PGH contienen uno o más dominios conservados tanto para el sitio catalítico como para los dominios no asociados al sitio catalítico *per se*. Dichos dominios probablemente ayudan a ubicar a estas enzimas en regiones específicas de la pared celular de bacterias o permiten su asociación con cofactores bacterianos o quizá con proteínas hospederas. Ejemplos de estos dominios no catalíticos comúnmente encontrados en PGH son los dominios que se asocian con la unión al ácido lipoteicoico, los que interactúan con carbohidratos y/o regiones poliprolina, entre otros (Humann y Lenz, 2009).

Las endolisinas de las bacterias Gram-positivas poseen un módulo estructural bien definido con dominios funcionales muy claros, para el dominio catalítico que hidroliza el

peptidoglucano en el amino terminal y para el sitio de unión que reconoce la pared celular en el carboxilo terminal (McGrawth y Van Sinderen, 2007; Callewaert *et al.*, 2011).

Los dominios no catalíticos conservados en las PGH son comúnmente denominados CBDs (Cell-wall Binding Domains), al menos siete tipos diferentes se encuentran reportados en la literatura, CHAP (Cystein and Histidine dependent Amidase/Peptidase), dominio GW para la unión no covalente al ácido lipoteicoico, dominio SH3, dominio PlyPSA, dominio FtsN, dominio de unión a colina y dominio LysM (Vollmer *et al.*, 2008b).

Dentro de los más importantes se encuentran los dominios CHAP que están relacionados con la actividad amidasa/peptidasa dependientes de histidina y cisteína, donde la cisteína tiene un rol importante en el mecanismo de acción de la amidasa (Zou y Hou, 2010). Fueron identificados primero en la autolisina LytA de *S. aureus* pero también se encuentran presentes en una glutationilespermidina amidasa de *E. coli*, una lisina putativa de *Streptococcus pyogenes* y algunas enzimas líticas del bacteriófago B30 de *Streptococcus agalactiae* (Bateman y Rawlings, 2003).

Los dominios CHAP se encuentran frecuentemente asociados con otros dominios catalíticos de las PGH dentro de una sola proteína, por lo que los dominios CHAP pueden permitir que una misma enzima tenga múltiples especificidades catalíticas, además de actuar de manera cooperativa en la hidrólisis de los sustratos. Esto nos lleva a concluir que existe una razón funcional muy importante para que múltiples amidasas coexistan dentro de una sola cadena polipeptídica, quizá la multifuncionalidad de las amidasas permite que actúen de forma cooperativa para proveer una estrecha regulación de los complejos eventos en el metabolismo de la pared celular de bacterias (Bateman y Rawlings, 2003).

E. coli tiene cinco diferentes amidasas las cuales tienen diferente ubicación celular: cuatro de ellas AmiA, AmiB, AmiC y AmiD se encuentran solubles en el periplasma y AmpD está localizada en el citoplasma. La redundancia y diversidad de estas amidasas son un reflejo de la abundancia de las mismas descritas por la literatura y las predichas por el análisis bioinformático de los genomas. Las amidasas cuentan con un módulo catalítico y

otro módulo funcional (variable e independiente) que es responsable de la unión de estas enzimas a la pared celular (Vollmer *et al.*, 2008b).

En *Lactococcus lactis* MG1363 la autolisina AcmA es la responsable de la lisis en la fase estacionaria, además de estar involucrada en la división celular. La enzima consta de dos dominios, un dominio de amidasa hacia la región amino terminal, mientras que en el carboxilo terminal tiene dominios específicos de unión al peptidoglucano de *L. lactis* y otras bacterias Gram-positivas (Steen *et al.*, 2005).

Durante la división celular en *E. coli*, la ruptura de la red del peptidoglucano septal es mediada por amidasas periplásmicas (AmiA, AmiB y AmiC), las cuales son estrictamente reguladas para prevenir que formen lesiones innecesarias en la pared celular y provocar así la lisis celular. Por lo que requieren de activadores específicos con dominios LytM, tales como EnvC y NlpD. EnvC activa específicamente a las amidasas AmiA y AmiB, mientras que NlpD activa a AmiC (Uehara *et al.*, 2010).

Otro de los factores de regulación, en la división celular en *E. coli*, es un complejo similar a un transportador ABC denominado FtsEX. Este se encuentra integrado por FtsE y FtsX, que corresponden respectivamente a los componentes NBD (Nucleotide-Binding Domain) y TMD (Transmembranal Domain), característicos de los transportadores ABC (Yang *et al.*, 2011).

Yang *et al.* (2011) demostraron que el componente FtsX del complejo FtsEX, regula la actividad amidasa de AmiA y AmiB, por EnvC en el periplasma a través de cambios conformacionales inducidos por la hidrólisis de ATP, que a su vez es mediada por el componente FtsE en el lado opuesto de la membrana (Figura 5). Este hecho sugiere alguna interacción o relación fisiológica entre las peptidoglucano hidrolasas y estructuras homólogas a los transportadores ABC.

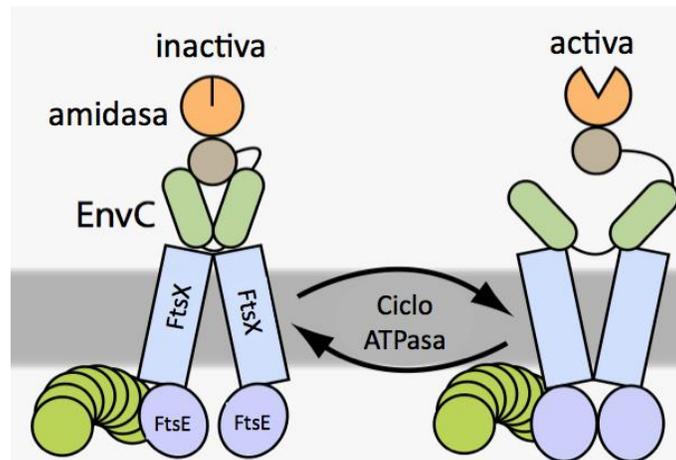


Figura 5. Modelo para la función del complejo FtsEX en la regulación de la actividad peptidoglucano hidrolasa durante la división celular de *E. coli* (tomado y modificado de Yang *et al.*, 2011).

1.3 TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette) son proteínas integrales de membrana que usan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar substratos a través de la membrana. Los transportadores ABC están involucrados en diversos procesos celulares tales como la división celular, regulación de la presión osmótica, importación de nutrientes, resistencia a antibióticos y citotoxinas, patogénesis y esporulación (Young y Holland, 1999; Jones *et al.*, 2009). Están ampliamente distribuidos tanto en eucariontes como en procariontes (Licht y Schneider, 2011).

Se componen típicamente de dos dominios transmembranales hidrofóbicos (TMDs) que se encuentran embebidos en la membrana y un par de dominios de unión a nucleótidos (NBDs) solubles en agua que están localizados en el citoplasma (Rees *et al.*, 2009). Basados en la comparación de secuencias, se pueden clasificar en tres clases: clase I comprende a transportadores con TMDs y NBDs fusionados (exportadores); clase II incluye a los no transportadores ABCs carentes de dominios TMDs y clase III incluyen principalmente transportadores con NBDs y TMDs formados por cadenas polipeptídicas separadas (importadores), los cuales están ausentes en eucariontes (Licht y Schneider, 2011).

Los substratos transportados, también denominados *allocrite* (derivado del griego para hacer referencia a los compuestos transportados), por estos sistemas son diversos:

azúcares, aminoácidos, péptidos, vitaminas, iones, antibióticos, etc. (Tabla 4) (Young y Holland, 1999; Higgins, 2001). La especificidad por el sustrato está relacionada a los TMDs, lo cual implica que no se encuentren secuencias homólogas en dichos dominios por la amplia variedad de sustratos que reconocen los transportadores ABC. Por el contrario los NBDs tienen motivos más conservados porque la estructura que permite unirse al ATP e hidrolizarlo es muy similar entre los transportadores (Licht y Schneider, 2011).

Tabla 4. Transportadores ABC en procariontes (tomado y modificado de Young y Holland, 1999; Licht y Schneider, 2011).

Transportador	Sustrato transportado (Allocriete)	Relación fisiológica	Organismo
HlyBDToIC	hemolisina	Factor de virulencia	<i>Escherichia coli</i>
LmrA	múltiples antibióticos	Modo de resistencia	<i>Lactococcus lactis</i>
DrrAB	doxorubicina, daunorubicina	Modo de resistencia	<i>Streptomyces peuceetius</i>
NisFEG	Nisina	Inmunidad Autoprotección	<i>Lactococcus lactis</i>
BsrABC	bacitracina	Péptidos antibióticos	<i>Bacillus licheniformis</i>
TagHG	poliglicerolfosfato, poliglucosagalactosamina-fosfato	Ácidos teicoicos	<i>Bacillus subtilis</i>
BexABC	poliribosilribitol	Cápsula de polisacáridos	<i>Haemophilus influenzae</i>
EcsAB	exoamilasa	Exoenzimas	<i>Bacillus subtilis</i>
PrtB	proteasa	Enzimas hidrolíticas	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
MsbA	precursor lípido A	Lipopolisacáridos	<i>Escherichia coli</i>

El mecanismo de los transportadores ABC se basa de forma general en que los NBDs interconvierten entre una conformación abierta y una conformación cerrada en la superficie de la membrana durante un ciclo de hidrólisis del ATP (Figura 6). Estos cambios conformacionales, a su vez, se transmiten a los TMDs para promover transiciones entre las conformaciones que miran al exterior y al interior de la cavidad central formada por los TMDs (Jones *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2011).

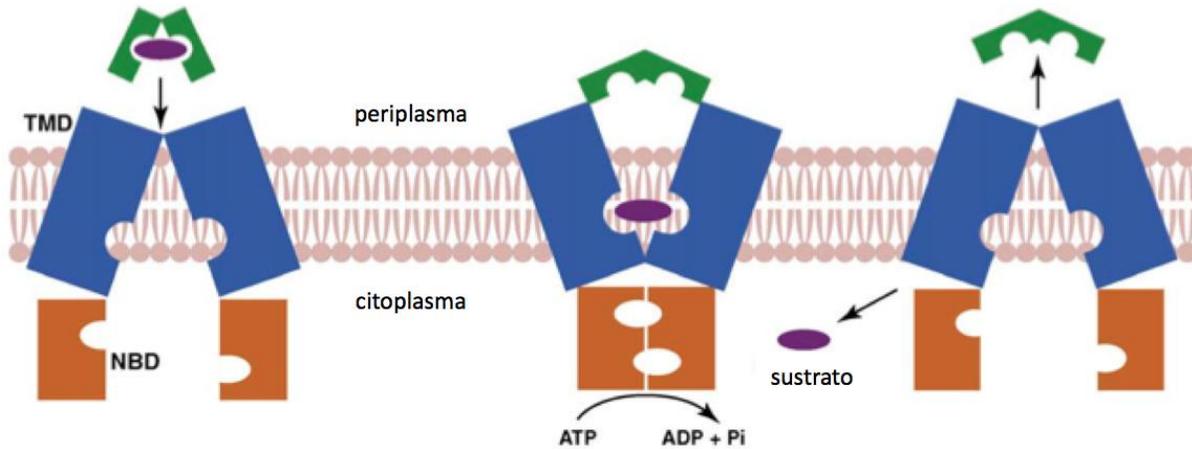


Figura 6. Esquema general de los transportadores ABC. Se observan los dominios característicos transmembranales (TMD) y dominios de unión a nucleótidos (NBD), así como los cambios conformacionales en función de la hidrólisis del ATP, los cuales permiten el traslado del sustrato del periplasma al citoplasma (tomado y modificado de Jones *et al.*, 2009).

1.3.1 Características estructurales y dominios accesorios

Los NBDs están presentes en los transportadores ABC como dímeros, cada monómero de este dímero tiene dos subdominios constitutivos: un núcleo catalítico, el cual cuenta con un motivo conservado Walker A o P-loop (GxxGxGKT/S), un motivo Walker B (hhhhD, donde h es un residuo hidrofóbico), un Q-loop y un motivo H o región “switch”; y un subdominio α -helicoidal estructuralmente más diverso, el cual cuenta con un motivo LSGGQxQR altamente conservado en los transportadores ABC (Figura 7) (Davidson y Chen, 2004; Holland y Holland, 2005; Jones *et al.*, 2009; Rees *et al.*, 2009; Licht y Schneider, 2011).

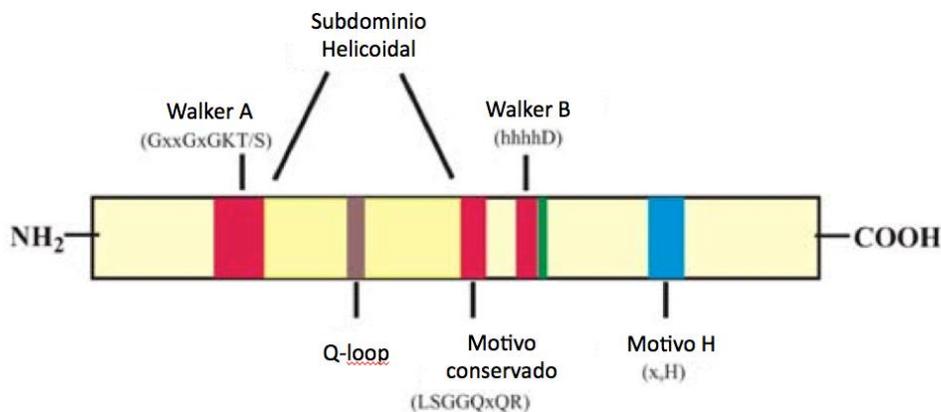


Figura 7. Motivos conservados de los NBDs. Representación lineal con los principales subdominios funcionales y las secuencias de aminoácidos de los principales motivos conservados (tomado y modificado de Licht y Schneider, 2011).

Cada transportador ABC tiene dos TMDs que pueden ser homodímeros o heterodímeros, de acuerdo al transportador. Son estructuralmente heterogéneos, al no tener motivos tan claramente conservados como en el caso de los NBDs. Sin embargo, pueden clasificarse en función de la cantidad y distribución de hélices transmembranales en tres tipos: Tipo I importador ABC, tipo II importador ABC y exportadores ABC. Los importadores ABC tipo I y tipo II se diferencian en la cantidad de hélices transmembranales que los componen, para el tipo I se tiene una agrupación mínima de cinco hélices transmembranales, en tanto que el tipo II presenta una agrupación de 20. Los exportadores ABC contienen una agrupación de 12 hélices, además de contar con *loops* intracelulares largos que extienden a las hélices transmembranales más allá de la superficie de membrana y hacia el citoplasma (Jones *et al.*, 2009; Rees *et al.*, 2009).

Las proteínas de unión a sustrato (Substrate-Binding Protein, SBPs) son componentes de los importadores ABC, que residen en el espacio periplásmico, a veces fusionados a los TMDs, en el caso de las bacterias Gram-negativas. En bacterias Gram-positivas y archaea son expuestas en la superficie celular y adheridas a la membrana citoplasmática ya sea por un lípido de anclaje o fusionadas a los TMDs más frecuentemente que bacterias Gram-negativas (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Las SBPs de los importadores ABC en bacterias, han demostrado actuar como chaperonas y en otros casos como receptores de quimiotaxis (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Además existen elementos adicionales que pueden estar fusionados a los TMDs o NBDs y tener funciones regulatorias sobre el transportador ABC, denominados dominios accesorios (Rees *et al.*, 2009). Los dominios accesorios pueden ser identificados como dominios externos, internos o segmentos transmembranales adicionales unidos a los TMDs o extensiones de los NBDs. En muchos casos se ha demostrado que estos dominios accesorios pueden ser eliminados sin afectar la función de translocación. Se clasifican de acuerdo a su localización (extrínseca o intrínseca a la membrana) y su función (regulatoria o catalítica) en dominios extracitoplásmicos, embebidos en membrana, regulatorios citosólicos y catalíticos. Estos últimos son usados principalmente para la exportación de péptidos estimulados por competencia, bacteriocinas, hemolisinas y material no proteico. En este caso, el

transportador ABC tiene una función dual, exportar los polipéptidos y remover los péptidos señal (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006).

Los transportadores ABC tienen asociados dominios que les permiten participar en funciones que requieren actividad lítica, tal como la actividad peptidasa en la remoción de péptidos señal (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006), en otros casos se han reportado como partícipes en la regulación de actividad amidasa durante la división celular de *E. coli* (Yang *et al.*, 2011) o en la regulación de la peptidoglucano hidrolasa PcsB de *S. pneumoniae* durante la división celular (Sham *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se tienen reportes de que las estructuras tipo transportador ABC tengan propiamente dominios con actividad lítica.

1.4 APLICACIONES DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

La globalización del mercado de alimentos, los nuevos procesos de manufactura en alimentos, el crecimiento en la demanda de alimentos menos procesados (por ejemplo, productos “orgánicos”) y el aumento en la venta de alimentos listos para comer requieren una más amplia y compleja cadena de producción lo cual incrementa el riesgo de contaminación microbiológica (García *et al.*, 2010b). En la búsqueda de alternativas seguras e inocuas que evitan el uso de aditivos químicos para la conservación de alimentos se han desarrollado nuevos procesos, como la bioconservación, que se refiere al empleo de herramientas biológicas (microorganismos y/o sus metabolitos) para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y/o responsables de la descomposición del alimento, aumentar la vida de anaquel y mejorar las características sensoriales del alimento o producto (Caplice y Fitzgerald, 1999).

A su vez la resistencia a antibióticos se ha extendido entre las bacterias, por transmisión horizontal de genes, a partir de un uso indiscriminado de los mismos. Este fenómeno ha complicado el control de las enfermedades producidas por bacterias, además de que la producción de nuevos antibióticos ha caído drásticamente en los últimos años provocando que la causa de mortandad por estas enfermedades aumente a nivel mundial (García *et al.*, 2010b; Moellering, 2011). Ha sido necesario avanzar en la investigación,

desarrollo y diversificación de alternativas para el control de bacterias patógenas a nivel mundial (Donovan *et al.*, 2006; Fischetti, 2010).

Los bacteriófagos líticos, es decir, fagos con enzimas tipo peptidoglucano hidrolasas, son una opción atractiva en el control de bacterias patógenas porque afectan específicamente a un tipo de bacterias, son efectivos contra bacterias resistentes a antibióticos y la resistencia que las bacterias pudieran generar hacia los fagos no es inconveniente porque su tasa de mutación es mucho más alta que la de las bacterias (Parisien *et al.*, 2008).

Sin embargo, el uso sistemático de una terapia con bacteriófagos en humanos tiene varios inconvenientes como la contaminación de la fase de preparación con endotoxinas, la producción de toxinas por algunos fagos, la falta de datos farmacocinéticos y el estricto control en su aplicación, provocando que la terapia se complique y en algunos casos sea imposible. Una alternativa interesante para resolver este problema es usar las enzimas de los fagos que degradan la pared celular bacteriana (Manoharadas *et al.*, 2009; Moellering, 2011).

Estas peptidoglucano hidrolasas tienen una rápida y potente actividad *in vivo* e *in vitro* especialmente contra bacterias Gram-positivas, espectro antibacteriano estrecho, poca probabilidad de que se genere resistencia contra ellas y se pueden modificar por ingeniería genética de forma relativamente fácil, obteniendo enzimas recombinantes con un gran potencial antibacteriano. Por lo que se ha propuesto denominarlas con el término de enzibióticos (Borysowski *et al.*, 2006; Donovan *et al.*, 2006; Parisien *et al.*, 2008).

Dentro de las aplicaciones de los enzibióticos se encuentran la eliminación de colonización bacteriana de membranas mucosas, el tratamiento en infecciones provocadas por bacterias, el biocontrol de bacterias en alimentos y la protección de plantas contra bacterias fitopatógenas (Tabla 5).

Tabla 5. Aplicaciones de peptidoglucano hidrolasas de bacteriófagos (enzibióticos)

Nombre	Uso o potencial aplicación	Referencia
Endolisina de fago C1 de <i>Streptococcus</i> grupo C	Descolonización de <i>Streptococcus</i>	Borysowski <i>et al.</i> , 2006
Amidasa Pal de fago Dp-1	Descolonización nasofaríngea de <i>S. pneumoniae</i>	Loeffler <i>et al.</i> , 2001
Lisozima Cpl-1	Descolonización de <i>S. pneumoniae</i>	Loeffler <i>et al.</i> , 2003
PlyGBS	Descolonización de <i>S. agalactiae</i> en recién nacidos	Cheng <i>et al.</i> , 2005
Ply3626 amidasa	Contra <i>Clostridium perfringens</i> en alimentos	Zimmer <i>et al.</i> , 2002
PlyG	Inhibe <i>Bacillus anthracis</i>	Fischetti V., 2008
IMM-001	Afecta factor de colonización de <i>E. coli</i> enterotoxigénica	Mahony <i>et al.</i> , 2011
LysH5	Inhibe <i>S. aureus</i> en leche pasteurizada	García <i>et al.</i> , 2010a
CD27L	Inhibe diversas cepas de <i>Clostridium difficile</i>	Fenton <i>et al.</i> , 2010
PlyV12	Actividad lítica contra <i>Enterococcus faecalis</i>	Yoong <i>et al.</i> , 2004
Ply700	Actividad lítica contra estreptococos que causan mastitis	Obeso <i>et al.</i> , 2008
Ply511	Control de <i>L. monocytogenes</i> en quesos madurados	Gaeng <i>et al.</i> , 2000

La lisostafina es un ejemplo de peptidoglucano hidrolasa producida y distribuida comercialmente como antibacteriano, al tener una actividad bactericida muy alta. Es una enzima estafilocócica secretada por *Staphylococcus simulans*, clasificada como glicilglicina endopeptidasa dependiente de zinc, que tiene una alta especificidad sobre la pared celular de *S. aureus*, ya que rompe el enlace pentaglicina característico del peptidoglucano en este microorganismo (Fedorov *et al.*, 2003; Moellering, 2011).

Otro ejemplo es la lisozima, que es una muramidasa de la cual se tienen tres diferentes tipos, los cuales muestran pronunciadas similitudes en su arreglo tridimensional, pese a no tener mucha relación a nivel de estructura primaria. La HEWL (Hen Egg White Lysozyme) es el tipo de lisozima más extensamente estudiado y de los pocos agentes antibacterianos aprobado como bioconservador en Estados Unidos y otros países (Callewaert *et al.*, 2011).

II. ANTECEDENTES

En Italia se reportó actividad intracelular de peptidoglucano hidrolasas en cepas de *Pediococcus acidilactici*, la cual se detectó mediante zimografía usando células de *M. lysodeikticus* como microorganismo indicador. La banda más intensa de actividad lítica se observó a 116 kDa y adicionalmente se observaron otras bandas entre 45 y 110 kDa de actividad lítica (Mora *et al.*, 2003).

En el grupo de trabajo, Llorente-Bousquets *et al.* (2008) reportaron actividad de peptidoglucano hidrolasa extracelular en cultivos de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 en medio MRS (Man Rogosa Sharpe). Posteriormente, Llorente-Bousquets (2008) demostró que dichos sobrenadantes tenían actividad antibacteriana de amplio espectro, lo cual podría explicar el efecto de bioconservación de esta cepa en productos cárnicos. Velasco-Pérez (2010) detectó la mayor actividad de peptidoglucano hidrolasa contra el microorganismo indicador *S. aureus*, en proteínas adheridas a membrana producidas durante la fase logarítmica de crecimiento de *P. acidilactici* ATCC 8042 (Figura 8). Tras un proceso de purificación parcial, la preparación mostró actividad lítica sobre el peptidoglucano de *M. lysodeikticus*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. acidilactici*.

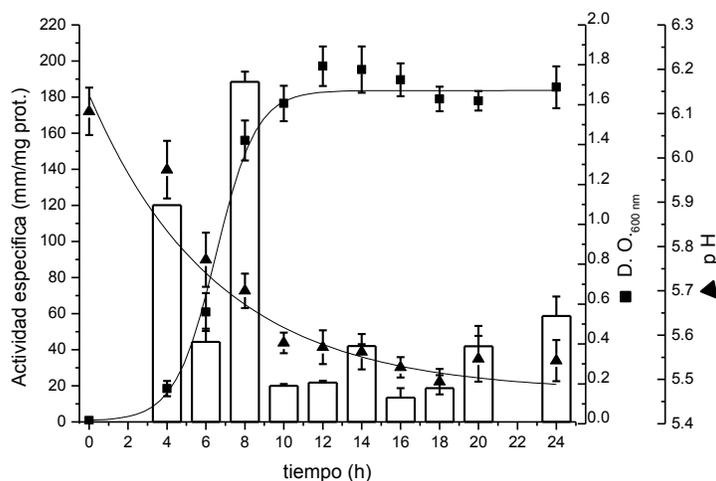


Figura 8. Actividad de peptidoglucano hidrolasa en función de la lisis de *S. aureus*, de la fracción de proteínas adheridas a membrana de la cepa de *P. acidilactici* en su fase logarítmica de crecimiento (tomado de Velasco-Pérez, 2010).

Posteriormente, García-Cano *et al.* (2011) identificaron en esta preparación dos proteínas con actividad lítica, que copurifican y que constituyen el 94.5% de las proteínas presentes. Sus masas moleculares fueron de 99 kDa y 110 kDa, analizadas con el documentador de geles y el software Quantity One (BioRad). Se identificaron por LC/ESI-MS/MS (Cromatografía Líquida Electropray acoplada a Espectroscopía de Masas) en la Facultad de Medicina de la UNAM. Los péptidos encontrados corresponden a secuencias de proteínas putativas identificadas a partir del análisis del genoma de *P. acidilactici* 7_4 (Figura 9).

A	1	MFKSGKKWAF	ASIATASLGL	VALNTNAEKA	HADSDAQANT	NSASQLDQQT	
	51	KTAPVNEKQV	TLAKPATVKA	SSAAVTAQSA	APAPSAQAQSA	AKVNADSTAK	
	101	ADQHSAAAKV	GTKATTSSAV	KPAKEAASAN	AVKAAPASSA	AKKVSTSVAS	
	151	SAAPSSAASK	TVTSAAVKDS	AAKEAVSSAA	NVKSSSAAAK	TSVNSSAVSE	
	201	AAKDKAKAEK	TAEKKTDNSS	KDYTIDNTYR	LADNEGSDQK	TNNKIIVAHA	
	251	VGQYSSARDV	AIYEKREWDS	SETYVQYIVG	DGGRVYAVGE	EGYVAVGAGK	
	301	WANENAPVQV	ELAQTYSDSQ	FKKDYQTYVN	LLRDSAKKWN	IPPTLDSDEY	
	351	TGIKSHVWVT	EHVWGNHVPD	YGYLGTHGIT	KEQFAHDLAY	GFDNDAANDN	
	401	QNNNQNDNHQ	NDNQNNQNNN	HQNDSSNNHG	NQNNQSYHVG	DKVTIKNSAS	
	451	HWATGQSIYN	GVRGHTYKII	QTNGHKLLLD	QVISWINDGD	VYKAGSNSGS	
	501	SNNHNNHTT	NNADIKVGTV	VTINNNASHW	ATGQSIYSGV	KGKSYKVIQT	
	551	NGNRLLLDKV	ISWINKGDVH	VPGSNSNNNN	SGNQNHNNGN	NHNNNGNTES	
	601	IHVGSKVTIN	NNAKRWATGQ	NIYSGVKGKT	YTVIQMNGSR	LLLDKVISWI	
	651	NKGDVHLPGS	NGSQNNNNNN	NNHANNDGT	IRVGTNVTIK	PSAKRWATGQ	
	701	NIYYGVKGGT	YKVIQMNGNR	LLLDKVISWI	NKGDVYVPGS	SNNNNSNSNN	
	751	NHNNNGSNYH	FTNQNWTAQA	TNFVNSIASD	VMNVCQNNHL	YASVAMAQAV	
	801	VESAYGASTL	AQEAHNLFGI	KADSTWHGAT	YTKNTQEVIN	GRVVTISAAF	
	851	RKYDSFKDSI	ADYAKKLESR	PQYANAFSNH	AHNYVESVKA	IKAGGYATAP	
	901	TYVSSIVNCI	NNYGFYKLDG	LNSAISL			
					No. de acceso		
					gi 2702900692/NCBI		
B	1	MVRKEWKFIR	NNKLILISVL	AIIFIPFLYS	IFFLKSVDWP	YGDTKNLPVA	
	51	VVNLDPVKY	QGQRLAVGDE	MVDNLKHHNQ	LGWHFVSARK	AKEGMKDKKY	
	101	YTVVTIPKDF	SANAATVTDK	NPKKMQLKYS	TNASLNYIGK	VISDVGTEKL	
	151	NSEVREQVTK	SYATAMFDQV	KTAGKGFQQA	SDGAKKLDKG	AVQLNDGTKT	
	201	YTAGVQLHD	GIATMAVSVK	PLQAGVAQLA	DGSSQLTNGL	DQLNGKTGAL	
	251	SSGVSQLANG	SGQVTTGAVA	LSKGLNELQQ	KSGALVTGVS	QLNNGALQLK	
	301	VKVPQYVNGV	YQLNDGIQEL	NAKTGQLVGG	IKQLSSGAGA	LSAGVKQYTD	
	351	GVSAGAGQLQ	GGVAKLANDT	KDMPSSINAL	HNGIADIASK	SKQLADANGK	
	401	ISTGLGQVAD	QVSANDISKQ	AAALKQQMAS	IQTQLVALNK	ATAGQTNNGN	
	451	AAQSINNQLS	EIKSEVGSIA	NSSKTTTSTS	GGVSQATINS	KIDGAGLSAE	
	501	DAAKAKSALA	GVANGSQNKT	TSQTVDTNKI	ASIQKKITDV	QGQVTKLNDL	
	551	ANKQAEINKQ	VTSLTASFQK	LAAGANELTG	NSDDMKQLAA	TLKKLAAGSQ	
	601	EVTTNLQALS	SGSNTVAGKV	GEFAGSASEL	TDGVAQLDSG	AKSLASQTNK	
	651	NSKDVKKLVS	GSQELSSSLA	MLDKQTPTLQ	SKIGQLAAGS	NQISAGTGAL	
	701	AGGINQLSNG	ISAASSQMPD	LVSGVSLLAN	GGNQLAAGSS	QVTGGGLNTLN	
	751	GQVPALVSGV	AQLDNGGHQL	NTGIQTLNNS	TGTLINGVNG	LNTGAAELDA	
	801	NSGALLDATK	QISDNGGELS	SKLADGAKQV	NSVPLTDKTA	NMFAAPTCLK	
	851	HTNYSYVPNY	GHALAPYVLS	LALYVGAIIV	NFAYPIRKVS	ERGGTPTQWF	
	901	LSKVSQVTVV	ALGMALVETT	IMMIAIHVD	HVGQFYMTAI	MISLASYMYIV	
	951	MFLSMAFDNP	GRFVAMILLM	LQLGGSGGTF	PMEVTNHFYN	VIHFPLPTY	
	1001	SILSFRQAIT	SGLGDGTFEQ	AMGALLLFAV	IALLLWFSM	NQLQKHHLEN	
	1051	KSQLDNDNQL	QEVER				
					No. de acceso		
					gi 270289973/NCBI		

Figura 9. Secuencia de aminoácidos de las proteínas de 99 kDa (A) y 110 kDa (B) de *P. acidilactici* ATCC 8042 y su número de acceso acorde con las bases de datos según el algoritmo BLAST. En negritas se indican los péptidos identificados por LC/ESI-MS/MS

El análisis de las secuencias indica que los péptidos obtenidos de la proteína de 99 kDa tienen una cobertura del 45% del total de la secuencia y posee un 100% de identidad con una *N*-acetilmuramidasa de la secuencia genómica de *P. acidilactici* 7_4. Los péptidos obtenidos de la proteína de 110 kDa presentan un 47% de cobertura del total de la secuencia y tiene 100% de identidad con una proteína putativa de función desconocida y con una región conservada homóloga a un transportador ABC de la secuencia genómica de *P. acidilactici* 7_4.

La preparación donde copurificaron ambas proteínas (99 y 110 kDa) fue capaz de disminuir el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli* y a la propia cepa productora de *P. acidilactici*, al adicionarse en la fase logarítmica de crecimiento de estas bacterias. Además, inhibió el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Tabla 6) (García-Cano *et al.*, 2011).

Tabla 6. Espectro antibacteriano reportado en función de halos de inhibición (medidos en mm) y concentración de proteína (tomado y modificado de García-Cano *et al.*, 2011)

Microorganismo	Actividad (mm/mg proteína)
Gram-positivas	
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	206.4
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	127.2
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	188.9
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	180.2
<i>Enterococcus faecium</i> QB	99.4
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	88.9
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	77.8
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	89.6
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	79.2
Gram-negativas	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	200.6
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	76.6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0

Posteriormente, en nuestro grupo de trabajo, Valenzuela-Rosas (2012) intentó separar a las proteínas de 99 y 110 kDa reportadas por García-Cano *et al.* (2011) mediante métodos cromatográficos. No se logró la separación de estas proteínas, por lo

que se caracterizó la preparación enzimática parcialmente pura, que incluía a las proteínas de 99 y 110 kDa. Ésta presentó la máxima actividad de peptidoglucano hidrolasa a los 37 °C. Fue estable en un intervalo de pH de 6-9, obteniendo una máxima actividad a pH 4. La actividad lítica de la preparación parcialmente pura se inhibió por concentraciones de EDTA 1 y 10 mM. El inhibidor PMSF no tuvo ningún efecto sobre su actividad, lo que sugiere que la enzima responsable de la actividad no es una serin-proteasa. Finalmente, se demostró un aumento de actividad lítica al adicionar Mg^{2+} en una concentración 10 mM y una inactivación por Na^+ en concentraciones 1 y 10 mM (Valenzuela-Rosas, 2012).

Al no lograr separar estas proteínas con actividad lítica por métodos cromatográficos se propone como alternativa para estudiar las dos proteínas de manera independiente, el clonar y expresar cada una, tanto la de 99 kDa como la de 110 kDa. Esto permitirá determinar si ambas proteínas presentan algún tipo de efecto sinérgico o complementario en su actividad lítica, si cada una de forma independiente tiene un espectro antibacteriano similar al que se reporta cuando se aplican como preparación parcialmente pura, así como, caracterizar la actividad lítica sobre peptidoglucano de cada una y explicar dicha actividad lítica en función de las regiones presentadas en su secuencia de aminoácidos, además de otras posibilidades de análisis que ofrece el contar con los genes aislados y las proteínas recombinantes.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Las dos proteínas (99 kDa y 110 kDa) que copurifican, tendrán actividad lítica de forma independiente?

Para responder esta pregunta se propuso clonaras y expresarlas independientemente. Una vez clonadas y expresadas se deben realizar pruebas para detección de su actividad lítica. De estas pruebas podemos esperar los siguientes panoramas con sus respectivas implicaciones:

1. Sólo la proteína de 99 kDa tiene actividad lítica. Es un resultado esperado, porque la proteína de 99 kDa se encuentra reportada con un dominio de *N*-acetilmuramidasa, sin embargo, quedaría por explicar ¿Por qué entonces se observa una banda de actividad en zimogramas con un tamaño aproximado de 110 kDa?
2. Ambas proteínas, tanto la de 99 kDa como la de 110 kDa tienen actividad lítica de forma independiente. Esto conduciría la investigación de: ¿Por qué la proteína de 110 kDa que posee una región que presenta homología a un transportador ABC tiene actividad lítica?
3. Ninguna de las proteínas presenta actividad lítica de forma independiente. La hipótesis en este caso tendría que dirigirse a resolver el tipo de efecto o interacción que presentan ambas proteínas al copurificar y demostrar la influencia de la proteína de 110 kDa (descrita con una región de transportador ABC) sobre la actividad de la proteína de 99 kDa que se reporta con un dominio de *N*-acetilmuramidasa.

Por lo que la hipótesis es: Si la proteína de 110 kDa al copurificar con la proteína de 99 kDa muestra actividad lítica contra peptidoglucano, al ser clonada y expresada de forma independiente tendrá actividad lítica por sí misma.

IV.OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad lítica sobre el peptidoglucano de *M. lysodeikticus* de la proteína de 110 kDa, producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, al ser clonada y expresada en *E. coli* BL21.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Clonar y expresar la proteína de 110 kDa en *E. coli* BL21.

Determinar la actividad lítica sobre el peptidoglucano de *M. lysodeikticus* y de *S. aureus* de la proteína recombinante a través de zimogramas.

Comparar los resultados obtenidos de la actividad lítica sobre peptidoglucano de *M. lysodeikticus* determinada por zimogramas contra los que demostró la proteína de 99 kDa clonada y expresada en *E. coli*.

V. METODOLOGÍA

La estrategia experimental completa en función de los objetivos particulares se muestra en la Figura 10.

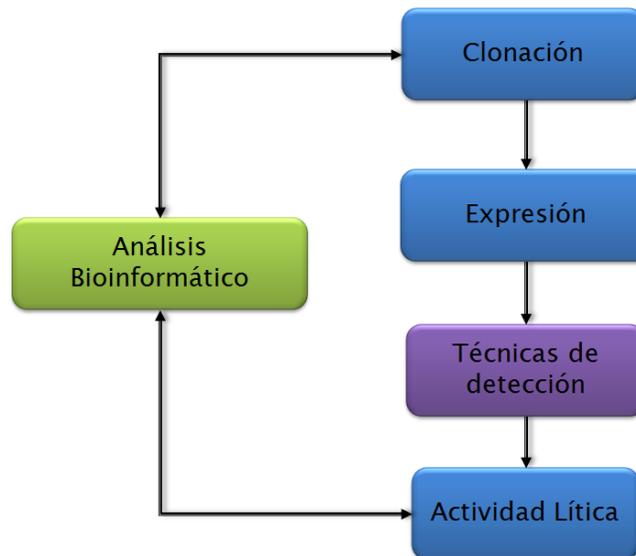


Figura 10. Diagrama de trabajo para la determinación y caracterización de la actividad lítica sobre peptidoglucano de la proteína de 110 kDa producida por *P. acidilactici*

5.1 MEDIOS DE CULTIVO

Los medio de cultivo utilizados fueron:

- Medio MRS (Man Rogosa Sharpe, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).
- Medio LB (Luria-Bertani: 10 g/L Bacto triptona Difco; 5 g/L Extracto de levadura Difco; 10 g/L NaCl, JTBaker, EUA), ajustado a pH 7.5
- Medio LB bajo en sales (Luria-Bertani: 10 g/L Bacto triptona Difco; 5 g/L Extracto de levadura Difco; 5 g/L NaCl, JTBaker, EUA), ajustado a pH 7.5
- Medio SOB (20 g/L Bacto triptona Difco; 5 g/L Extracto de levadura Difco; 0.5 g/L NaCl, KCl 250 mM, MgCl₂ 10 mM, JTBaker, EUA)
- Medio SOC (medio SOB adicionado con 20 mM Glucosa, JTBaker, EUA)

5.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *P. ACIDILACTICI* ATCC 8042

La cepa *P. acidilactici* ATCC 8042 se mantuvo conservada a -20 °C en glicerol al 80%. Se tomaron 200 µL y con ellos se inocularon 10 mL de medio MRS, que se cultivaron a 29 °C durante 8 h. Este cultivo se transfirió a 90 mL de medio fresco MRS y se incubaron 5 h a 29 °C. Este volumen de 100 mL se centrifugó a 10,000 x *g* durante 15 min. El sobrenadante se desechó y las células se utilizaron para la extracción de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó con el sistema de extracción Genomic DNA Extraction Kit (FAST ID, No. de catálogo K1-0001-0050, EUA).

5.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 110 KDA

A partir de la secuencia del gen que codifica a la proteína putativa de 110 kDa, reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 (acceso: gi|270289973) se diseñaron los cebadores que lo flanquean, los cuales fueron sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Tabla 7). Estos cebadores se utilizaron para amplificar el gen que codifica a la proteína de 110 kDa, con un tamaño de 3,198 pares de bases (pb), a partir del ADN genómico que se extrajo de la cepa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

Tabla 7. Cebadores diseñados mediante el software Oligoanalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies), con base en la secuencia del gen que codifica para la proteína de 110 kDa, reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4.

Tipo	Secuencia (de 5´ a 3´)	Tm (°C)
Directo (Forward)	CCG GTT CGC AAA GAG TGG AAA TTT ATT AG	58
Inverso (Reverse)	CGT CTT TCA ACT TCT TGA AGC TTT TGG	57

Se utilizó la mezcla enzimática High Fidelity PCR (Fermentas, No. de catálogo K0191, EUA) bajo las condiciones de amplificación por PCR: 1 ciclo a 95 °C por 180 s, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 58 °C por 30 s, polimerización a 72 °C por 210 s y un paso final de extensión a 72 °C por 600 s. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1%, revelado posteriormente con tinción de bromuro de etidio (Bio-Rad, No. de catálogo: 1610433, EUA).

Para verificar que el producto amplificado era el gen de interés (con un tamaño esperado de aproximadamente 3,200 pb), se realizó una digestión a 37 °C durante 1 h con la enzima *EcoRI* (Fermentas, No. de catálogo: ER0271, EUA), con base en el análisis de los sitios de restricción mediante el software SerialCloner 2.1. Se esperaban fragmentos de 1,950 pb y 1,225 pb (Figura 11).

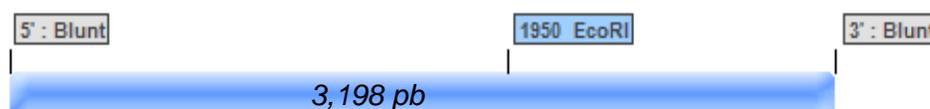


Figura 11. Análisis de los sitios de restricción de la secuencia del gen que codifica para la proteína de 110 kDa. El recuadro indica la enzima que se utilizó experimentalmente (*EcoRI*).

5.4 CLONACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA PROTEÍNA DE 110 KDA

Con el producto de PCR amplificado con los cebadores de la Tabla 7 (el gen que codifica a la proteína de 110 kDa) y basados en la metodología del kit de clonación del TOPO[®]-XL-PCR (Invitrogen, No. de catálogo: K4700-10, EUA) se obtuvo la construcción TOPO-110 (vector pCR[®]-XL-TOPO[®] con el gen insertado que codifica para la proteína de 110 kDa).

5.4.1 Construcción del plásmido TOPO-110

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α con la construcción TOPO-110 por electroporación en el electroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor en el boletín 3112-7, con un pulso de voltaje de 2.5 kV, capacitancia de 25 μ F y resistencia de 200 Ω . Inmediatamente se adicionó 1 mL de medio SOC, se incubó 40 min a 37 °C. Se centrifugó a 10,000 x *g* durante 15 min a 4 °C, el paquete celular se resuspendió en 200 μ L de medio SOB. Se sembró por extensión en placa en agar LB bajo en sales (medio

LB bajo en sales con 1% de Agar Difco, EUA) adicionado con 25 µg/mL de zeocina (Invitrogen, No. de catálogo: R250-01, EUA) como antibiótico

Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 h. De las placas se picaron colonias y se cultivaron en 5 mL de medio fresco LB bajo en sales, adicionado con 25 µg/mL de zeocina, durante 12 h a 37 °C. A las clonas que crecieron se les realizó PCR de colonia para verificar si contenían el gen de interés utilizando los cebadores de la Tabla 7 y las condiciones de amplificación descritas en la sección 5.3.

5.4.2 PCR de colonia

El PCR de colonia consistió en tomar 100 µL de los cultivos de las colonias donde se observó crecimiento, se centrifugaron a 3,500 x g durante 5 min y se desechó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 50 µL de agua estéril, se calentó a ebullición durante 5 min, posteriormente, se centrifugó a 14,000 x g durante 1 min. Del sobrenadante se utilizaron 10 µL como fuente de ADN para la amplificación por PCR con la mezcla enzimática High Fidelity PCR, los cebadores y condiciones de amplificación respectivas. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1%, revelado posteriormente con tinción de bromuro de etidio.

5.5 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

5.5.1 Construcción del plásmido pET-110

Para generar la construcción del vector de expresión con el gen de interés insertado se probaron dos alternativas de amplificación para dicho gen en función de la fuente de ADN molde que se utilizó. En la primer alternativa se amplificó el gen a partir de la construcción TOPO-110, mientras que en la segunda se amplificó a partir del ADN genómico de *P. acidilactici*.

La amplificación del gen que codifica a la proteína de 110 kDa se hizo en función del vector de expresión. Para el vector pET-20b(+) (Novagen, No. de catálogo: 69739-3, EUA) se usaron cebadores que incluían los sitios de restricción requeridos para insertar el gen en dicho vector, mismos que fueron sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Tabla 8).

Las condiciones de amplificación por PCR utilizando la mezcla enzimática High Fidelity fueron: 1 ciclo a 95 °C por 180 s, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s, polimerización a 72 °C por 210 s y un paso final de extensión a 72 °C por 600 s.

Tabla 8. Cebadores diseñados mediante el software Oligoanalyzer 3.1, con base en un análisis de los sitios restricción, para la inserción del gen que codifica a la proteína de 110 kDa en el vector de expresión pET-20b(+). En negritas se indican los sitios de restricción que reconoce cada enzima.

Tipo	Secuencia (de 5´ a 3´)	Tm (°C)
Directo (Forward) <i>EcoRV</i>	GCG GAT ↓ ATC GTT CGC AAA GAG TGG AAA TTT	60
Inverso (Reverse) <i>XhoI</i>	TGA C ↓ TC GAG TCT TTC AAC TTC TTG AAG CTT	59

Los productos de PCR se purificaron mediante columnas GenElute Minus EtBr (Sigma-Aldrich, No. de catálogo: 56501-70EA, EUA). Dichos productos y el vector pET-20b(+), se digirieron con *EcoRV* (Fermentas, No. de catálogo: ER0301, EUA) durante 1 h a 37 °C y *XhoI* (Fermentas, No. de catálogo: ER0691, EUA) durante 30 min a 37 °C. Las reacciones de digestión se purificaron con el kit MinElute Reaction Cleanup (Qiagen, No. de catálogo: 28204, EUA), para posteriormente ligar los productos con la DNA ligasa T4 (Fermentas, No. de catálogo: EL0019, EUA) durante 16 h a 22 °C.

En el caso del vector pET-22b(+) (Novagen, No. de catálogo: 69744-3, EUA), los cebadores que se utilizaron en la amplificación incluían los sitios de restricción requeridos para insertar el gen en este vector. Los cebadores fueron sintetizados en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Tabla 9).

Tabla 9. Cebadores diseñados mediante el software Oligoanalyzer 3.1, con base en un análisis de los sitios de restricción, para la inserción del gen que codifica a la proteína de 110 kDa en el vector de expresión pET-22b(+). En negritas se indican los sitios de restricción que reconoce cada enzima.

Tipo	Secuencia (de 5´ a 3´)	Tm (°C)
Directo (Forward) <i>Nco</i> I	GCG C↓CA TGG GAG TTC GCA AAG AGT GGA AAT T	64
Inverso (Reverse) <i>Xho</i> I	TGA C↓TC GAG TCT TTC AAC TTC TTG AAG CTT	59

La amplificación por PCR se hizo con la mezcla enzimática High Fidelity bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C por 180 s, 35 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 62 °C por 30 s, polimerización a 72 °C por 210 s y un paso final de extensión a 72 °C por 600 s.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante columnas GenElute Minus EtBr, para posteriormente digerirlos al igual que al vector pET-22b(+) con *Nco*I (Fermentas, No. de catálogo: ER0571, EUA) durante 1 h a 37 °C y posteriormente con *Xho*I durante 1 h a 37 °C. Las reacciones de digestión se purificaron con el kit MinElute Reaction Cleanup. Los productos de digestión se ligaron con la DNA ligasa T4 durante 16 h a 22 °C. La construcción obtenida se denominó pET22-110.

5.5.2 Expresión en *E. coli* BL21

Se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET20-110 por electroporación como se describió en la sección 5.4.1. El paquete celular se resuspendió en medio SOB y se sembró por extensión en placa en agar LB (medio LB con 1% de agar) adicionado con 100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich, No. de catálogo: A9518, EUA). Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 h. De las placas se picaron colonias y se cultivaron en 5 mL de medio fresco LB adicionado con 100 µg/mL de ampicilina (LB-Amp) durante 12 h a 37 °C. A las clonas que crecieron se

les realizó PCR de colonia como se describe en la sección 5.4.2, con los cebadores de la Tabla 7 y las condiciones de amplificación descritas en las sección 5.3.

La transformación de células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET22-110 se realizó siguiendo la misma metodología.

Se purificó el plásmido de las clonas que fueron positivas en el PCR de colonia para las respectivas transformaciones, mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Fermentas, No. de catálogo: K0502, EUA) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los plásmidos purificados se mandaron secuenciar (Macrogen Inc., Corea) con los cebadores T7 propios del sistema de expresión pET (Novagen, EUA) para determinar si la secuencia del gen de interés insertada en el vector se encontraba en el marco de lectura y verificar que los promotores no se hubieran modificado. Además, con la finalidad de comparar la secuencia real y completa del gen que codifica a la proteína de 110 kDa con la reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4, se diseñaron cebadores que amplificaran regiones intermedias del gen (Figura 12), los cuales se sintetizaron en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (Tabla 10).

Tabla 10. Cebadores diseñados mediante el software Oligoanalyzer 3.1, con base en la secuencia del gen que codifica para la proteína de 110 kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 para corroborar cambios en la secuencia del gen que codifica a la proteína recombinante de *P. acidilactici* ATCC8042

Tipo	Secuencia	Tm (°C)	Tamaño esperado (pb)
Directo F1	CCG GTT CGC AAA GAG TGG AAA TTT ATT AG	58	≈ 800
Inverso R1	CCG GTG GTT ACT TGA CCA G	53	
Directo F2	CGC TCT GGT CAA GTA ACC	50	≈ 790
Inverso R2	TAC AGT TTG CGA AGT AGT C	47	
Directo F3	CCG ACT TCG CAA ACT GTA GAT AC	55	≈ 800
Inverso R3	ACG CCG TTG ATT AAC GTT CC	52	
Directo F4	CGC ACT GGA ACG TTA ATC AAC	52	≈ 850
Inverso R4	CGT CTT TCA ACT TCT TGA AGC TTT TGG	57	

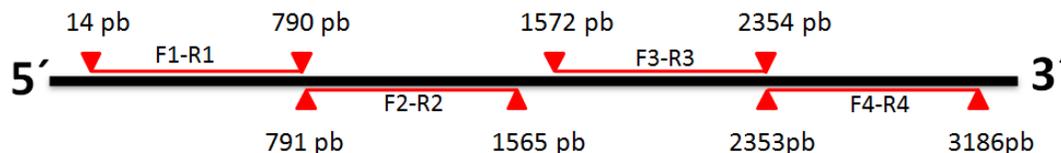


Figura 12. Esquema de las regiones del gen de interés (3,198 pb) que se amplificaron con los cebadores mostrados en la Tabla 9.

La amplificación por PCR para cada uno de los pares de cebadores se realizó utilizando la mezcla enzimática High Fidelity bajo las condiciones descritas en la sección 5.3, cambiando únicamente la temperatura de alineamiento para cada uno de los pares de cebadores en función de su T_m . Los productos de amplificación se mandaron a secuenciar (Macrogen Inc., Corea).

Las clonas recombinantes que tenían al vector pET22-110 se cultivaron a 37 °C, en 100 mL de LB-Amp hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{600nm} = 0.6-0.8$). La expresión de la proteína recombinante se indujo con la adición de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Fermentas, No. de catálogo: R117, EUA), con una concentración final de 1 mM. Después del tiempo establecido de inducción a 37 °C, se colectaron las células por centrifugación (10,000 x g durante 15 min) y se lavaron con amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 a 4 °C. El paquete celular se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 y se ajustó a una $DO_{600nm} = 2.0$, lo que permitió estandarizar la cantidad muestra para los ensayos de inmunoanálisis y detección de actividad lítica. En tanto que el sobrenadante de cada una de las muestras se liofilizó y se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 10 mM, pH 7.6 (sobrenadante concentrado).

5.6 INMUNOANÁLISIS

Del paquete celular resuspendido en amortiguador Tris-HCl 10mM y ajustado a $DO_{600nm} = 2.0$, se centrifugó 1 mL a 14,000 x g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el nuevo paquete celular se resuspendió en 40 μ L de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 2.5% glicerol, 0.5% β -mercaptoetanol y

0.5% de azul de bromofenol). Se trataron a ebullición durante 5 min y posteriormente, se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes usando SDS-PAGE al 10% (Bis-acrilamida 30%, Tris-HCl 2 M, pH 8.8, SDS 10%, H₂O, TEMED y APS 10%) que se corrieron a 80 V hasta que el frente iónico salió del gel (Manual Bio-Rad).

Las proteínas se transfirieron del gel SDS-PAGE a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF; PolyScreen[®], No. de catálogo: NEF1000, PerkinElmer, EUA) a 15 V durante 60 min en el equipo de transferencia semisecco Trans-blot Semy-Dry Electrophoretic Transfer cell (Bio-Rad), usando como amortiguador de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM en metanol al 10%.

Después de la transferencia, la membrana se incubó en solución TBS (10 mM Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) con 3% de leche descremada (Difco, No. de catálogo 232100, EUA) a temperatura ambiente 1 h en agitación rotatoria. La membrana se lavó dos veces con solución TBS en agitación durante 30 s cada lavado. Después se incubó con el anticuerpo monoclonal acoplado a fosfatasa alcalina Anti-His (C-term)/AP Ab (Invitrogen, No. de catálogo: R932-25, EUA) en una concentración 1:5000. Se lavó la membrana dos veces con solución TBS en agitación durante 30 s cada lavado. Se reveló con el sustrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indoxil fosfato y el cloruro de nitro-azul de tetrazolio (BCIP/NBT; Perkinelmer, No. de catálogo: NEL937001PK, EUA). La reacción se detuvo con agua destilada al observar señal en la membrana.

5.7 DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PEPTIDOGLUCANO

Para detectar la actividad lítica sobre peptidoglucano se emplearon zimogramas (Leclerc y Asselin, 1989) utilizando como sustrato 0.2% de células de los microorganismos indicadores *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich) y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (cepario Posgrado FESC-UNAM), los cuales se

resuspendieron de forma independiente en los reactivos necesarios para hacer el SDS-PAGE al 10% (Manual Bio-Rad) según fuese el caso.

Del paquete celular de las muestras de estudio, resuspendido en amortiguador Tris-HCl 10 mM y ajustado a $DO_{600nm} = 2.0$, se centrifugó 1 mL a $14,000 \times g$ durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el nuevo paquete celular se resuspendió en 40 μ L de amortiguador de carga. Se trataron a ebullición durante 5 min y posteriormente, se sometieron a electroforesis en gel (se utilizó el gel SDS-PAGE 10% que contenía las células del microorganismo indicador) a 80 V hasta que el frente iónico salió del gel.

Después de la electroforesis, el gel se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, se incubó a 37 °C con 50 mL de buffer de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1% v/v) durante 16 h en agitación suave. La tinción se realizó con azul de metileno (0.01% de KOH y 0.1% de azul de metileno), posteriormente, se lavó con agua destilada hasta observar bandas de actividad lítica.

Otro método que se utilizó para la detección de actividad lítica sobre el peptidoglucano de la pared bacteriana, fue la prueba de difusión en agar. En esta prueba se utilizaron como microorganismos indicadores a *M. lysodieticus* y a *S. aureus*. En la caja petri se colocaron 20 mL de agar BHI al 1%, se dejó solidificar y posteriormente se le adicionó 10 mL de agar al 0.8% con una concentración de células adecuadas para obtener un césped bacteriano uniforme de los microorganismos indicadores. Se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionaron 100 μ L de cada una de las muestras de sobrenadantes concentrados, finalmente se incubaron las cajas petri a 37 °C por 24 h. Se evaluó el diámetro del halo de inhibición del microorganismo indicador para cada caso y se correlacionó con la concentración de proteína colocada en cada pozo (actividad definida en mm de inhibición/mg de proteína).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN

Debido a que el gen que codifica a la proteína de 110 kDa tiene un tamaño de 3,198 pb, se utilizó la mezcla enzimática High Fidelity PCR, la cual permite obtener productos de PCR grandes y disminuye la posibilidad de errores en la amplificación al contar con dos enzimas (una *Taq* DNA polimerasa y una DNA polimerasa termoestable con actividad correctiva) que actúan sinérgicamente. En la Figura 13, se observa el amplicón de aproximadamente 3,198 pb, obtenido en la amplificación por PCR del gen, bajo las condiciones descritas en la sección 5.3.

En el género *Pediococcus*, Choi *et al.*, (1991) con una metodología similar lograron amplificar un fragmento de ADN genómico de *Pediococcus pentosaceus* con actividad de la glutamato racemasa de aproximadamente 6,000 pb, para posteriormente digerirlo con enzimas de restricción obteniendo un inserto más pequeño de 1,800 pb e insertarlo en un vector de expresión.

Sin embargo, la mayoría de la investigación se enfoca en la amplificación de los genes que codifican para las pediocinas, producidas por algunos miembros del género *Pediococcus*, para su posterior clonación y expresión en sistemas heterólogos ya sea en bacterias ácido lácticas (Chikindas *et al.*, 1995; Buyong *et al.*, 1998; Horn *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 2005) o en *E. coli* (Madrugg *et al.*, 1992; Bukhtiyarova *et al.*, 1994; Osmanağaoğlu *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2006).

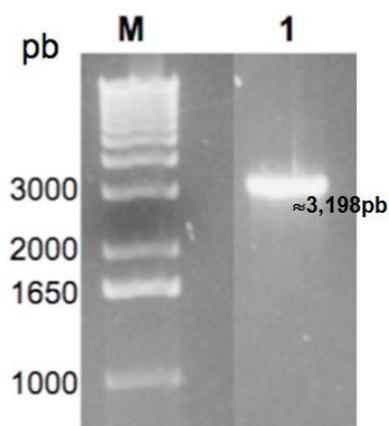


Figura 13. Producto de amplificación del gen que codifica a la proteína de 110 kDa. Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, No. de catálogo: 10787-018, EUA). Carril 1: Amplificación de interés, aproximadamente 3,198 pb. Tinción de bromuro de etidio.

Para corroborar que el producto de PCR era el gen de interés se realizó una digestión con la enzima *EcoRI*, que de acuerdo al análisis de los sitios de restricción del gen tiene un sitio único, digiriendo el gen en dos fragmentos: uno de 1,950 pb y otro de 1,225 pb (Figura 11).

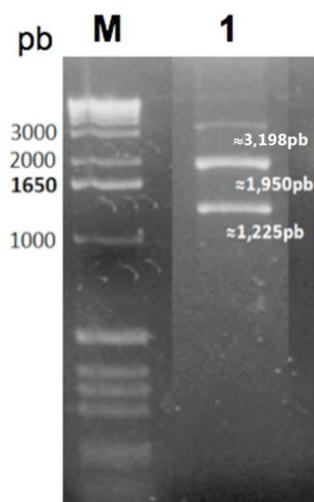


Figura 14. Digestión con *EcoRI* del producto de amplificación para verificar identidad. Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular 1 Kb Plus DNA ladder. Carril 1: Digestión con *EcoRI* del gen que codifica para la proteína de 110 kDa. Tinción de bromuro de etidio.

De las tres bandas del carril 1 de la Figura 14, la primera de aproximadamente 3,198 pb, es el gen que no se logró digerir por completo. Las otras dos bandas

corresponden en pares de bases con los fragmentos predichos por el análisis de los sitios de restricción (de aproximadamente 1,950 pb y 1,225 pb). Con base en estas pruebas se puede suponer que el producto de PCR obtenido es el gen de interés, por lo que se procedió a la clonación del gen en un vector de clonación.

6.2 CLONACIÓN

Se eligió el vector de clonación pCR[®]-XL-TOPO[®] (Invitrogen, EUA) debido a que este sistema presenta ventajas tales como: clonar productos de PCR grandes (entre 3 a 10 kb), no requiere de DNA ligasa para la inserción del fragmento de ADN, permite que con el material de la reacción de clonación se transformen directamente células electrocompetentes y la selección de las clonas es directa, al contener el gen letal *ccdB* de *E. coli*, fusionado al C-terminal, lo que permite que crezcan únicamente las clonas positivas después de la transformación (Figura 15). La tecnología de clonación TOPO-TA ha sido usada para la obtención de construcciones estables de los productos de amplificación de fragmentos de secuencias del gen *atIL* de *Staphylococcus lugdunensis* (Bourgeois *et al.*, 2009) y en la clonación del gen *murA* de *Listeria monocytogenes* (Carroll *et al.*, 2003). En ambos casos los genes clonados codifican para enzimas con actividad lítica sobre el peptidoglucano propias de cada microorganismo.

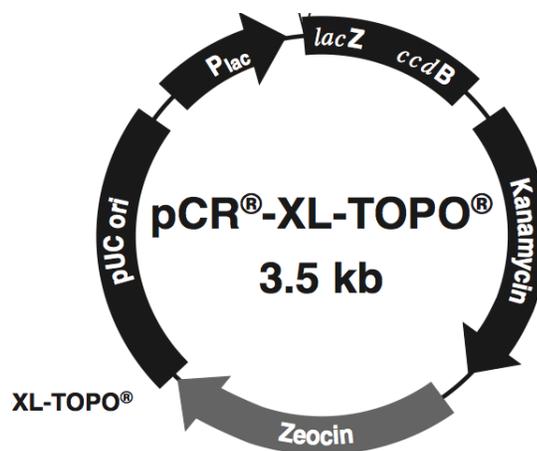


Figura 15. Esquema del vector pCR[®]-XL-TOPO[®]

De la transformación de células de *E. coli* DH5 α con la construcción TOPO-110 (tal como se describe en la sección 5.4.1), se obtuvieron 27 colonias presuntamente positivas para el gen de interés. En la Figura 16, se muestran los resultados representativos del PCR de colonia que se les realizó.

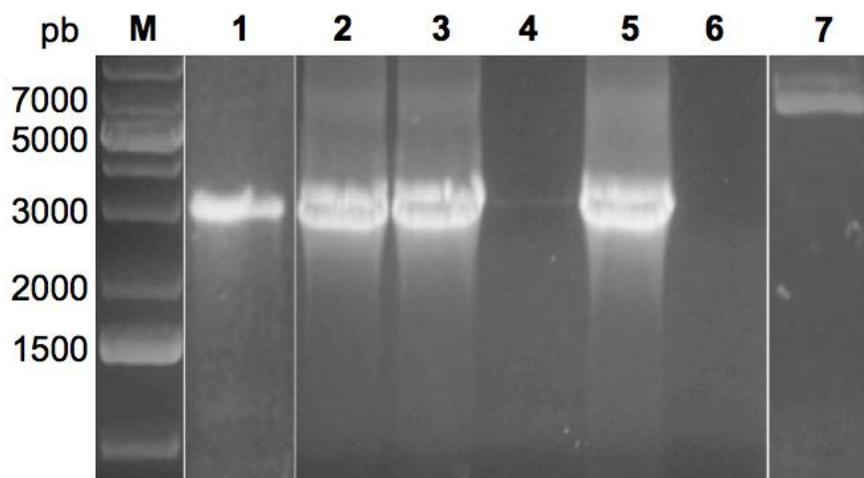


Figura 16. Análisis de colonias recombinantes derivadas de la inserción del gen 110 kDa en el vector TOPO 110. Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus (Fermentas, No. de catálogo: SM1333, EUA). Carril del 1 al 6 productos de amplificación por PCR de las colonias seleccionadas como presuntivas. Carril 7: Construcción TOPO-110 (aproximadamente 7,700 pb). Tinción con bromuro de etidio. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoría entre ellos.

Se obtuvieron cuatro clones recombinantes de *E. coli* DH5 α con la construcción TOPO-110. Se les extrajo el ADN para usarlo como molde en la amplificación del gen con los cebadores mostrados en la Tabla 8.

6.3 EXPRESIÓN

6.3.1 Construcción del vector de expresión

Se eligió el vector de expresión pET-20b(+) porque permite la inserción de genes relativamente grandes, es regulado por el promotor T7, inserta la secuencia señal *peIB*

en el N-terminal para direccionar las proteínas expresadas al periplasma, adiciona al final de la proteína expresada un tallo de histidinas que permite tanto la detección de la proteína por métodos de inmunoanálisis como su purificación, además de poseer un gen que codifica para la resistencia a ampicilina que facilita la selección de clones (Figura 17) (Novagen, 2006).

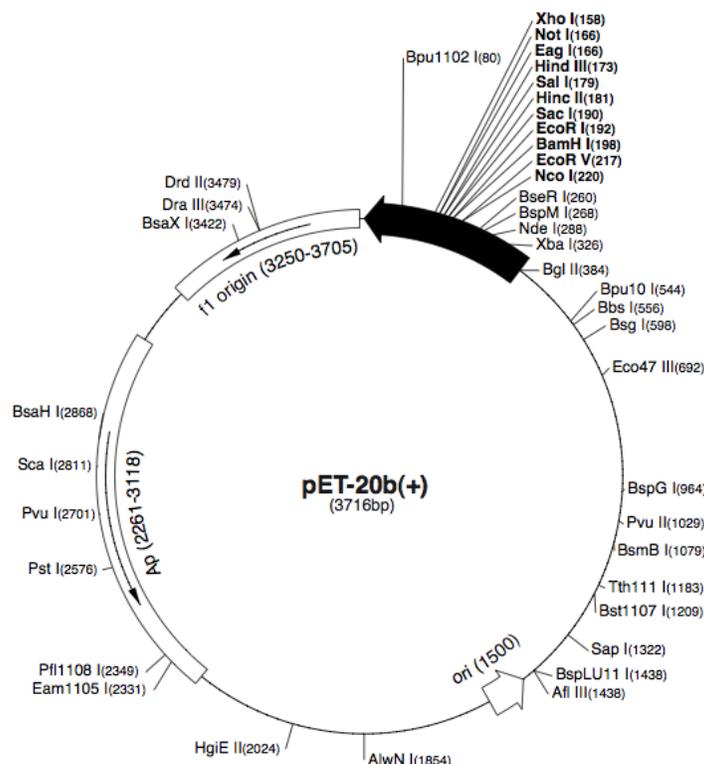


Figura 17. Esquema del vector pET-20b(+). Novagen (No. Cat. 69739-3)

Se utilizó la construcción TOPO-110 como ADN molde para amplificar el gen que codifica a la proteína de 110 kDa utilizando cebadores que incluyeran los sitios de restricción reconocidos por las enzimas *EcoRV* y *XhoI* (Tabla 8). Posteriormente, tanto los productos de la amplificación por PCR (aproximadamente 3.2 kb), como el vector pET-20(b)+ con un tamaño de 3.7 kb fueron digeridos y ligados. Sin embargo, tras varios intentos, en los que se modificaron condiciones de digestión y ligación, no se obtuvo el producto de ligación esperado, de aproximadamente 6.9 kb.

Se decidió cambiar la estrategia y se optó por amplificar el gen que codifica a la proteína de 110 kDa con los cebadores mostrados en la Tabla 8 y a partir del ADN genómico de *P. acidilactici*, en lugar de usar la construcción TOPO-110, bajo las condiciones de amplificación descritas en la sección 5.5.1.

Los nuevos productos de la amplificación por PCR a partir de ADN genómico y el vector pET-20(b)+ fueron digeridos y ligados con las condiciones descritas en la sección 5.5.1. En la Figura 18, en el carril 1, se puede apreciar el producto de ligación de aproximadamente 6,900 pb (construcción pET20-110). Se observaron dos bandas adicionales que corresponden a productos de 3,700 y 3,198 pb, éstos son el vector pET-20(b)+ que está linealizado como efecto de la digestión, pero que no se logró ligar de forma eficiente con el amplicón de aproximadamente 3,198 pb, también observable, que corresponde al gen que codifica para la proteína de 110 kDa.

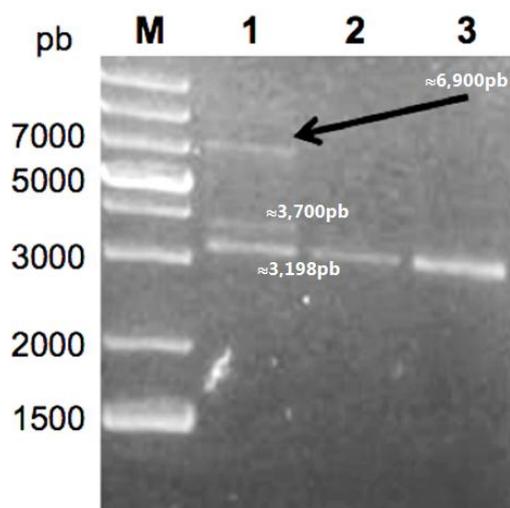


Figura 18. Construcción de recombinantes a partir de ADN genómico y vector pET-20b(+). Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus. Carril 1: Producto de ligación, entre el gen de aprox. 3,198 pb y el vector pET-20b(+), de aproximadamente 6,900 pb. Carril 2: Producto de amplificación de aprox. 3,198 pb digerido con enzimas de restricción. Carril 3: Amplicón esperado (3,198 pb) del gen que codifica a la proteína de 110 kDa usando los cebadores de la Tabla 8. Tinción con bromuro de etidio.

Con la construcción pET20-110 se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* BL21, pero nunca se obtuvo una clona positiva, probablemente porque la construcción resultó poco estable, dado que el gen codifica una proteína tóxica para el

hospedero (Novagen, 2006), como se demostró en trabajos previos donde la proteína inhibe el crecimiento de *E. coli* (García-Cano *et al.*, 2011), lo cual también provocaría la muerte del mismo antes de que lograr aislarlo.

Con el propósito de lograr la expresión del gen que codifica a la proteína de 110 kDa, se decidió cambiar de vector al pET-22b(+) (5,493 pb) que contiene un promotor T7/*lac* (Figura 19).

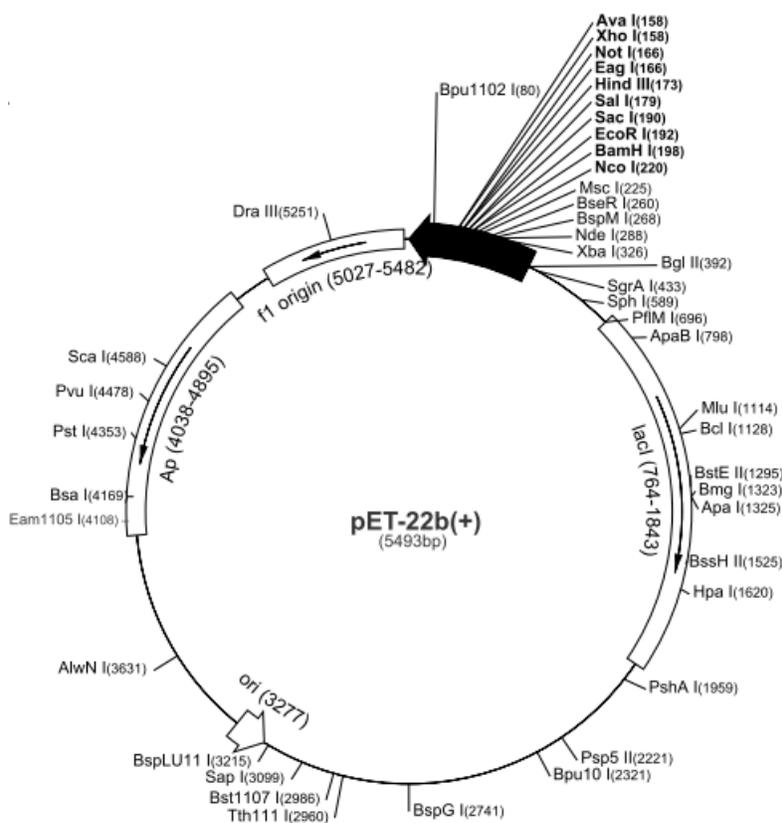


Figura 19. Esquema del vector pET-22b(+). Novagen (No. Cat. 69744-3)

El vector de expresión pET-22b(+) comparte características con el vector pET-20b(+), como el hecho de que permite la inserción de genes relativamente grandes, tiene una secuencia señal *peIB* en el extremo N-terminal que potencia la localización de las proteínas expresadas a periplasma, adiciona en el C-terminal de la proteína expresada un tallo de histidinas y posee un gen que codifica para la resistencia a ampicilina. Sin embargo, a diferencia de los plásmidos con promotor T7, los plásmidos

del sistema pET con promotor T7/lac permiten un control de la expresión basal de las proteínas recombinantes ya que contienen 25 pb de la secuencia del operador *lac* inmediatamente “río abajo” de la región promotora. La unión del represor *lac* en este sitio disminuye eficazmente la transcripción por la T7 RNA polimerasa, proporcionando así un segundo mecanismo basado en *lacI* (además de la represión en *lacUV5*) para suprimir la expresión basal en cepas λ DE3 lisogénicas. Los plásmidos con el promotor T7/lac también contienen su propia copia de *lacI* que garantiza la síntesis de suficiente represor para todos los sitios de operador disponibles (Novagen, 2006). Se tienen varios reportes de su uso para la expresión de proteínas que resultan tóxicas para el hospedero (Tabla 11).

Tabla 11. Reportes de enzimas con actividad lítica en el sistema pET

Vector pET	Promotor	Tallo de Histidinas	Condiciones de inducción	Proteína	Referencia
15b	T7/lac	N-terminal	1 mM IPTG / 37 °C / 2 h	Glucosaminidasa	Inagaki <i>et al.</i> , 2009
19b	T7/lac	N-terminal	1 mM IPTG / 4 h	Amidasa	Supungul <i>et al.</i> , 2010
26b	T7/lac	C-terminal	1 mM IPTG / 37 °C / 4 h	Endolisina	Briers <i>et al.</i> , 2008
28b	T7/lac	N-terminal, C-terminal	2 mM IPTG / 3 h	Cinasa	Maestro <i>et al.</i> , 2011
30a	T7/lac	Intermedio, C-terminal	1 mM IPTG / 37 °C	Transglicosilasa	Scheurwater <i>et al.</i> , 2007
32a	T7/lac	Intermedio, N-terminal	1 mM IPTG / 20 y 37 °C	Lisozima tipo G	Sun <i>et al.</i> , 2006
41a	T7/lac	Intermedio, C-terminal	1 mM IPTG / 37 °C	Endopeptidasa	Hett <i>et al.</i> , 2008

La amplificación del gen que codifica a la proteína de 110 kDa se realizó a partir de ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042, usando los cebadores mostrados en la Tabla 9, bajo las condiciones descritas en la sección 5.5.1. Los productos de PCR y el vector pET-22b(+) se digirieron con *NcoI* y *XhoI* y posteriormente, fueron ligados con la DNA ligasa T4 para obtener la construcción pET22-110 (Figura 20).

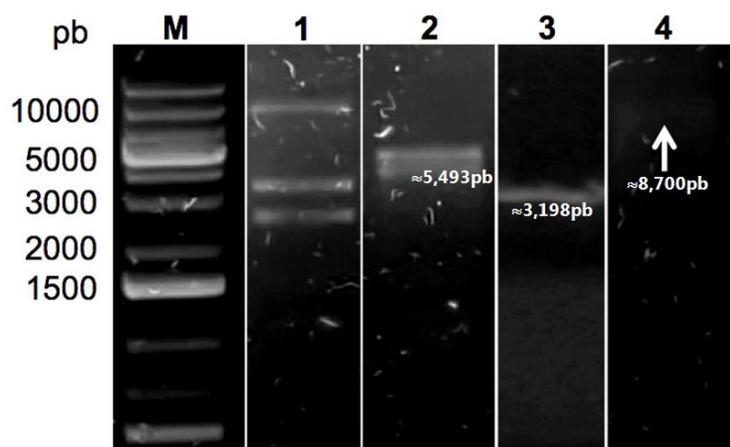


Figura 20. Construcción de clones del gen de interés obtenido por amplificación de ADN genómico y el vector pET-22b(+). Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus. Carril 1: Vector pET-22b(+). Carril 2: Vector pET-22b(+) digerido (5,493 pb). Carril 3: Producto de PCR del gen que codifica para la proteína de 110 kDa digerido (3,198pb). Carril 4: Construcción del gen de interés y el vector pET-22b(+) aproximadamente 8,700 pb. Tinción con bromuro de etidio. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los gels más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoría entre ellos.

El plásmido pET22-110 se utilizó para transformar células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, como se describió en la sección 5.5.2. Se seleccionaron 5 clones presuntivos, de las cuales sólo amplificaron 3 con los cebadores mostrados en la Tabla 7, lo que indica la presencia del gen que codifica para la proteína de 110 kDa en estas 3 clones (Figura 21).

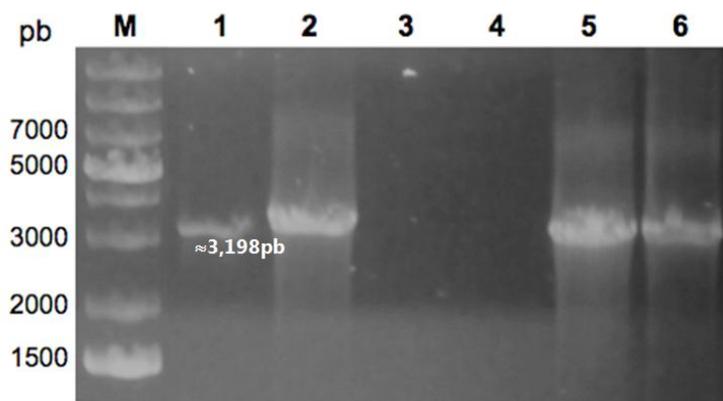


Figura 21. Verificación de la presencia del gen que codifica para la proteína de 110 kDa. Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder Plus. Carril 1: Amplicón del gen que codifica para la proteína de 110 kDa digerido (3,198pb). Carril del 2 al 6 productos de amplificación por PCR de las colonias seleccionadas como presuntivas. Tinción con bromuro de etidio.

Los plásmidos purificados de las clonas positivas se secuenciaron con los cebadores T7, propios del sistema de expresión pET. Los resultados indicaron que la secuencia insertada en el vector pET22-110 del gen que codifica a la proteína de 110 kDa se encuentra en marco de lectura, además de que ninguno de los promotores se modificó.

Para determinar la secuencia completa del gen insertado, se realizó una amplificación de dicho gen con cada uno de los pares de cebadores de la Tabla 10. Los productos de amplificación (Figura 22) se mandaron secuenciar.

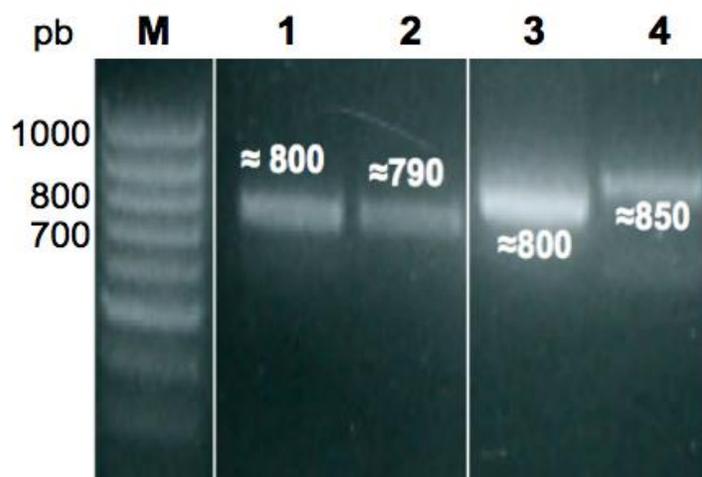


Figura 22. Comprobación de la secuencia completa del gen de interés a través de la amplificación de regiones intermedias de la misma. Gel de agarosa al 1%. Carril M: Marcador molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, No. de catálogo: SM0241, EUA). Carriles del 1 al 4 Fragmentos amplificados del gen que codifica para la proteína de 110 kDa con los cebadores de la Tabla 10. Tinción con bromuro de etidio. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los gels más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoría entre ellos.

Los resultados permitieron obtener la secuencia completa del gen que codifica para la proteína de 110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042, misma que se comparó con la secuencia del gen que codifica a la proteína putativa de 110 kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4. Ambas secuencias se interpretaron como posibles aminoácidos y su análisis indica que sólo dos de los aminoácidos predichos difieren entre ambas secuencias (Tabla 12). Los aminoácidos que difieren entre las secuencias

comparadas tienen propiedades químicas muy distintas, sin embargo, no se encuentran en las regiones reportadas como conservadas para la proteína en las diferentes bases de datos (Tabla 13).

Tabla 12. Aminoácidos que cambiaron entre la secuencia de la proteína de 110 kDa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7_4 y la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante.

Posición del aminoácido	Genoma de <i>P. acidilactici</i> 7_4	Gen clonado de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042
632	D/aspartato	K/lisina
680	Q/glutamina	K/lisina

La secuencia completa de la proteína recombinante (110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042) se analizó mediante el algoritmo BLAST y se comparó en diferentes bases de datos (Figura 23 y Tabla 13).

```

1 MVRKEWKFIR NNKLILISVL AIIFIPFLYS IFFLKSVWDP YGDTKNLPVA VVNLDPVKY 60
61 QGQRLAVGDE MVDNLKHNHQ LGWHFVSAKK AKEGMDKDKY YTVVTIPKDF SANAATVTDK 120
121 NPKKMQLKYS TNASLNLYIGK VISDVGTEKL NSEVREQVTK SYATAMFDQV KTACKGFKQA 180
181 SDGAKKLDG AVQLNDGTKT YTAGVSQLHD GIATMAVSVK PLQAGVAQLA DGSSQLTNGL 240
241 DQLNGKFGAL SSGVSQLANG SGQVTTGAVA LSKGLNELQQ KSGALVTVGS QLNNGALQLK 300
301 VKVPQYVNGV YQLNDGIQEL NAKTQQLVGG IKQLSSGAGA LSAGVKQYTD GVSAGAGQLQ 360
361 GGVAKLANDT KMPSSINAL HNGIADIAXS SKQLADANGK ISTGLGQVAD QVSANDISKQ 420
421 AAALKQOMAS IQTQLVALNK ATAGQTNGGN AAQSINNQLS EIKSEVGSLS NSSKTTTSTS 480
481 GGVSQATINS KIDGAGLSAE DAAKAKSALA GVANGSQNKT TSQTVDTNKI ASIQQKITDV 540
541 QGQVTKLNDL ANKQAEINKV VTSLTASFQK LAAGANELTG NSDDMKQLAA TLKCLAAGSQ 600
601 EVTTNLQALS SGSNTVAGKV GEFAGSASEL TDGVAQLDSG AKSLASQTNK NSKDVKKLVS 660
661 GSQELSSSLA MLDKQTPPTLQ SKIGQLAAGS NQISACTGAL AGGINQLSNG ISAASSQMP 720
721 LVSGVSLLAN GGNQLAAGSS QVTGGLNFTLN GQVPALVSGV AQLDNGGHQL NTGIQTINSS 780
781 TGTILINGVNQ LNTGAEELDA NSGALLDATK QISDNGGELS SKLDAGAKQV NSVPLTDKTA 840
841 NMFAPATKPK HNYSYVVPNY GHALAPYVLS LALYVGAIVF NFAYPIRKVS ERGTPPTQWF 900
901 LSKVSVGTVV ALGMALVETT IMMAGIHDV HVGQFYMTAI MISLASMIVV MFLSMAFDNP 960
961 GRFVAMILIM LQLGGSGGTF PMEVTNHFFYN VIHPPFLPTY SILSFRQAIT SGLDGTTFEQ 1020
1021 AMGALLLFAV IALALLWFSM NQLQKHLEN KSQLEDDNQKL QEVER 1065
    
```

Figura 23. Secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante de 110 kDa. Las zonas contrastantes denotan regiones conservadas mismas que se explican en la Tabla 13.

Tabla 13. Regiones conservadas reportadas por el análisis mediante algoritmo BLAST y comparadas en diferentes bases de datos (SBASE, SMART, Prodom, TCBD)

Región	Dominio	Observaciones	Valor E
13-217	Transportador ABC	Sistemas de transporte dependientes de ATP	1.3e-11
386-631	Transductor de quimiotaxis	Respuesta a sustancias atrayentes o repelentes	1.36e-1
842-912	Proteína de membrana de fago de infección	Proteína de fago YHGE	1e-26
908-1009	Transportador ABC	Sistemas de transporte dependientes de ATP	1.86e-6

Con base en los resultados de la secuenciación que comprueban que el gen insertado en el vector pET-22b(+), es el gen que codifica a la proteína de 110 kDa y que su secuencia se encuentra en marco de lectura, se realizó el estudio de la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* BL21.

6.3.2 Expresión de la proteína recombinante

Las clonas recombinantes transformadas con el vector pET22-110 se cultivaron a 37 °C, en medio LB-Amp hasta alcanzar su fase exponencial. Se indujo la expresión de la proteína recombinante con la adición de IPTG, como se describió en la sección 5.5.2. Además se variaron condiciones de tiempo, temperatura y concentración del inductor con la finalidad de optimizar la expresión de la proteína recombinante (Tabla 14). La condición inicial de 3 h a 37 °C con 1 mM de IPTG se estableció en función del protocolo sugerido en el manual del sistema de expresión pET (Novagen, EUA) y con base en resultados preliminares. Sin embargo, dadas las características de la proteína que se buscaba expresar se probaron diferentes alternativas, basados también en los reportes de enzimas con actividad lítica expresadas en el sistema pET (Tabla 11).

En primer lugar se disminuyó el tiempo de inducción dado que largos períodos de inducción podrían provocar la degradación de la proteína expresada (condición 1, Tabla 14). De acuerdo a los antecedentes la proteína de interés tiene actividad inhibitoria sobre *E. coli* (García-Cano *et al.*, 2011), por lo tanto al ser tóxica para el hospedero una sobreexpresión conduciría a la muerte del hospedero antes de que se pudiera sintetizar suficiente cantidad de la proteína recombinante. Una alternativa para prevenir este suceso fue adicionar una menor concentración del inductor (IPTG) con la finalidad de disminuir la síntesis de la proteína recombinante (condición 2, Tabla 14). Otra opción (condición 3, Tabla 14) fue cultivar a una menor temperatura para disminuir la velocidad de producción de la proteína recombinante, además de que la incubación a 25 °C se recomienda si el vector de expresión tiene una secuencia señal, como en el caso del vector pET-22b (Novagen, 2006).

Tabla 14. Condiciones propuestas para optimizar la expresión de la proteína recombinante

Experimentos	T (°C)	[IPTG] (mM)	t (h)
	37	1	3
Condición 1	37	1	1
Condición 2	37	0.1	3
Condición 3	25	1	3

El paquete celular obtenido en cada una de las condiciones de inducción se empleó como se describe en la sección 5.6, para el ensayo de inmunoanálisis con el anticuerpo Anti-His (C-term)/AP, dado que el vector pET-22b(+) adiciona a la proteína expresada un tallo de histidinas en el carboxilo terminal lo que permite su detección (Figura 24).

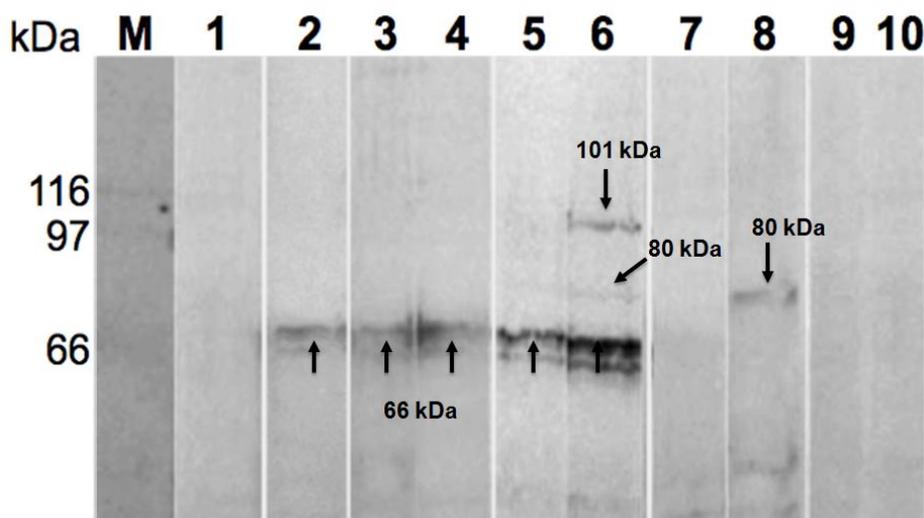


Figura 24. Detección de la proteína recombinante por técnicas inmunológicas (Western Blot) para determinar la expresión de la proteína de 110 kDa. Se empleó anticuerpo Anti-His (C-term)/AP. Carril M: Marcador molecular High Range (Bio-Rad, No. de catálogo: 161-0303, EUA). Carril 1: Cultivo a 37 °C antes de la adición del inductor. Carril 2: Cultivo a 37 °C / 3 h. Carril 3: Cultivo a 37 °C / 3 h con 1 mM de IPTG. Carril 4: Cultivo a 37 °C / 3 h con 0.1 mM de IPTG. Carril 5: Cultivo a 37 °C / 1 h. Carril 6: Cultivo a 37 °C / 1 h con 1 mM de IPTG. Carril 7: Cultivo a 25 °C / 3 h. Carril 8: Cultivo a 25 °C / 3 h con 1 mM de IPTG. Carril 9: Cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado 37 °C / 3 h. Carril 10: Cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con vector pET-22(+), sin gen insertado 37 °C / 3 h con 1 mM de IPTG. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoria entre ellos.

Es posible observar una banda de aproximadamente 66 kDa (carriles del 2 al 6), a excepción de cuando se hace la inducción 25 °C, donde se observó una banda de aproximadamente 80 kDa (carril 8), misma que se observa con menor intensidad en el carril 6. Sin embargo, la proteína esperada era de 110 kDa. La banda más cercana a este peso molecular es la que se observó con la adición de 1 mM de IPTG a 1 h de incubación a 37 °C (carril 6) con un peso de aproximadamente 101 kDa, la cual es tenue.

El experimento se repitió cuatro veces y el patrón de bandeo siempre fue el mismo, lo cual indica que existe una expresión de la proteína recombinante. En el hospedero existen sistemas proteolíticos que evitan la acumulación de proteínas con plegamientos deficientes presentados principalmente cuando se utilizan promotores fuertes (como por ejemplo los *T7/ac*) y altas concentraciones del inductor (Baneyx y Mujacic, 2004). Por otra parte, se tienen reportes de que proteínas heterólogas altamente hidrofóbicas o integrales de membrana (como en el caso de la proteína analizada en el presente trabajo), manifiestan problemas en su secreción hacia el periplasma, porque presentan un fenómeno de “atascamiento” al cruzar la membrana citoplasmática, el cual eventualmente conduce a la muerte celular. Los sistemas de secreción de *E. coli* son capaces de resolver estos problemas, sin embargo, en algunos casos conllevan a la degradación proteolítica de las proteínas heterólogas (Feilmeier *et al.*, 2000; Baneyx y Mujacic, 2004). Estas evidencias sugieren la probable degradación de la proteína recombinante de 110 kDa explicando así la presencia de bandas de 101, 80 y 66 kDa.

6.4 ACTIVIDAD LÍTICA SOBRE PEPTIDOGUCANO

A la proteína recombinante expresada se le determinó actividad lítica sobre peptidoglucano por zimogramas que emplean *M. lysodeikticus* como sustrato, tal y como se describió en la sección 5.7 (Figura 25). Se esperaba un comportamiento similar al mostrado por la proteína de 110 kDa que copurificó con la proteína de 99 kDa,

en una preparación con 94.5 % de pureza, como habían demostrado Velasco-Pérez (2010), García-Cano *et al.* (2011) y Valenzuela-Rosas (2012).

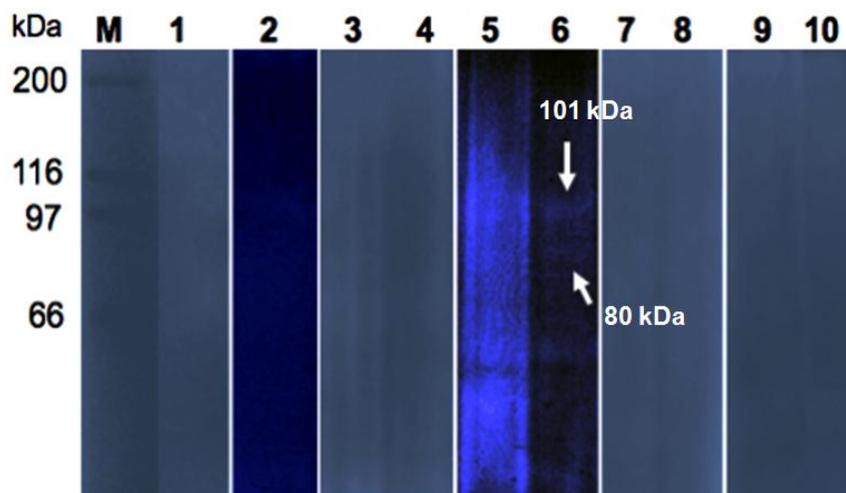


Figura 25. Actividad lítica de la proteína recombinante sobre *M. lysodeikticus*. Zimograma (SDS-PAGE 10%). Carril M: Marcador molecular High Range (Bio-Rad). Carril 1: Cultivo a 37 °C antes de la adición del inductor. Carril 2: Cultivo a 37 °C / 3 h. Carril 3: Cultivo a 37 °C / 3 h con 1 mM de IPTG. Carril 4: Cultivo a 37 °C / 3h con 0.1 mM de IPTG. Carril 5: Cultivo a 37 °C / 1 h. Carril 6: Cultivo a 37 °C / 1 h con 1 mM de IPTG. Carril 7: Cultivo a 25 °C/ 3 h. Carril 8: Cultivo a 25 °C/ 3 h con 1 mM de IPTG. Cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado 37 °C / 3 h. Carril 10: Cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con vector pET-22(+), sin gen insertado 37 °C / 3 h con 1 mM de IPTG. Tinción con azul de metileno. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoria entre ellos.

Se lograron observar dos bandas tenues (aproximadamente 101 y 80 kDa) con actividad lítica bajo las condiciones de 37 °C a 1 h de inducción con 1 mM de IPTG (carril 6). El patrón de bandeado coincide parcialmente con el observado en el inmunoanálisis (Figura 24, carril 6). Esto quiere decir que pese a las complicaciones en la expresión de la proteína y la diferencia en tamaños observada, su dominio lítico no resulta afectado.

En proteínas recombinantes grandes y/o tóxicas los sistemas de secreción de *E. coli* presentan respuestas que involucran la degradación de la proteína recombinante o una deficiente expresión (Baneyx, 1999; Baneyx y Mujacic, 2004). También se ha demostrado que se puede lograr una mejor estabilidad de la proteína recombinante en

cepas hospederas con un plásmido compatible con la resistencia a cloranfenicol (por ejemplo *E. coli* BL21 pLysS), el cual proporciona una baja cantidad de T7 lisozima que es un inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa del hospedero. Por lo que, sólo en presencia del inductor habría T7 RNA polimerasa para la expresión de la proteína de interés (Novagen, 2006).

Por lo tanto, se decidió como alternativa utilizar las clonas recombinantes de la cepa *E. coli* BL21 pLysS transformadas con el vector pET22-110. En la Figura 26, se observa el zimograma de actividad sobre el peptidoglucano de la pared de *M. lysodeikticus* para determinar y comparar la actividad lítica de la proteína recombinante expresada en las dos cepas de *E. coli* bajo las mejores condiciones de expresión para cada cepa de estudio, utilizando el paquete celular tratado como se describe en la sección 5.7 para la detección de actividad lítica sobre peptidoglucano.

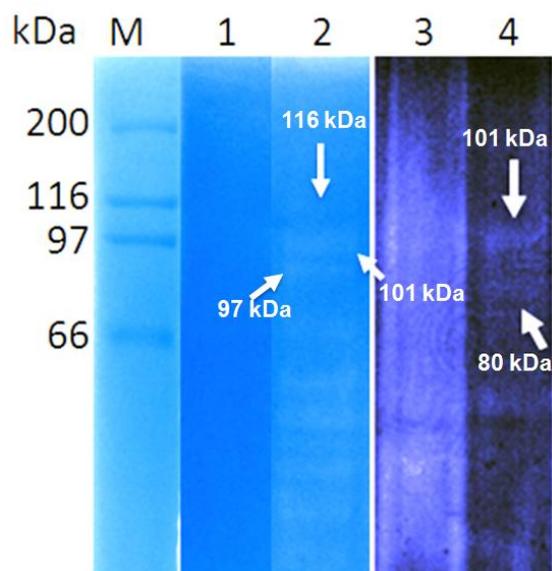


Figura 26. Actividad lítica sobre *M. lysodeikticus* generada por proteínas recombinantes obtenidas en dos cepas hospederas de *E. coli* empleando diferentes condiciones de inducción. Zimograma (SDS-PAGE 10%). Carril M: Marcador molecular High Range (Bio-Rad). Carril 1: Cultivo de *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h. Carril 2: Cultivo de *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. Carril 3: Cultivo de *E. coli* BL21 a 37 °C / 1 h. Carril 4: Cultivo de *E. coli* BL21 a 37 °C / 1 h con 1 mM de IPTG. Tinción con azul de metileno. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoría entre ellos.

Se observó una banda de actividad lítica de aproximadamente 116 kDa (carril 2, Figura 26), cuando la proteína recombinante se expresa en la cepa *E. coli* BL21 pLysS. También se observó otra banda de actividad de 101 kDa misma que ya se había obtenido en la expresión de la proteína recombinante en la cepa *E. coli* BL21, además de otras bandas de actividad lítica por debajo de los 97 kDa, probablemente porque la proteína sufre un proceso de degradación durante su expresión.

Es importante señalar que durante el cultivo de la cepa *E. coli* BL21 pLysS, se observó una disminución de la densidad óptica en función del tiempo de inducción, lo cual indicaba probablemente que la proteína recombinante hidrolizaba la pared del hospedero. Por la tanto, se consideró analizar los sobrenadantes de cultivo para determinar si la proteína recombinante se encontraba en dicha fracción, el tratamiento de los mismos se describe en la sección 5.5.2.

Se emplearon las cepas hospederas *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pLysS, que ya contenían el vector pET22-110, para realizar una prueba de lisis por difusión en agar. En esta prueba se utilizaron el paquete celular y los sobrenadantes concentrados (ver sección 5.5.2) de las cepas mencionadas, bajo las mismas condiciones de expresión para compararlas. Se evaluó la generación de halos de inhibición sobre los microorganismos indicadores *M. lysodeikticus* y *S. aureus* (Figura 27 y 28), así como el tamaño de los mismos.

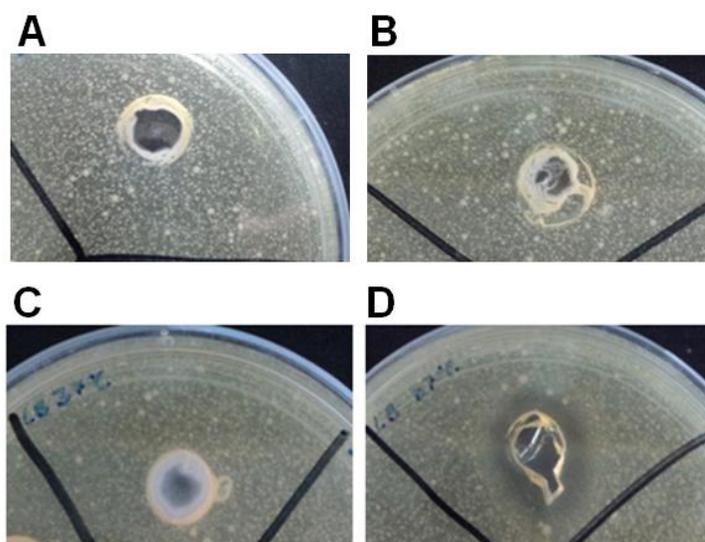


Figura 27. Halos de inhibición usando como microorganismo indicador *M. lysodeikticus*. A, sobrenadante concentrado del cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. B, sobrenadante concentrado del cultivo de células de *E. coli* BL21 pLysS transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. C, sobrenadante concentrado del cultivo de *E. coli* BL21 a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. D, sobrenadante concentrado del cultivo de *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG.

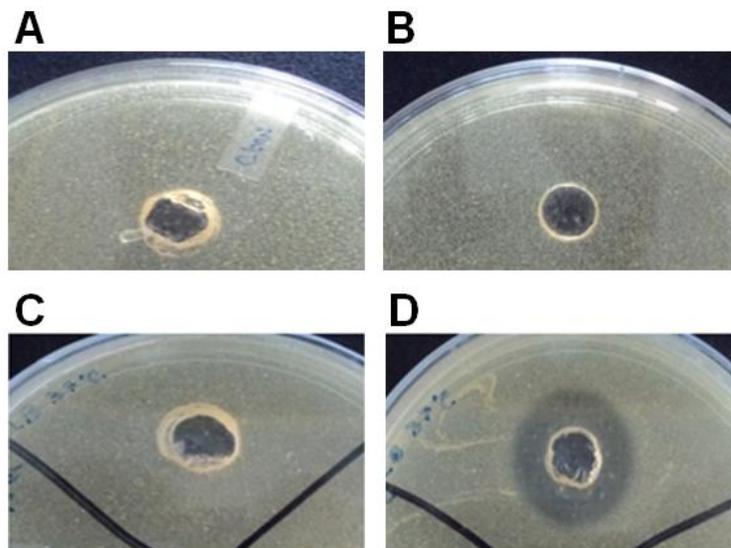


Figura 28. Halos de inhibición usando como microorganismo indicador *S. aureus*. A, sobrenadante concentrado del cultivo de células de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. B, sobrenadante concentrado del cultivo de células de *E. coli* BL21 pLysS transformadas con el vector pET-22b(+), sin gen insertado a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. C, sobrenadante concentrado del cultivo de *E. coli* BL21 a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. D, sobrenadante concentrado del cultivo de *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG.

Los paquetes celulares de ambas cepas no tuvieron actividad lítica observable contra ninguno de los microorganismos indicadores en la prueba de difusión en agar, ni tampoco los sobrenadantes concentrados obtenidos de la expresión en la cepa *E. coli* BL21 (Figura 27 y 28, inciso C). Sin embargo, el sobrenadante concentrado obtenido de la expresión de la proteína recombinante en la cepa *E. coli* BL21 pLysS generó un halo de inhibición de 30.93 mm para *S. aureus* y de 20.67 mm para *M. lysodeikticus* (Figura 27 y 28, inciso D).

La actividad lítica de la proteína recombinante es favorecida cuando se expresa en la cepa *E. coli* BL21 pLysS cultivada a 37 °C, después de 24 h de inducción con 1 mM de IPTG. La proteína recombinante encontrada en el sobrenadante tiene una mayor actividad lítica sobre el peptidoglucano de la pared celular de *S. aureus* (829.29 mm / mg de proteína) que sobre el peptidoglucano de la pared celular de *M. lysodeikticus* (554.05 mm / mg de proteína), lo anterior basados en los milímetros de inhibición respecto a los miligramos de proteína totales de cada muestra.

Posteriormente, se corroboró la actividad lítica sobre peptidoglucano de la pared celular de los mismos microorganismos indicadores observada en la prueba de difusión en agar mediante zimografía (Figura 29)

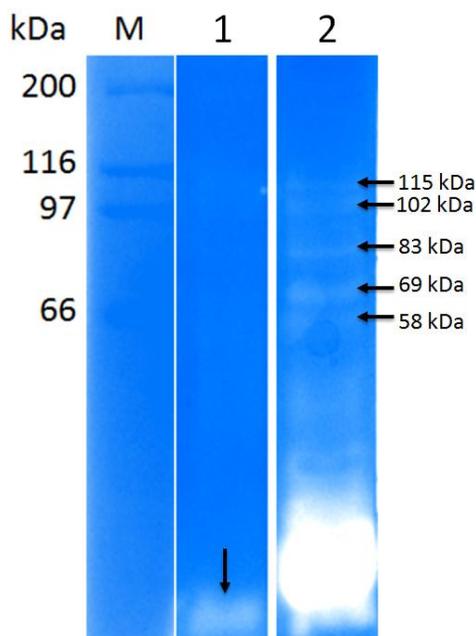


Figura 29. Actividad lítica sobre *M. lysodeikticus* y *S. aureus* de la proteína recombinante producida extracelularmente en *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. Zimograma (SDS-PAGE 10 %). Carril M: Marcador molecular High Range (Bio-Rad). Carril 1: Sobrenadante concentrado del cultivo probado contra células de *M. lysodeikticus*. Carril 2: Sobrenadante concentrado del cultivo probado contra células de *S. aureus*. Tinción con azul de metileno. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoria entre ellos.

La proteína recombinante expresada *E. coli* BL21 pLysS se encuentra en el sobrenadante concentrado y tiene actividad lítica sobre el peptidoglucano de la pared de *M. lysodeikticus*, pero dicha banda de actividad se muestra muy por debajo del peso molecular esperado (carril 1, Figura 29). Contra el microorganismo indicador *S. aureus*, mostró una mayor actividad lítica, se observaron cinco bandas de actividad con pesos moleculares aproximados de 115, 102, 83, 69 y 58 kDa, además de una banda de actividad lítica muy intensa de bajo peso molecular (carril 2, Figura 29). En la Figura 30 se visualiza con mayor definición y claridad la banda, de actividad lítica contra *S. aureus*, de bajo peso molecular, que en realidad está conformada por dos bandas de aproximadamente 25 kDa y 28 kDa.

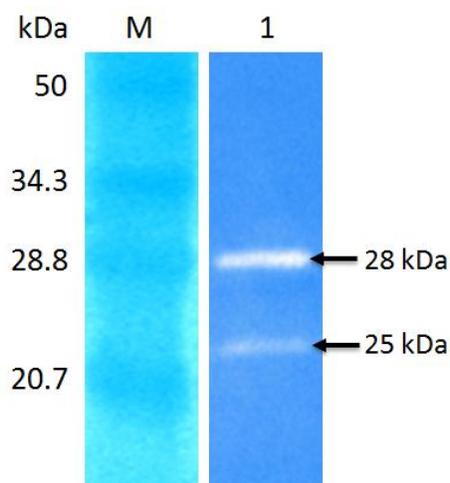


Figura 30. Actividad lítica sobre *S. aureus* de la proteína recombinante producida en *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. Zimograma (SDS-PAGE 12.5 %). Carril M: Marcador molecular Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad, No. de catálogo: 161-0305, EUA). Carril 1: Sobrenadante concentrado del cultivo probado contra células de *S. aureus*. Tinción con azul de metileno

Los resultados que se obtuvieron por medio de zimografía para el sobrenadante concentrado de la expresión de la proteína recombinante en la cepa *E. coli* BL21 pLysS, sugieren que la proteína recombinante presenta actividad lítica contra *M. lysodeikticus* y *S. aureus*, denotando que tiene una mayor actividad lítica sobre el peptidoglucano de *S. aureus*.

La actividad lítica sobre peptidoglucano observada corresponde a la proteína recombinante completa y a otros fragmentos de la misma de diversos pesos moleculares que se presentan de forma reproducible. Lo cual sugiere que la proteína recombinante presenta degradación o lisis durante su expresión en *E. coli* BL21 pLysS, sin embargo, no pierde su actividad lítica contra los microorganismos indicadores *M. lysodeikticus* y *S. aureus*.

Una de las bandas de actividad lítica sobre el peptidoglucano de *S. aureus* generadas durante la expresión de la proteína recombinante de 110 kDa, tiene el mismo peso molecular (aproximadamente 28 kDa) que una de las bandas de actividad lítica determinadas por Pérez-Munguía (comunicación personal), aunque el patrón de corte no es idéntico para ambos casos (Figura 31). Pérez-Munguía (comunicación

personal) atribuye dicha actividad a una proteína purificada del sobrenadante de cultivo del microorganismo *P. acidilactici* ATCC 8042, que es la cepa de la cual se obtuvo la proteína extracelular de 110 kDa con actividad de peptidoglucano hidrolasa reportada inicialmente por Llorente-Bousquets *et al.* (2008). Esto conduce a sugerir más estudios que permitan dilucidar si se trata de la misma estructura polipeptídica.

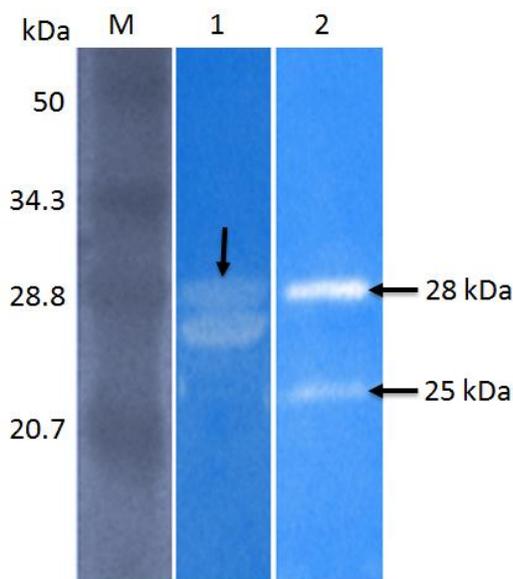


Figura 31. Comparación del patrón de lisis en zimograma de *S. aureus* generado por la proteína recombinante de 110 kDa y una proteína nativa purificada de *P. acidilactici*. Carril M: Marcador molecular Prestained SDS-PAGE Standards (Bio-Rad). Carril 1: Proteína purificada del sobrenadante de cultivo de *P. acidilactici* ATCC 8042 en MRS (Pérez-Munguía, comunicación personal). Carril 2: Sobrenadante concentrado del cultivo de *E. coli* BL21 pLysS a 37 °C / 24 h con 1 mM de IPTG. Los resultados mostrados son representativos y para su mejor presentación se seleccionaron los carriles de los geles más claros de cada experimento, por lo cual se nota una línea divisoria entre ellos.

La actividad lítica sobre el peptidoglucano de las paredes celulares de *M. lysodeikticus* y *S. aureus*, que presentó la proteína recombinante de 110 kDa, al compararse con los resultados de García-Cano (comunicación personal), que indican que la proteína recombinante de 99 kDa expresada en *E. coli* BL21, también presenta actividad lítica sobre peptidoglucano, permiten afirmar que las dos proteínas tienen actividad lítica de forma independiente.

La banda de actividad lítica que presentan de forma independiente tanto la proteína de 99, como la de 110 kDa tratadas bajo las mismas condiciones en zimogramas de *M. lysodeikticus* es menos intensa que la observada para cada una cuando copurifican en una preparación semipura (García-Cano *et al.*, 2011; Valenzuela-Rosas, 2012) (Figura 32). Por lo que, no se descarta la posibilidad de que ambas proteínas presenten algún efecto sinérgico o complementario respecto a la actividad lítica sobre peptidoglucano.

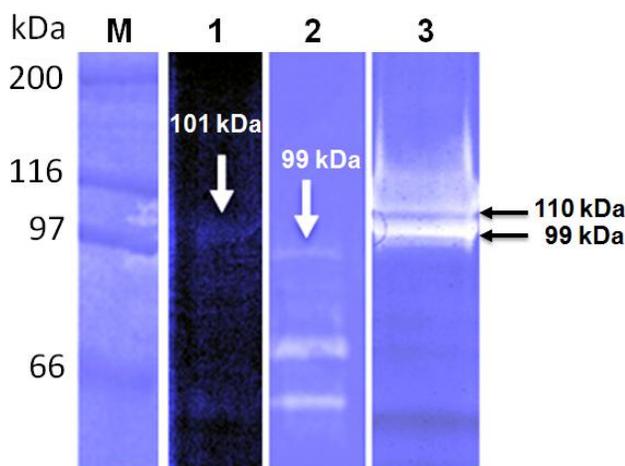


Figura 32. Actividad lítica en zimograma de *M. lysodeikticus* de proteínas recombinantes empleadas de manera independiente en comparación con la preparación semipurificada donde copurifican ambas proteínas nativas. Zimograma (SDS-PAGE 10%). Carril M: Marcador molecular High Range (Bio-Rad). Carril 1: Proteína recombinante de 110 kDa en *E. coli* BL21. Carril 2: Proteína recombinante de 99 kDa en *E. coli* BL21 (García-Cano, comunicación personal). Carril 3: Preparación donde copurificaron ambas proteínas (99 y 110 kDa) (Tomado y modificado de García-Cano *et al.*, 2011). Tinción con azul de metileno.

El hecho de que la proteína recombinante de 110 kDa presente actividad lítica no se puede explicar con la información disponible a la fecha. Los análisis bioinformáticos obtenidos de las bases de datos por comparación de la estructura primaria coinciden en que el rasgo más notable de la proteína de 110 kDa es la presencia de una zona homóloga a un transportador ABC. No se encuentran regiones que sean características de muramidasa o amidasa, que explicarían la presencia de actividad lítica. Las amidasa se caracterizan por tener residuos conservados de cisteína, histidina y ácido aspártico los cuales son aparentemente esenciales para la catálisis (Rigden *et al.*, 2003), sin embargo, la proteína recombinante no contiene cisteína. En tanto que en

algunas peptidasas, se han reportado regiones que sólo contienen ácido aspártico y glutámico, presentes en la zona de la proteína que no es similar a transportador.

Se decidió utilizar el programa YASARA (Krieger *et al.*, 2002) para realizar una homología de modelado o modelado comparativo que tiene como objetivo construir modelos tridimensionales de la estructura de las proteínas utilizando estructuras determinadas experimentalmente, de proteínas de familias relacionadas, como moldes y parámetros que permiten definir la relación entre el modelo obtenido y la proteína real que más se parece a dicho modelo.

El resultado del modelado comparativo se muestra en la Figura 33, donde la región en amarillo es la que tiene una mayor probabilidad de tomar esa conformación en la proteína real. En la construcción del modelo se alineó el 49.1 % de los residuos de la proteína recombinante con los residuos utilizados como moldes (523 de 1065 aa). Entre estos alineamientos de residuos, la identidad de la secuencia fue del 14.7 % y la similitud del 33.8 %, con un valor Z final para el modelo de -1.230, lo cual se considera como satisfactorio, dado que mientras más cercano a cero sea el valor Z el modelado es mejor.

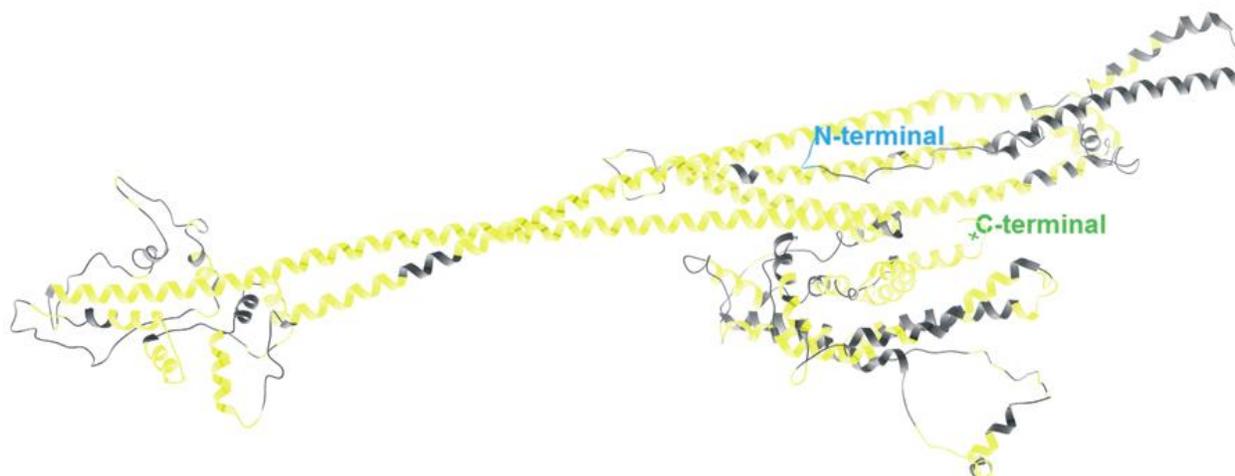


Figura 33. Modelo diseñado mediante YASARA, utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante de 110 kDa. El modelo construido tiene una mayor probabilidad de semejanza con la estructura obtenida experimentalmente de la Colicina la, principalmente en la región transmembranal.

La comparación en las bases de datos de estructuras de proteínas obtenidas experimentalmente indica que el modelo es semejante a la Colicina Ia, con una cobertura del 52 %, un puntaje de alineamiento de 56 y un valor E (BLAST) del 0.22. Las colicinas son proteínas tóxicas generadas por algunas cepas de *E. coli*, se producen en grandes cantidades y en general son secretadas a través de la membrana al medio extracelular. Se unen a receptores en la membrana externa que permiten su translocación a la membrana citoplasmática, donde ejercen su efecto citotóxico incluyendo la despolarización de la membrana citoplasmática, en algunos casos por actividad nucleasa en el citoplasma o por degradación del peptidoglucano (Lazdunski, 1988; Jakes y Finkelstein, 2010).

El modelo generado permitió obtener una idea más clara acerca de la posible naturaleza de la actividad lítica sobre peptidoglucano de la proteína recombinante, que inicialmente se consideraba como una proteína transmembranal con una región homóloga a un transportador ABC, lo cual no permitía explicar su actividad lítica. Sin embargo, es importante resaltar que los modelos presentan suposiciones que deben ser esclarecidas experimentalmente por completo para conocer la estructura y función real de la proteína de interés.

La actividad lítica sobre peptidoglucano que presenta la proteína recombinante de 110 kDa, es un resultado muy interesante, porque pese a los análisis bioinformáticos y modelos estructurales, no se puede determinar claramente su naturaleza. Además, el hecho de que los fragmentos de la proteína recombinante de 110 kDa presenten actividad lítica reproducible y al parecer específica, conduce al problema de determinar cuál es el fragmento mínimo que presenta esta actividad, así como buscar qué tipo de actividad lítica sobre peptidoglucano posee.

VII. CONCLUSIONES

El gen de la proteína de 110 kDa se logró clonar en el vector pET-22b(+) y se expresó en *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pLysS.

En la detección de la actividad lítica sobre el peptidoglucano de *M. lysodeikticus*, de la proteína recombinante se observaron dos bandas tenues de 101 y 80 kDa que corresponden en tamaño con las detectadas mediante el inmunoanálisis.

El sobrenadante del cultivo de la cepa *E.coli* BL21 pLysS en la que se expresó la proteína recombinante de 110 kDa, presentó un efecto inhibitorio sobre *M. lysodeikticus* y *S. aureus*, así como una actividad lítica sobre el peptidoglucano de la pared celular de ambos microorganismos.

La proteína de 110 kDa tuvo actividad lítica sobre peptidoglucano al ser clonada y expresada de forma independiente, que se retiene en fragmentos de menor tamaño, generados por rupturas, aparentemente, en puntos específicos y reproducibles.

VIII. PERSPECTIVAS

Optimizar las condiciones de expresión del gen que codifica a la proteína de 110 kDa.

Purificar y caracterizar la proteína recombinante de 110 kDa.

Identificar el efecto antibacteriano de la proteína recombinante de 110 kDa

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Atanassova M., Choiset Y., Dalgalarrrondo M., Chobert J., Dousset X., Ivanova I. and Haertlé T. (2003). Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* strain M3. *International Journal of Food Microbiology* 83:63-73.
- Baneyx F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 10:411-421.
- Baneyx F. and Mujacic M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* 22:1399-1408.
- Bateman A. and Rawlings N. (2003). The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. *TRENDS in Biochemical Sciences* 5:234-237.
- Biemans-Oldehinkel E., Doeven M. and Poolman B. (2006). ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Letters* 580:1023-1035
- Briers Y., Miroshnikov K., Chertkov O., Nekrasov A., Mesyanzhinov V., Volckaert G. and Lavigne R. (2008). The structural peptidoglycan hydrolase gp181 of bacteriophage ϕ KZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374:747-751.
- Borysowski J., Weber-Dabrowska B. and Górski A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Society for Experimental Biology and Medicine* 366-377.
- Bourgeois I., Camiade E., Biswas R., Courtin P., Gibert L., Götz F., Chapot-Chartier M., Pons J. and Pestel-Caron M. (2009). Characterization of AtIL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with *N*-acetylglucosaminidase and *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters* 290:105-113.
- Bukhtiyarova M., Yang R. and Ray B. (1994). Analysis of pediocin AcH gene cluster from plasmid pSMB74 and its expression in a pediocin-negative *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* 60:3405-3408.

-
- Buyong N., Kok J. and Luchansky J. (1998). Use of genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 64:4842-4845.
 - Cabeza-Herrera E. A. (2006). Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctica y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo". Universidad Libre. Barranquilla, Colombia. pp. 1-2.
 - Callewaert L., Walmagh M., Michiels C. and Lavigne R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology* 22:164-171.
 - Caplice E. and Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50:131-149.
 - Carroll S., Hain T., Technow U., Darji A., Pashalidis P., Joseph S. and Chakraborty T. (2003). Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology* 185(23):6801-6808.
 - Cheng Q., Nelson D., Zhu S. and Fischetti V. (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:111-117.
 - Chikindas M., Venema K., Ledebøer A., Venema G. and Kok J. (1995). Expression of lactococcin A and pediocin PA-1 in heterologous hosts. *Letters in Applied Microbiology* 21(3):183-189
 - Choi S., Esaki N., Yoshimura T. and Soda K. (1991) Overproduction of glutamate racemase of *Pediococcus pentosaceus* in *Escherichia coli* clone cells and its purification. *Protein expression and purification* 2:90-93.
 - Cotter P. D., Hill C. and Ross R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3:777-788.
 - Davidson A. and Chen J. (2004). ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annual Reviews of Biochemistry* 73:241-268.

-
- De Vuyst L. and Vandamme E. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. Ed. Blackie Academic and Professional. Inglaterra. pp. 107-125.
 - Deng L. L., Humphries D. E., Arbeit R. D., Carlton L. E., Smole S. C. and Carroll J. D. (2005). Identification of a novel peptidoglycan hidrolase CwIM in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1747:57-66.
 - Donovan D., Dong S., Garrett W., Rousseau G., Moineau S. and Pritchard D. (2006). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology* 4:2988-2996.
 - Feilmeier B., Iseminger G., Schroeder D., Webber H. and Phillips G. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182:4068–4076.
 - Fedorov T. V., Surovtsev V. I., Pletnev V. Z., Borozdina M. A. and Gusev V. V. (2003). Purification and some properties of Lysostaphin, a glycyglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus. *Biochemistry (Moscow)* 68:61-65.
 - Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J. and Coffey A. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs* 1:9-16.
 - Fischetti V. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology* 11:393-400.
 - Fischetti V. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology* 300:357-362.
 - Frankel M., Hendrickx A., Missiakas D., Schneewind O. (2011). LytN, a murein hydrolase in the cross-wall compartment of *Staphylococcus aureus*, is involved in proper bacterial growth and envelope assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 286:32593-32605.
 - Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2951-2958.

-
- García P., Martínez B., Rodríguez L. and Rodríguez A. (2010a). Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 141:151-155.
 - García P., Rodríguez L., Rodríguez A. and Martínez B. (2010b). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology* 21:373-382.
 - García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernández G. and Farrés A. (2011). Detection and localization of two lytic enzymes in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology* 3:607-615.
 - Hett E., Chao M., Deng L. and Rubin E. (2008). A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathogens* 4:1-8.
 - Higgins C. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism –an overview. *Research in Microbiology* 152:205-210.
 - Holland K. and Holland B. (2005). Adventures with ABC-proteins: Highly conserved ATP-dependent transporters. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 52(3-4):309-322.
 - Horn N., Martinez M., Martinez J., Hernandez P., Gasson M., Rodriguez J. and Dodd H. (1998). Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococin A secretory apparatus. *Applied and Environmental Microbiology* 64:818-823.
 - Humann J. and Lenz L. (2009). Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *Journal Innate Immunology* 1:88-97.
 - Inagaki N., Iguchi A., Yokoyama T., Yokoi J., Ono Y., Yamakawa A., Taketo A. and Kodaira K. (2009). Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: mutational and biochemical analyses. *Gene* 447:61-71.
 - Jakes K. and Finkelstein A. (2010). The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Molecular Microbiology* 75(3):567-578.
 - Johnsen L., Fimland G. and Nissen-Meyer J. (2005). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the

- C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *The Journal of Biological Chemistry* 280(10):9243-9250.
- Jones P., O'Mara M. and George A. (2009). ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences* 34:520-531.
 - Karska-Wysocki B., Bazo M. and Smoragiewicz W. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research* 165:674-686.
 - Krieger E, Koraimann G and Vriend G (2002). Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field. *Proteins* 47:393–402.
 - Lazdunski C. (1988). Pore-forming colicins: synthesis, extracellular release, mode of action, immunity. *Biochimie* 70:1291-1296.
 - Leclerc D. and Asselin A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology* 35:749-753.
 - Licht A. and Schneider, E. and (2011). ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology* 6:785-801.
 - Llorente-Bousquets A. (2008). Caracterización de la actividad antibacteriana de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM
 - Llorente-Bousquets A., Pérez-Munguía S. and Farrés A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Canadian Journal of Microbiology* 54:694-699.
 - Loeffler J., Nelson D. and Fischetti V. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 294:2170-2172.
 - Loeffler J., Djurkovic S. and Fischetti V. (2003). Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infection and Immunity* 71:6199-6204.
 - Loessner M. (2005) Bacteriophage endolysins current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology* 8:480-487.

-
- Lortal S., Valence F., Bizet C. and Maubois J. L. (1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Research in Microbiology* 148:461-474.
 - Lortal S. and Chapot-Chartier M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal* 15:857-871.
 - Marugg J., Gonzalez C., Kunka B., Ledebøer A., Pucci M., Toonen M., Walker S., Zoetmulder L. and Vandenberg P. (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, and bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and Environmental Microbiology* 58:2360-2367
 - Maestro N., Novaková L., Heseck D., Lee M., Leyva E. Mobashery S., Sanz J. and Branny P. (2011). Recognition of peptidoglycan and β -lactam antibiotics by the extracellular domain of the Ser/Thr protein kinase from *Streptococcus pneumoniae*. *FEBS Letters* 585:357-363.
 - Magnusson J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Ph. D. dissertation. Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 3-10.
 - Mahony J., McAuliffe O., Ross P. and van Sinderen D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology* 22:157-163.
 - Manoharadas S., Witte A. and Bläsi U. (2009). Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biotechnology* 139:18-123.
 - McGrawth S. and Van Sinderen D. (2007). Bacteriophage. Genetics and Molecular Biology. Editorial Caister Academic Press. pp. 19-20
 - McKay L. and Baldwin K. (1990). Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 87:3-14.
 - Moellering R. (2011). Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37:2-9.
 - Moon Gi-S., Pyun Yu-R and Wang J. (2006). Expression and purification of a fusion-typed pediocin PA-1 in *Escherichia coli* and recovery of biologically active pediocin PA-1. *International Journal of Food Microbiology* 108:136-140.

- Mora D., Parini C., Fortina M. G. and Manachini P. L. (1998). Discrimination among pediocin ACh/PA-1 producer strains by comparison of *pedB* and *pedD* amplified genes and by multiplex PCR assay. *Systematics and Applied Microbiology* 21:454-460.
- Mora D., Musacchio F., Fortina M. G., Senini L. and Manachini P. L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 94:561-570.
- Murray R. P., Rosenthal S. K. and Pfäuer A. M. (2006). Microbiología Médica. Elsevier. España. pp. 11-47.
- Nagel R. (2007). La resistencia de las bacterias a los antibióticos. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos. CONICET. Tomado de <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/15regulacion.htmtecnologia/2007/07/24/28327.php> (consultado 11 de junio de 2010).
- Navarre W. and Schneewind O. (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63:174-229.
- Nes I., Diep D., Havarstein L., Brurberg M., Eijsink V., and Holo H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70:113-128.
- Novagen (2006). pET System Manual, 11a Edición. Estados Unidos
- Obeso J., Martínez B., Rodríguez A. and García P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 128:211-8
- Olrichs N., Aarsman M., Verheul J., Arnusch C., Martin N., Hervé M., Vollmer W., de Krujiff B., Breukink E. and den Blaauwen T. (2011). A novel in vivo cell-wall labeling approach sheds new light on peptidoglycan synthesis in *Escherichia coli*. *ChemBioChem*. 12:1124-1133.
- Oshida T., Sugai M., Komatsuzawa H., Hong Y., Suginaka H. and Tomasz A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo- β -N-acetylglucosaminidase domain: Cloning, sequence analysis, and characterization. *Microbiology* 92:285-289.

-
- Osmanağaoğlu O., Beyatli Y. and Gündüz U. (2000). Cloning and expression of a plasmid-linked pediocin determinant trait of *Pediococcus acidilactici* F. *Journal of Basic Microbiology* 40(1):41-49.
 - Østlie H. M., Vegarud G. and Langsrud T. (2007). Autolysis of propionibacteria: detection of autolytic enzymes by renaturing SDS-PAGE and additional buffer studies. *International Journal of Food Microbiology* 117:167-174.
 - Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R. and Lan C. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13.
 - Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009) ABC transporters: The power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10:218–227.
 - Rigden D., Jedrzejas M. and Galperin (2003). Amidase domains from bacterial and phage autolysins define a family of g-D, L-glutamate-specific amidohydrolases. *TRENDS in Biochemical Sciences* 28:230-234.
 - Roger Y. S., Ingraham L. J., Wheelis L. M. and Painter R. P. (1996). Microbiología. España. Editorial Reverté. pp. 161-176, 533-536.
 - Salminen S., Von Wright A. and Ouwehand A. (2004). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Editorial Marcel Dekker. 3ra edición. E.U.A. pp. 5-24, 375-387.
 - Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71:394-406.
 - Schlag M., Biswas R., Krismer B., Kohler T., Zoll S., Yu W., Schwarz H., Peschel A. and Götz F. (2010). Role of staphylococcal wall teichoic acid in targeting the major autolysin. *Molecular Microbiology* 75:864-873.
 - Scheurwater E., Pfeffer J. and Clarke A. (2007). Production and purification of bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification* 56:128-137.
 - Sham L., Barendt S., Kopecky K. and Winkler M. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsX_{Spn} cell division protein in

Streptococcus pneumoniae D39. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: E1061-E1069.

- Sitkin B. V., Lysanskaya V. Y., Tsfasman I. M., Stepnaya O. A. and Kulaev I. S. (2003). The structure of peptidoglycan from *Lysobacter* sp., a producer of extracellular bacteriolytic enzymes. *Microbiology* 72:118-119.
- Smith T. J., Blackman S. A. and Foster S. J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146:249-262.
- Steen A., Palumbo E., Deghorain M., Cocconcelli P., Delcour J., Kuipers O., Kok J., Buist G. and Hols P. (2005). Autolysis of *Lactococcus lactis* is increased upon D-Alanine depletion of peptidoglycan and lipoteichoic acids. *Journal of Bacteriology* 187:114-124.
- Sugai M. (1997). Peptidoglycan hydrolases of Staphylococci. *Journal of Infection and Chemotherapy* 3:113-127.
- Sun B., Wang G., Xie H., Gao Q. and Nie P. (2006). Gene structure of goose-type lysozyme in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* with analysis on the lytic activity of its recombinant in *Escherichia coli*. *Aquaculture* 252:106-113.
- Supungul P., Rimphanitchayakit V., Aoki T., Hirono I. and Tassanakajon A. (2010). Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology* 28:490-498.
- Uehara T., Parzych K., Dinh T. and Bernhardt T. (2010) Daughter cell separation is controlled by cytokinetic ring-activated cell wall hydrolysis. *EMBO J* 29:1412–1422.
- Valenzuela-Rosas A. (2012). Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Velasco-Pérez L. (2010). Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM
- van Heijenoort J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11: 25R-36R.

-
- Vollmer W. and Bertsche U. (2008a). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778:1714-1734.
 - Vollmer W., Joris B., Charlier P. and Foster S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews* 32:259-286.
 - Wang, I.-N., Smith, D.L., Young, R., (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Reviews of Microbiology* 54:799–825.
 - Wood B. J. B. (1992). The lactic acid bacteria in health and disease. *Elsevier Applied Science* 211-225.
 - Yang D., Peters N., Parzych K., Uehara T., Markovski M. and Bernhardt T. (2011). An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 45:E1052-E1060.
 - Yoong P., Schuch R., Nelson D. and Fischetti V. (2004). Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology* 186:4808-4812.
 - Young, J. and Holland I. (1999). ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1461:177-200.
 - Zimmer M., Vukov N., Scherer S. and Loessner M. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5311-5317.
 - Zou Y. and Hou C. (2010). Systematic analysis of an amidase domain CHAP in 12 *Staphylococcus aureus* genomes and 44 staphylococcal phage genomes. *Computational Biology and Chemistry* 34:251-257.