



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS DE  
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
CARLOS EDUARDO SERRANO MALDONADO**

**TUTOR PRINCIPAL:  
DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. AGUSTÍN LÓPEZ MUNGUÍA CANALES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**MÉXICO, D. F. JUNIO, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# CARACTERIZACIÓN DE PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA

## **Jurado asignado:**

<u>Presidente:</u>	Dr. Ismael Bustos Jaimes	Fac. Medicina, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dr. Dimitris Georgellis	I. Fisiología Celular, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dr. Francisco Ruíz Terán	Fac. Química, UNAM.
<u>Vocal:</u>	Dra. Clarita Olvera Carranza	I. Biotecnología, UNAM.
<u>Secretario:</u>	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Fac. Química, UNAM.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 312 del Conjunto E, departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch.

Los miembros del Comité Tutor fueron:

Dr. Agustín López Munguía Canales	I. Biotecnología, UNAM.
Dr. Guillermo Aguilar Osorio	Fac. Química, UNAM.

## **Reconocimientos**

A la Dra. Patricia Coello Coutiño y a la Dra. Vanessa Maya Ampudia, por su colaboración y asesoría para realizar la electroforesis en dos dimensiones.

Al Dr. Guillermo Mendoza, por su apoyo y asesorías en la identificación de proteínas mediante LC/MS-MS.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Al PAPIIT IN230511 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto.

---

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch  
TUTOR

---

Carlos Eduardo Serrano Maldonado  
SUSTENTANTE

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme de la mejor manera, no sólo como estudiante, sino como persona.

A la Facultad de Química por todo lo que he aprendido y porque ahora tengo la oportunidad de regresar parte de lo que aprendí dentro de ella.

A la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por darme la oportunidad de desarrollar este maravilloso proyecto y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

A Isra, Manuel, Mariana, Stef, Eva, Ales, José Luis y Páez, porque son como mi familia y pasamos muchos momentos muy buenos. Hacen que el tiempo en el laboratorio sea mejor y siempre sigo aprendiendo con ustedes.

A los demás integrantes del laboratorio 312: Sergio, Brenda, Augusto, Erick, Caro, Dra. Amelia, don Rodri y aquéllos que no nombré.

A mis tíos Paco, Chela, José y Silvia porque siempre están al pendiente e interesados por sus sobrinos y porque se enorgullecen de nuestros logros.

A mis hermanos, Alex y Pepita, por estar conmigo siempre, todo su apoyo y porque hemos llevado un paso muy fuerte que nos ha llevado a lograr grandes cosas.

A mis papás, Laura y Eduardo, por todo su cariño, apoyo y comprensión. Porque han formado a una persona de bien y porque siguen dándome todo para que alcance mis metas. Los quiero mucho.

A Myrna porque siempre estás a mi lado, porque hemos compartido muchos momentos increíbles, sonrisas y triunfos. Eres mi motivación para dar siempre lo mejor de mí. Eres mi vida.

# Índice

1	Resumen.....	7
2	Marco teórico.....	9
2.1	Bacterias ácido lácticas.....	9
2.1.1	El género <i>Enterococcus</i> .....	9
2.1.2.	Aplicaciones de las BAL.....	9
2.2	Peptidoglucano hidrolasas.....	10
2.3	Caracterización de peptidoglucano hidrolasas producidas por bacterias del género <i>Enterococcus</i> .....	12
2.4	Glicosilación de proteínas en procariontes.....	13
3	Antecedentes del grupo de trabajo.....	14
3.1	Bacterias aisladas del queso Cotija con actividad antibacteriana.....	14
3.2	Identificación de los compuestos con actividad antibacteriana.....	16
4	Justificación.....	18
5	Hipótesis.....	18
6	Objetivos.....	18
6.1	Objetivo general.....	18
6.2	Objetivos particulares.....	18
7	Metodología.....	19
7.1	Plan de trabajo.....	19
7.2	Identificación de la cepa por métodos moleculares.....	20
7.2.1	Extracción de ADN.....	20
7.2.2	Amplificación de las regiones del gen ribosomal 16S y secuenciación....	20
7.3	Electroforesis en gel nativo.....	22
7.4	Electroforesis en dos dimensiones.....	23
7.5	Prueba de glicosilación.....	24
7.6	Incremento de las condiciones desnaturalizantes.....	25
7.7	Clonación de las peptidoglucano hidrolasas.....	25
7.7.1	Identificación y secuenciación de los genes.....	26
7.7.2	Amplificación de fragmentos internos para conocer la secuencia completa.....	28

7.7.3	Amplificación de los genes para su clonación .....	29
7.7.4	Clonación y expresión de las proteínas en <i>Escherichia coli</i> .....	31
7.7.4.1	Preparación de células competentes .....	32
7.7.4.2	Doble digestión.....	33
7.7.4.3	Ligación .....	33
7.7.4.4	Transformación .....	34
7.7.4.5	Expresión .....	35
7.7.4.6	Western blot .....	36
7.8	Purificación de las enzimas recombinantes .....	36
7.9	Caracterización de las enzimas recombinantes .....	37
7.9.1	Especificidad por sustrato.....	37
7.9.1.1	Actividad de muramidasa .....	37
7.9.1.2	Actividad de glucosaminidasa .....	37
7.9.1.3	Actividad de endopeptidasa.....	38
7.9.2	Temperatura óptima de actividad .....	38
7.9.3	Resistencia a tratamientos térmicos.....	39
7.9.4	Actividad a diferentes valores de pH .....	39
7.9.5	Influencia de la fuerza iónica.....	39
7.9.6	Influencia de inhibidores y activadores .....	40
8	Resultados .....	41
8.1	Identificación de las cepas por métodos moleculares.....	41
8.2	Detección de formación de oligómeros mediante electroforesis nativa.....	43
8.3	Electroforesis en dos dimensiones.....	44
8.4	Prueba de glicosilación .....	46
8.5	Incremento de las condiciones desnaturizantes.....	47
8.6	Análisis de las secuencias.....	48
8.6.1	Análisis de la secuencia de la proteína P54.....	48

8.6.2	Análisis de la secuencia de la proteína P72.....	52
8.7	Identificación y secuenciación de los genes.....	55
8.8	Clonación.....	62
8.9	Expresión.....	66
8.9.1	Expresión de la proteína P54.....	66
8.9.2	Expresión de la proteína P72.....	69
8.10	Comparación de las proteínas recombinantes con las nativas.....	71
8.11	Caracterización de las proteínas recombinantes.....	72
8.11.1	Especificidad por sustrato.....	72
8.11.1.1	Actividad de muramidasa.....	72
8.11.1.2	Actividad de glucosaminidasa.....	73
8.11.1.3	Actividad de endopeptidasa.....	73
8.11.2	Temperatura óptima.....	73
8.11.3	Estabilidad a tratamientos térmicos.....	75
8.11.4	Actividad a diferentes valores de pH.....	77
8.11.5	Influencia de la fuerza iónica.....	79
8.11.6	Efecto de activadores e inhibidores.....	81
9	Conclusiones.....	83
10	Anexos.....	84
10.1	Anexo 1. Secuencias del ARNr 16S para la identificación de la cepa en estudio. .....	84
11	Bibliografía.....	86

## 1 Resumen

El queso Cotija artesanal es elaborado con leche bronca y sin la adición intencional de cultivos iniciadores, que después de tres meses de maduración presenta una disminución del número de coliformes totales. Esto se puede deber a que durante la maduración del queso se modifican factores como  $a_w$ , pH y acidez, producida por bacterias ácido lácticas, de las cuales, el género *Enterococcus* es importante en este producto. En nuestro grupo de trabajo se aisló una cepa de *Enterococcus faecalis* que produce proteínas extracelulares con actividad antibacteriana. Mediante SDS-PAGE y zimogramas, se determinó el peso molecular de las bandas con actividad lítica contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Micrococcus lysodeikticus*. Al perder actividad por proteólisis enzimática, se demostró su naturaleza proteínica. Se seleccionaron bandas con actividad lítica para su identificación por LC-MS/MS. Una banda de 95 kDa se relacionó con dos peptidoglucano hidrolasas diferentes. La primera fue una *N*-acetilglucosaminidasa de 72 kDa reportada en *E. faecalis* V583, nombrada AtIA. La segunda fue una proteína hipotética de 54 kDa, que corresponde a otra *N*-acetilglucosaminidasa. Para explicar el aumento de peso y la comigración, se eliminó la interacción proteína-proteína, adicionando diferentes agentes reductores; sin embargo, se mantuvo el perfil electroforético y la actividad. Adicionalmente, se determinó que las proteínas activas no estaban glicosiladas mediante el uso de un kit que detecta diferentes tipos de glicosilación.

El objetivo de este trabajo fue la caracterización de dichas proteínas. Para lo cual, se decidió clonar y expresar dichas proteínas en *E. coli*. Adicionalmente, se realizaron análisis en las proteínas nativas. El extracto proteínico extracelular fue purificado parcialmente por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y ácido tricloroacético. No fue posible separarlas por electroforesis en 2D ni mediante el aumento de las condiciones desnaturizantes. Adicionalmente, se realizó una desglicosilación enzimática mediante el uso de dos enzimas que hidrolizan en dos enlaces diferentes; tampoco hubo diferencia en los pesos moleculares. Por lo que se llevó a cabo la secuenciación completa de los genes que codifican para dichas proteínas directamente en la cepa productora y hacer la comparación con lo reportado en bases de datos. Al no existir diferencias, se procedió con la clonación y expresión en *E. coli*. La proteína con peso molecular teórico de 54 kDa se obtuvo con un peso de 80 kDa y la de 72 kDa con un peso de 86 kDa. Se llevó a cabo una caracterización parcial de las enzimas. La de 80 kDa presentó su actividad óptima a pH 6, mantuvo un 50% de la actividad tras un tratamiento de 90°C durante 30 min y en 300 mM de NaCl y presentó actividad de *N*-



acetilglucosaminidasa. La de 86 kDa presentó su actividad óptima a pH 6, mantuvo un 50% de la actividad tras un tratamiento de 70°C durante 30 min y en 500 mM de NaCl y presentó actividad de *N*-acetilglucosaminidasa.

Ambas proteínas recombinantes presentaron actividad por separado; sin embargo, se observaron con un peso molecular mayor al teórico. La proteína de 54 kDa no había sido reportada previamente, lo que representa el aporte de este trabajo.

## **2 Marco teórico**

### **2.1 Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos.

Los principales géneros que conforman al grupo de las BAL son: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Salminen *et al.*, 2004).

#### **2.1.1 El género *Enterococcus***

Los enterococos forman parte de las bacterias ácido lácticas (BAL). Son cocos esféricos u ovoides, Gram positivos, se pueden encontrar solos, en pares o en cadenas cortas (Domig *et al.*, 2003). Los enterococos son anaerobios facultativos y crecen bien en la superficie de medios sólidos expuestos al aire. Sin embargo, no son capaces de sintetizar ATP por medio de la respiración. Su metabolismo es homofermentativo, siguen la vía Embden-Meyerhof-Parnas, resultando en la producción de ácido láctico. El producto final predominante es el enantiómero ácido L(+)-láctico (Garg y Mital, 1991). Su temperatura óptima de crecimiento es de 35°C, pero son capaces de crecer en un rango de entre 10 y 45°C y sobreviven a 60°C al menos 30 minutos. Pueden crecer a pH de 9.6 y en presencia de 6.5% de cloruro de sodio. La mayoría de las especies de enterococos pueden hidrolizar la escualina en presencia de 40% de sales biliares (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Los enterococos no forman esporas, son oxidasa negativos y catalasa negativos, pero algunas cepas pueden exhibir una actividad de pseudo-catalasa (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Su capacidad biosintética es muy limitada. Requieren de vitaminas del complejo B, varios aminoácidos, bases púricas y pirimídicas (Garg y Mital, 1991).

#### **2.1.2. Aplicaciones de las BAL**

Las BAL tienen aplicaciones en la producción de bebidas y alimentos fermentados. Algunas cepas de BAL aportan beneficios a la salud, en su uso como probióticos, en la producción de péptidos bioactivos y como vehículos transportadores de moléculas con valor terapéutico. Pero sin duda, la aplicación más importante es su uso como cultivos iniciadores en varios productos lácteos fermentados (Savijoki *et al.*, 2006), ya que la fermentación de los azúcares lleva a la producción de ácidos orgánicos y a un descenso en el pH, importante en el fenómeno de la coagulación de las proteínas y en la reducción o prevención del crecimiento de microbiota acompañante; participan en la hidrólisis de proteínas, contribuyendo a la textura y sabor final de diferentes productos fermentados; sintetizan compuestos que dan sabor y aroma, como ácidos orgánicos, acetaldehído, diacetilo, acetoína, etc.; sintetizan agentes texturizantes, los

cuales aportan consistencia al producto y producen componentes inhibitorios de otros microorganismos, principalmente patógenos y de descomposición. Además de la producción de ácidos orgánicos, el efecto inhibitorio puede ser causado por la generación de otros compuestos como peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas o peptidoglucano hidrolasas (Moreno *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2004).

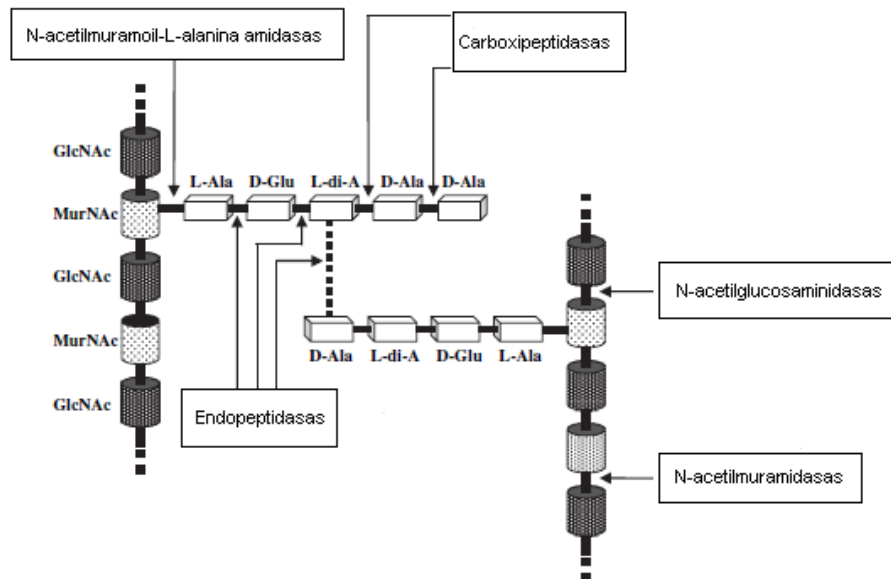
La actividad autolítica de las BAL es un factor importante en algunos productos, principalmente en quesos, debido a que la liberación de enzimas localizadas en el interior de las células, como las proteasas, peptidasas y esterases, permite su acción en los componentes de la leche o en la cuajada, acelerando la maduración y dando lugar al desarrollo de aromas y sabores. En particular, se ha observado que la liberación de peptidasas acelera la producción de aminoácidos, lo que resulta en una disminución en la amargura por la hidrólisis de péptidos hidrofóbicos; además, el catabolismo de los aminoácidos lleva a la formación de aromas. La autólisis es un proceso complejo que envuelve diferentes enzimas que se han clasificado como peptidoglucano hidrolasas (Ouzari *et al.*, 2002; Cibik y Chapot-Chartier, 2004).

## **2.2 Peptidoglucano hidrolasas**

El peptidoglucano (o mureína) es el mayor componente de la pared celular de bacterias. Esta molécula forma una barrera que recubre la membrana plasmática y protege a la célula contra la presión osmótica interna en condiciones hipoosmóticas. El peptidoglucano consiste en cadenas de residuos alternados de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos. Durante todo su crecimiento, las células necesitan romper de manera controlada los enlaces del peptidoglucano. Las enzimas responsables de este proceso son conocidas como peptidoglucano hidrolasas o PGHs (Eckert *et al.*, 2006). Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular. Algunas de estas funciones incluyen la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis, que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes. Algunas PGHs especializadas amplían los poros en el peptidoglucano para el ensamblaje de grandes complejos que atraviesan las envolturas celulares (pili, flagelos, sistemas de secreción), u otras degradan el peptidoglucano durante la esporulación o la germinación. En bacterias patógenas juegan un papel importante en la adhesión y en la amplificación de la respuesta inflamatoria al liberar péptidos. Además, las PGHs están involucradas en los fenómenos de lisis de poblaciones microbianas (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).

La formación de la red del peptidoglucano requiere de la polimerización de las cadenas de glicanos por glucosiltransferasas y el entrecruzamiento con los péptidos cortos por DD-transpeptidasas. Los modelos de polimerización del peptidoglucano predicen que la incorporación de nuevos precursores requiere de una hidrólisis parcial de la red preexistente. La actividad de peptidoglucano hidrolasa es necesaria en la célula para la digestión del septo durante la división y el ensamblaje de estructuras como el pili (Mesnage *et al.*, 2008).

Las PGHs se han clasificado de acuerdo con el tipo de enlace que hidrolizan en el peptidoglucano (Figura 1). Las *N*-acetilmuramoyl-L-alanina amidasas rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas). Las *N*-acetilglucosaminidasas y las *N*-acetilmuramididasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de la cadena de glicanos. Las primeras lo hacen dejando un extremo GlcNAc reductor, mientras que las segundas hidrolizan el enlace entre MurNAc y GlcNAc, pudiendo dejar libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc, conocidas como transglicosilasas líticas (Vollmer *et al.*, 2008; Layec *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Estructura del peptidoglucano y especificidad por sustrato de las PGHs (adaptado de Layec *et al.*, 2008).

Las PGHs pueden ser agrupadas en dos clases de enzimas. En el primer grupo se encuentran las autolisinas, las cuales son secretadas del citoplasma bacteriano por un péptido señal en el extremo N-terminal y degradan el peptidoglucano de la pared celular en sitios específicos durante el desarrollo de la célula. Como las autolisinas son peligrosas para la integridad de la

célula, su expresión o actividad debe estar bien regulada. Una vez producida la PGH, su regulación se lleva a cabo por algunas proteasas asociadas a la pared celular que disminuyen drásticamente su capacidad autolítica. En el segundo grupo se encuentran las endolisinas, que están codificadas en bacteriófagos y son exportadas por holinas (pequeños polipéptidos que se insertan dentro de la membrana citoplasmática de la bacteria hospedera). La función de las endolisinas es la hidrólisis completa de la pared celular para la liberación de los bacteriófagos. La inducción del profago puede ser causada por un agente mutagénico o por estrés ambiental, por ejemplo, choque térmico (Navarre *et al.*, 1999; Lortal y Chapot-Chartier, 2005).

Algunos factores como el pH, la temperatura, concentración de sal y la fuente de carbono tienen una influencia en el proceso de autólisis. El grado de autólisis depende de cada cepa, pero el proceso normalmente empieza después de la fase exponencial de crecimiento. Como se mencionó anteriormente, esta actividad autolítica es importante en la maduración de los quesos, ya que permite la liberación al exterior de enzimas como las peptidasas. Con el fin de entender y, en determinado momento, poder controlar la autólisis es necesaria la identificación y la caracterización de las enzimas involucradas en este fenómeno (Cibik *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003); además de su evaluación para su posible aplicación como conservadores en alimentos.

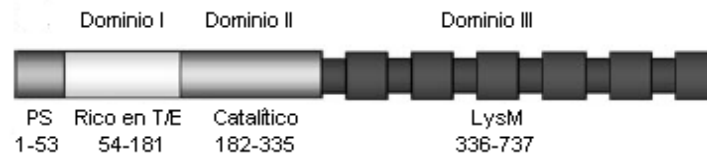
### **2.3 Caracterización de peptidoglucano hidrolasas producidas por bacterias del género *Enterococcus***

Se han caracterizado peptidoglucano hidrolasas de BAL, entre ellas, algunas del género *Enterococcus*. *Enterococcus hirae* tiene dos hidrolasas autolíticas: la muramidasa-1, que es una  $\beta$ -1,4-*N*-acetilmuramidasa con una forma activa de 87 kDa (Dolinger *et al.*, 1988), y la muramidasa-2, que tiene dos formas activas, una de 125 kDa y otra de 75 kDa (Dolinger *et al.*, 1989). La muramidasa-1 se sintetiza como zimógeno y necesita una proteólisis para su activación. La muramidasa-2 tiene dos o posiblemente tres dominios con actividad de glicosaminidasa cerca del extremo amino terminal y seis secuencias repetidas de 45 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal que están involucradas en la unión al peptidoglucano (Shockman, 1992).

Por otra parte, el genoma de *Enterococcus faecalis* codifica para 20 peptidoglucano hidrolasas, de las cuales 6 son glucosaminidasas, 7 muramidasas, 2 amidasas, 2 endopeptidasas y 3 proteínas relacionadas con transglicosilasas líticas. De todas ellas se han estudiado solamente tres. La primera fue la AtlA, la cual muestra actividad de *N*-acetilglucosaminidasa. Posteriormente se identificaron dos autolisinas adicionales: la AtlB y la AtlC, que muestran una actividad de *N*-acetilmuramidasa (Mesnage *et al.*, 2008).

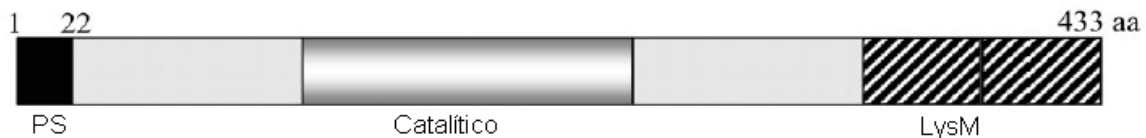
AtlA es la peptidoglucano hidrolasa de *E. faecalis* más abundante. Esta enzima de tres dominios (Figura 2) está compuesta por un dominio rico en treonina y ácido glutámico (rico en

T/E) en el extremo amino terminal cuya función se desconoce (dominio I), un dominio catalítico central (dominio II) y un dominio de unión a la pared celular formado por seis módulos LysM (dominio III). Se traduce como una proteína de 737 aminoácidos; sin embargo, posee un péptido señal que va del aminoácido 1 al 53. La proteína madura tiene un peso molecular de 72 kDa, pero adicionalmente presenta otra forma activa de 62 kDa, que se deriva al perder el dominio I. El dominio de unión al peptidoglucano es muy importante para que la enzima presente su actividad, cuyas condiciones óptimas son a una temperatura de 37°C y un valor de pH de 7 (Eckert *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Organización de dominios de AtIA (adaptado de Eckert *et al.*, 2006).

AtIB y AtIC poseen pesos moleculares de 50 y 47 kDa respectivamente. Presentan una secuencia de aminoácidos prácticamente idéntica, sólo que AtIB está compuesta por 433 aminoácidos y AtIC por 413. Ambas presentan un péptido señal, un dominio catalítico con actividad de *N*-acetilmuramidasa y un dominio de unión a la pared celular (Figura 3; Mesnage *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Organización de dominios de AtIB (adaptado de Mesnage *et al.*, 2008).

## 2.4 Glicosilación de proteínas en procariontes

Como parte de una caracterización completa de una proteína, es posible incluir la búsqueda de modificaciones postraduccionales. Una de ellas es la glicosilación de la proteína, que, entre otras cosas, hace que se incremente su peso molecular. Aunque las glicoproteínas están ampliamente distribuidas en células eucariontes, en procariontes aparentemente son raras. La idea de que las bacterias no glicosilan proteínas ha sido motivo de discusión por mucho tiempo, pero se han dado varios reportes en los últimos años de glicoproteínas producidas por bacterias. La evidencia experimental de la naturaleza de las glicoproteínas no siempre es clara y convincente, en algunos casos puede arrojar resultados incorrectos. Esto es debido a la abundancia de glicanos en la pared celular de las bacterias, unión a lectinas o tinción con ácidos de Schiff, incluso después de una SDS-PAGE, causado por una asociación fuerte pero

no covalente con azúcares. La prueba final es la identificación del enlace entre el aminoácido y el azúcar.

Todas las glicoproteínas de procariontes reportadas pueden ser clasificadas en cinco grupos, dependiendo de su localización. Éstos incluyen: i) las glicoproteínas de la capa superficial, aquéllas presentes en la monocapa más externa de la envoltura celular, como la proteína de la capa S de *Lactobacillus buchneri*; ii) las glicoproteínas asociadas a la membrana, aquéllas que están distribuidas al interior o al exterior de la membrana y en el periplasma, por ejemplo, el antígeno C de *Streptococcus salivarius*; iii) glicoproteínas asociadas a la superficie celular, aquéllas asociadas a pili o flagelos, como la pilina tipo A de *Pseudomonas aeruginosa*; iv) glicoproteínas secretadas y exo-enzimas, por ejemplo, una autolisina de *Clostridium acetobutylicum* y una muramidasa de *Enterococcus faecium*; y v) glicoproteínas celulares, cuya localización dentro de la célula es incierta o no específica, como una prototoxina de *Bacillus thuringensis* subsp. *kurstaki* (Upreti *et al.*, 2003).

Las glicoproteínas pueden desempeñar distintas funciones en procariontes. Pueden participar en la patogenicidad de bacterias. Varios reportes han demostrado que la glicosilación altera la inmunogenicidad inhibiendo la presentación al complejo mayor de histocompatibilidad de péptidos individuales a las células T. Pueden facilitar la adhesión y actuar como antifagocíticos. Glicoproteínas en la superficie celular pueden estar involucradas en interacciones célula-célula entre bacterias y eucariontes. Es posible que los glicanos en enzimas faciliten la interacción con el sustrato. Las glicoproteínas de superficie son importantes para dar y mantener la forma de la bacteria (Upreti *et al.*, 2003).

Dentro de las proteínas glicosiladas reportadas en procariontes se encuentra una muramidasa (peptidoglucano hidrolasa) producida por *Streptococcus faecium* (ahora *Enterococcus faecium*), con ramificaciones de glucosa unidas por enlaces O-glucosídicos. La enzima se observa con un peso de 130 kDa en SDS-PAGE, pero también presenta una forma activa de 87 kDa (Kawamura y Shockman, 1983). Esto es un ejemplo de una enzima glicosilada con actividad similar a las estudiadas en este trabajo.

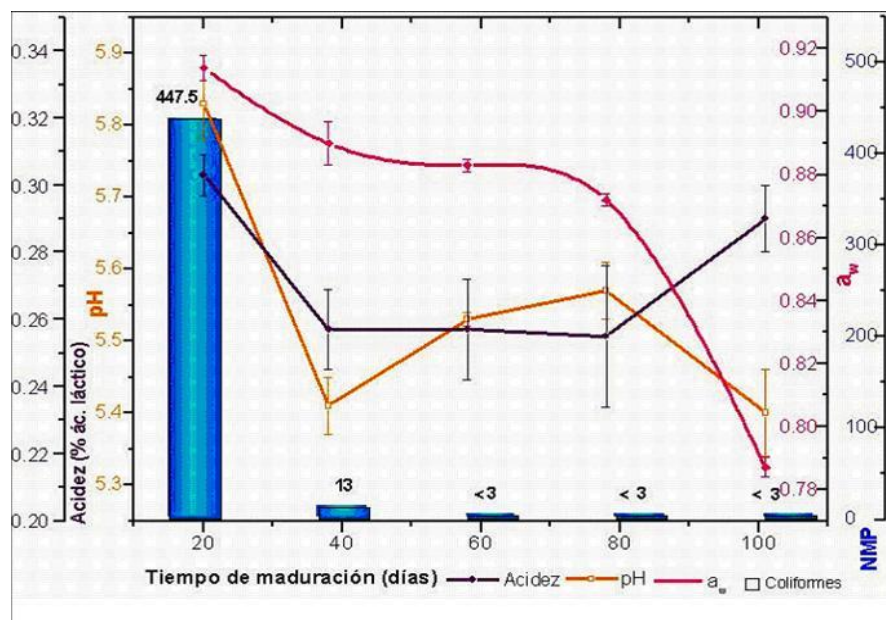
### **3 Antecedentes del grupo de trabajo**

#### **3.1 Bacterias aisladas del queso Cotija con actividad antibacteriana**

El queso Cotija se elabora de manera artesanal desde hace más de 400 años. Es un queso de gran formato pues se produce en voluminosas piezas cilíndricas de 22 kg en promedio, de pasta firme, prensada y friable. Es nombrado así por la ciudad de Cotija de la Paz en el estado de Michoacán, donde se ha comercializado tradicionalmente. La zona está ubicada en la sierra Jalmich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán. El queso Cotija se produce a partir de leche entera y bronca que proviene de ganado cebú o criollo que se alimenta en pastoreo libre.

En ninguna etapa de la elaboración sufre algún tratamiento térmico como la pasteurización, ni se adicionan cultivos iniciadores de manera intencional. El queso Cotija, cuando es el auténtico madurado, tiene un mínimo de tres meses de almacenamiento dentro del lugar que se produce antes de ser comercializado, por lo que desarrolla aromas, olores y sabores característicos intensos (Álvarez-Barajas *et al.*, 2005; Cervantes-Escoto *et al.*, 2008; Bravo-Mendoza, 2008).

Por otra parte, Bravo-Mendoza en el 2008 reportó una disminución de más del 95% de la población inicial de coliformes en muestras de queso Cotija después de 60 días de maduración (Figura 4). Esta disminución tan drástica puede deberse, en parte, a factores fisicoquímicos que se ven modificados durante este tiempo, como lo son el pH, la acidez y la actividad acuosa ( $a_w$ ). Sin embargo, este efecto puede deberse también a la producción de metabolitos inhibidores generados por el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en el queso. En el mismo trabajo se aislaron 9 cepas, nombradas con las letras de la A a la I, de quesos de diferentes productores. En estudios posteriores realizados por Hernández-Alcántara (2010), se encontró que algunas de estas cepas presentaban actividad antibacteriana extracelular contra microorganismos indicadores como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Esta actividad extracelular se produjo en medio MRS. Los resultados fueron observados mediante una prueba de difusión en agar, en la que se aplicó el sobrenadante de la fermentación libre de células, neutralizado y concentrado por liofilización. También encontró que el tiempo al cual hubo una mayor inhibición de los microorganismos indicadores fue cuando las cepas en estudio se encontraban en la fase estacionaria temprana de crecimiento (Figura 5). Estas cepas de BAL fueron identificadas por pruebas bioquímicas.



**Figura 4.** Resultados fisicoquímicos del queso Cotija, comparados con la cuenta de coliformes (tomado de Bravo-Mendoza, 2008).





**Figura 5.** Actividad inhibitoria del extracto extracelular de una cepa de BAL (F) aislada del queso Cotija frente a *S. aureus*, a distintos tiempos de fermentación (Hernández-Alcántara, 2010).

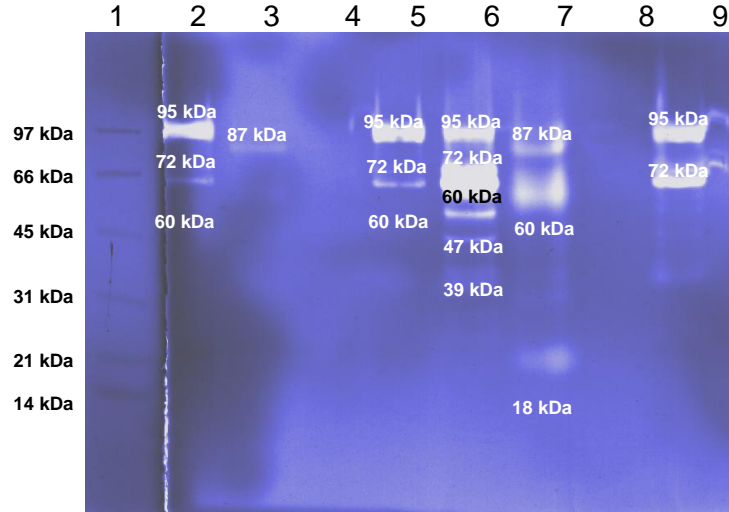
Posteriormente, Matamoros-Ortega (2010) observó que los extractos extracelulares semipurificados mediante una precipitación con sulfato de amonio al 40% (p/v) de algunas de las cepas aisladas del queso Cotija presentaban actividad bacteriostática contra los mismos microorganismos indicadores, pero esta vez en un medio lácteo con sal que simulaba la cuajada con la que se elabora el queso.

### 3.2 Identificación de los compuestos con actividad antibacteriana

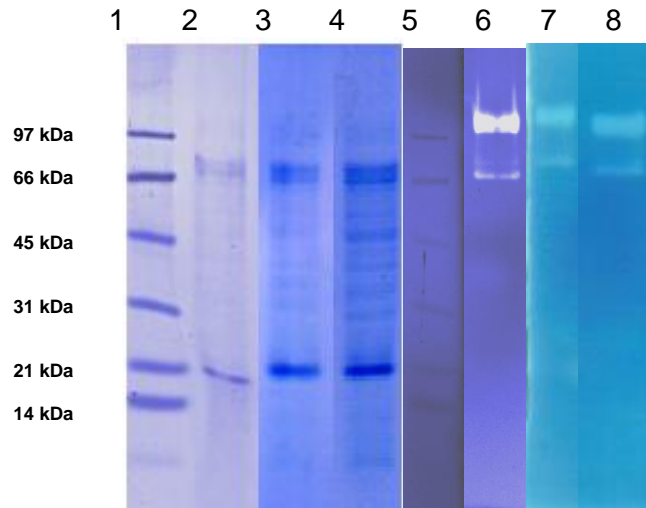
En el trabajo previo a éste (Serrano-Maldonado, 2010) se lograron identificar algunas proteínas con actividad antibacteriana mediante zimogramas y su secuenciación parcial. En la cepa G se identificó una proteína de *Enterococcus faecium* de 87 kDa con una región NplcP60 con actividad de endopeptidasa (Figura 6, carriles 3 y 7). En la cepa F se identificó una proteína de *Enterococcus faecalis* de 60 kDa (Figura 6, carril 6) con una región SCP que participa en la degradación de la pared celular, no se conoce mucho acerca de este tipo de dominios, pero se cree que puede participar en la protección contra patógenos o competidores; también se identificó una banda de 95 kDa con actividad de PGH cuyos péptidos secuenciados presuntamente corresponden a dos *N*-acetilglucosaminidasas de *E. faecalis* que migran juntas al realizar una electroforesis. Al realizar un análisis mediante el algoritmo BLAST, se encontró en las bases de datos que estas dos peptidoglucano hidrolasas tienen pesos moleculares de 54 (GI:29342352) y 74 kDa (GI:29342849); sin embargo, estos pesos no corresponden con lo observado, posiblemente porque se trata de proteínas diferentes. De éstas, la primera es una proteína hipotética y la segunda ya se ha caracterizado (Béliveau *et al.*, 1991; Eckert *et al.*, 2006).

Para tratar de encontrar la razón por la cual el peso molecular teórico y el real no coincidieron, y determinar si la banda de 95 kDa estaba formada por proteínas aglomeradas, se les realizaron tratamientos con agentes reductores fuertes como el ditiotreitól (DTT) y tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) para descartar que se encontraran agregadas por puentes disulfuro;

sin embargo, no fue posible separarlas, se mantuvo el peso molecular y la actividad intacta (Figura 7).



**Figura 6.** Zimograma de actividad lítica celular contra *M. lysodeikticus* de los extractos extracelulares precipitados con TCA 10% (v/v): Cepa 1 (2), Cepa 2 (3), Cepa 3 (4), Cepa 4 (5). Proteína total de 4.8 a 8.4  $\mu$ g. Muestras precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40% (p/v) y TCA 10% (v/v): Cepa 1 (6), Cepa 2 (7), Cepa 3 (8), Cepa 4 (9). Proteína total de 23 a 44  $\mu$ g. Marcador de peso molecular bajo (1). Gel SDS-Tris-Tricina 10% (Serrano-Maldonado, 2010).



**Figura 7.** Perfil electroforético y de actividad lítica de los extractos extracelulares de la Cepa I precipitados con TCA al 10% (v/v) tratados con diferentes agentes reductores. Marcador de peso molecular (1 y 5), 2-mercaptoetanol (2 y 6), TCEP (3 y 7), DTT (4 y 8). Gel SDS-Tris-Tricina 10% (1-4) y zimograma contra *M. lysodeikticus* (5-8). La cantidad de proteína total empleada en cada pozo fue de aproximadamente 10  $\mu$ g (Serrano-Maldonado, 2010).

También se realizó una prueba de glicosilación, encontrándose que algunas proteínas tienen unidas residuos de manosa, pero no son las de interés. La glicosilación pudiera ser aún una

explicación para el aumento en el peso molecular, debido a que no se analizaron todos los tipos de glicosilación de bacterias.

#### **4 Justificación**

Al no poder explicar la diferencia en pesos entre lo observado mediante zimografía y lo reportado en bases de datos, se puede pensar en distintas posibilidades. La primera es que se puede tratar de agregados homogéneos o heterogéneos de proteínas que no se pudieron separar en las condiciones evaluadas. También es posible que se lleve a cabo un procesamiento diferente de las proteínas en la cepa productora respecto a lo reportado previamente. Otra posibilidad es que se trate de una especie o cepa diferente, la cual produce enzimas que no han sido reportadas. Por tal razón, es importante identificar por métodos moleculares (secuenciación de regiones variables del ADNr 16S) la cepa a nivel especie.

Debido a que lo observado no corresponde con lo reportado, se deben realizar estudios para caracterizar las proteínas responsables de la actividad antibacteriana, ya que puede tratarse de enzimas nuevas que pudieran tener aplicación como antimicrobianos.

#### **5 Hipótesis**

La proteína con actividad antibacteriana observada por zimografía con un peso molecular de 95 kDa corresponde a varias peptidoglucano hidrolasas no identificadas previamente y con pesos moleculares mayores a los reportados en la especie *Enterococcus faecalis*.

#### **6 Objetivos**

##### **6.1 Objetivo general**

Purificación y caracterización de la(s) proteína(s) responsable(s) de la actividad de peptidoglucano hidrolasa producida por *Enterococcus* sp. aislada del queso Cotija.

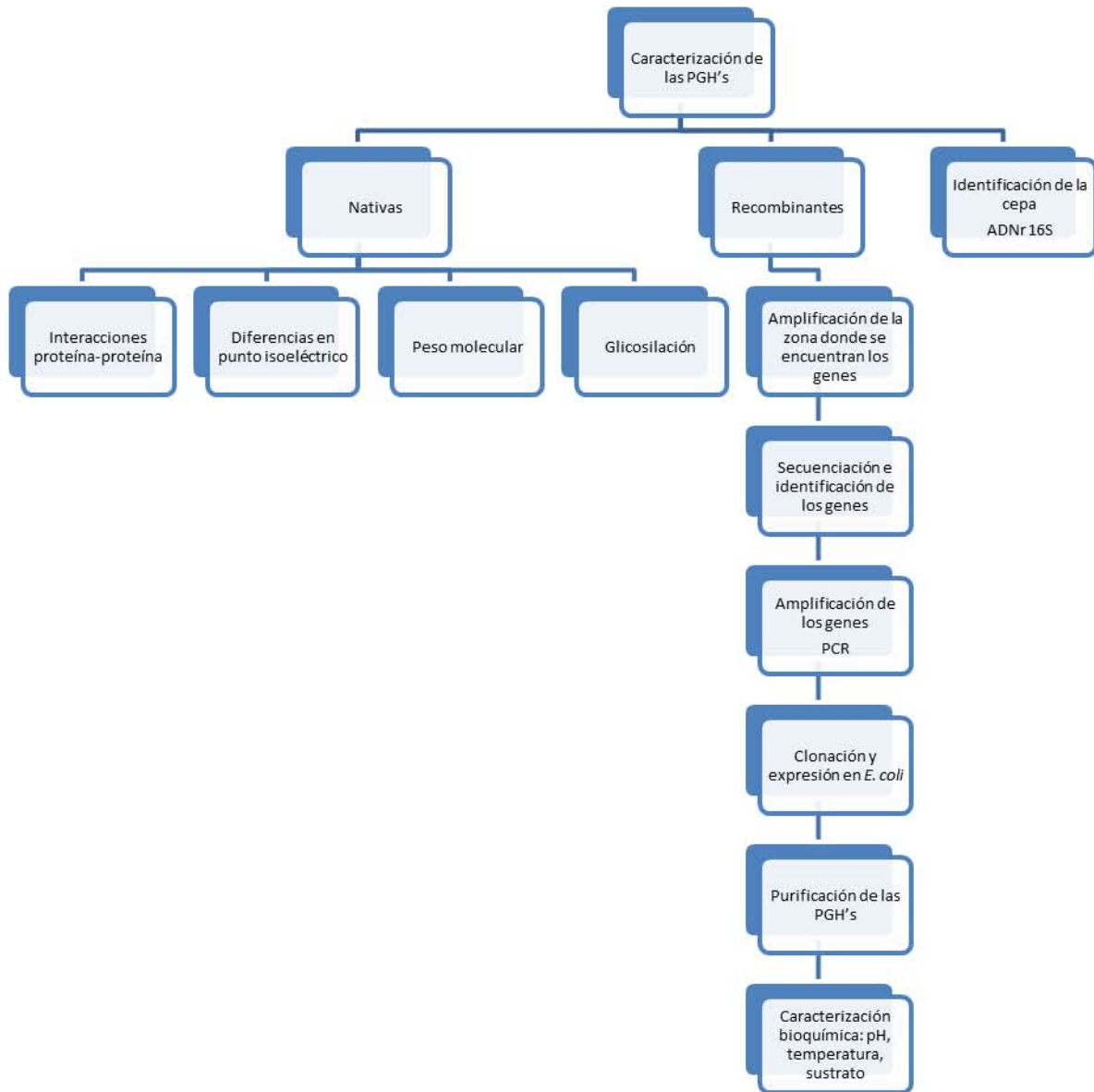
##### **6.2 Objetivos particulares**

- Corroborar la identidad de la cepa productora mediante la secuenciación de regiones variables del gen ribosomal 16S.
- Clonación y expresión en *Escherichia coli* para la obtención de la o las peptidoglucano hidrolasas recombinantes que se observan con un peso molecular de 95 kDa en la cepa productora.
- Caracterización bioquímica de las peptidoglucano hidrolasas, que incluya parámetros como actividad a distintos valores de pH, temperatura y especificidad por sustrato.

## 7 Metodología

### 7.1 Plan de trabajo

A continuación se muestra un diagrama general del plan de trabajo para el cumplimiento de los objetivos (Figura 8).



**Figura 8.** Diagrama general de trabajo.

## 7.2 Identificación de la cepa por métodos moleculares

La cepa en estudio no se había identificado por métodos moleculares, sólo se le habían realizado pruebas bioquímicas mediante la batería de pruebas API 50 CHL (Biomérieux), pero los resultados eran dudosos. Para conocer exactamente la identidad del microorganismo con el que se trabajó, se decidió llevar a cabo la secuenciación de regiones variables del gen ribosomal 16S. Al conocer el microorganismo con el que se trabaja, se puede realizar una comparación con cepas relacionadas, con el fin de identificar los posibles genes que codifican para las peptidoglucano hidrolasas.

### 7.2.1 Extracción de ADN

Se hizo un cultivo de la cepa en medio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe; Oxoid). Las condiciones de incubación fueron a 37°C y 250 rpm (Incubator Shaker, Innova 4000, New Brunswick Scientific). Se detuvo la fermentación a las 4 horas, es decir, durante la fase exponencial de crecimiento. Para separar las células del medio, se centrifugó a 15,000 x g durante 15 min a 4°C (Centrífuga Beckman J2-MC). Posteriormente, se hicieron tres lavados con solución salina isotónica (0.85% p/v, pH 7) y se recuperaron las células centrifugando en las mismas condiciones.

Para la extracción de ADN se empleó un kit (Fast ID Genomic DNA Extraction Kit), siguiendo las instrucciones del proveedor, sólo que para hacer más eficiente la lisis celular se agregaron 0.5 mg/mL de lisozima.

### 7.2.2 Amplificación de las regiones del gen ribosomal 16S y secuenciación

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación de dos regiones del gen ribosomal 16S: la región V3, del nucleótido 338 al 534 (Zúñiga-Bustos, 2009; Muyzer *et al.*, 1993); y otro fragmento que abarca del final de la región V3 a la V8, del nucleótido 562 al 1259 (Rojas-Herrera *et al.*, 2008). La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la amplificación de la región V3 se utilizaron los cebadores universales de la Tabla 1, para la mezcla de reacción se utilizaron las concentraciones indicadas en la Tabla 2 y las condiciones en la que se llevó a cabo la reacción se muestran en la Tabla 3. La misma información para el fragmento de la región V3 a V8 se muestra en las Tablas 4, 5 y 6.

**Tabla 1.** Cebadores utilizados para amplificar la región V3 del gen rRNA 16S (Zúñiga-Bustos, 2009; Muyzer *et al.*, 1993)

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
AGC 338F	NAACTCCTACGGGAGGCAGCAG	338-357	Directa
B518R	NAATTACCGCGGCTGCTGG	518-534	Reversa

**Tabla 2.** Concentraciones de reacción para la amplificación de la región V3 del gen rRNA 16S

Reactivo	Concentración final
Amortiguador <i>Pfu</i> + MgSO <sub>4</sub>	1x
dNTP's	0.2 mM
Cebador AGC 338F	0.2 μM
Cebador B518R	0.2 μM
ADN	200 ng
<i>Pfu</i> polimerasa	1.25 U/50 μL

**Tabla 3.** Condiciones de reacción para la amplificación de la región V3 del gen rRNA 16S

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	5
20	94	1
	65	1
	72	3
10	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

**Tabla 4.** Cebadores utilizados para amplificar el fragmento de la región V3 a la V8 del gen rRNA 16S (Rojas-Herrera et al., 2008).

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición	Orientación
Pedio2:644	GATTTATTGGGCGTAAAGCGA	562-581	Directa
FirR:1244	TAGCCARGTCATAAGGGGCATG	1239-1259	Reversa

**Tabla 5.** Concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación del fragmento de la región V3 a la V8 del gen rRNA 16S

Reactivo	Concentración final
Amortiguador <i>Pfu</i> + MgSO <sub>4</sub>	1x
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
BSA	0.2 %
dNTP's	0.2 mM
Cebador Pedio2:644	0.2 μM
Cebador FirR:1244	0.2 μM
ADN	200 ng
<i>Pfu</i> polimerasa	1.25 U/50 μL

**Tabla 6.** Condiciones de reacción para la amplificación del fragmento de la región V3 a la V8 del gen rRNA 16S

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	3 min
35	94	30 s
	53	45 s
	72	2 min
1	72	10 min

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando un kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron concentradas a 50 µg/mL en un concentrador de ADN (DNA plus) para su posterior secuenciación (MacroGen Inc., Seúl, Corea).

Las secuencias fueron analizadas mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Center of Biotechnology Information) y comparadas con la base de datos de la subunidad 16s del rARN (Ribosomal Database Project, Michigan State University).

### 7.3 Electroforesis en gel nativo

Se realizó una electroforesis en gel nativo de la fracción extracelular semipurificada utilizando las condiciones empleadas en el trabajo previo. Esto para determinar si existe una influencia en el peso molecular de la desnaturalización de las peptidoglucano hidrolasas.

Para la obtención de las enzimas semipurificadas se siguió la siguiente metodología (para la metodología detallada ver Serrano, 2010):

- Fermentación de 10 h (fase estacionaria temprana) para la producción de las enzimas.
- Remoción de las células mediante centrifugación.
- Neutralización del sobrenadante.
- Precipitación con sulfato de amonio al 40% (p/v).
- Diálisis con membrana de 1 kDa.
- Precipitación con TCA al 10% (v/v).

Para hacer el gel nativo se prepararon las siguientes disoluciones:

- Solución de acrilamida: acrilamida 30% (p/v) y bis-acrilamida 0.8% (p/v).
- Amortiguador Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 y 6.8.

Las cantidades de reactivos empleadas para la preparación de un gel se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Cantidades empleadas para la preparación del gel nativo

<b>Reactivo</b>	<b>Separador 12%</b>	<b>Concentrador 4%</b>
Solución de acrilamida	3.39 mL	415 $\mu$ L
Tris-HCl 1.5 M	1.91 mL	250 $\mu$ L
Agua destilada	3.06 mL	1.81 mL
TEMED	4.3 $\mu$ L	1.75 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10% (p/v)	43 $\mu$ L	17.5 $\mu$ L

A 45  $\mu$ g de proteína total se le agregaron 40  $\mu$ L de amortiguador de carga (Tris-HCl 1 M pH 6.8, glicerol al 24% v/v, azul brillante de Coomassie al 0.02% p/v) y se agitó hasta su completa solubilización. Todo el volumen se cargó en un pozo de un gel de 1.5 mm. Para esto se utilizó el equipo Mini Protean 3 System, Electrophoresis Module de Bio-Rad Laboratories. Las condiciones de la electroforesis fueron 80 V durante 2 h a 4°C. Las proteínas se tiñeron con una solución con azul brillante de Coomassie G-250 al 2.5% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

#### **7.4 Electroforesis en dos dimensiones**

Se llevó a cabo una electroforesis en dos dimensiones para determinar si las dos proteínas que se observaban en una sola banda en la electroforesis en una dimensión se podían separar por diferencias en el punto isoeléctrico.

La electroforesis en dos dimensiones se realizó siguiendo el manual de GE Healthcare Life Sciences (2-D Electrophoresis: Principles and Methods. 80-6429-60 AD). La muestra semipurificada, como se menciona en el apartado 5.3, fue posteriormente tratada con un amortiguador que contenía urea 7 M, tiourea 2 M y azul de bromocresol. Esta mezcla fue añadida a las tiras del gel para el isoelectroenfoque con el fin de que se rehidrataran. Se dejaron reposar toda la noche. El isoelectroenfoque se realizó en un gradiente de pH de 4 a 7 (Immobiline Dry Strip gel, 7 cm, pH 3-10, No. Cat. 17-6001-10), en un equipo Ettan IPGphor 3 System.

Posteriormente, la segunda electroforesis se llevó a cabo en geles de acrilamida al 10% (Laemli, 1970) con un espesor de 1 mm. Se corrió a 60 mA hasta que el frente de corrida salió del gel. Las proteínas se tiñeron con una solución con azul brillante de Coomassie G-250 al 2.5% (p/v), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

Después, se llevó a cabo una segunda electroforesis en dos dimensiones con el objetivo de secuenciar las proteínas de interés una vez separadas también por su punto isoeléctrico. Se siguieron los pasos descritos previamente. También, se hizo un zimograma para identificar a



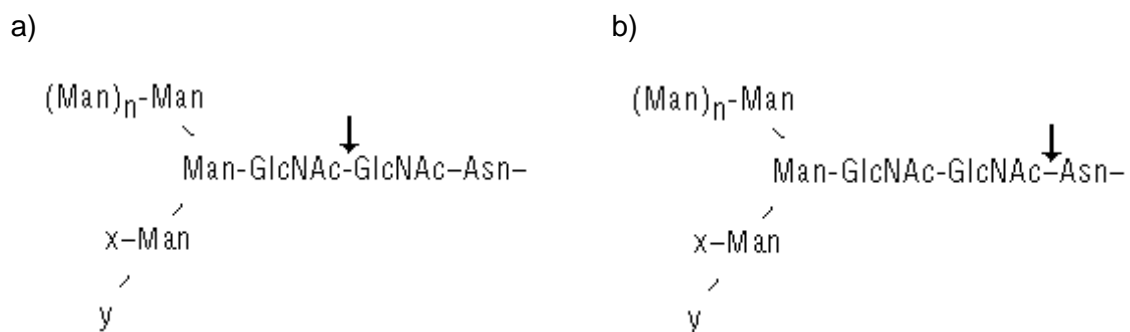
las proteínas con actividad lítica. Para esto, en el gel de acrilamida de la segunda dimensión, se añadieron células de *M. lysodeikticus* al 0.2%. Se corrieron los geles a las mismas condiciones que los anteriores y posteriormente, se incubaron a 37°C y 50 rpm durante 18 h en una solución renaturalizante (Tris HCl 100 mM y Tritón 1% (v/v), pH 8) para que las proteínas recobraran su actividad. La actividad se detectó por la presencia de una banda clara o translúcida sobre un fondo opaco. Para aumentar el contraste, el gel fue teñido con una solución de azul de metileno 0.1% (p/v) en KOH 0.01% (p/v) durante 20 minutos y posteriormente desteñido en agua hasta observar la aparición de las bandas (Leclerc y Asselin, 1989).

Las proteínas fueron secuenciadas mediante el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas que genera espectros en tándem (LC/MS-MS), utilizando tripsina para digerirlas parcialmente (Facultad de Medicina, UNAM). Los péptidos obtenidos fueron comparados con la base de datos del GeneBank utilizando el algoritmo BLAST para conocer la identidad de las proteínas.

### 7.5 Prueba de glicosilación

En el trabajo anterior se realizó una prueba de glicosilación con el DIG Glycan Differentiation Kit de Roche, el cual detecta diferentes residuos de azúcares, resultando que algunas proteínas se encontraban glicosiladas con residuos de manosa (Serrano-Maldonado, 2010). Para confirmar esto, se decidió utilizar una glicosidasa para remover los carbohidratos y conocer el peso molecular de la proteína.

Se probaron dos glicosidasas. La primera fue la Endo H<sub>f</sub> de New England BioLabs, la cual es una proteína recombinante que fusiona una Endoglicosidasa H y una proteína de unión a maltosa. La segunda fue la PNGasa F (Peptide: N-Glicosidase F) de New England Biolabs, que es una amidasa. Ambas cortan estructuras de alta manosa y estructuras híbridas de N-glicoproteínas, pero difieren en el sitio de corte. La especificidad se muestra en la Figura 9.



**Figura 9.** Especificidad de corte de a) Endo H<sub>f</sub> y b) PNGasa F. Para estructuras de alta manosa, n=2-150, x=(Man)<sub>1-2</sub>, y=H. Para estructuras híbridas, n=2, x y/o y=AcNeu-Gal-GlcNAc.

Para la reacción con la Endo H<sub>f</sub> se emplearon 20 µg del concentrado proteínico extracelular descrito en el apartado anterior y 20 µL de amortiguador desnaturante 1x (0.5% SDS, 0.04 M DTT). Se calentó a 100°C por 10 min y se adicionaron 2 µL de amortiguador G5 de reacción 10x (0.5 M de citrato de sodio, pH 5.5). Posteriormente, se adicionaron 2 µL de Endo H<sub>f</sub> y se incubó a 37°C durante 1 h.

Para la reacción con la PNGasa F se emplearon 20 µg del concentrado proteínico extracelular y se le adicionaron 10 µL de amortiguador desnaturante 1x. Se calentó a 100°C por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 2 µL de amortiguador G7 de reacción 10x (0.5 M de fosfato de sodio, pH 7.5), 2 µL de NP40, 5 µL de agua y 1 µL de PNGasa F. Se incubó a 37°C durante 1 h.

Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y zimogramas contra *M. lysodeikticus*, donde se incluyeron controles de la muestra sin tratamiento y con tratamiento. Los resultados del perfil de proteínas fueron observados tras una tinción con azul de Coomassie y para los zimogramas con azul de metileno. Adicionalmente, se realizó el ensayo de detección de glicosilaciones empleando el kit de Roche que se utilizó en el trabajo previo (Serrano-Maldonado, 2010) siguiendo las instrucciones del proveedor (DIG Glycan differentiation kit, Roche).

### **7.6 Incremento de las condiciones desnaturantes**

Debido a que no se había podido explicar la diferencia de pesos de las proteínas entre el valor teórico y el observado, ni con la electroforesis en dos dimensiones, ni por las pruebas de glicosilación, se decidió aumentar las condiciones desnaturantes, aumentando la concentración de SDS o adicionando urea, para romper por completo cualquier asociación que pudiera existir entre las proteínas y desdoblar por completo la estructura secundaria.

El extracto extracelular semipurificado se resuspendió en 40 µL de amortiguador de carga, que contenía lo siguiente: 25% p/v 4x Tris-HCl pH6.8, 4% p/v de SDS, 20% p/v de glicerol, 2% v/v de 2-mercaptoetanol y 0.001% p/v de azul de bromofenol. En el caso del que se agregó urea, ésta fue adicionada en una concentración final de 8 M. Para el caso en el que se aumentó la concentración de SDS, ésta fue de 8%, en lugar de 4%. La electroforesis se llevó a cabo como lo describió Laemmli (1970) en geles de poliacrilamida al 10%.

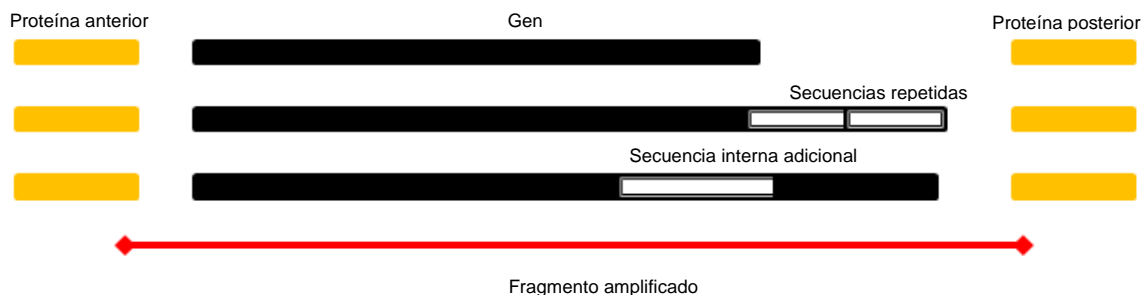
### **7.7 Clonación de las peptidoglucano hidrolasas**

Se realizó un análisis de las secuencias de los genes de las peptidoglucano hidrolasas codificados en el genoma de *Enterococcus faecalis* V583. Para realizar una mejor caracterización de éstas, se decidió clonarlas y expresarlas en *Escherichia coli*, dado que en la

cepa de estudio la producción es muy baja. El proceso de clonación puede permitir purificarlas más fácilmente y obtener mayor concentración para su caracterización.

### 7.7.1 Identificación y secuenciación de los genes

Se decidió amplificar segmentos de ADN de la cepa en estudio en donde se incluyó el gen completo para cada peptidoglucano hidrolasa, para poder detectar cualquier diferencia con respecto a la secuencia reportada en el genoma, como pudieran ser secuencias repetidas o secuencias intermedias extras, ya que esto puede suceder dependiendo de la cepa. Para esto, se diseñaron cebadores que alinean con las secuencias de las proteínas que se encuentran antes y después del gen de interés. En la Figura 10 se muestran algunas situaciones hipotéticas que pudieran explicar la diferencia en peso molecular dada por las secuencias del gen. Estas proteínas son las mismas para todas las cepas de *E. faecalis* de las que se conoce la secuencia de su genoma.



**Figura 10.** Fragmento amplificado para conocer la secuencia completa del gen

Los cebadores empleados para amplificar la región donde se podría incluir la proteína de 54 kDa (se nombrará únicamente P54) se muestran en la Tabla 8 y los cebadores empleados para amplificar la proteína de 72 kDa (se nombrará como P72) se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 8.** Cebadores utilizados para amplificar el fragmento que puede contener a P54

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Orientación
AmidF	CGC CCA AGA AAT CAA AGA GGC ACT TCG	Directa
AmidR	GTT ACC ACT ACC TGT TGT CCA CTC TCC	Reversa

**Tabla 9.** Cebadores utilizados para amplificar el fragmento que puede contener a P72

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Orientación
AutoF	GCC TTC CGC AAC ACG AGC ATC AAA TAA	Directa
AutoR	GAC CTA CGT GTA AGC CTT GTC CAG ATG	Reversa

La ADN polimerasa fue la *Pfu* (Fermentas), que se recomienda para amplificar fragmentos de un máximo de 3000 pb. Los fragmentos que se deseaba amplificar se encuentran en el límite, ya que para P54 se esperaba un amplicón de 2200 pb y para P72 de 3200 pb.

Las concentraciones de la mezcla de reacción fueron las mismas para ambas reacciones y se muestran en la Tabla 10. Las condiciones para P54 y P72 difirieron en el tiempo de elongación, que fueron de 4 y 6 min, respectivamente; también se probaron distintas temperaturas de alineamiento para los cebadores. Las condiciones empleadas se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 10.** Concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación de los fragmentos donde se incluyan P54 y P72

Reactivo	Concentración final
Amortiguador <i>Pfu</i> + MgSO <sub>4</sub>	1x
dNTP's	0.2 mM
Cebador F	0.2 μM
Cebador R	0.2 μM
ADN	100 ng
<i>Pfu</i> polimerasa	1.25 U/50μL

**Tabla 11.** Condiciones para la amplificación de los fragmentos donde se incluyan la P54 y P72

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
35	95	30 s
	60, 58, 55	45 s
	72	4 / 6 min
1	72	10 min

Dado que el tamaño de los amplicones está en el límite de pares de bases sobre los que puede actuar la *Pfu* polimerasa, se decidió probar con una enzima que permitiera amplificar fragmentos mayores. Se utilizó la mezcla de enzimas Long PCR Enzyme Mix (Fermentas), que permite obtener fragmentos incluso superiores a 21000 pb.

Las concentraciones de la mezcla de reacción fueron las mismas para ambas reacciones y se muestran en la Tabla 12. Las condiciones para P54 y P72 difirieron en el tiempo de elongación, que fueron de 2 y 3 min en los primeros 10 ciclos y de 6 y 7 min, respectivamente, en los siguientes 25 ciclos. Las condiciones empleadas se resumen en la Tabla 13.

**Tabla 12.** Concentraciones de la mezcla de reacción para la amplificación de los fragmentos donde se incluyan P54 y P72 utilizando Long PCR Enzyme Mix (condiciones establecidas en este trabajo, con base en las recomendaciones del proveedor).

Reactivo	Concentración final
Amortiguador Long + MgSO <sub>4</sub>	1x
dNTP's	0.2 mM
Cebador F	0.3 μM
Cebador R	0.3 μM
ADN	100 ng
Long PCR Enzyme Mix	1.25 U/50μL

**Tabla 13.** Condiciones para la amplificación de los fragmentos donde se incluyan la P54 y P72 (condiciones establecidas en este trabajo, con base en las recomendaciones del proveedor).

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 min
10	94	20 s
	56	30 s
	68	2 / 3 min
25	94	20 s
	56	30 s
	68	6 / 7 min
1	68	10 min

Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con los fragmentos amplificados y se purificaron utilizando un kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras fueron concentradas a 50 µg/mL en un concentrador de ADN (DNA plus) para su posterior secuenciación (MacroGen Inc., Seúl, Corea).

Con las secuencias obtenidas se pudo identificar el inicio y el término de los genes que codifican para ambas proteínas mediante su comparación con los genes reportados en la base de datos.

### 7.7.2 Amplificación de fragmentos internos para conocer la secuencia completa

La secuenciación de los amplicones no se hizo completa desde la primera vez, ya que el sistema permite secuenciar cerca de 1000 pb, de las cuales sólo 700 pb son confiables, por lo que fue necesario diseñar cebadores internos para amplificar un fragmento más corto y que se pudiera secuenciar la parte faltante.

Hipotéticamente, P54 tiene un tamaño de 1509 pb, de los cuales, en la primera secuenciación se obtuvieron con certeza alrededor de los primeros 600 nucleótidos y los últimos 500. Los 400 restantes se obtuvieron en una segunda secuenciación. En el caso de P72, al ser de mayor tamaño (2214 pb), fue necesario realizar este mismo procedimiento tres veces para conocer la secuencia completa del gen. Los cebadores que se diseñaron para secuenciar los genes se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Cebadores utilizados para conocer secuencia completa de los genes

Proteína	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Posición en el gen	Orientación
54	Fam496	GCG CCA GCT GAA AAG CCA GTA GAA	496-522	Directa
	AmeR	CGC CTC GAG TTT ATC TTT TGG AAC GAT	Término	Reversa
72	Fut257	CGG AAC AAC CGA CAA CGG ATT CGT	257-283	Directa
	AuxR	CGC CTC GAG ACC AAC TTT TAA AGT TTG A	Término	Reversa

Las concentraciones de la mezcla de reacción fueron las mismas que se presentan en la Tabla 10 para ambas reacciones, ya que se utilizó la *Pfu* DNA Polimerasa. Las condiciones empleadas se resumen en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Condiciones para la amplificación de los fragmentos a secuenciar

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
35	95	30 s
	55	45 s
	72	2 min
1	72	10 min

Los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar como se describió anteriormente.

### 7.7.3 Amplificación de los genes para su clonación

Se comparó la secuencia nucleotídica obtenida con el gen reportado en la base de datos y se hizo un análisis traduciendo la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, buscando codones de inicio y de paro y buscando posibles secuencias promotoras (Swiss Institute of Bioinformatics, ExPASy Proteomics Tools).

Conociendo el inicio y el término del gen, se diseñaron cebadores para amplificarlo completo, incluyendo en éstos los sitios de restricción para su ligación en el vector de clonación, del cual se hablará más adelante. En la Tabla 16 se muestran los cebadores empleados para la clonación y en las Figuras 11 y 12 se muestra el alineamiento con el gen.

**Tabla 16.** Cebadores utilizados para la clonación de los genes (diseñados para este trabajo).

Proteína	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Orientación
54	AmeF	<b>CGC CCA TGG</b> <u>GTA</u> GTA TGA AAA AAC AAT TTG	Directa
	AmeR	<b>CGC CTC GAG</b> TTT ATC TTT TGG AAC GAT	Reversa
72	AuxF	<b>CGC CCA TGG</b> <u>GTA</u> AGA AAG AAT CAA TGT	Directa
	AuxR	<b>CGC CTC GAG</b> ACC AAC TTT TAA AGT TTG A	Reversa

Negritas: Secuencia rica en GC para anclaje. Sombreado: sitios de restricción. Subrayado: secuencia adicional para que el gen entre en el marco de lectura.

5' -CGCCATGGGT**AGTATGAAAAACAATTTG**-3' Cebador directo AmeF

```

ATGAGTATGAAAAACAATTTGCCCTGTTCTCTACCTTATTACTTTTAGG 50
TTCATCAATGCCAGTAGGTGCATTTGCAGAAGGTAATAACTTGGTAGCTG 100
AAAATAGTTCTGTTGCAGAAACAACCGCAGAAGCAACAAGTCTGAAGCC 150
ACTGAAACGACAGCGACTAGTGAACAACAGAAGCGACAGAAGAATCAAC 200
AACTGAAACAGAAAGTTCAACCGAATCAAGTGAATCTGCAACCACGGAGT 250
CCACGAAACGTCAGGAACCGAAACGACAGATTCCACAAGTCAATCAACA 300
TCCACAAGTACGACAGAATCGACTACTGACTCCACCTCAACGAGTACAAC 350
AGAGTCAACCACAGATTCTACGTCAACAAGTACAAGTCAATCAAGTACCA 400
CGCCGACGACTACACCAAGTTCTTCTAAAGAACAGCCAAAACCTGGCAGC 450

```

```

AGTACTTCTGAATCAAAACAGCCGGCGAAACCAGTGACACCAACAGCGCC 500
AGCTGAAAAGCCAGTAGAACAACCAGTAGCGTCAACACCGCAGCCCGAAA 550
TAGTCCCACCAGTTACAAATGAAACGGTTGGGTTAGTGAAGACGATGAG 600
ACGTTTACGGTCAGCAAAACGAAGAAGACAGAAGAGTTTATTCAAGAAAT 650
CGGTGAATCTGCTCGGAAAGTGGCCAAGGACAAAAACTTATATGCTAGTG 700
TGATGATTGCTCAAGCAATTTTAGAAAGTGGCAGCGGCAATAGTAAATTA 750
AGCCAGAAACCAAACACTACAATTTGTTTGGTATTAAAGGCGATTACAAAG 800
TCAATCTGTTTCTTTTATTACCTATGAAGACAATGGTTTCGGTAACCTAT 850
ACACAGTAGAAGCAAAATTCGGTCAATATCCAACGTATAAAGAATCAATG 900
GAAGATTATGCGAAATTATTGAAAAATGGTTTAGATTCCAATAAAGATTT 950
CTATCATGGTGTCTGGAACCGGAAGCCAAATCATACAAAGAAGCGACAC 1000
GTTTCCTAACAGGAAAATACGCAACGGACAAAGATTACCATAAGAAATTA 1050
AATGCGTTAATTA AACATACGATTTAACTTATTATGATAAAGAAAAAGC 1100
AACCGTTGAACCAATGGAATCAAATTTCCAGCCTATAATGGCAAAAACT 1150
ATGACACCTTTAATAGTTATGCTTGGGGCAACTGTACACAATATGTCTAC 1200
AACCGTATTACGCAATTAGGTAAACGTGTGGACTTAACAATGGGGAATGG 1250
TCAAGATTGGGGCGAAACAGGTTCGTGCACGCGGTACAAAGTAAGTCGTA 1300
CACCAAAAGCAGGTGCAGCGGTTTCTTCCAGCTGGTGTTTTAGGCGCA 1350
GACAATACTTATGGTCATGTCGCGTTTGTGAAAAAGTCTTTAAAGATGG 1400
TAGCATCTTAATTTCTGAAATGAACGTGAAGGGATTAACGTTGTTTCGA 1450
CACGTACAATCTCAGCTGATGAAACACATTTAATGAACTATATCGTTCCAAAAGATAAA TAA 1512
Cebador reversa AmeR 3' -TAGCAAGGTTTTCTATTTGAGCTCGCG-5'

```

**Figura 11.** Alineamiento de los primers utilizados para la expresión de la proteína P54 con el gen que la codifica.

```

5' -CGCCCATGGGTAAGAAAGAATCAATGT-3' Cebador directo AuxF
ATGAAGAAAGAATCAATGTCACGTATCGAAAAGAAGGAAAGCACAACAAAG 50
AAAGAAAACGCCAGTACAATGGAAGAAAAGCACTACTTTTATTAGCTCGG 100
CGTTAATTGTTTTCATCTGTAGGAACGCCCGTTGCGTTACTACCAGTGACT 150
GCTGAGGCAACAGAAGAGCAGCCAACAAATGCGGAAGTTGCCAAGCACC 200
TACTACGGAAACTGGCTTAGTAGAGACCAACCACAGAACTACGCCAG 250
GAACTACGGAAACACCGACAACGGATTTCGTATCAACGACTGAATCGACA 300
ACTGAATCATCAAAAGAAACACCAACAACACCAAGTACCAGCAACCAAC 350
AGTTGATTCAACTACACCTGTGGAATTAGGAACGACTGATTCTTCAGTAG 400
CAGAAATCGCGCCAGTAGCTCCTTCAACAACCGAGTCTGAAGCAGCGCCT 450
GCAGTTACACCCGATGATGAAGTAAAAGTACCAGAAGCTAGAGTAGCTTC 500
TGCGCAAACCTTTTTCAGCGTTATCACCGACGCAAAGTCTTCAGAATTTA 550
TTGCCGAGTTAGCTCGTTGTGCACAACCTATTGCGCAAGCCAATGATTTA 600
TATGCATCAGTGATGATGGCTCAAGCAATCGTTGAAAGTGGTTGGGGAGC 650
AAGTACGCTATCTAAGGCACCAAACTATAACTTATTTGGGATTAAGGCA 700
GCTACAATGGACAATCTGTCTATATGGATACATGGGAATATTTAAACGGC 750
AAATGGTTAGTGAAAAAAGAACCTTTCCGTAAATATCCTTCTTACATGGA 800
ATCATTCCAAGATAATGCGCACGTGCTAAAAACAACCTCTTTCCAAGCGG 850
GCGTTTACTATTATGCTGGGGCTTGAAAAGCAATACAAGCTCGTACCGC 900
GATGCAACTGCTTGTTAACAGGTCGTTATGCGACAGATCCTAGCTACAA 950
TGCTAAATTAATAATGTCTATACCGCATATAACTTAACTCAATATGATA 1000
CACCATCTTCTGGTGGAAATACTGGGGCGGAATAGTTAATCCAGGAACA 1050
GGCGGCTCGAACAATCAATCANGAACGAACACGTACTATACTGTAATAATC 1100
AGGAGATACCTTGAATAAAATTGCCGCGCAATATGGTGTGAGCGTTGCTA 1150

```

ATTTACGCTCATGGAACGGCATCTCTGGCGATTTAATTTTCGTTGGTCAA 1200  
 AACTTATCGTGAAAAAGTGCTTCAGTAACACTGGTGGCTCAGCAGCGGTG 1300  
 AAAATCAGGGGATACCTTGAATAAAATGCCGCCAATATGGCGTGAGCG 1350  
 TTGCTAATTTACGCTCATGGAATGGCATCTCTGGCGATTTAATTTTCGTT 1400  
 GGTCAAAAACATCATCGTGAAAAAAGGTGCTTCAGGTAACACTGGTGGCTC 1450  
 AAACAACGGTGGCTCTAACAATAATCAATCAGGAACGAATACGTACTACA 1500  
 CAATTAATCAGGCGATACCTTGAACAAAATGCCGCCAATATGGCGTG 1550  
 AGTGTGCTAATTTACGCTCATGGAATGGCATTCTGGCGATTTAATCTT 1600  
 CGCTGGTCAAAAAATTATTGTGAAAAAAGGTACTTCAGGTAACACCGGTG 1650  
 GCTCAAGCAATGGTGGTTCTAACAATAATCAATCAGGAACGAATACGTAC 1700  
 TACACGATTAATCGGGCGATACCTTGAACAAAATTTCTGCACAATTCGG 1750  
 TGTTAGTGTGGCTAACTTACAAGCCTGGAATAACATCAGCGGTAGTTTGA 1800  
 TTTTGTGCTGTCAAAAGATTATCGTGAAAAAAGGCGCCAACTCAGGTTCA 1850  
 ACGAATACGAACAAGCCTACGAATAATGGTGGCGGTGCGACAACATCCTA 1900  
 CACGATTAATCAGGTGATACGCTGAATAAAAATTTCTGCACAGTTTGGCG 1950  
 TGAGTGTGCTAATCTACGTTTCATGGAACGGGATCAAAGCGATTTAATT 2000  
 TTTGCTGGTCAAACAATCATCGTGAAAAAAGGCGCTTCTGCAGGTGGCAA 2050  
 TGCTTCTTCAACAAATAGTGCATCAGGCAAACGCCATACAGTTAAAAGCG 2100  
 GTGATTCACTTGGGGCTTATCAATGCAATACGAATCAGCATCCAAAAA 2150  
 ATCAAACAATTAAATGGCTTAAGCGGGGATACAATTTATATTGGTCAAACCTTTAAAAGTTGGTTAA 2214  
 3' -AGTTTGAATTTTCAACCAAGAGCTCCGC-5'

**Figura 12.** Alineamiento de los primers utilizados para la expresión de la proteína P72 con el gen que la codifica.

Las concentraciones empleadas para la reacción son las mismas de la Tabla 10. Las condiciones fueron las mismas para ambos genes y se muestran en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Condiciones para la amplificación de los fragmentos de clonación

No. De ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	3 min
35	95	30 s
	55	45 s
	72	4 min
1	72	10 min

Los amplicones obtenidos fueron empleados para la clonación y expresión en *E. coli*.

#### 7.7.4 Clonación y expresión de las proteínas en *Escherichia coli*

La clonación y expresión de las proteínas recombinantes se llevó a cabo utilizando el sistema pET (pET System, Novagen), que utiliza *E. coli* como microorganismo productor. La cepa hospedera seleccionada para la clonación fue DH5 $\alpha$ , mientras que para la expresión, en un inicio se utilizó la cepa BL21(DE3)pLysS, ya que en ésta no hay expresión basal de las proteínas recombinantes; al tratarse de enzimas que pueden degradar la pared celular de la propia bacteria productora y matarla, se trató de eliminar en mayor medida la expresión basal



durante su crecimiento. Sin embargo, sólo la P72 se obtuvo activa. Para P54 fue necesario emplear la cepa BL21(DE3), cuya expresión basal no está tan regulada. El vector empleado para este fin fue el pET-22b(+), ya que puede recibir insertos del tamaño requerido, posee un péptido señal que dirige los productos a periplasma, además de que adiciona una cola de histidinas que facilita su posterior purificación mediante una cromatografía de afinidad en geles de agarosa con níquel-ácido nitrilo triacético, que retienen específicamente a las proteínas con histidinas porque estos restos se quedan unidos al níquel. La proteína se eluye finalmente con un gradiente de imidazol (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005). Además de níquel, las columnas pueden contener cobalto para la purificación de las proteínas con cola de histidinas. El vector pET-22b(+) confiere resistencia a ampicilina, lo que facilita la selección de las colonias transformantes. Pero el factor más importante para su selección es que cuenta con el operador *lac*, al cual se une el represor *lacI*, que hace más estricta la expresión, reduciendo los niveles basales. Esto es importante debido a que se busca producir dos enzimas que degradan la pared celular y que pueden ser tóxicas para la célula huésped.

También la cepa de expresión BL21(DE3)pLysS regula la expresión basal a través de una T7 lisozima, codificada en un plásmido. La T7 lisozima es un inhibidor de la RNA polimerasa, reduciendo así la transcripción del gen y, por consiguiente, la expresión de la proteína. El mismo plásmido codifica para la resistencia a cloranfenicol.

#### 7.7.4.1 Preparación de células competentes

Para que las células pudieran ser transformadas fue necesario que recibieran un tratamiento especial. Se puso un inóculo de *E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) o BL21(DE3)pLysS de 100  $\mu$ L en 5 mL (2% v/v) de medio Luria Bertani (LB) con 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. La composición del medio se muestra en la Tabla 18. Se incubó a 37°C durante toda la noche a 200 rpm. De este cultivo se tomó 1 mL y se inocularon 100 mL de LB (dilución 1:100) y se incubó a las mismas condiciones hasta una densidad óptica a 600 nm de entre 0.5 y 0.7. Se centrifugó a 6400  $xg$  durante 15 min a 4°C. Se hicieron dos lavados con 100 mL de agua desionizada filtrada y estéril y se centrifugó a las mismas condiciones. Después, se resuspendió el pellet en 20 mL de glicerol al 15% y se centrifugó a las mismas condiciones. El pellet se resuspendió en 1 mL de glicerol al 15% y se almacenó a -80°C en alícuotas de 80  $\mu$ L.

**Tabla 18.** Medio Luria Bertani (LB)

Componente	Concentración (g/L)
Bacto Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10

Ajustar pH a 7.5. Para el cultivo de BL21(DE3)pLysS al medio se le adicionan 34  $\mu$ g/mL de cloranfenicol.

### 7.7.4.2 Doble digestión

Para la inserción de los genes en el plásmido, fue necesario realizar una doble digestión con enzimas que no los degradaran y que realizaran cortes en el sitio múltiple de clonación del vector. Las enzimas seleccionadas fueron *Xho*I y *Nco*I (Fermentas), ya que son las que le añaden la menor cantidad de aminoácidos a la proteína recombinante (Figura 13).

Se trabajó con el amortiguador Tango 2x porque ambas enzimas tienen su máximo rendimiento en éste. Las concentraciones de la reacción se muestran en la Tabla 19, las cuales fueron establecidas siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se dejó durante 1 h a 37°C. Para detenerla, se incrementó la temperatura a 80°C durante 20 min. Las muestras fueron purificadas con el High Pure PCR Product Purification Kit de Roche siguiendo las indicaciones del proveedor.

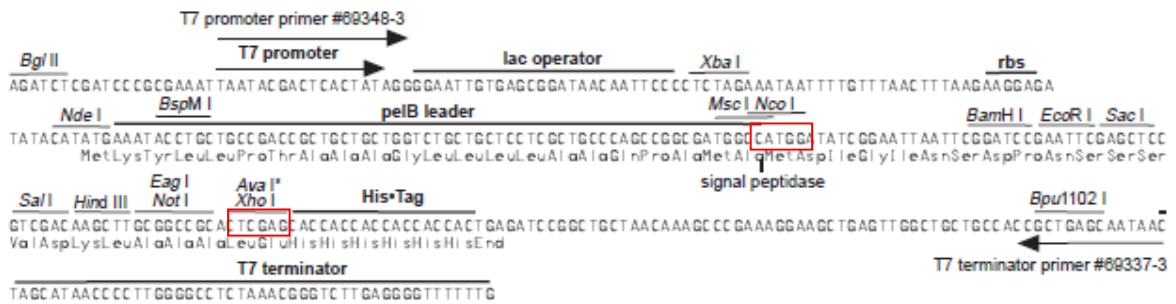


Figura 13. Región de clonación de pET-22b(+)

Tabla 19. Concentraciones de la reacción de restricción (doble digestión) del plásmido y los genes

Reactivo	Plásmido	Inserto
Amortiguador Tango	2x	2x
ADN	500 ng	1 µg
Enzimas	0.5 u/µL	0.5 u/µL

### 7.7.4.3 Ligación

Para insertar los genes en el plásmido, se llevó a cabo una reacción de ligación utilizando la T4 DNA Ligasa (Fermentas). Las concentraciones utilizadas en la reacción se muestran en la Tabla 20. Las condiciones de la reacción fueron a 22°C durante toda la noche. Para la inactivación de la ligasa, se calentó a 70°C durante 5 min. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para aislar y purificar únicamente los plásmidos con el inserto. La purificación se hizo con el High Pure PCR Product Purification Kit de Roche siguiendo las indicaciones del proveedor.

**Tabla 20.** Concentraciones de la reacción de restricción (doble digestión) del plásmido y los genes

Reactivo	Cantidad
Vector	100 ng
Inserto	500 ng
Amortiguador 10X T4 DNA Ligasa	2 $\mu$ L
T4 DNA Ligasa	1U
Agua grado biología molecular	c.b.p 20 $\mu$ L

#### 7.7.4.4 Transformación

Para la transformación de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se tomaron 2  $\mu$ L del plásmido con el inserto y se añadieron a 80  $\mu$ L de células competentes previamente descritas y se dejaron incubar 5 min en hielo. Después se transfirieron a una cubeta pre-enfriada en hielo y se llevó a cabo la transformación en un electroporador. Las condiciones empleadas fueron 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F y 2.5 kV. Inmediatamente se adicionó 1 mL de medio SOC (su composición se muestra en la Tabla 21) y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se dejó incubar durante 1 h a 37°C y 200 rpm para la recuperación de las células. Posteriormente, se centrifugó y el pellet se resuspendió en 200 $\mu$ L de medio SOB. Se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L y se inocularon en cajas Petri con agar LB con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Se incubaron durante toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron 10 colonias de todas las cajas para encontrar alguna transformante exitosa y se usaron para inocular 5 mL de caldo LB con ampicilina. Se dejaron crecer durante toda la noche. De ese cultivo se tomaron 200  $\mu$ L y se centrifugaron para obtener el pellet de células (8000 xg, 10 min, 4°C). Se resuspendieron en 100  $\mu$ L de agua grado biología molecular y se calentaron a 95°C durante 5 min para lisarlas y liberar al exterior el ADN. Se centrifugaron a las mismas condiciones y se tomaron 5  $\mu$ L como molde para realizar una amplificación utilizando los cebadores específicos de los genes. Las condiciones y concentraciones empleadas fueron las mismas de la Tabla 16 (sección 5.6.3) Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Aquellas clonas que amplificaron fragmentos del tamaño esperado para los genes fueron seleccionadas como positivas y se almacenaron a -70° con glicerol al 20% (v/v). También se les hizo una extracción del plásmido (GeneJet Plasmid Miniprep Kit, Fermentas) para utilizarlo en la transformación de la cepa de expresión BL21(DE3)pLysS.

**Tabla 21.** Concentraciones de los medios SOB y SOC

Reactivo	SOB	SOC
Bacto triptona	20 g/L	20 g/L
Extracto de levadura	5 g/L	5 g/L
NaCl	0.5 g/L	0.5 g/L
KCl	2.5 mM	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	10 mM
Glucosa		20 mM

Se enviaron a secuenciar algunos plásmidos que presuntamente contenían el inserto para corroborar su presencia (Macrogen, Corea). Una vez confirmado esto y analizadas las secuencias para ver que no hubiera mutaciones, se prosiguió con la transformación de las cepas de expresión. Para lo cual se siguió la misma metodología descrita anteriormente, sólo que para BL21 (DE3)pLysS, al medio se le adicionó también cloranfenicol.

#### 7.7.4.5 Expresión

Se seleccionaron algunas clonas que resultaron positivas en la PCR de colonia para llevar a cabo la expresión. Se inocularon 5 mL de caldo LB adicionado con los antibióticos necesarios en tubos de ensaye y se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.6. Con este cultivo se inocularon 50 mL de caldo LB en matraces Erlenmeyer de 250 mL y se incubaron en las mismas condiciones hasta alcanzar la misma densidad óptica. Una vez hecho esto, se dividió el cultivo en dos partes iguales de 25 mL en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Uno se tomó como el control sin inducir y al otro se le adicionó IPTG como inductor a una concentración final de 1 mM.

Se tomaron alícuotas de 5 mL a diferentes tiempos para encontrar las mejores condiciones de producción de las enzimas. Los tiempos probados fueron 1, 3, 5 y 8 h. En cada tiempo se realizó una medición de la D.O. 600nm para observar el comportamiento del crecimiento. Primeramente, se hizo un análisis de la proteína total celular para encontrar el tiempo de producción. Para lo cual, 1 mL del cultivo se centrifugó a 8000 x g durante 10 min a 4°C para bajar las células. A éstas se les agregaron 30 µL de amortiguador de carga 4x (Tris-HCl 125 mM, SDS 4%, glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 10%) y se calentaron a 92°C durante 5 min. Posteriormente, se corrió una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes y se hicieron zimogramas contra *M. lysodeikticus* para detectar actividad lítica.

Una vez encontradas las mejores condiciones para la producción de las enzimas, se buscó la fracción en donde se observara la mayor actividad lítica. El cultivo fue centrifugado para separar a las células del medio a 6400 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue separado en dos partes para concentrar la proteína por diferentes métodos; una se precipitó con TCA al 10% (v/v) y la otra se liofilizó.

Las células se sonicaron para romperlas siguiendo un programa de 20 ciclos de 20 seg de sonicación al 15% por 20 seg de descanso. El citosol y los restos celulares se separaron a través de una centrifugación a 6400 x g durante 45 min a 4°C. Una parte del citosol se precipitó con TCA al 10% (v/v) y la otra parte se concentró por liofilización.

Las 5 fracciones fueron analizadas por electroforesis y zimogramas como se describió anteriormente y se realizó un ensayo de Western Blot para su identificación.

#### **7.7.4.6 Western blot**

Para corroborar la producción de las enzimas recombinantes, identificarlas y conocer su peso molecular se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos para reconocer la cola de histidinas (la cual también sirvió para la purificación).

Se corrió una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% y posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF por sus siglas en inglés) PolyScreen® (Perkin-Elmer) a 15 V durante 1 h en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad), con un amortiguador de transferencia de Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10% (v/v). La membrana fue bloqueada con leche descremada (Skim milk, Difco) al 3% (p/v) en amortiguador TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) adicionado con Tween 20 al 0.05% (v/v) dejando en agitación a temperatura ambiente durante 1h. Después de este tiempo, la membrana fue lavada con 20 mL de amortiguador TBS + Tween dos veces durante 30 s y se le adicionó el anticuerpo primario (anticuerpo de ratón anti-his, GenTex 6x His tag) en una dilución 1:2500 en el mismo amortiguador y se incubó durante 1h en agitación a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados para adicionar el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo anti-ratón IgG acoplado a fosfatasa alcalina, Zymax, Invitrogen) en una dilución 1:750, que se dejó incubando 1h en agitación a temperatura ambiente. Al final de este tiempo se lavó la membrana nuevamente y se adicionó la solución reveladora de NBT/BCIP, que se dejó actuar hasta la aparición de las bandas cafés, que indican la presencia de las proteínas con cola de histidinas.

#### **7.8 Purificación de las enzimas recombinantes**

La purificación de P54 se realizó aprovechando el tallo de histidinas (6x His.tag), utilizando una columna de cromatografía de afinidad de níquel (Protino® Ni-TED Resin, Macherey-Nagel). Se partió del sobrenadante de la fermentación de 3 h y fue concentrado 30 veces por ultrafiltración con una membrana de celulosa de tamaño de corte de 30 kDa. Éste extracto fue el que se hizo pasar por la columna, la cual fue empacada y equilibrada con 3 volúmenes del amortiguador LEW (Lysis-Equilibration-Wash: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 8), siguiendo las instrucciones del proveedor (Purification of His-tag protein, User Manual, Protino Ni-TED, Macherey-Nagel). Se adicionó la muestra y se dejó drenar por gravedad, seguido de un lavado con 6 volúmenes con amortiguador LEW. Posteriormente, las proteínas unidas fueron eluidas con 3 volúmenes de amortiguador de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 8 M urea, 250 mM imidazol, pH 8), recolectando fracciones de 1 mL para su análisis posterior.

Se midió la concentración de proteína de cada fracción por el método de Bradford, modificando las instrucciones del manual del proveedor del reactivo (Bio-Rad) para medir en un lector de microplacas Epoch (Biotek) a 595 nm. Las cantidades empleadas fueron 40 µL del reactivo de Bradford y 160 µL de muestra.

Adicionalmente, se corrieron SDS-PAGE 10% y zimogramas contra *M. lysodeikticus* para el monitoreo de la purificación de las proteínas.

## 7.9 Caracterización de las enzimas recombinantes

La caracterización de las enzimas se realizó de dos formas diferentes: por zimografía y mediante ensayos espectrofotométricos con sustratos específicos.

### 7.9.1 Especificidad por sustrato

Para conocer el tipo de actividad que poseen las enzimas en estudio se identificó el enlace que hidrolizan, mediante ensayos espectrofotométricos utilizando distintos sustratos. Los tipos de actividad evaluados fueron la de muramidasa, glucosaminidasa y endopeptidasa.

Se utilizaron como controles positivos las siguientes enzimas comerciales (Tabla 22).

**Tabla 22.** Enzimas comerciales utilizadas como control positivo y el tipo de actividad de peptidoglucano hidrolasa.

Enzima (Marca)	Sustrato	Tipo de actividad
Lisozima (Sigma)	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	Muramidasa
$\beta$ - <i>N</i> -acetilglucosaminidasa (Sigma)	4-nitrofenil <i>N</i> -acetil- $\beta$ -D-glucosaminido	Glucosaminidasa
Lisostafin (Sigma)	Péptidos: Leu-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	Endopeptidasa

#### 7.9.1.1 Actividad de muramidasa

La actividad de muramidasa fue evaluada empleando el ensayo enzimático de lisozima (EC 3.2.1.17) de Sigma. La lisozima es una peptidoglucano hidrolasa con actividad de muramidasa. El método se basa en que la lisozima es capaz de lisar células intactas de *Micrococcus lysodeikticus*, reduciendo la densidad óptica a 450 nm de una suspensión de este microorganismo.

La densidad óptica fue medida en un lector de microplacas Epoch (Biotek). Se colocaron 250  $\mu$ L de la suspensión de *M. lysodeikticus* 0.015% y se adicionaron 10  $\mu$ L de la enzima. Se utilizó la lisozima (Sigma) como control positivo y amortiguador de fosfato de potasio 66 mM pH 6.24 como blanco. La densidad óptica fue monitoreada cada minuto durante 10 min. Una unidad produce un  $\Delta A_{450nm}$  de 0.001 por minuto.

#### 7.9.1.2 Actividad de glucosaminidasa

La actividad de glucosaminidasa fue medida utilizando el ensayo enzimático de la  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa (NAG) de Sigma. Este ensayo utiliza como sustrato al 4-nitrofenil *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido (NP-GlcNAc), que al ser hidrolizado por la NAG, libera p-Nitrofenol y

*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido (GlcNAc). El *p*-nitrofenol en medio básico forma el ion *p*-nitrofenolato, el cual es de color amarillo y puede ser medido espectrofotométricamente a 405 nm. El *p*-nitrofenolato tiene un coeficiente de extinción molar de  $18.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

En una microplaca (BioTek) se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de una solución de 2 mg/mL de NP-GlcNAc (Sigma) en citrato de sodio 100 mM y 60  $\mu\text{L}$  de la enzima en estudio. Se utilizó la  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa (de *Canavalia ensiformis*) de Sigma como control positivo, de la cual se emplearon 0.3  $\mu\text{L}$  y 59.7  $\mu\text{L}$  de amortiguador de citrato. Como control negativo se empleó lisozima en la misma concentración. Como blanco se utilizó la solución de sustrato y amortiguador, únicamente. Se incubó a 37°C durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio 140 mM para generar el color. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Epoch de BioTek. También se midió la absorbancia de una solución estándar de *p*-nitrofenol 5 mM para realizar los cálculos de actividad. Una unidad puede hidrolizar 1  $\mu\text{mol}$  de 4-nitrofenil *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido a *p*-nitrofenol y *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido en 1 min.

### 7.9.1.3 Actividad de endopeptidasa

Para la medición de la actividad de endopeptidasa se utilizó el método modificado de Cd-ninhidrina de Smitsopoulou *et al.* (1997), el cual se basa en la reacción de la ninhidrina con los extremos aminos libres (generados por la actividad de endopeptidasa utilizando diferentes péptidos como sustrato), que en presencia del cadmio, genera un compuesto colorido que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 507 nm. El compuesto colorido formado tiene un coeficiente de extinción molar de  $10.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Los sustratos de la reacción fueron tres péptidos diferentes: Leu-Gly-Gly (tripéptido), Gly-Gly-Gly-Gly (pentaglicina) y Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (hexaglicina). Para el ensayo se colocaron en un tubo Eppendorf: 400  $\mu\text{L}$  de amortiguador HEPES 20 mM pH 7, 50  $\mu\text{L}$  de uno de los péptidos (en concentración de 50 mM para el tripéptido y de 2 mM para los otros dos) y 50  $\mu\text{L}$  de la enzima. Se utilizó lisostafin (Sigma) como control positivo, ya que es una peptidoglucano hidrolasa con actividad de endopeptidasa y amortiguador HEPES como blanco, ya que puede haber una hidrólisis parcial de los péptidos en ausencia de enzima. La mezcla se incubó a 37°C durante una hora. Finalizado el tiempo se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Cd-ninhidrina y se incubó a 84°C durante 5 min para la generación del color. Se midió absorbancia a 507 nm en un lector de microplacas (Epoch, BioTek). El reactivo de Cd-ninhidrina está compuesto por ninhidrina 1% (Sigma), ácido acético 12.5% y  $\text{CdCl}_2$  1.25% en etanol absoluto.

### 7.9.2 Temperatura óptima de actividad

El ensayo de temperatura óptima se realizó únicamente mediante el ensayo espectrofotométrico para P54 purificada, que presentó actividad de glucosaminidasa. Se siguió

la metodología descrita en la sección 7.9.1.2, cambiando únicamente las temperaturas de incubación. Las temperaturas evaluadas fueron 4, 20, 29, 37, 45 y 50 °C.

### **7.9.3 Resistencia a tratamientos térmicos**

La resistencia a tratamientos térmicos se evaluó de dos maneras diferentes: al extracto crudo por zimografía y a la proteína pura mediante espectrofotometría.

Se tomaron alícuotas de 40  $\mu$ L del extracto crudo y se colocaron en tubos eppendorf de 600  $\mu$ L. Se sometieron a tratamientos durante 30 y 60 min a las siguientes temperaturas: 37, 50, 60, 70, 80 y 90°C. El control fue una muestra que no recibió ningún tratamiento térmico. Posteriormente, se hicieron zimogramas contra *M. lysodikticus*, como se describe en la sección 7.4.

Para la evaluación mediante espectrofotometría, se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L de la proteína pura y se colocaron en tubos eppendorf de 600  $\mu$ L. Se sometieron a tratamientos durante 60 min a las mismas temperaturas. Después, se hizo la determinación de la actividad de glucosaminidasa descrita en la sección 7.9.1.2.

### **7.9.4 Actividad a diferentes valores de pH**

La actividad a diferentes valores de pH también se evaluó mediante zimografía y espectrofotometría. Para los zimogramas se utilizó un amortiguador de renaturalización con diferente pH, evaluando a los valores de 4, 5, 6, 7 y 8. El amortiguador de renaturalización se preparó con diferentes agentes amortiguadores a una concentración final de 20 mM de cada, uno ajustando al pH deseado y adicionando Tritón X-100 a una concentración final de 1% (v/v). Los agentes amortiguadores fueron acetato de sodio (J.T. Baker), MES y HEPES (Sigma).

Para la medición espectrofotométrica se modificó la técnica de determinación de actividad de glucosaminidasa. Se colocaron 5  $\mu$ L de la solución de 2 mg/mL de NP-GlcNAc; 10  $\mu$ L de amortiguador que contenía acetato de sodio, MES y HEPES a una concentración 100 mM, ajustado a los distintos valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8) y 50  $\mu$ L de la enzima en estudio. El resto de la determinación se realizó sin modificaciones.

### **7.9.5 Influencia de la fuerza iónica**

La influencia de la fuerza iónica (concentración de sal) en la actividad lítica fue determinada mediante zimografía, agregando diferentes concentraciones de NaCl al amortiguador de renaturalización. Las concentraciones fueron 0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 500 mM y 1 M.



También se midió la actividad de glucosaminidasa con modificaciones a la metodología. A partir de un stock de NaCl 3.45 M, se adicionaron distintas alícuotas a la mezcla de reacción para alcanzar las concentraciones deseadas. Se evaluaron concentraciones de NaCl de 0, 10, 100, 200, 300, 500 y 1000 mM, adicionando 0.188, 1.88, 3.76, 5.64, 9.4 y 18.8  $\mu\text{L}$  del stock, respectivamente; se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución de 2 mg/mL de NP-GlcNAc, 40  $\mu\text{L}$  de la enzima y lo necesario de agua destilada para completar 65  $\mu\text{L}$ . El resto de la determinación no sufrió cambios.

#### **7.9.6 Influencia de inhibidores y activadores**

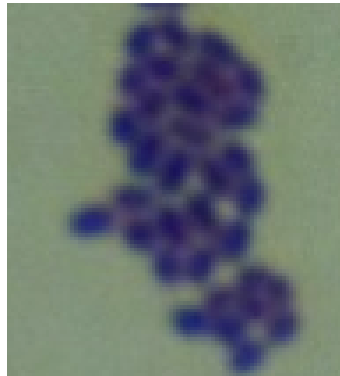
La función catalítica de algunas peptidoglucano hidrolasas requiere de la presencia de iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Mikoulinskaia *et al.*, 2009). Por tal razón, se evaluó el efecto de iones metálicos que pudieran funcionar como activadores o inhibidores.

Para la actividad de glucosaminidasa, se tomó una alícuota de P54 pura y se le adicionó EDTA a una concentración final de 10 mM para secuestrar los iones metálicos que pudieran estar presentes, ya que el EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Sigma) actúa como agente quelante de iones zinc del sitio activo, pero puede quelar calcio también. Se dejó incubando en hielo durante 30 min. A partir de esta muestra, se tomaron alícuotas para agregar los distintos iones a evaluar. A la mezcla de reacción se agregaron 5  $\mu\text{L}$  de la solución de 2 mg/mL de NP-GlcNAc, 53.5  $\mu\text{L}$  de la enzima tratada con EDTA y 6.5  $\mu\text{L}$  de una solución 100 mM de cada uno de los iones para tener una concentración final de 10 mM. Las soluciones empleadas fueron KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{ZnCl}_2$ . Como control se evaluó la actividad de la muestra tratada con EDTA sin la adición de ningún ion, por lo que se agregaron 6.5  $\mu\text{L}$  de agua destilada.

## 8 Resultados

### 8.1 Identificación de las cepas por métodos moleculares

La cepa de estudio no se había identificado por métodos moleculares, solamente por pruebas bioquímicas. Al realizarle una tinción de Gram, se observó como positiva; sin embargo, quedaba una duda en cuanto a la morfología, ya que aparentaba tener forma de cocos ligeramente ovalados que se podían confundir con bacilos cortos (Figura 14).

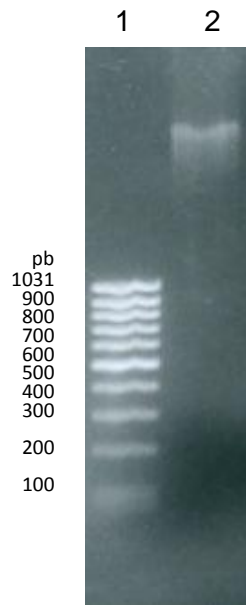


**Figura 14.** Morfología de la cepa en estudio observada al microscopio, tinción de Gram, aumento 100X.

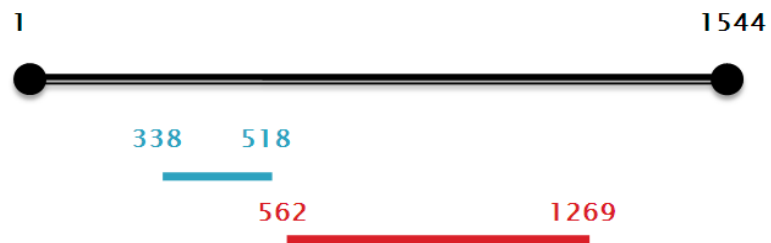
Los resultados obtenidos en la secuenciación de las proteínas con actividad lítica celular producida por la cepa se relacionaban con proteínas de bacterias del género *Enterococcus*, lo que hizo pensar que se podía tratar de este género. Las pruebas bioquímicas se realizaron mediante el uso de las tiras API 50 CHL (Biomérieux), que sirven para identificar algunos géneros como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, etc. (pero no es posible identificar *Enterococcus*). Los resultados obtenidos mediante estas pruebas fueron dudosos, ya que se identificó como *Lactobacillus plantarum*, con 72% de certeza (software APIweb).

Por estas razones se decidió llevar a cabo una identificación mediante la secuenciación de regiones variables del gen ribosomal 16s. Durante la extracción del ADN cromosomal de la cepa se obtuvo un solo producto, que se muestra en la Figura 15.

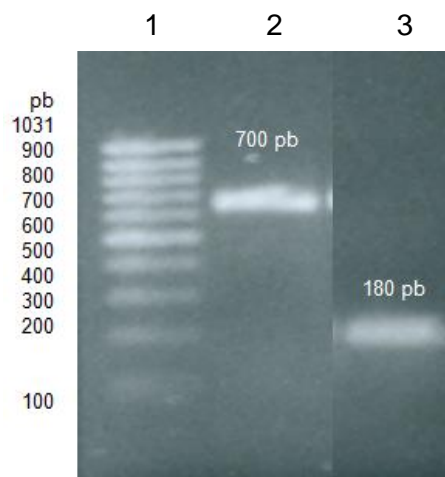
Al amplificar los fragmentos de las regiones del gen ribosomal 16s se obtuvieron los tamaños deseados para cada par de cebadores, los cuales fueron de 180 pb para la región V3 (par de cebadores AGC 338F y B518R) y de 700 pb para la región V3-V8 (par de cebadores Pedio2:644 y FirR:1244), por lo que se decidió enviarlos a secuenciar (MacroGen Inc. Seúl, Corea). Las regiones que se esperaban amplificar se muestran en la Figura 16 y los productos de PCR se muestran en la Figura 17. Las secuencias obtenidas se muestran en el Anexo 1.



**Figura 15.** ADN extraído de la cepa de estudio. Marcador (1), muestra (2).



**Figura 16.** Regiones amplificadas del gen ribosomal 16s para su secuenciación y posterior identificación del microorganismo.



**Figura 17.** Productos de amplificación de fragmentos del gen ribosomal 16s. Marcador (1), amplicón de la región V3-V8 (2), amplicón región V3 (3). Gel de agarosa 1% (p/v) con bromuro de etidio.

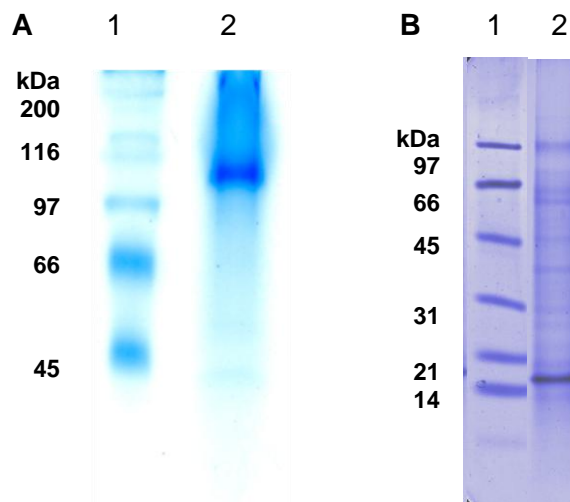
Se compararon las secuencias con las bases de datos del algoritmo BLAST (National Center for Biotechnology Information) y del gen ribosomal 16s (Ribosomal Database Project, Michigan State University). En todos los casos se relacionaron con secuencias de *Enterococcus faecalis* (Tabla 23). Además, coincide con lo previamente encontrado, al relacionar las secuencias de las proteínas con esta especie.

**Tabla 23.** Identificación de la cepa por regiones variables del gen ribosomal 16s

Cebador	BLAST NCBI	Ribosomal Database Project
AGC 338F	<i>Enterococcus faecalis</i> (99% identidad, valor E: 5E-70)	<i>Enterococcus faecalis</i>
B518R	<i>Enterococcus faecalis</i> (100% identidad, valor E: 3E-77)	<i>Enterococcus faecalis</i>
Pedio2:644	<i>Enterococcus faecalis</i> (99% identidad, valor E: 0)	<i>Enterococcus faecalis</i>
FirR:1244	<i>Enterococcus faecalis</i> (100% identidad, valor E: 0)	<i>Enterococcus faecalis</i>

## 8.2 Detección de formación de oligómeros mediante electroforesis nativa

Para determinar si existía una diferencia en el peso molecular de la proteína de interés (95 kDa) en condiciones nativas y desnaturalizantes debida a la formación de oligómeros, se realizó una electroforesis nativa, ya que previamente sólo se había hecho en condiciones desnaturalizantes (Serrano-Maldonado, 2010). Los resultados de la electroforesis nativa se muestran en la Figura 18.



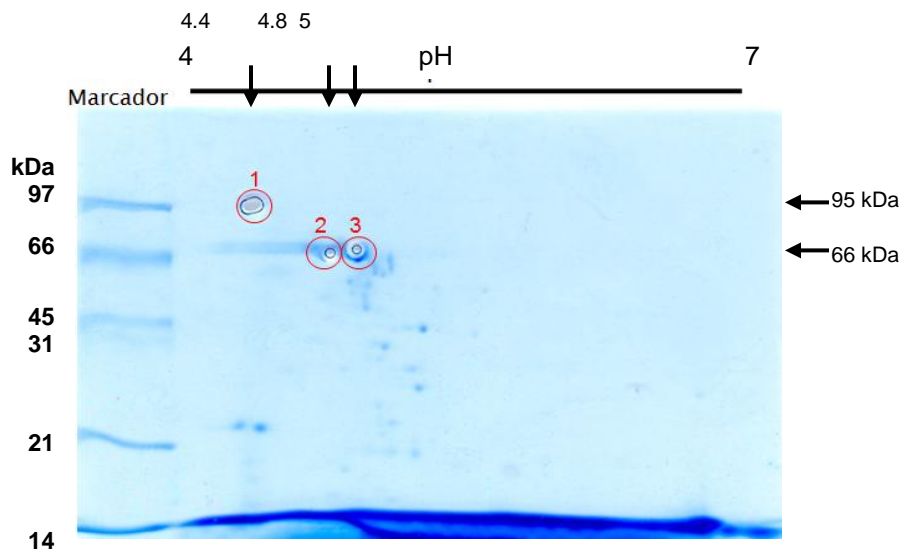
**Figura 18.** Electroforesis nativa (A) y desnaturalizante (B) del extracto extracelular de la cepa en estudio. Marcador de peso molecular (1). Sobrenadante purificado de la fermentación (2). Gel de poliacrilamida al 10%.

Se observa una sola banda de mayor peso molecular; sin embargo, en condiciones nativas, el marcador de peso molecular no necesariamente refleja el peso real. Únicamente se observa una banda, lo que puede indicar que se forman agregados de proteínas y que al llevar a cabo la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (con SDS), es posible separarlos.

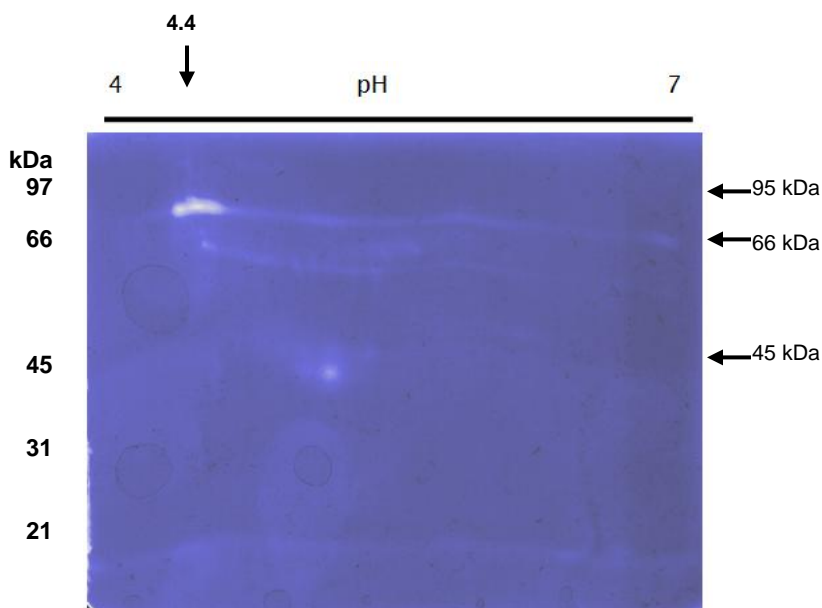
### 8.3 Electroforesis en dos dimensiones

Para determinar si se trataba de dos proteínas diferentes, como lo indican los resultados previos de la secuenciación, en los que se obtuvieron péptidos que forman parte de dos peptidoglucano hidrolasas diferentes (Serrano-Maldonado, 2010), se realizó una electroforesis en dos dimensiones, con un gradiente de pH de 4 a 7. Los resultados se muestran en la Figura 19.

No fue posible separar las proteínas, ya que se observó un solo punto en un peso de 95 kDa. Se secuenció el material obtenido de ese punto, así como otros dos observados en pesos cercanos a los 66 kDa. Adicionalmente, se hizo un zimograma en dos dimensiones para identificar a las proteínas con actividad lítica (Figura 20). Se pueden observar puntos (y en ocasiones barridos) de actividad a 95, 66 y 45 kDa.



**Figura 19.** Electroforesis en dos dimensiones del extracto extracelular semipurificado de la cepa de estudio. Marcador de peso molecular (izquierda), patrón de puntos de la electroforesis (derecha). Rango de pH de 4 a 7. Los círculos rojos numerados señalan las proteínas secuenciadas.



**Figura 20.** Zimograma en dos dimensiones del extracto extracelular semipurificado de la cepa de estudio. Microorganismo indicador: *M. lysodeikticus*.

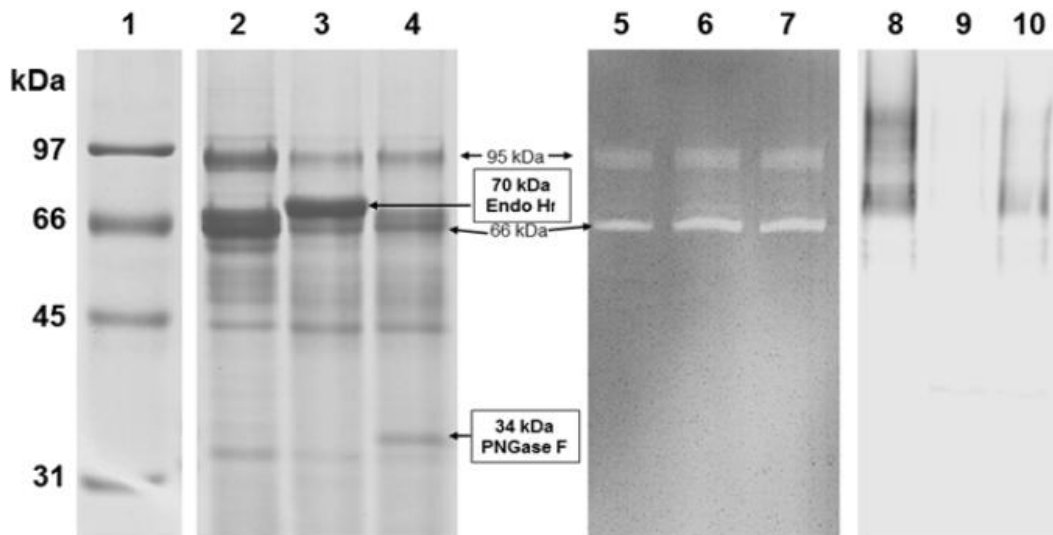
La técnica empleada para la identificación de las proteínas fue la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas que genera espectros en tándem (LC-MS/MS), en la cual, se hace una digestión de las proteínas con alguna proteasa, en este caso tripsina, y los péptidos generados son separados por cromatografía e identificados por espectrometría de masas; posteriormente, se busca en bases de datos aquellas proteínas que contengan tales péptidos. Los resultados de la identificación de péptidos confirmaron los resultados previos (Serrano-Maldonado, 2010). En el punto 1 se detectaron péptidos que forman parte de una glucosaminidasa de 503 aminoácidos con peso de 54 kDa (gij29374894), de otra glucosaminidasa diferente (AtIA) de 747 aminoácidos con peso de 72 kDa (Béliveau *et al.*, 1991) y de un antígeno de secreción con un dominio tipo SCP (participan en degradación de pared celular) de 47 kDa (gij29375030).

En los puntos 2 y 3 también se detectaron la glucosaminidasa de 54 kDa y el antígeno de 47 kDa, lo que pudiera indicar que son degradación del primero pero que conservan su actividad lítica. Sin embargo, los pesos moleculares obtenidos en la electroforesis tampoco concuerdan con los reportados anteriormente (Serrano-Maldonado, 2010), lo que puede explicarse si la proteína estuviera glicosilada. Estudios previos demuestran que una muramidasa de *Enterococcus faecium* de 87 kDa puede incrementar su peso hasta 130 kDa por la glicosilación con monómeros y oligómeros de glucosa (Kawamura y Shockman, 1983). Otra explicación podría ser que las proteínas se encontraran fuertemente asociadas a su sustrato, que es el peptidoglucano y que por lo tanto migraran juntas a un peso mayor al reportado para cada una

por separado. Esto podría explicar también el resultado positivo para la glicosilación, que para descartarlo es necesario realizar estudios sobre la posible glicosilación de estas proteínas.

#### 8.4 Prueba de glicosilación

En el trabajo previo (Serrano-Maldonado, 2010) se realizó una prueba para determinar si las proteínas de interés se encontraban glicosiladas, utilizando el DIG Glycan differentiation kit (Roche). Se observó una reacción positiva para glicosilaciones con residuos de manosa. Para confirmar dichos resultados, ya como parte del presente estudio, las proteínas fueron tratadas con endoglicosidasas: la endo H<sub>f</sub>, que reconoce y corta residuos de manosa, y la PNGasa F, que reconoce enlaces *N*-glucosídicos (New England Biolabs). Si las proteínas se encontraran glicosiladas, tras el tratamiento con dichas enzimas, éstas deberían de mostrar un peso molecular menor. Adicionalmente, se realizó de nuevo la prueba de detección de glicosilaciones utilizando el kit, antes y después del tratamiento enzimático. Sin embargo, el perfil electroforético antes y después del tratamiento fue el mismo; además, la actividad lítica se mantuvo intacta y la posible glicosilación, observada con el uso del kit, no corresponde con los pesos de las proteínas de interés (Figura 21).



**Figura 21.** Confirmación de la prueba de glicosilación. Marcador de peso molecular (1), muestra sin tratamiento (2, 5 y 8), tratamiento con Endo H<sub>f</sub> (3, 6 y 9), tratamiento con PNGasa F (4, 7 y 10). SDS-PAGE 10% (1 a 4), zimograma contra *M. lysodeikticus* (5 a 7) y membrana PVDF utilizada para kit de diferenciación de glicosilaciones.

La primera glicosidasa que se probó fue la Endo H<sub>f</sub>, pero al obtenerse un resultado negativo, se decidió utilizar la PNGasa. Ambas enzimas reconocen y cortan estructuras de alta manosa, que en estudios previos se detectó que podría haber este tipo de glicosilación (Serrano-Maldonado, 2010). Sin embargo, difieren en el sitio de corte. Los resultados fueron los mismos en ambos

casos, por lo que es probable que la proteína no se encuentre glicosilada. En ocasiones, la evidencia experimental puede llevar a conclusiones incorrectas debido a la abundancia de glicanos en las paredes celulares, la unión a lectinas o la asociación fuerte pero no covalente con azúcares, por lo que para poder afirmar que existe una glicosilación es necesario identificar el enlace aminoácido-azúcar (Upreti *et al.*, 2003).

No se detectaron glicosilaciones en las proteínas de interés; sin embargo, el kit y las enzimas empleadas reconocen un número limitado de residuos de glicano y el kit está diseñado principalmente para glicoproteínas eucariontes. Las glicoproteínas bacterianas pueden poseer monosacáridos atípicos, como 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxihexosa (DATDH), *N*-acetilfucosamina (FucNAc), ácido pseudamínico y ácido legionamínico (Dube *et al.*, 2010). Además, existen proteínas glicosiladas que han sido estudiadas en células procariontes, como una *N*-acetilmuramidasa producida por *Streptococcus faecium* (ahora *Enterococcus hirae*), con residuos de glucosa, con un peso molecular de 87 kDa en su forma glicosilada (Kawamura y Shockman, 1983). En otros estudios, se reporta que la principal endopeptidasa secretada por *Lactobacillus rhamnosus*, la Msp1 (también llamada p75), es susceptible a una desglicosilación química, observándose una disminución en el peso molecular de 28 kDa; además, mantiene la actividad enzimática tras el tratamiento (Lebeer *et al.*, 2012). Por estas razones, no se puede descartar aún la posibilidad de glicosilaciones en las proteínas de interés. Es necesario utilizar otros kits de detección que reconozcan más tipos de glicosilaciones, utilizar otras enzimas que reconozcan *O*-glicanos o llevar a cabo una desglicosilación química utilizando agentes como el ácido trifluorometanosulfónico (Sánchez y Urdaci, 2012).

### **8.5 Incremento de las condiciones desnaturalizantes**

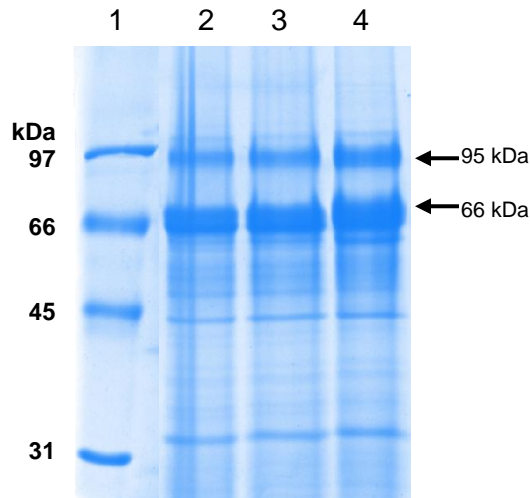
Al encontrar reiteradamente la diferencia de masa de las proteínas, entre lo observado y lo teórico, mediante electroforesis en una y dos dimensiones y sin observar posibles glicosilaciones, se decidió incrementar las condiciones desnaturalizantes y así tratar de eliminar cualquier interacción entre las proteínas y desplegar completamente cualquier estructura secundaria que pudiera afectar el corrimiento en la electroforesis. Para tal efecto, se adicionó el doble de la concentración de SDS empleada anteriormente y en otro ensayo se adicionó urea (8 M).

Como resultado, no se observó ningún cambio en los pesos moleculares (Figura 22) ni en la actividad de las proteínas (imagen no mostrada), por lo que se puede decir que el incremento de peso no se debe a una interacción entre dos proteínas o a que se forme una estructura secundaria que retarde el corrimiento en la electroforesis.

Se continúa sin poder explicar esta diferencia de pesos entre lo observado y lo teórico. Por tal razón, se decidió secuenciar completamente los genes que codifican para las proteínas en la



cepa en estudio y determinar si la diferencia está a nivel genómico. Posteriormente, clonar y expresar dichas proteínas para poder llevar a cabo su caracterización.



**Figura 22.** Incremento de condiciones desnaturalizantes. Marcador de peso molecular (1), tratamiento con amortiguador de carga con SDS 4% (2), SDS 8% (3) y SDS 4% + urea 8 M (4). SDS-PAGE 10%.

## 8.6 Análisis de las secuencias

Después del análisis electroforético y una vez que se tuvo identificada a la cepa, se realizó el análisis de la secuencia de su genoma y de los genes que codifican para las peptidoglucano hidrolasas de 72 y 54 kDa, previamente identificadas por secuenciación de la banda de 95 kDa.

Al realizar un análisis de la secuencias de aminoácidos y de los genes que las codifican, en la cepa de *Enterococcus faecalis* V583 (cepa de la que se ha secuenciado el genoma completo), se puede observar que se trata de dos proteínas totalmente independientes, cuyos genes se encuentran muy alejados uno del otro en el genoma (una se encuentra del nucleótido 227768 al 229279 y la otra del 758976 al 761189), por lo que no pueden transcribirse juntos. Una de ellas es hipotética y la otra ya se ha caracterizado (Béliveau *et al.*, 1991; Eckert *et al.*, 2006; Mesnage *et al.*, 2008).

Como se mencionó en la sección de metodología, la proteína de 54 kDa se nombrará como P54 y la de 72 kDa como P72.

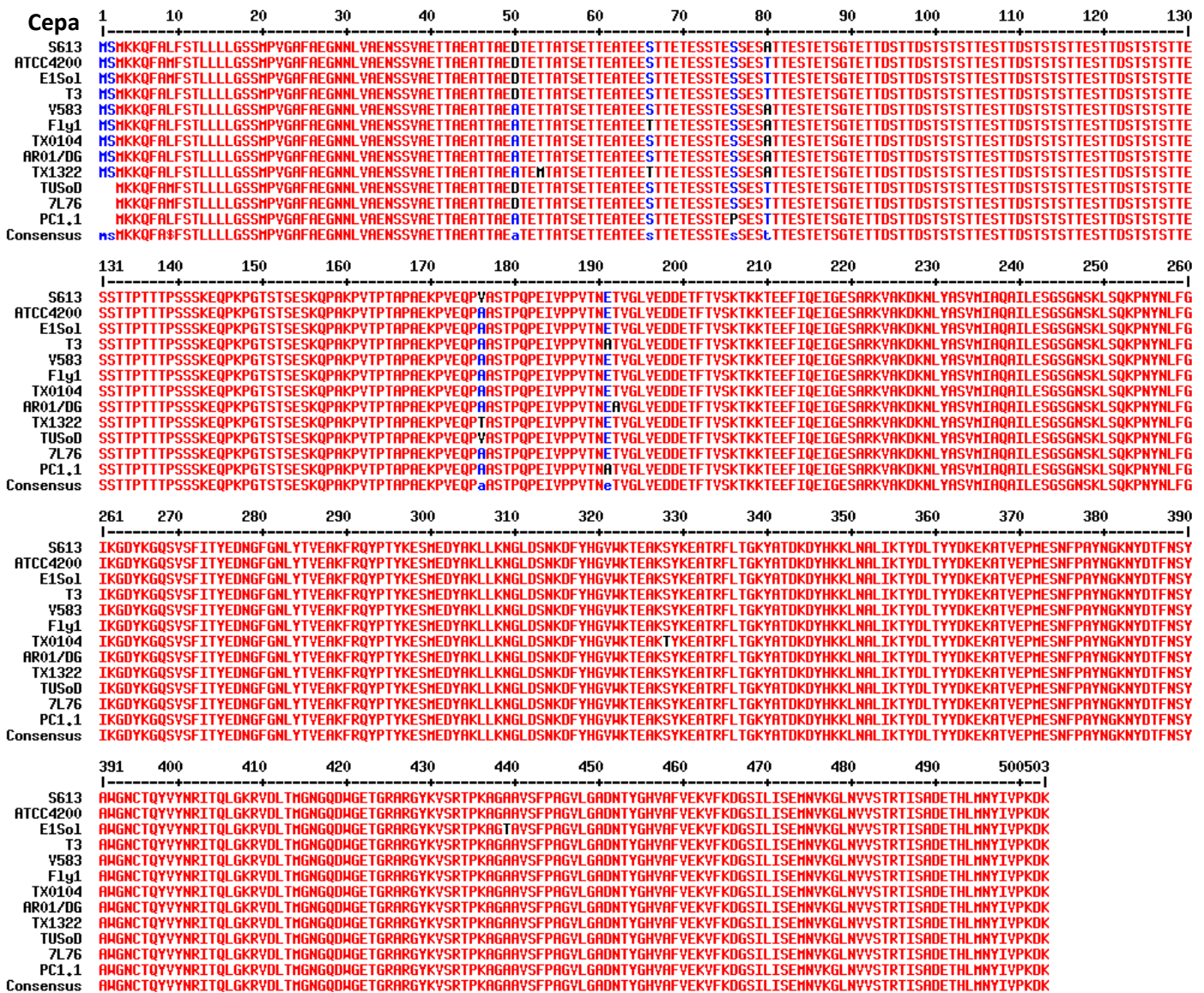
### 8.6.1 Análisis de la secuencia de la proteína P54

P54 fue encontrada en el genoma de varias cepas de *Enterococcus faecalis*. Es una proteína hipotética de 503 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 54.5 kDa. En todas las cepas la secuencia está muy conservada y difieren en muy pocos aminoácidos (MultAlin, Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin>) (Figura 23).

Tiene una región teórica de *N*-acetilglucosaminidasa que va del aminoácido 207 al 368 y una región que pertenece a la familia NplC/P60, que es una familia de peptidasas de pared celular ampliamente representadas en varios linajes de bacterias. De los miembros de esta familia que han sido caracterizados se sabe que pueden hidrolizar enlaces de D-gamma-glutamil-mesodiaminopimelato o de *N*-acetilmuramato-L-alanina (Anantharaman y Aravind, 2003). También es probable que presente un péptido señal, que va del aminoácido 1 al 26 (SignalIP 3.0 Server) y varios sitios posibles de glicosilación (NetNGlyc 1.0 Server) (Figura 24).

Dado que se trata de una proteína hipotética, se decidió comprobar que fuera del tamaño reportado en las bases de datos (NCBI). Se hizo un análisis de las secuencias de los genes para comprobar que el sitio de inicio y de término de la transcripción fueran donde se reporta (Translate Tool, ExPSy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics). Todos estos análisis se muestran en la Figura 25.

Los sitios de inicio y de término de la transcripción indican que la proteína se transcribe con 503 aminoácidos. Si se toma en cuenta sólo a la proteína madura, tendría 477 aminoácidos, su peso molecular y punto isoeléctrico teórico serían de 51.9 kDa y 4.79, respectivamente. El peso molecular no coincide con lo observado en la electroforesis en dos dimensiones, pero el pI sí.



**Figura 23.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de P54 en 12 diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*. Alineamiento multiple realizado con la herramienta MultAlaine.

ACGAGAAAAAGAGAGGACGTTGATGTTTGTTCAGCCCTTCTTTTTTTCTTTAGAAAATTACCAAAAAAGATAGAAGAATTTGT  
 GAATTTTCTTCTATTTTTTTAACTTTTTGCTAGAAATTTTTTATGAAACAGTATACTATTA AAAAAGGAGCCATTTAAACAATAAC  
 TATGTC AATTATTATGTTGGTACATAAAAAATAAATGGAGAAAAATAAAAAAGGAGA

ORIGEN  
 1 ATG AGT ATG AAA AAA CAA TTT GCC CTG TTC TCT ACC TTA TTA CTT TTA GGT TCA TCA ATG  
 M S M K K Q F A L F S T L L L G S S M 20  
 61 CCA GTA GGC GCA TTT GCA GAA GGT AAT AAC TTG GTA GCT GAA AAT AGT TCT GTC GCA GAA  
 P V G A F A E G N N L V A E N S S V A E 40  
 121 ACA ACC GCA GAA GCA ACG ACT GCT GAA GAC ACT GAA ACG ACA GCG ACT AGT GAA ACA ACA  
 T T A E A T T A E D T E T T A T S E T T 60  
 181 GAA GCG ACA GAA GAA TCA ACA ACT GAA ACA GAA AGT TCA ACC GAA TCA AGT GAA TCT GCA  
 E A T E E S T T E T E S S T E S S E S A 80  
 241 ACC ACG GCA TCC GAA ACG TCA GGA ACC GAA ACG ACA GAT TCC ACA ACT GAT TCA ACA  
 T T E S T E T S G T E T T D S T T D S T 100  
 301 TCC ACA AGT ACG ACA GAA TCG ACT ACT GAC TCC ACC TCA ACG AGT ACA ACA GAG TCA ACC  
 S T S T T E S T T D S T S T S T T E S T 120  
 361 ACA GAT TCT ACG TCA ACA AGT ACA ACT GAA TCA ACA AGT ACC ACG CCG ACG ACT ACA CCA AGT  
 T D S T S T S T T E S S T T P T T P S 140  
 421 TCT TCT AAA GAA CAG CCA AAA CCT GGC ACG AGT ACT TCT GAA TCA AAA CAG CCG GCG AAA  
 S S K E Q P K P G T S T S E S K Q P A K 160  
 481 CCA GTG ACA CCA ACA GCG CCA GCT GAA AAG CCA GTA GAA CAA CCA GTA GCG TCA ACA CCG  
 P V T P T A P A E K P V E Q P V A S T P 180  
 541 CAG CCC GAA ATA GTC CCA CCA GTT ACA AAT GAA ACG GTT GGG TTA GTG GAA GAC GAT GAG  
 Q P E I V P P V T N E T V G L V E D D E 200  
 601 ACG TTT ACG GTC AGC AAA AAG AAG ACA GAA GAG TTT ATT CAA GAA ATC GGT GAA TCT  
 T F T V S K T K K T E E F I Q E I G E S 220  
 661 GCT CGG AAA GTG GCC AAG GAC AAA AAC TTA TAT GCT AGT GTG ATG ATT GCT CAA GCA ATT  
 A R K V A K D K N L Y A S V M I A Q A I 240  
 721 TTA GAA AGT GGT AGC GGC AAT AGT AAA TTA AGC CAG AAA CCA AAC TAC AAT TTG TTT GGT  
 L E S G S G N S K L L S Q K P N Y N L F G 260  
 781 ATT AAA GGC GAT TAC AAA GGT CAA TCT GTT TCT TTT ATT ACC TAT GAA GAC AAT GGT TTC  
 I K G D Y K G Q S V S F I T Y E D N G F 280  
 841 GGT AAC CTA TAC ACA GTA GAA GCA AAA TTC CGT CAA TAT CCA ACG TAT AAA GAA TCA ATG  
 G N L Y T V E A K F R Q Y P T Y K E S M 300  
 901 GAA GAT TAT GCG AAA TTA TTG AAA AAT GGT TTA GAT TCC AAT AAA GAT TTC TAT CAT GGT  
 E D Y A K L L K N G L D S N K D F Y H G 320  
 961 GTC TGG AAA ACG GAA GCC AAA TCA TAC AAA GAA GCG ACA CGT TTC CTA ACA GGA AAA TAT  
 V W K T E A K S Y K E A T R F L T G K Y 340  
 1021 GCA ACG GAC AAA GAT TAC CAT AAG AAA TTA AAT GCG TTA ATT AAA ACA TAC GAT TTA ACT  
 A T D K D Y H K K L N A L I K T Y D L T 360  
 1081 TAT TAT GAT AAA GAA AAA GCA ACC GTT GAA CCA ATG GAA TCA AAT TTC CCA GCC TAT AAT  
 Y Y D K E K A T V E P M E S N F P A Y N 380  
 1141 GGC AAA AAC TAT GAC ACC TTT AAT AGT TAT GCT TGG GGC AAC TGT ACA CAA TAT GTC TAC  
 G K N Y D T F N S Y A W G N C T Q Y V Y 400  
 1201 AAC CGT ATT ACG CAA TTA GGT AAA CGT GTG GAC TTA ACA ATG GGG AAT GGT CAA GAT TGG  
 N R I T Q L G K R V D L T M G N G Q D W 420  
 1261 GGC GAA ACA GGT CGT GCA GCG GGG TAC AAA GTA AGT CGT ACA CCA AAA GCA GGC GCA GCG  
 G E T G R A R G Y K V S R T P K A G A A 440  
 1321 GTT TCC TTC CCA GCT GGC GTT TTA GGC GCA GAC AAT ACT TAT GGT CAT GTC GCA TTT GTG  
 V S F P A G V L G A D N T Y G H V A F V 460  
 1381 GAA AAA GTC TTT AAA GAT GGT AGC ATC TTA ATT TCT GAA ATG AAC GTG AAG GGA TTA AAC  
 E K V F K D G S I L I S E M N V K G L N 480  
 1441 GTT GTT TCG ACA CGT ACA ATC TCA GCC GAT GAA ACA CAT TTA ATG AAC TAT ATC GTT CCA  
 V V S T R T I S A D E T H L M N Y I V P 500  
 1501 AAA GAT AAA TAA  
 K D K Stop 503  
 AAAAATCAGCTCTTTGTCAATAAGAACGAATGAGTTGGAAAAATCAAAGCTAGCACTGAAGAAGCAATTTTAATTCCTCAGTGCTA  
 GCTTTTTTTGTGGCAAAAGTTTTCTCCAATAAAGTTTAATACATTCAGTTATTGCCAGGAGGCTTCAGGTCGGGATGAGTTAGCAA  
 CAGTCGCTGAGAGCTATATTTTTTTAGGTAGAATCACTTTTAGGTTAAAGATGTCTTATAATTGTAAGCGGATACAAAAAT  
 AAAAAAGAGGTGGGTAAT

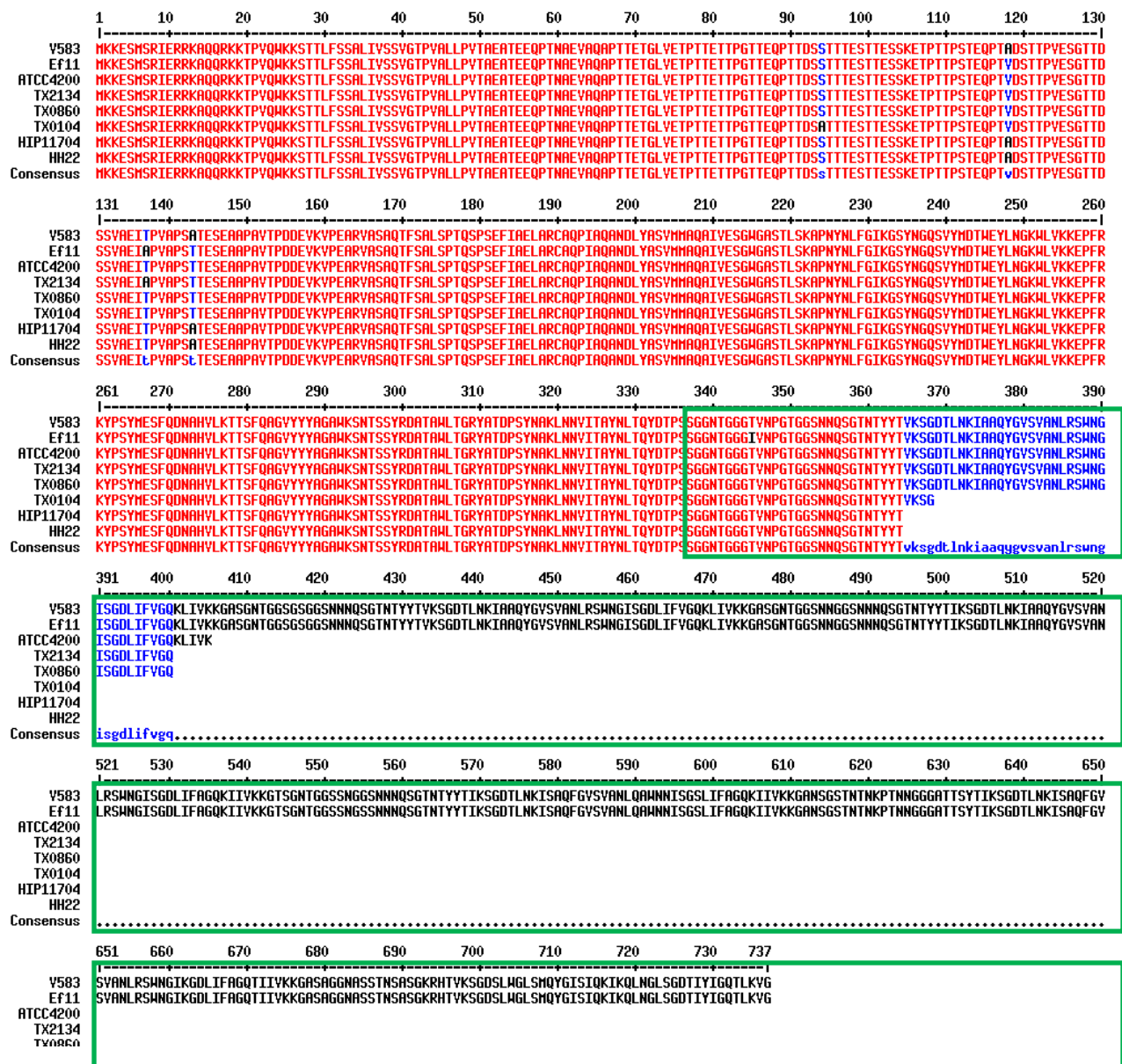
**Figura 24.** Análisis de la secuencia de P54 (Translate Tool, ExPSy Proteomics Server, Swiss Institute of Bioinformatics). Verde: péptido señal (SignalP 3.0 Server). Azul: región teórica de N-acetilglucosaminidasa. Anaranjado: región teórica de NpIC/P60. Subrayado: posibles sitios de glicosilación (NetNGlyc 1.0 Server).

### 8.6.2 Análisis de la secuencia de la proteína P72

Para P72 también se realizó un análisis similar. Al buscar en el genoma de varias cepas de *E. faecalis*, se encontró que el gen que codifica para esta proteína se encuentra en todas ellas; sin embargo, poseen algunas diferencias marcadas.

La peptidoglucano hidrolasa que ya se ha caracterizado es la de la cepa V583, llamada AtIA (Béliveau *et al.*, 1991; Eckert *et al.*, 2006), tiene una longitud de 737 aminoácidos y un peso molecular de 72 kDa. Sin embargo, en otras cepas la longitud varía demasiado, puede ir desde 350 hasta los 737 aminoácidos. Esta gran variación se debe a que las secuencias repetidas del sitio de unión al peptidoglucano que se encuentran en el extremo carboxilo no siempre se transcriben o se transcriben menos de seis (que son las que tiene la mayor). El extremo amino se encuentra muy conservado en todas las cepas (Figura 25).

AtIA es la peptidoglucano hidrolasa que se ha caracterizado (apartado 1.3 del marco teórico), posee un péptido señal, posibles sitios de glicosilación y secuencias repetidas de unión al peptidoglucano (Figuras 2 y 26). El punto isoeléctrico teórico es de 8.93; sin embargo, no coincide con lo observado en la electroforesis en dos dimensiones, donde se observan puntos entre un rango de 4 a 5.



**Figura 25.** Comparación de las secuencias de aminoácidos de P72 en 8 diferentes cepas de *Enterococcus faecalis*. Alineamiento múltiple realizado con la herramienta MultAlin. Se marcan las secuencias repetidas de unión a péptidoglucano con un recuadro verde.

-535 AATTTTCGTTCCGTC AATT CGATGCCTTGTCTTTTAAAATTCTTCTGCGATAACTCGTGGTTTCCC -467

-466 CAATGATTTTGGCACTTGTCTTCTGTTTCGCTTCCGCAACACGAGCATCAAATAACGCCTTGATTTTCGCAAGAATA -388

-387 ATAGCTTGATCTTTTGGATTTAATGCTTTTAAATAAAATTTTCAGCTCAATAATAAAATGTTCTTTATTCCGCTCC -309

-308 CTCTTTCTACACGATTCATTTCTCATCTTAAACTATAATTTCTTTTGGGCGAATAACAAGAGGAATTAATAAAATCAG -230

-229 ACTAAGGTAAAGAAGCGTCTACAACATAAAGTCGCAGTTTTTTTCCGAGTAGTAACAAGAGGAAATCCATGTTAAAAA -151

-150 ACATTACTTCTTTACAATCTAGTTACAGTAATATGAAATTTTGTGAAGTGTTTTAAATTCGCCAGAAAAAAGGTATA -72

-71 CTTGTTATAATAACAAAACATAAAAATTACATTTACATATAAGTTAAAAAAGGAAAGTTGGGACGTATCA ATG AAG 6  
TATAAT Met Lys

7 AAA GAA TCA ATG TCA CGT ATC GAA AGA AGG AAA GCA CAA CAA AGA AAG AAA ACG CCA GTA 66  
Lys Glu Ser Met Ser Arg Ile Glu Arg Arg Lys Ala Gln Gln Arg Lys Lys Thr Pro Val

67 CAA TGG AAG AAG AGC ACT ACT TTA TTC AGC TCG GCG TTA ATT GTT TCA TCT GTA GGA ACG 126  
Gln Trp Lys Lys Ser Thr Thr Leu Phe Ser Ser Ala Leu Ile Val Ser Ser Val Gly Thr

127 CCC GTT GCG TTA CTA CCA GTG ACT GCT GAG GCA ACA GAA GAG CAG CCA ACA AAT GCG GAA 186  
Pro Val Ala Leu Leu Pro Val Thr Ala Glu Ala Thr Glu Glu Gln Pro Thr Asn Ala Glu

187 GTT GCC CAA GCA CCT ACT ACA GAA ACT GGC TTA GTA GAG ACA CCA ACC ACA GAA ACT ACG 246  
Val Ala Gln Ala Pro Thr Thr Glu Thr Gly Leu Val Glu Thr Pro Thr Thr Glu Thr Thr

247 CCA GGA ATT ACG GAA CAA CCG ACA ACG GAT TCG TCA ACA ACG ACT GAA TCG ACA ACT GAA 306  
Pro Gly Ile Thr Glu Gln Pro Thr Thr Asp Ser Ser Thr Thr Thr Glu Ser Thr Thr Glu

307 TCA TCA AAA GAA ACA CCA ACA ACA CCA AGT ACC GAG CAA CCA ACA GTT GAT TCA ACT ACA 366  
Ser Ser Lys Glu Thr Pro Thr Thr Pro Ser Thr Glu Gln Pro Thr Val Asp Ser Thr Thr

367 CCT GTG GAA TCA GGA ACG ACT GAT TCT TCA GTA GCA GAA ATC ACG CCA GTA GCT CCT TCA 426  
Pro Val Glu Ser Gly Thr Thr Asp Ser Ser Val Ala Glu Ile Thr Pro Val Ala Pro Ser

427 ACA ACC GAG TCT GAA GCA GCG CCT GCG GTT ACA CCC GAT GAT GAA GTA AAA GTA CCA GAA 486  
Thr Thr Glu Ser Glu Ala Ala Pro Ala Val Thr Pro Asp Asp Glu Val Lys Val Pro Glu

487 GCT AGA GTA GCT TCT GCG CAA ACT TTT TCA GCG TTA TCA CCG ACG CAA AGT CCT TCA GAA 546  
Ala Arg Val Ala Ser Ala Gln Thr Phe Ser Ala Leu Ser Pro Thr Gln Ser Pro Ser Glu

547 TTT ATT GCC GAG TTA GCT CGT TGT GCA CAA CCT ATT GCG CAA GCC AAT GAT TTA TAT GCA 606  
Phe Ile Ala Glu Leu Ala Arg Cys Ala Gln Pro Ile Ala Gln Ala Asn Asp Leu Tyr Ala

607 TCA GTG ATG ATG GCT CAA GCA ATC GTT GAA AGT GGT TGG GGG GCA AGT ACG TTA TCT AAG 666  
Ser Val Met Met Ala Gln Ala Ile Val Glu Ser Gly Trp Gly Ala Ser Thr Leu Ser Lys

667 GCA CCA AAC TAT AAC TTA TTT GGG ATT AAA GGC AGC TAC AAT GGA CAA TCT GTC TAT ATG 726  
Ala Pro Asn Tyr Asn Leu Phe Gly Ile Lys Gly Ser Tyr Asn Gly Gln Ser Val Tyr Met

727 GAT ACA TGG GAA TAT TTA AAC GGC AAA TGG TTA GTG AAA AAA GAA CCT TTC CGT AAA TAT 786  
Asp Thr Trp Glu Tyr Leu Asn Gly Lys Trp Leu Val Lys Lys Glu Pro Phe Arg Lys Tyr

787 CCT TCT TAT ATG GAA TCA TTC CAA GAT AAT GCG CAC GTG CTA AAA ACA ACT TCT TTC CAA 846  
Pro Ser Tyr Met Glu Ser Phe Gln Asp Asn Ala His Val Leu Lys Thr Thr Ser Phe Gln

847 GCG GGC GTT TAC TAT TAT GCT GGG GCT TGG AAA AGC AAT ACA AGC TCG TAT CGC GAT GCA 906  
Ala Gly Val Tyr Tyr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys Ser Asn Thr Ser Ser Tyr Arg Asp Ala

907 ACT GCT TGG TTA ACA GGT CGT TAT GCG ACA GAT CCT AGC TAC AAT GCT AAA TTA AAT AAT 966  
Thr Ala Trp Leu Thr Gly Arg Tyr Ala Thr Asp Pro Ser Tyr Asn Ala Lys Leu Asn Asn

967 GTC ATT ACC GCA TAT AAC TTA ACT CAA TAT GAT ACA CCA TCT TCT GGT GGA AAT ACT GGG 1026  
Val Ile Thr Ala Tyr Asn Leu Thr Gln Tyr Asp Thr Pro Ser Ser Gly Gly Asn Thr Gly

1027 GGC GGA ACA GTT AAT CCA GGA ACA GGC GGT TCT AAC AAT CAA TCA GGA ACG AAC ACG TAC 1086  
Gly Gly Thr Val Asn Pro Gly Thr Gly Gly Ser Asn Asn Gln Ser Gly Thr Asn Thr Tyr

1087 TAT ACT GTA AAA TCA GGA GAT ACC TTG AAT AAA ATT GCC GCG CAA TAT GGT GTG AGC GTT 1146  
Tyr Thr Val Lys Ser Gly Asp Thr Leu Asn Lys Ile Ala Ala Gln Tyr Gly Val Ser Val

1147 GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAC GGC ATC TCT GGC GAT TTA ATT TTC GTT GGT CAA AAG CTC 1206  
Ala Asn Leu Arg Ser Trp Asn Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ile Phe Val Gly Gln Lys Leu

```

1207 ATC GTG AAA AAA GGT GCT TCA GGT AAT ACT GGT GGC TCA GGC AAC GGT GGT TCT AAC AAT 1266
Ile Val Lys Lys Gly Ala Ser Gly Asn Thr Gly Gly Ser Gly Asn Gly Gly Ser Asn Asn
1267 AAT CAA TCA GGA ACG AAC ACG TAC TAT ACT GTA AAA TCA GGG GAT ACC TTG AAT AAA ATT 1326
Asn Gln Ser Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Thr Val Lys Ser Gly Asp Thr Leu Asn Lys Ile
1327 GCC GCG CAA TAT GGC GTG ACG GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAT GGC ATC TCT GGC GAT 1386
Ala Ala Gln Tyr Gly Val Thr Val Ala Asn Leu Arg Ser Trp Asn Gly Ile Ser Gly Asp
1387 TTA ATT TTC GTT GGT CAA AAA CTC ATC GTG AAA AAA GGT ACT TCA GGT AAC ACC GGT GGC 1446
Leu Ile Phe Val Gly Gln Lys Leu Ile Val Lys Lys Gly Thr Ser Gly Asn Thr Gly Gly
1447 TCA AGT AAT GGT GGC TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAT ACG TAC TAC ACA ATT AAA 1506
Ser Ser Asn Gly Gly Ser Asn Asn Asn Gln Ser Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Thr Ile Lys
1507 TCA GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT GCT GCG CAA TAT GGC GTG AGT GTT GCT AAT TTA CGC 1566
Ser Gly Asp Thr Leu Asn Lys Ile Ala Ala Gln Tyr Gly Val Ser Val Ala Asn Leu Arg
1567 TCA TGG AAT GGC ATT TCT GGC GAT TTA ATC TTC GCT GGT CAA AAA ATT ATT GTG AAA AAA 1626
Ser Trp Asn Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ile Phe Ala Gly Gln Lys Ile Ile Val Lys Lys
1627 GGT ACT TCA GGT AAC ACC GGT GGC TCA AGT AAT GGT GGC TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA 1686
Gly Thr Ser Gly Asn Thr Gly Gly Ser Ser Asn Gly Gly Ser Asn Asn Asn Gln Ser Gly
1687 ACG AAT ACG TAC TAC ACG ATT AAA TCA GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT TCT GCA CAA TTC 1746
Thr Asn Thr Tyr Tyr Thr Ile Lys Ser Gly Asp Thr Leu Asn Lys Ile Ser Ala Gln Phe
1747 GGT GTT AGT GTT GCT AAT CTA CGT TCA TGG AAC GGG ATC AAA GGC GAT TTA ATT TTT GCT 1806
Gly Val Ser Val Ala Asn Leu Arg Ser Trp Asn Gly Ile Lys Gly Asp Leu Ile Phe Ala
1807 GGT CAA ACA ATC ATC GTG AAA AAA GGC GCT TCT GCA GGT GGC AAT GCT TCT TCA ACA AAT 1866
Gly Gln Thr Ile Ile Val Lys Lys Gly Ala Ser Ala Gly Gly Asn Ala Ser Ser Thr Asn
1867 AGT GCA TCA GGC AAA CGC CAT ACA GTT AAA AGC GGT GAT TCA CTT TGG GGC TTA TCA ATG 1926
Ser Ala Ser Gly Lys Arg His Thr Val Lys Ser Gly Asp Ser Leu Trp Gly Leu Ser Met
1927 CAA TAC GGA ATC AGC ATC CAA AAA ATC AAA CAA TTA AAT GGC TTA AGC GGG GAT ACA ATT 1986
Gln Tyr Gly Ile Ser Ile Gln Lys Ile Lys Gln Leu Asn Gly Leu Ser Gly Asp Thr Ile
1987 TAT ATT GGT CAA ACT TTA AAA GTT GGT TAA TTTAAGATTGAAAAAATAGCTATCTTTGGTAACATGAG 2055
Tyr Ile Gly Gln Thr Leu Lys Val Gly End
2056 TCTTTAATACATGAGTCTTATAATAAAAAAACAATGAGAAGGAATAGTAGAAAGAACCATGTGATAGAGCGGTATGG 2134
2135 CTGGTGAAATACGTACAGAAGCTTTTGAACCTGCCTTTAAGTTACTTTTTTGAACAAACCAAGTAGGAAAAGTCGGTG 2213
2214 ACGA

```

**Figura 26.** Análisis de la secuencia de AtIA (adaptado de Béliveau *et al.*, 1991) Verde: péptido señal. Azul: Dominio rico en T/E. Naranja: Dominio catalítico. Morado: Sitio de unión a peptidoglucano.

### 8.7 Identificación y secuenciación de los genes

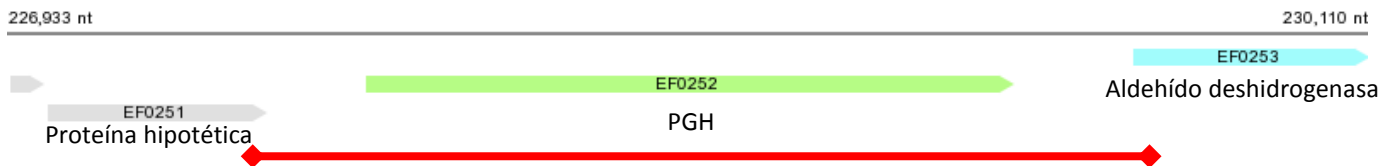
Tras el análisis de las secuencias, se podría pensar que la banda de actividad de 95 kDa efectivamente involucra a dos proteínas que migran juntas en la electroforesis. Para obtenerlas por separado y poder purificarlas, la estrategia planteada fue clonar y expresar estas proteínas en *E. coli*.

Debido a las diferencias en pesos moleculares y de pI que hay entre los valores teóricos y los observados, no se puede concluir que los genes reportados en el análisis sean exactamente los mismos que codifiquen para las peptidoglucano hidrolasas en la cepa de estudio, pero sí podrían ser similares, debido a que incluyen la secuencia de los péptidos obtenidos en la

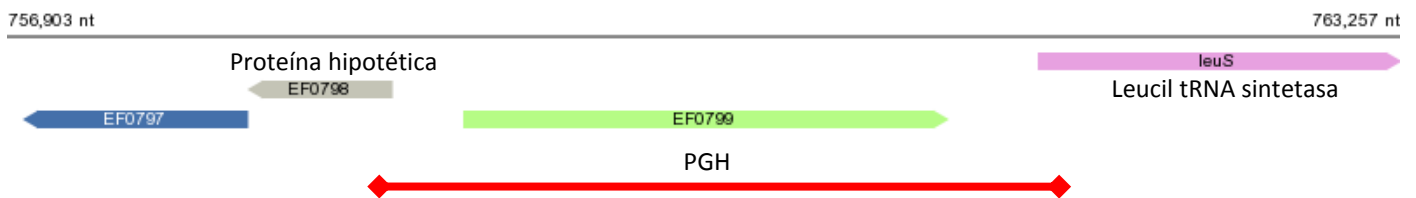


secuenciación previa (Serrano-Maldonado, 2010). También, se ha podido observar en el análisis que estas proteínas pueden variar entre las distintas cepas en cuanto a la longitud en los extremos (amino y/o carboxilo) como puede ser en el número de secuencias repetidas, o en secuencias adicionales en el interior del gen estructural.

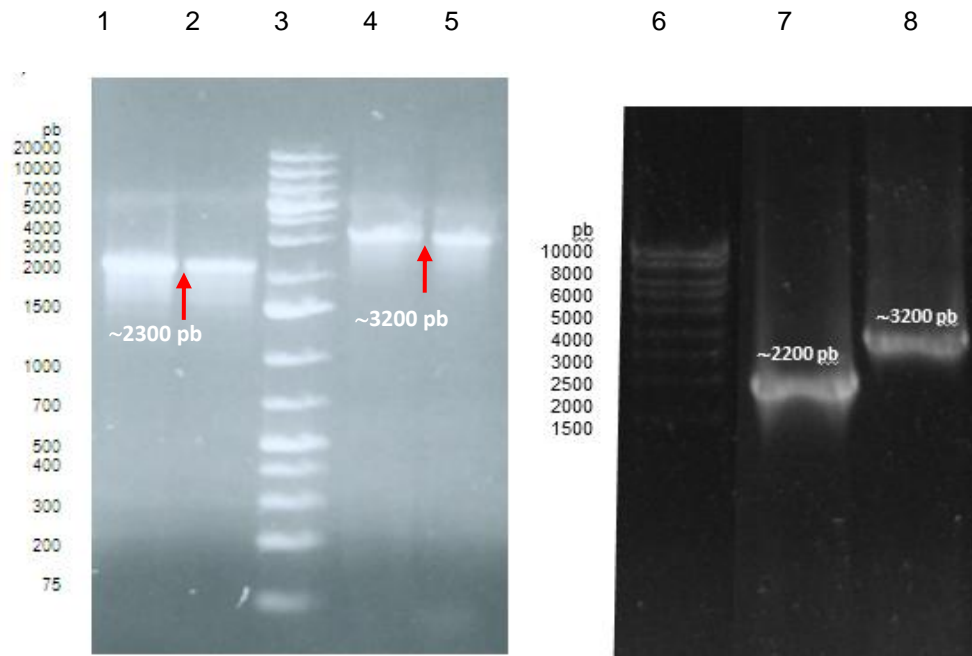
Por todo esto, se decidió amplificar una zona más amplia en donde se pueda incluir el gen con cualquier diferencia que pueda tener y detectarla por secuenciación. Se analizaron las secuencias de las proteínas que se encuentran antes y después de los genes de interés en varias cepas de *E. faecalis* y se observó que están muy conservadas. Por lo que se decidió diseñar cebadores que alinearan con los genes de las proteínas contiguas y así incluir el gen de interés completo (Figuras 27 y 28). Para P54 se esperaba un amplicón de aproximadamente 2200 pb y para P72 de 3200 pb, que en efecto, fueron los obtenidos (Figura 29). Como la DNA polimerasa empleada fue la *Pfu* que amplifica hasta 3 kpb y los amplicones se encuentran en su límite, se decidió probar también con una mezcla de enzimas (Long PCR Enzyme Mix, Fermentas) que amplifican fragmentos de mayor tamaño, para descartar la posibilidad de que hayan secuencias repetidas adicionales o secuencias intermedias. Sin embargo, los amplicones fueron del mismo tamaño (Figura 29).



**Figura 27.** Región amplificada para P54.



**Figura 28.** Región amplificada para P72.



**Figura 29.** Productos de la amplificación obtenidos donde se espera incluir a los genes estructurales de las peptidoglucano hidrolasas. Amplicón proteína 54 *Pfu* polimerasa (1 y 2), Long polimerasa (7). Amplicón proteína 72 *Pfu* polimerasa (4 y 5), Long polimerasa (8). Marcador (3 y 6).

Estos amplicones fueron enviados para su secuenciación y poder comparar con los reportados en la base de datos y proseguir con la clonación. Como no fue posible obtener la secuencia completa de los genes en un solo ensayo, debido a que se obtienen de manera confiable alrededor de 700 pb, se tuvieron que diseñar cebadores intermedios para ir amplificando y secuenciando los fragmentos faltantes. La secuenciación se hizo en ambos sentidos. Posteriormente, se tuvieron que ensamblar los fragmentos. Esto se hizo alineando y empalmado el final de la secuencia del primer amplicón con el segundo. Al final se comprobó debido a que se pudo comparar con la secuencia complementaria y con la secuencia reportada en la base de datos. También se hizo un análisis para determinar el inicio y término de la transcripción, resultando ser los mismos que los de la base de datos. También se realizó una traducción *in silico* para obtener la secuencia de aminoácidos. La longitud de los genes es de 1512 pb ó 503 aminoácidos para P54 y 2214 pb ó 737 aminoácidos para P72. La secuencia del gen de P54 se muestra en la Figura 30 y la de P72 en la Figura 31.

TTTTGTTTGAGGATACGAGAAAAGAGAGGACGTTGATGTTTGTTCAGCCCTTTCTTTTTTTTCTTAGAAAATTACCAAAAAAAGA  
TAGAAGAATTTGTGAATTTTCTTCTATTTTTTTAACTTTTTGCTAGAAATTTTTTATGAAACAGTATACTATTAATAAAAGGAGCCA  
TTTAAACAATAACTATGTCAATTATATATGTTGGTACATAAAAATAAATGGAGAAAAATATAATGGAGAAAAATAAAAAAGGAGA

1	ATG	AGT	ATG	AAA	AAA	CAA	TTT	GCC	CTG	TTC	TCT	ACC	TTA	TTA	CTT	TTA	GGT	TCA	TCA	ATG	
	M	S	M	K	K	Q	F	A	L	F	S	T	L	L	L	L	G	S	S	M	20
61	CCA	GTA	GGC	GCA	TTT	GCA	GAA	GGT	AAT	AAC	TTG	GTA	GCT	GAA	AAT	AGT	TCT	GTT	GCA	GAA	
	P	V	G	A	F	A	E	G	N	N	L	V	A	E	N	S	S	V	A	E	40
121	ACA	ACC	GCA	GAA	GCA	ACG	ACT	GCT	GAA	GAC	ACT	GAA	ACG	ACA	GCG	ACT	AGT	GAA	ACA	ACA	
	T	T	A	E	A	T	T	A	E	D	T	E	T	T	A	T	S	E	T	T	60

181 GAA GCG ACA GAA GAA TCA ACA ACT GAA ACA GAA AGT TCA ACC GAA TCA AGT GAA TCT GCA  
E A T E E S T T E T E S S T E S S E S A 80  
241 ACC ACG GAG TCC ACG GAA ACG TCA GGA ACC GAA ACG ACA GAT TCC ACA ACT GAT TCA ACA  
T T E S T E T S G T E T T D S T T D S T 100  
301 TCC ACA AGT ACG ACA GAA TCG ACT ACT GAC TCC ACC TCA ACG AGT ACA ACA GAG TCA ACC  
S T S T T E S T T D S T S T S T T E S T 120  
361 ACA GAT TCT ACG TCA ACA AGT ACA ACT GAA TCA AGT ACC ACG CCG ACG ACT ACA CCA AGT  
T D S T S T S T T E S S T T P T T T P S 140  
421 TCT TCT AAA GAA CAG CCA AAA CCT GGC ACG AGT ACT TCT GAA TCA AAA CAG CCG GCG AAA  
S S K E Q P K P G T S T S E S K Q P A K 160  
481 CCA GTG ACA CCA ACA GCG CCA GCT GAA AAG CCA GTA GAA CAA CCA GTA GCG TCA ACA CCG  
P V T P T A P A E K P V E Q P V A S T P 180  
541 CAG CCC GAA ATA GTC CCA GTT ACA AAT GAA ACG GTT GGG TTA GTG GAA GAC GAT GAG  
Q P E I V P P V T N E T V G L V E D D E 200  
601 ACG TTT ACG GTC AGC AAA ACG AAG AAG ACA GAA GAG TTT ATT CAA GAA ATC GGT GAA TCT  
T F T V S K T K K T E E F I Q E I G E S 220  
661 GCT CGG AAA GTG GCC AAG GAC AAA AAC TTA TAT GCT AGT GTG ATG ATT GCT CAA GCA ATT  
A R K V A K D K N L Y A S V M I A Q A I 240  
721 TTA GAA AGT GGT AGC GGC AAT AGT AAA TTA AGC CAG AAA CCA AAC TAC AAT TTG TTT GGT  
L E S G S G N S K L S Q K P N Y N L F G 260  
781 ATT AAA GGC GAT TAC AAA GGT CAA TCT GTT TCT TTT ATT ACC TAT GAA GAC AAT GGT TTC  
I K G D Y K G Q S V S F I T Y E D N G F 280  
841 GGT AAC CTA TAC ACA GTA GAA GCA AAA TTC CGT CAA TAT CCA ACG TAT AAA GAA TCA ATG  
G N L Y T V E A K F R Q Y P T Y K E S M 300  
901 GAA GAT TAT GCG AAA TTA TTG AAA AAT GGT TTA GAT TCC AAT AAA GAT TTC TAT CAT GGT  
E D Y A K L L K N G L D S N K D F Y H G 320  
961 GTC TGG AAA ACG GAA GCC AAA TCA TAC AAA GAA GCG ACA CGT TTC CTA ACA GGA AAA TAT  
V W K T E A K S Y K E A T R F L T G K Y 340  
1021 GCA ACG GAC AAA GAT TAC CAT AAG AAA TTA AAT GCG TTA ATT AAA ACA TAC GAT TTA ACT  
A T D K D Y H K K L N A L I D K T Y D L T 360  
1081 TAT TAT GAT AAA GAA AAA GCA ACC GTT GAA CCA ATG GAA TCA AAT TTC CCA GCC TAT AAT  
Y Y D K E K A T V E P M E S N F P A Y N 380  
1141 GGC AAA AAC TAT GAC ACC TTT AAT AGT TAT GCT TGG GGC AAC TGT ACA CAA TAT GTC TAC  
G K N Y D T F N S Y A W G N C T Q Y V Y 400  
1201 AAC CGT ATT ACG CAA TTA GGT AAA CGT GTG GAC TTA ACA ATG GGG AAT GGT CAA GAT TGG  
N R I T Q L G K R V D L T M G N G Q D W 420  
1261 GGC GAA ACA GGT CGT GCA CGC GGG TAC AAA GTA AGT CGT ACA CCA AAA GCA GGC GCA GCG  
G E T G R A R G Y K V S R T P K A G A A 440  
1321 GTT TCC TTC GCA GCT GGC GTT TTA GGC GCA AAT ACT TAT GGT CAT GTC GCA TTT GTG  
V S F P A G V L G A D N T Y G H V A F V 460  
1381 GAA AAA GTC TTT AAA GAT GGT AGC ATC TTA ATT TCT GAA ATG AAC GTG AAG GGA TTA AAC  
E K V F K D G S I L I S E M N V K G L N 480  
1441 GTT GTT TCG ACA CGT ACA TCA GCC GAT GAA ACA CAT TTA ATG AAC TAT ATC GTT CCA  
V V S T R T I S A D E T H L M N Y I V P 500  
1501 AAA GAT AAA TAA  
K D K Stop 503

AAAATCAGCTCTTTGTCAATAAGAACGAATGAGTTGGAAAAATCAAAGCTAGCACTGAAGAAGCAATTTTAATTCTTCAGTGCTAG  
CTTTTTTTGTGGCAAAAGTTCTCTCCAATAAAGTTTAATACATTGAGTTATTGCCAGCGGTTTCAGTTCGGGATGAGTTAGCAAC  
AGTCGCTGATAGCTATATTTTTTTTTAGGTAGAATCATTTACTTTTTAGGTGAAAGATGTCTTATAATTGTAAGCGGATACAAAATA  
AAAAAGAGGTGGGTAAATGAGTAAAAAAGAAATAAATCAAGTAGTGCCAGTAGCTATCA

**Figura 30.** Secuencia obtenida del gen que codifica para P54.

TTTCGAGATATAGCTTGATCTTTTGGATTTAATGCTTTTAAATAAATTTTCAGCTCAATAATAAAATGTTCTTTATTCATTCCGCT  
CCCTCTTTCTACACGATTCATTTCTCATCTTAAACTATAATTTCTTTTTGAGCGAATAACAAGAGGAATTAATAAAATCAGACTAA  
GGTAAAGAAGCATCTACAATAAAGTCGAGTTTTTTTTCCGAGTAGTAACAAGAGAGGAAATCCATGTTAAAAAACATTACTTCTT  
TACAATCTAGTTACAGTAATATGAAATTTTGTGAAGTGTTTTTAATTCGCTAGAAAAAAGGTATACTTGTATAATAACAAAAC  
TAAAAAATTACATTTACATATAAGTTAAAAAAGGAAAGTTGGGGACGTATCA

1 ATG AAG AAA GAA TCA ATG TCA CGT ATC GAA AGA AGG AAA GCA CAA CAA AGA AAG AAA ACG  
M K K E S M S R I E R R K A Q Q R K K T 20  
61 CCA GTA CAA TGG AAG AAA AGC ACT ACT TTA TTC AGC TCG GCG TTA ATT GTT TCA TCT GTA  
P V Q W K K S T T L F S S A L I V S S V 40

121 GGA ACG CCC GTT GCG TTA CTA CCA GTG ACT GCT GAG GCA ACA GAA GAG CAG CCA ACA AAT  
G T P V A L L P V T A E A T E E Q P T N 60  
181 GCG GAA GTT GCC CAA GCA CCT ACT ACG GAA ACT GGC TTA GTA GAG ACA CCA ACC ACA GAA  
A E V A Q A P T T E T G L V E T P T T E 80  
241 ACT ACG CCA GGA ACT ACG GAA CAA CCG ACA ACG GAT TCG TCA TCA ACG ACT GAA TCG ACA  
T T P G T T E Q P T T D S S T T T E S T 100  
301 ACT GAA TCA TCA AAA GAA ACA CCA ACA ACA CCA AGT ACC GAG CAA CCA ACA GTT GAT TCA  
T E S S K E T P T T P S T E Q P T A D S 120  
361 ACT ACA CCT GTG GAA TTA GGA ACG ACT GAT TCT TCA GTA GCA GAA ATC GCG CCA GTA GCT  
T T P V E S G T T D S S V A E I T P V A 140  
421 CCT TCA ACA ACC GAG TCT GAA GCA GCG CCT GCA GTT ACA CCC GAT GAT GAA GTA AAA GTA  
P S A T E S E A A P A V T P D D E V K V 160  
481 CCA GAA GCT AGA GTA GCT TCT GCG CAA ACT TTT TCA GCG TTA TCA CCG ACG CAA AGT CCT  
P E A R V A S A Q T F S A L S P T Q S P 180  
541 TCA GAA TTT ATT GCC GAG TTA GCT CGT TGT GCA CAA CCT ATT GCG CAA GCC AAT GAT TTA  
S E F I A E L A R C A Q P I A Q A N D L 200  
601 TAT GCA TCA GTG ATG ATG GCT CAA GCA ATC GTT GAA AGT GGT TGG GGA GCA AGT ACG CTA  
Y A S V M M A Q A I V E S G W G A S T L 220  
661 TCT AAG GCA CCA AAC TAT AAC TTA TTT GGG ATT AAA GGC AGC TAC AAT GGA QAA TCT GTC  
S K A P N Y N L F G I K G S Y N G Q S V 240  
721 TAT ATG GAT ACA TGG GAA NAT TTA AAC GGC AAA TGG TTA GTG AAA AAA GAA CCT TTC CGT  
Y M D T W E Y L N G K W L V K K E P F R 260  
781 AAA TAT CCT TCT TAC ATG GAA TCA TTC CAA GAT AAT GCG CAC GTG CTA AAA ACA ACT TCT  
K Y P S Y M E S F Q D N A H V L K T T S 280  
841 TTC CAA GCG GGC GTT TAC TAT TAT GCT GGG GCT TGG AAA AGC AAT ACA AGC TCG TAC CGC  
F Q A G V Y Y A G A W K S N T S S Y R 300  
901 GAT GCA ACT GTT TGG TTA ACA GGT CGT TAT GCG ACA GAT CCT AGC TAC AAT GCT AAA TTA  
D A T A W L T G R Y A T D P S Y N A K L 320  
961 AAT AAT GTC ATT ACC GCA TAT AAC TTA ACT CAA TAT GAT ACA CCA TCT TCT GGT GGA AAT  
N N V I T A Y N L T Q Y D T P S S G G N 340  
1021 ACT GGG GGC GGA ATA GTT AAT CCA GGA ACA GGC GGC TCG AAC AAT CAA TCA GGA ACG AAC  
T G G G T V N P G T G A T S N N Q S G T N 360  
1081 ACG TAC TAT ACT GTA AAA TCA GGA GAT ACC TTG AAT AAA ATT GCC GCG CAA TAT GGT GTG  
T Y Y T V K S G D T L N K I A A Q Y G V 380  
1141 AGC GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAC GGC ATC TCT GGC GAT TTA ATT TTC GTT GGT CAA  
S V A N L R S W N G I S G D L I F V G Q 400  
1201 AAA CTT ATC GTG AAA AAA GGT GCT TCA GGT AAC ACT GGT GGC TCA GGC AGC GGT GGT TCT  
K L I V K K G A S G N T G G S G S G S 420  
1261 AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAC ACG TAC TAT ACT GTA AAA TCA GGG GAT ACC TTG AAT  
N N N S G T N T Y T V K S G D T L N 440  
1321 AAA ATT GCC GCC CAA TAT GGC GTG AGC GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAT GGC ATC TCT  
K I A A Q Y G V S V A N L R S W N G I S 460  
1381 GGC GAT TTA ATT TTC GTT GGT CAA AAA CTC ATC GTG AAA AAA GGT GCT TCA GGT AAC ACT  
G D L I F V G Q K L I V K K G A S G N T 480  
1441 GGT GGC TCA AAC AAC GGT GGC TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAT ACG TAC TAC ACA  
G G S N N G G S N N N Q S G T N T Y Y T 500  
1501 ATT AAA TCA GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT GCC CAA TAT GGC GTG AGT GTT GCT AAT  
I K S G D T L N K I A A Q Y G V S V A N 520  
1561 TTA CGC TCA TGG AAT GGC ATT TCT GGC GAT TTA ATC TTC GCT GGT CAA AAA ATT ATT GTG  
L R S W N G I S G D L I F A G Q K I I V 540  
1621 AAA AAA GGT ACT TCA GGT AAC ACC GGT GGC TCA AGC AAT GGT GGT TCT AAC AAT AAT CAA  
K K G T S G N T G G S S N G G S N N Q 560  
1681 TCA GGA ACG AAT ACG TAC TAC ACG ATT AAA TCG GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT TCT GCA  
S G T N T Y T I K S G D T L N K I S A 580  
1741 CAA TTC GGT GTT AGT GTG GCT AAC TTA CAA GCC TGG AAT AAC ATC AGC GGT AGT TTG ATT  
Q F G V S V A N L Q A W N N I S G S L I 600  
1801 TTT GCT GGT CAA AAG ATT ATC GTG AAA AAA GGC GCC AAC TCA GGT TCA ACG AAT ACG AAC  
F A G Q K I I V K K G A N S G S T N T N 620  
1861 AAG CCT ACG AAT AAT GGT GGC GGT GCG ACA ACA TCC TAC ACG ATT AAA TCA GGT GAT ACG  
K P T N N G G G A T T S Y T I K S G D T 640  
1921 CTG AAT AAA ATT TCT GCA CAG TTT GGC AGT GTT GCT AAT CTA CGT TCA TGG AAC GGG  
L N K I S A Q F G V S V A N L R S W N G 660  
1981 ATC AAA GGC GAT TTA ATT TTT GCT GGT CAA ACA ATC ATC GTG AAA AAA GGC GCT TCT GCA

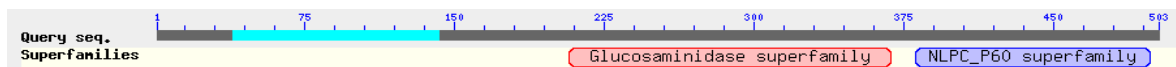
	I	K	G	D	L	I	F	A	G	Q	T	I	I	V	K	K	G	A	S	A	680
2041	GGT	GGC	AAT	GCT	TCT	TCA	ACA	AAT	AGT	GCA	TCA	GGC	AAA	CGC	CAT	ACA	GTT	AAA	AGC	GGT	
	G	G	N	A	S	S	T	N	S	A	S	G	K	R	H	T	V	K	S	G	700
2101	GAT	TCA	CTT	TGG	GGC	TTA	TCA	ATG	CAA	TAC	GGA	ATC	AGC	ATC	CAA	AAA	ATC	AAA	CAA	TTA	
	D	S	L	W	G	L	S	M	Q	Y	G	I	S	I	Q	K	I	K	Q	L	720
2161	AAT	GGC	TTA	AGC	GGG	GAT	ACA	ATT	TAT	ATT	GGT	CAA	ACT	TTA	AAA	GTT	GGT	TAA			
	N	G	L	S	G	D	T	I	Y	I	G	Q	T	L	K	V	G	Stop		737	

TTTAAGATTGAAAAAATAGCTATCTTTGGTAACATGAGTCTTATAATAGAAAAACAATGAGAAGGAATAGTAGAAAGAACCAT  
 GTGATAGAGAGCGTATGGCTGGTGGAAATACGTACAGAAGCTTTTGAACCTCGCCTTTAAGTTACTTTTTTGAACAAACCAAGTAGG  
 AAAAGTCGGTGACGATCGTTAAGACGTTTGGAGTTAAGGTGACGGTACTGACCGTTTCTTTGACGAATTTAGGTGGTACCACGTT  
 GCATTTGTATGTTACAGTCCTATAGGAATTTTTCCCTATAGGACTTTTTTTTATCACTAAGTGGCTAGTTTAAAGTCAGAATAGTGAC  
 AATGGCTGCAGGTGGCAAATTTTAAGAATGAAAAATTTTATATTACTAGGAGGAATAACATGAGCTACAATCACAAAGAGATTGAG  
 AAAAAATGGCAAAAATATTGGGCTAAGAACAATTGTTTCAATACATTGGACGACCCAAATAAAGAAAAATTTATGCACTAGAT

**Figura 31.** Secuencia obtenida del gen que codifica para P72.

La secuencia de nucleótidos es prácticamente igual a las reportadas en la base de datos, pero la de aminoácidos cambia en uno para la P54 y para P72 cambia en seis; sin embargo, ninguno de estos cambios caen en los dominios catalíticos o de unión al sustrato. Los genes también tienen el mismo tamaño que los reportados, por lo que no poseen secuencias adicionales que pudieran incrementar el tamaño de las proteínas. La diferencia en peso molecular debe ser explicada por otras causas distintas al tamaño de los genes. A partir de las secuencias nucleotídicas reales y su traducción *in silico* se volvió a hacer el análisis de los dominios y se comparó con los genes reportados (Figuras 32 y 33).

MSMKKQFALFSTLLLLGSSMPVGAFAEGNNLVAENSSVAETTAEATTAEATETTATSETTEATEESTTET	70
ESSTESSESATTESTETSGTETTTDSTTDSTSTSTTTESTTTDSTSTSTTTESTTTDSTSTSTTESSTPTTTT	140
SSKEQPKPGTSTSESKQPAKPVPTAPAEKPVQVASTPQPEIVPPVTNETVGLVEDDEFTTVSKTKKT	210
EEFIQEIGESARKVAKDKNLYASVMIAQAILESGSGNSKLSQKPNYNLFGIKGDYKQSVSFITYEDNGF	280
GNLYTVEAKFRQPTYKESMEDYAKLLKNGLDNKNDFYHGVWVKTEAKSYKEATRFLTGKYATDKDYHKKL	350
NALIKTYDLTYDKEKATVEPMESNFPAYNGKNYDTFNYSYAWGNCQYVYNRITQLGKRVDLTMGNGQDW	420
GETGRARGYKVSRTPKAGAAVSFPAGVLGADNTYGHVAFVEKVKFDGSILISEMNVKGLNVVSTRTISAD	490
ETHLMNYIVPKDK	503



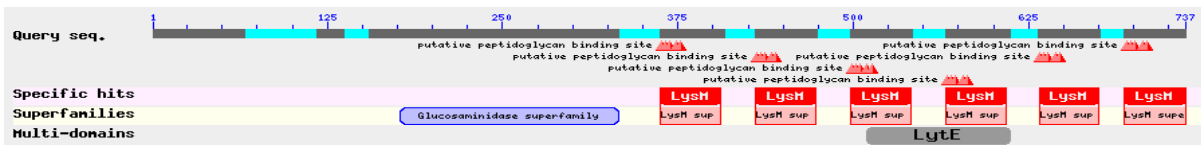
**Figura 32.** Análisis de la secuencia obtenida del gen que codifica para P54 y sus dominios. Péptido señal (verde). Región teórica de N-acetilglucosaminidasa (rojo). Región teórica de NpIC/P60 (azul). Aminoácido que difiere de la secuencia teórica (negritas), (BLAST, NCBI).

Adicionalmente se obtuvo un perfil de hidrofobicidad de cada proteína para ver si era posible que las proteínas se asociaran por interacciones hidrofóbicas (Figuras 34 y 35). El perfil se obtuvo mediante el programa ProtScale utilizando el algoritmo Kyte & Doolittle (ExPASy Tools, SIB), donde los picos que se encuentran en valores positivos son las regiones hidrofóbicas. Pese a que ambas proteínas tienen regiones hidrofóbicas, no son las que predominan y en el

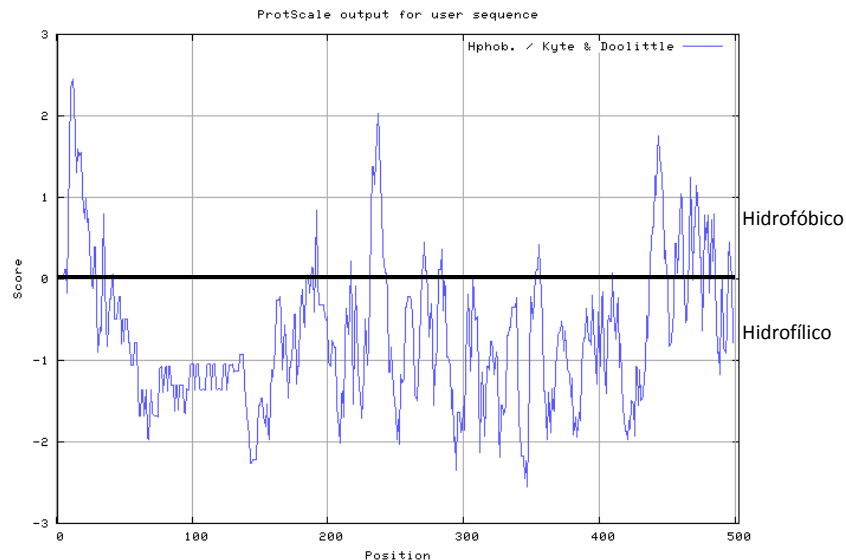
caso de P72, los sitios de unión a peptidoglucano son los que presentan la mayor hidrofobicidad. No se observa una zona clara de hidrofobicidad por la cual se pueda llevar a cabo una asociación fuerte entre ambas proteínas.

```

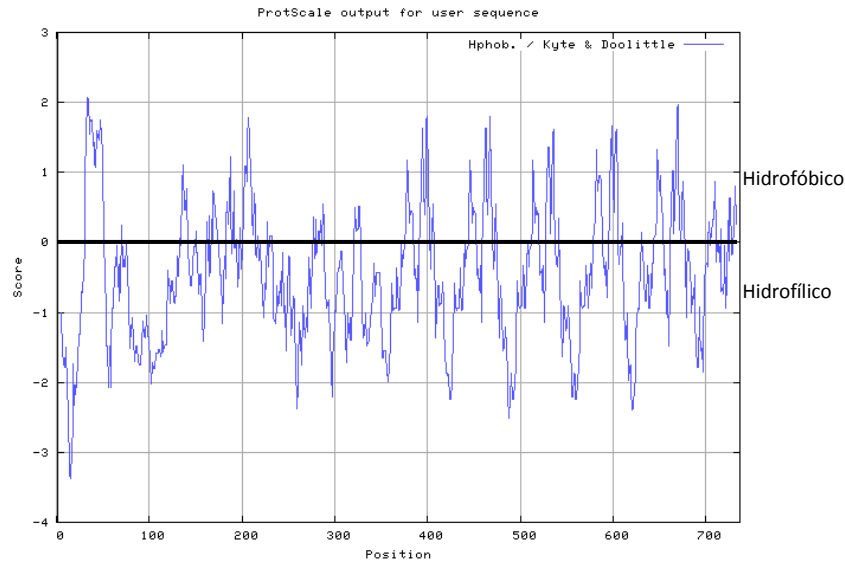
MKKESMSRIERRKAQQRKKTTPVQWKKSTTLFSSALIVSSVGGTPVALLPVTAEATEEQPTNAEVAQAPTTE 70
TGLVETPTTETTPGTTTEQPTTDDSSSTTESTTESSKETPTTPSTEQPTVDSTTPVELGTTDDSSVAEIA 140
PSTTESEAAPAVTPDDEVKVPPEARVASAQTFALSPTQSPSEFIAELARCAQPIAQANDLYASVMMQAQAI 210
VESGWGASTLSKAPNYNLFGIKGSYNGQSVYMDTWEYLNKGWLVKKEPFRKYPSYMESFQDNAHVLKTTTS 280
FQAGVYYYAGAWKSNNTSSYRDATAWLTGRYATDPSYNAKLNNVITAYNLTQYDTPSSGGNTGGGIVNPGT 350
GGSNNQSGTNTYYTVKSGDTLNKIAAQYGVSVANLRSWNGISGDLI FVGQKLI V KKGASGNTGGSGSGGS 420
NNNQSGTNTYYTVKSGDTLNKIAAQYGVSVANLRSWNGISGDLI FVGQKLI V KKGASGNTGGSNNGSNN 490
NQSGTNTYYTIKSGDTLNKIAAQYGVSVANLRSWNGISGDLI FAGQKI V KKGTSGNTGGSSNNGSNNNQ 560
SGTNTYYTIKSGDTLNKISAQFGVSVANLQAWNNISGSLI FAGQKI V KKGANSGSTNTNKPTNNGGGAT 630
TSYTIKSGDTLNKISAQFGVSVANLRSWNGIKGDLI FAGQTI V KKGASAGGNASSTNSASGKRHTVKSG 700
DSLWGLSMQYGISIQKIKQLNGLSGDTIYIGQTLKV 737
  
```



**Figura 33.** Análisis de la secuencia obtenida del gen que codifica para P72 y sus dominios. Péptido señal (verde). Región teórica de *N*-acetilglucosaminidasa (azul). Secuencias repetidas de unión a peptidoglucano LysM (cada módulo sombreado, rojo). Aminoácidos que difiere de la secuencia teórica (negritas), (BLAST, NCBI).



**Figura 34.** Perfil de hidrofobicidad de P54.



**Figura 35.** Perfil de hidrofobicidad de P72.

Conociendo la secuencia fue posible diseñar los cebadores para amplificar el gen completo y añadirle a éstos la secuencia de restricción con que se iban a cortar tanto los insertos como el plásmido. Se decidió trabajar con *NcoI* y *XhoI*, ya que no degrada a los insertos y cortan en los extremos del sitio múltiple de clonación del plásmido, dejando pocos aminoácidos adicionales a la proteína recombinante.

## 8.8 Clonación

El vector pET-22b(+) tiene un tamaño de 5493 pb y al insertar los genes se obtuvieron construcciones de aproximadamente 7000 pb para P54 y 7700 pb para P72. La construcción de los plásmidos se muestra en las Figuras 36 y 37.

Al realizar el ensayo de ligación se obtuvieron las construcciones de los tamaños esperados (Figura 38). Se observó otra banda de menor tamaño, que puede corresponder al plásmido sin inserto. Con los que sí lo contenían, se prosiguió con la transformación en la cepa DH5 $\alpha$ . Se seleccionaron 10 colonias de cada una de las proteínas y se les hizo PCR para ver que se encontrara el inserto; para P54 las 10 colonias fueron positivas y para P72 sólo una (Figuras 39 y 40). De una de las clonas de P54 y de la única de P72 se aisló el plásmido para transformar en las cepas de expresión, que fueron la BL21(DE3) y BL21(DE3)pLysS, respectivamente. Nuevamente se obtuvieron 10 clonas positivas de 10 colonias analizadas para P54 y una para P72 (Figuras 41 y 42).

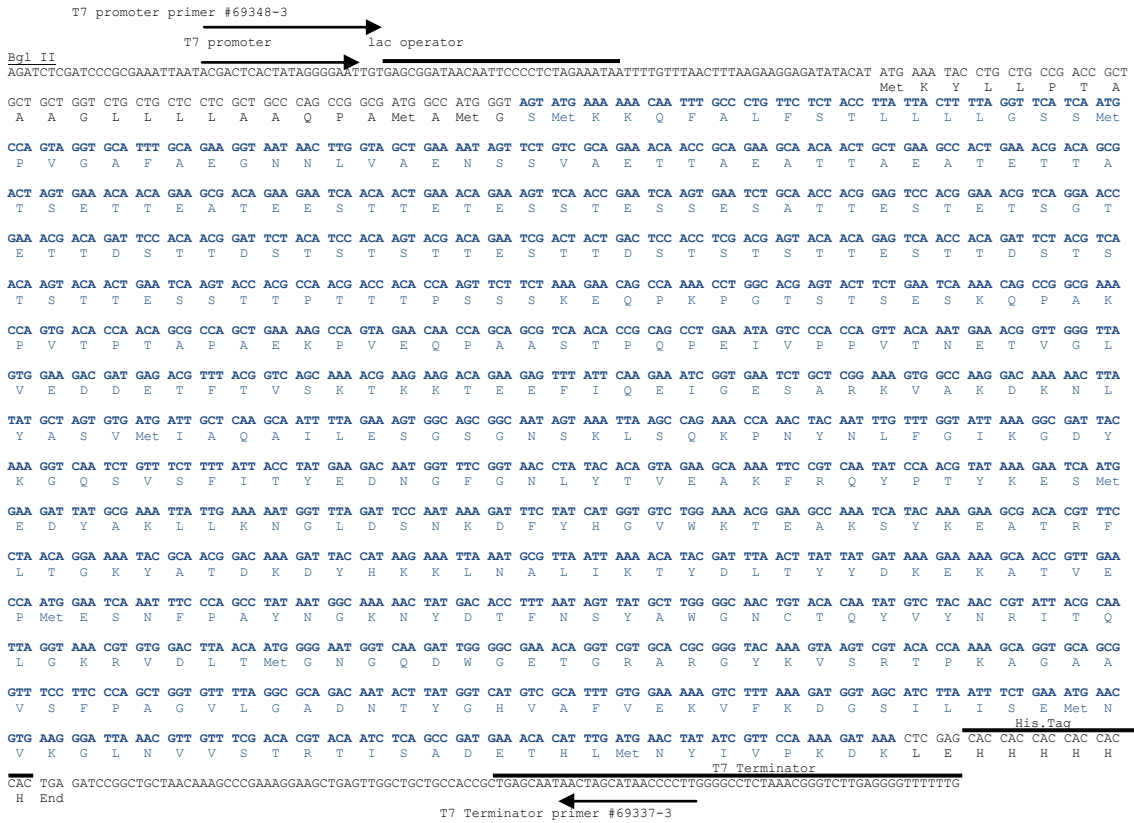


Figura 36. Construcción del plásmido para P54.



T7 promoter primer #69348-3  
 T7 promoter → lac operator

Bgl II  
 AGATCTCGATCCCGGAAAATTAATACGACTCACATATAGGGGAAATTGTGACGGATAACAATTCCOCTCTAGAAATAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATG AAA TAC CTG CTG CCG ACC GCT  
 Met K Y L L P T A

GCTGCTGGTCTG CTG CTC CTC GCT GCC CAG CCG GCG ATG GCC ATG GGT AAG AAA GAA TCA ATG TCA CGT ATC GAA AGA AGG AAA GCA CAA CAA AGA AAG AAA ACG CCA GTA  
 A A G L L L L A A Q P A Met A Met G K K E S Met S R I E R R K A Q Q R K K T P V

CAA TGG AAG AAG AGC ACT ACT TTA TTC AGC TCG GCG TTA ATT GTT TCA TCT GTA GGA ACG CCC GTT GCG TTA CTA CCA GTG ACT GCT GAG GCA ACA GAA GAG CAG  
 Q W K K S T T L F S S A L I V S S V G T P V A L L P V T A E A T E E Q

CCA ACA AAT GCG GAA GTT GCC CAA GCA CCT ACT ACG GAA ACT GGC TTA GTA GAG ACA CCA ACA ACA GAA ACT ACG CCA GGA ACT ACG GAA CAA CCG ACA ACG GAT  
 P T N A E V A Q A P T T E T G L V E T P T T E T T P G T T E Q P T T D

TCG TCA ACA ACG ACT GAA TCG ACA ACT GAA TCA TCA AAA GAA ACA CCA ACA ACA CCA AGT ACC GAG CAA CCA ACA GCT GAT TCA ACT ACA CCT GTG GAA TCA GGA  
 S S T T T E S T T E S S K E T P T T P S T E Q P T A D S T T P V E S G

ACG ACT GAT TCT TCA GTA GCA GAA ATT ACG CCA GTA GCT CCT TCA GCA ACC GAG TCT GAA GCA GCG CCT GCG GTT ACA CCC GAT GAT GAA GTA AAA GTA CCA GAA  
 T T D S S V A E I T P V A P S A T E S E A A P A V T P D D E V K V P E

GCT AGA GTA GCT TCT GCG CAA ACT TTT TCA GCG TTA TCA CCG ACG CAA AGT CCT TCA GAA TTT ATT GCC GAG TTA GCT CGT TGT GCA CAA CCT ATT GCG CAA GCC  
 A R V A S A Q T F S Y Met D T S A L S A G S E F I A E L A R C A Q A

AAT GAT TTA TAT GCA TCA GTG ATG ATG GCT CAA GCA ATC GTT GAA AGT GGT TGG GGA GCA AGT ACG CTA TCT AAG GCA CCA AAC TAT AAC TTA TTT GGG ATT AAA  
 N D L Y A S V Met Met A Q A I V E S G W G A S T L S K A P N Y N L F G I K

GGC AGC TAC AAT GGA CAA TCT GTC TAT ATG GAT ACA TGG GAA TAT TTA AAC GGC AAA TGG TTA GTG AAA AAA GAA CCT TTC CGT AAA TAT CCT TCT TAC ATG GAA  
 G S Y N G Q S V Y Met D T S A L S A G S E F I A E L A R C A Q A

TCA TTC CAA GAT AAT GCG CAC GTG CTA AAA ACA ACT TCT TTC CAA GCG GGC GTT TAC TAT TAT GCT GGG GCT TGG AAA AGC AAT ACA AGC TCG TAC CGC GAT GCA  
 S F Q D N A H V L K T T S F Q A G V Y Y Y A G A W K S N T S S Y R D A

ACT GCT TGG TTA ACA GGT CGT TAT GCG ACA GAT CCT AGC TAC AAT GCT AAA TTA AAT AAT GTC ATT ACC GCA TAT AAC TTA ACT CAA TAT GAT ACA CCA TCT TCT  
 T A W L T G R Y A T D P S Y N A K L N N V I T A Y N L T Q Y D T P S S

GGT GGA AAT ACT GGG GCG GGA ACA GTT AAT CCA GGA ACA GGC GGC TCG AAC AAT CAA TCA GGA ACG AAC ACG TAC TAT ACT GTA AAA TCA GGA GAT ACC TTG AAT  
 G G N T G G S N N G T V N P G T G G S N N Q S G T N T Y Y T V K S G D T L N

AAA ATT GCC GCG CAA TAT GGT GTG ACG GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAC GGC ATC TCT GGC GAT TTA ATT TTC GTT GGT CAA AAA CTT ATC GTG AAA AAA GGT  
 K I A A Q Y G V S V A N L R S W N G I S G D L I F V G Q K L I V K K G

GCT TCA GGT AAC ACT GGT GGC TCA GGC AGC GGT GGT TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAC ACG TAC TAT ACT GTA AAA TCA GGC GAT ACC TTG AAT AAA ATT  
 A S G N T G G S G S G S N N Q S G T N T Y Y T V K S G D T L N K I A A

GCC GCC CAA TAT GCG GTG AGC GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAT GGC ATC TCT GGC GAT TTA ATT TTC GTT GGT CAA AAA CTC ATC GTG AAA AAA GGT GCT TCA  
 A A Q Y G V S V A N L R S W N G I S G D L I F V G Q K L I V K K G A S

GGT AAC ACT GGT GGC TCA AAC AAC GGT GGC TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAT ACG TAC TAC ACA ATT AAA TCA GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT GCC GCC  
 G N T G G S N N G G S N N Q S G T N T Y Y T I K S G D T L N K I A A

CAA TAT GCG GTG AGT GTT GCT AAT TTA CGC TCA TGG AAT GGC ATT TCT GGC GAT TTA ATC TTC GCT GGT CAA AAA ATT ATT GTG AAA AAA GGT ACT TCA GGT AAC  
 Q Y G V S V A N L R S W N G I S G D L I F A G Q K I I V K K G T S G N

ACC GGT GGC TCA ACG AAT GGT GGT TCT AAC AAT AAT CAA TCA GGA ACG AAT ACG TAC TAC ACG ATT AAA TCG GGC GAT ACC TTG AAC AAA ATT TCT GCA CAA TTC  
 T G G S S N G G S N N N Q S G T N T Y Y T I K S G D T L N K I S A Q F

GGT GTT AGT GTG GCT AAC TTA CAA GCC TGG AAT AAC ATC AGC GGT AGT TTG ATT TTT GCT GGT CAA AAG ATT ATC GTG AAA AAA GGC GCC AAC TCA GGT TCA ACG  
 G V S V A N L R S W N G I S G S L I F A G Q K I I V K K G A N S G S T

AAT ACG AAC AAG CCT ACG AAT AAT GGT GGC GGT GCG ACA ACA TCC TAC ACG ATT AAA TCA GGT GAT ACG CTG AAT AAA ATT TCT GCA CAG TTT GGC GTG AGT GTT  
 N T N K P T N N G G G A T T S Y T I K S G D T L N K I S A Q F G V S V

GCT AAT CTA CGT TCA TGG AAC GGC ATC AAA GGC GAT TTA ATT TTT GCT GGT CAA ACA ATC ATC GTG AAA AAA GGC GCT TCT GCA GGT GGC AAT GCT TCT TCA ACA  
 A N L R S W N G I K G D L I F A G Q T I I V K K G A S A G G N A S S T

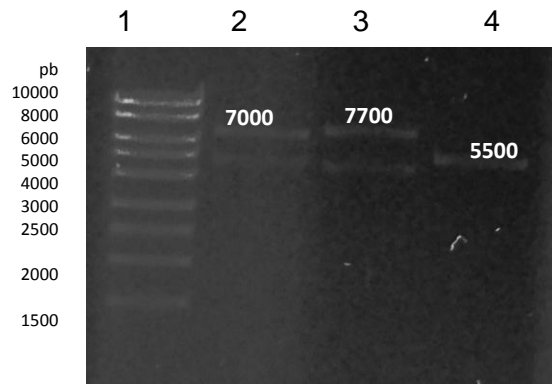
AAT AGT GCA TCA GGC AAA CGC CAT ACA GTT AAA AGC GGT GAT TCA CTT TGG GGC TTA TCA ATG CAA TAC GGA ATC AGC ATC CAA AAA ATC AAA CAA TTA AAT GGC  
 N S A S G K R H T V K S G D S L W G L S Met Q Y G I S I Q K I K Q L N G

TTA AGC GGG GAT ACA ATT TAT ATT GGT CAA ACT TTA AAA GTT GGT CTC GAG CAC CAC His.Tag  
 L S G D T I Y I G Q T L K V G L E H H H H H

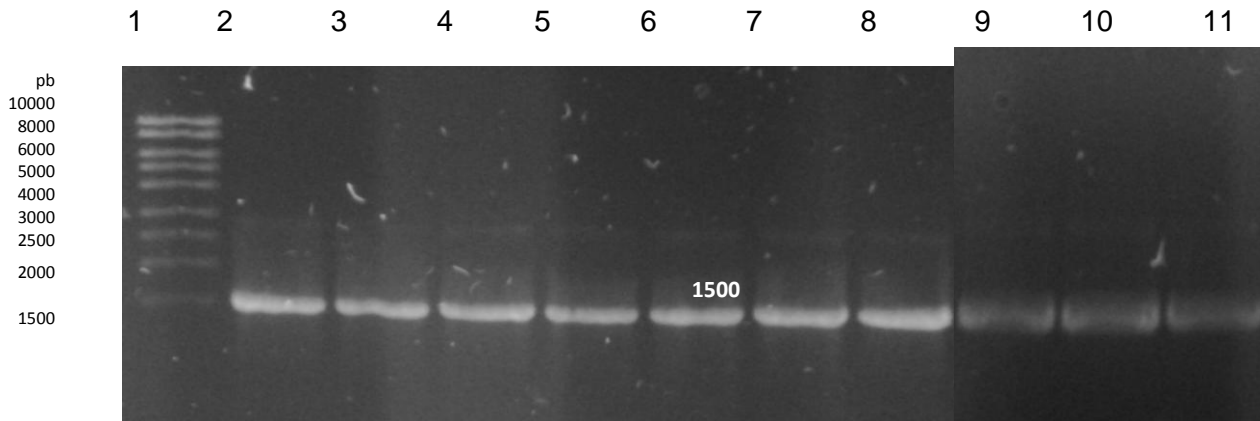
T7 Terminator  
 CAC TGA GATCCGGCTGCTAACAAGCCGAAAGCAAGCTAGTGGCTGCTGCCACCCCTGAGCAATAACCTAGCATAACCCCTGGGGCCCTTAACCGGTCTTGAGGGGTTTTTTC  
 H End

T7 Terminator primer #69337-3

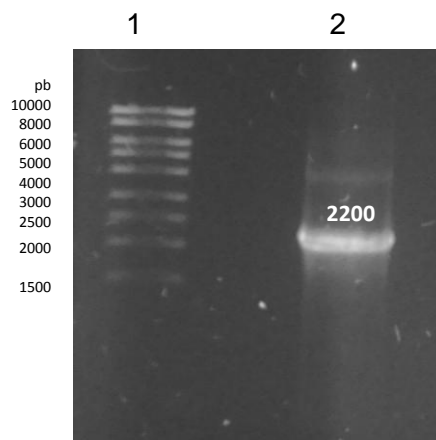
Figura 37. Construcción del plásmido para P72.



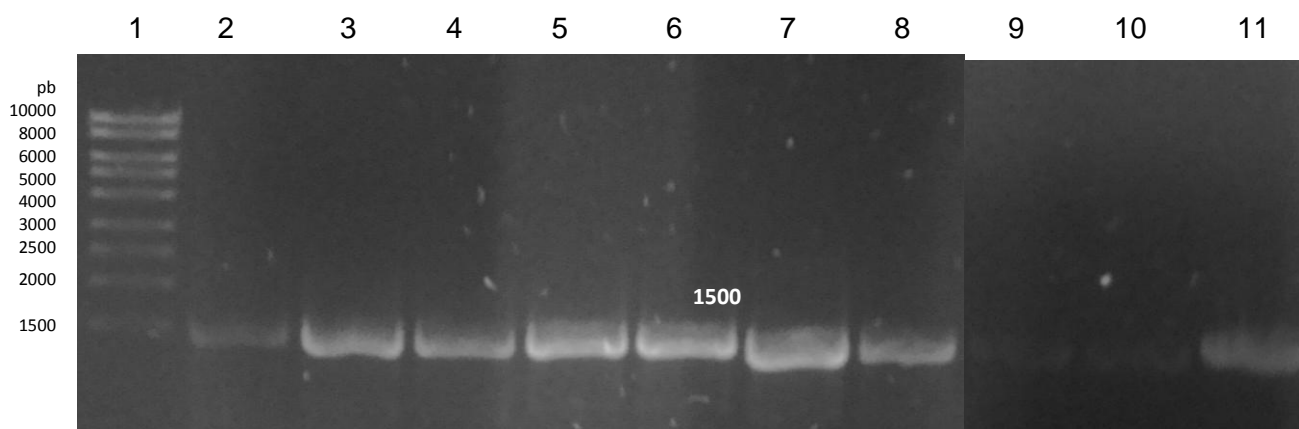
**Figura 38.** Ensayo de ligación de los genes amplificados en pET-22(b)+. Marcador de peso molecular (1). Construcción de P54 (2). Construcción de P72 (3). Plásmido sin inserto. Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.



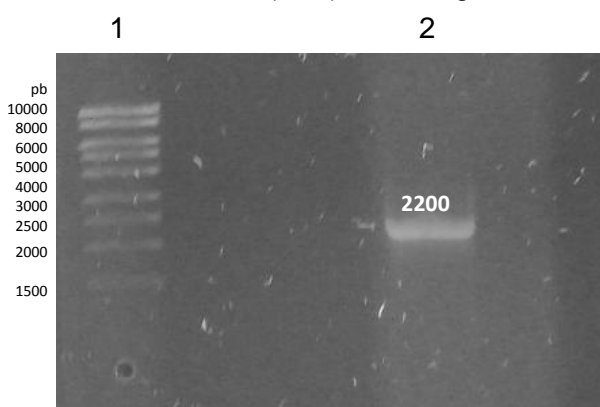
**Figura 39.** PCR de colonia de las clonas obtenidas en DH5 $\alpha$  para P54. Marcador de peso molecular (1). Colonias seleccionadas (2-11). Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.



**Figura 40.** PCR de colonia de las clonas obtenidas en DH5 $\alpha$  para P72. Marcador de peso molecular (1). Clona positiva (2). Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.



**Figura 41.** PCR de colonia de las clonas obtenidas en BL21(DE3) para P54. Marcador de peso molecular (1). Colonias seleccionadas (2-11). Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.



**Figura 42.** PCR de colonia de las clonas obtenidas en BL21(DE3)pLysS para P72. Marcador de peso molecular (1). Clona positiva (2). Gel de agarosa 1% con bromuro de etidio.

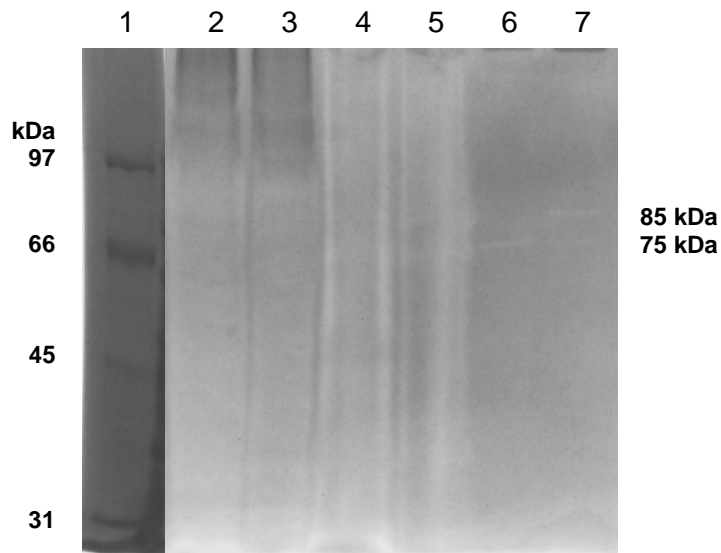
## 8.9 Expresión

### 8.9.1 Expresión de la proteína P54

Para la expresión de las proteínas recombinantes, las clonas fueron cultivadas en caldo LB y se les adicionó IPTG como inductor a una concentración final de 1 mM. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se hizo una electroforesis de la proteína celular total, así como un zimograma para detectar actividad lítica. Se observaron 2 bandas con actividad, una de 85 kDa y otra de 75 kDa. Es posible que la banda de menor tamaño sea degradación de la mayor. Se obtuvieron 4 clonas que presentaron actividad lítica contra *M. lysodeikticus*, aunque se decidió trabajar únicamente con la que tuvo la mayor actividad. Este es un resultado muy importante, ya que esta proteína era sólo hipotética y no había sido reportada previamente. El mejor tiempo para la expresión fue a las 3 h de inducción con IPTG 1 mM.

A lo largo de la fermentación, la densidad óptica con inductor no aumenta a la par de la fermentación sin inductor. Al tiempo cero, la D.O.<sub>600 nm</sub> fue de 0.83 y tras las tres horas de

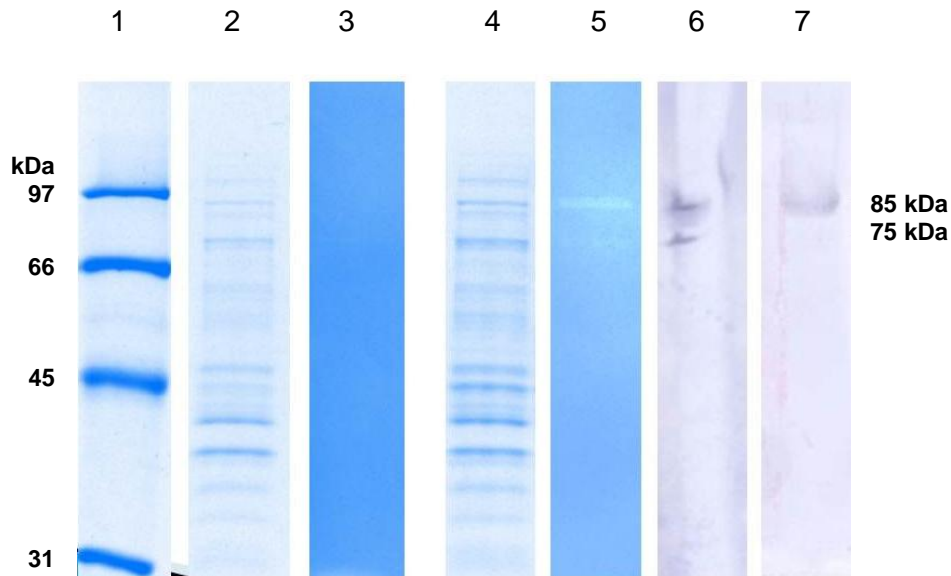
fermentación fue de 2.04 para el cultivo no inducido y 1.76 para el inducido. Es posible que al irse expresando la proteína y tener una actividad lítica, esté lisando a la cepa productora y se liberen sus proteínas al medio. Es por esa razón que se determinó en cuál fracción se obtenía la mayor actividad. De las tres fracciones evaluadas, el sobrenadante fue el que mostró la mayor actividad (Figura 43). Además, se observa una banda de actividad incluso sin inductor y dos con inductor, lo que puede deberse a que en la cepa BL21(DE3) se puede presentar una expresión basal.



**Figura 43.** Zimograma de las diferentes fracciones de P54. Marcador de peso molecular (1). Restos celulares sin IPTG (2), con IPTG (3); citosol sin IPTG (4), con IPTG (5) y sobrenadante de la fermentación sin IPTG (6), con IPTG (7). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

En resumen, las mejores condiciones para la expresión de la proteína recombinante fueron: concentración de IPTG 1 mM, 3 h de inducción, sobrenadante de la fermentación concentrado por liofilización y dializado con membrana de 50 kDa.

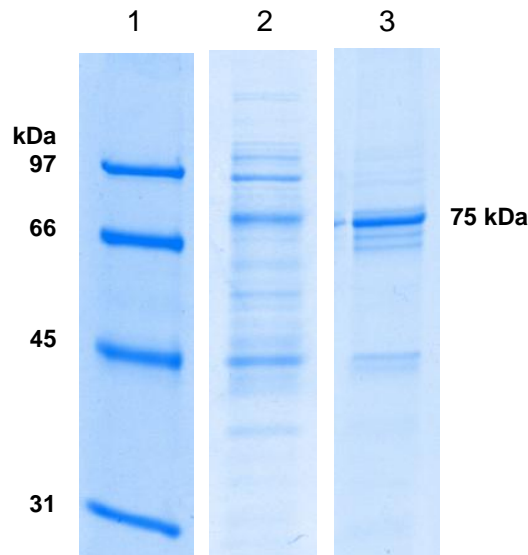
Se realizó un Western blot tanto en condiciones desnaturalizantes como nativas para detectar la presencia del tallo de histidinas. En ambos casos la prueba fue positiva para las bandas que presentaron actividad en el zimograma, aunque en el gel nativo sólo se observó una banda (Figura 44). Al permanecer con las histidinas, es posible utilizar una columna de  $\text{Ni}^{2+}$  para su purificación. Para esto, fue empleada la resina Protino Ni-TED, con la cual fue posible obtener la banda de la proteína de interés con un 70% de pureza, observada mediante electroforesis (Figura 45). Se decidió trabajar con esta muestra para las determinaciones posteriores.



**Figura 44.** Expresión de P54. Macador de peso molecular (1), cultivo sin IPTG: perfil electroforético (2) y zimograma (3); cultivo con IPTG: perfil electroforético (4) y zimograma (5); western blot desnaturante (6) y nativo (7).

Al poder expresar la proteína recombinante activa se descarta que necesite estar glicosilada para presentar dicha actividad lítica, ya que la cepa de expresión no realiza modificaciones postraduccionales como la glicosilación. Sin embargo, el peso molecular fue mayor al esperado. De acuerdo con la secuencia del gen insertado en el vector de clonación, sumando el tallo de histidinas y otros aminoácidos que se incluyen dentro del sitio múltiple de clonación, se esperaba una proteína con un peso de 58 kDa, no de 75 kDa. Adicionalmente, se realizaron las mismas pruebas que para las proteínas nativas, como el aumento de condiciones desnaturantes y detección de glicosilaciones (resultados no mostrados), sin embargo, no se observó variación en el peso molecular.

La diferencia de pesos moleculares no se debe a la secuencia del gen y por las pruebas realizadas, tampoco pudiera deberse a asociaciones con otras proteínas o a la formación de alguna estructura secundaria que modificara el corrimiento. Sin embargo, existe alguna causa por la que se observa con ese peso mediante electroforesis, como pudiera ser una interacción con la acrilamida. Por lo que, para conocer el peso real, es necesario determinarlo por otros métodos, como cromatografía de exclusión molecular o espectrometría de masas.



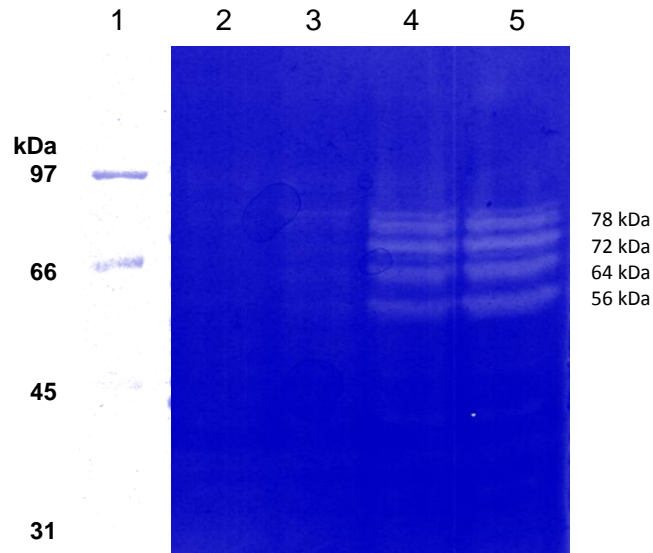
**Figura 45.** Purificación de P54. Macador de peso molecular (1), extracto extracelular concentrado por ultrafiltración (2) y muestra purificada con la resina Protino Ni-TED (3). SDS-PAGE 10%.

### 8.9.2 Expresión de la proteína P72

P72 fue clonada en la cepa de expresión BL21(DE3)pLysS, presentando actividad en condiciones de inducción desde 1 h hasta 5 h (Figura 46). No se encontró actividad en la cepa sin inducir ni en una con el plásmido sin inserto, lo que nos indica que la actividad se debe únicamente a la proteína recombinante deseada. Dicha actividad se observó en varias bandas entre 60 y 95 kDa, lo que podría ser el resultado de degradación. En condiciones normales, la proteína nativa producida por *E. faecalis* muestra degradación; pero lo que no se sabe es si se trata de autodegradación y/o si interviene el sistema proteolítico de la cepa productora. Pese a eso, se sigue observando con un peso molecular mayor al esperado de acuerdo al tamaño del gen y se observó una banda de actividad con el peso observado para la cepa de *E. faecalis* (95 kDa). Béliveau y colaboradores (1991) se presentaron ante un problema similar, ya que al tratar de clonar y expresar la misma proteína (AtIA) en *E. coli*, observaban bandas de actividad entre 130 y 70 kDa. La banda de 130 kDa no sufrió alteraciones cuando le dieron un tratamiento con altas concentraciones de agente reductor (DTT 10%), descartando una asociación mediante puentes disulfuro. Por lo que el aumento de peso lo explicaron por una dimerización covalente, la cual puede ocurrir *in vitro* por la exposición a agentes químicos.

Se monitoreó el crecimiento de la cepa sin y con inductor mediante la densidad óptica a 600 nm y se observó un menor crecimiento en el cultivo inducido (Figura 47). Esto puede deberse a que, como se trata de una enzima lítica, algunas células se estén lisando por su acción y liberen su contenido al exterior, por lo que se decidió probar si el sobrenadante de la fermentación presentaba actividad lítica. Se probaron además, la fracción citosólica y los restos

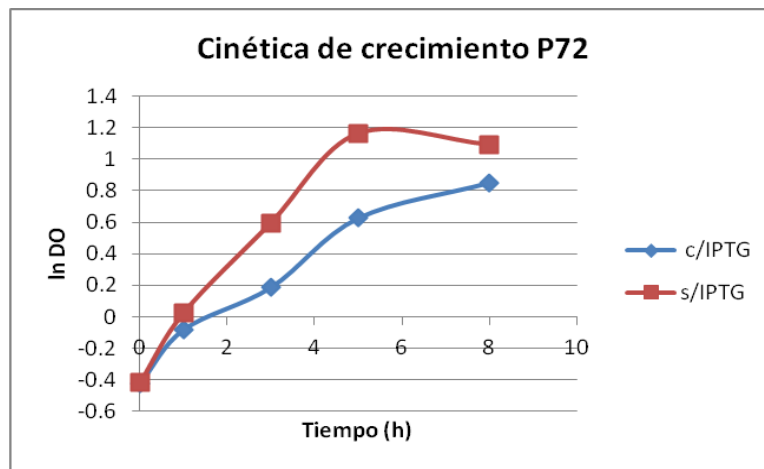
celulares. Tanto el sobrenadante como el citosol se concentraron de dos formas: liofilizando y precipitando con TCA al 10%. Se observó actividad lítica en todas las fracciones, excepto al precipitar con TCA. Es posible que haya resultado ser un tratamiento muy agresivo que les hizo perder completamente la actividad. Como el sobrenadante presentó actividad, se decidió trabajar con esta fracción debido a que es más sencillo de tratar y no hay que realizar otros pasos como la sonicación de las células.



**Figura 46.** Zimograma de la proteína total celular de P72 con y sin inductor a diferentes tiempos. Marcador de peso molecular (1). Sin inducir (2), con inductor a 1 h (3), 3 h (4), 5 h (5). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

En resumen, las mejores condiciones para la expresión de P72 recombinante y con las que se decidió trabajar para el resto de las determinaciones son: 1 mM de IPTG, 5 h de fermentación, medio extracelular, concentrado por liofilización y dializado con una membrana de 50 kDa de tamaño de corte.

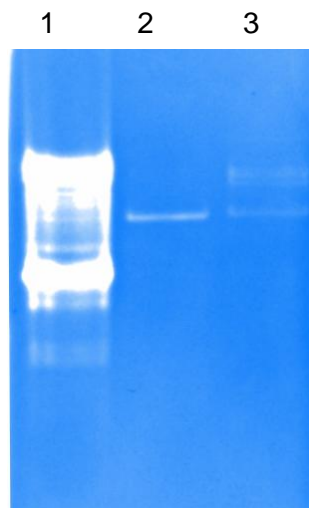
Se realizó un ensayo de Western Blot con anticuerpos Anti-His para identificar a la proteína recombinante con el tallo de histidinas; sin embargo, no se observó ninguna banda positiva. Esto pudiera deberse a que se haya cortado la cola de histidinas de la proteína, lo que dificulta su purificación. Otra razón podría ser que el plegamiento de la proteína se haga con la cola de histidinas hacia el interior y que no se encuentre expuesta a los anticuerpos. Para descartar esto, se trató a la proteína con urea 6 M y SDS para tratar de desnaturalizarla lo más posible, pero los resultados fueron los mismos. Al carecer del tallo de histidinas, no fue posible purificar la proteína mediante una columna de afinidad con  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$ . Pese a no haber realizado una purificación mayor, se decidió trabajar con el extracto crudo para la caracterización.



**Figura 47.** Cinética de crecimiento de la cepa productora de P72 con y sin inductor (1 mM de IPTG).

### 8.10 Comparación de las proteínas recombinantes con las nativas

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteínas recombinantes (P54 y P72) y el extracto semipurificado extracelular donde se encuentran las proteínas nativas con actividad lítica con el fin de poder comparar su peso en un mismo gel (Figura 48). Las proteínas recombinantes se observan con pesos moleculares menores que la proteína más grande del patrón de bandas del extracto nativo, aunque esta diferencia no es tan grande. Se puede pensar que en las proteínas nativas hay alguna modificación que hace que incrementen su peso o que el corrimiento en la electroforesis no sea el adecuado. Además, las propias proteínas recombinantes se observan con un peso mayor al esperado de acuerdo al tamaño del gen clonado.



**Figura 48.** Comparación de las proteínas recombinantes con las nativas. Extracto extracelular de *E. faecalis* I semipurificado (1). Proteína recombinante P54 (2). Proteína recombinante P72 (3). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.



## 8.11 Caracterización de las proteínas recombinantes

Ambas proteínas se pudieron expresar activas en *E. coli*; sin embargo, P72 no presentó el tallo de histidinas que facilitaría la purificación y la única proteína que se pudo purificar fue la P54. Por tal razón, la caracterización se llevó a cabo tanto para los extractos crudos de ambas proteínas, como para P54 purificada.

### 8.11.1 Especificidad por sustrato

#### 8.11.1.1 Actividad de muramidasa

La actividad de muramidasa se evaluó tanto para los extractos crudos concentrados, como para P54 pura. Sin embargo, ninguna de las muestras analizadas presentó este tipo de actividad, al no haber un decaimiento en la densidad óptica de la suspensión de *M. lysodeikticus*. Los resultados se muestran en la Figura 49. La densidad óptica se monitoreó durante 10 minutos sin observarse ningún decaimiento en la densidad óptica. Además, la microplaca se dejó incubando 24 h a 37°C sin observar cambios.

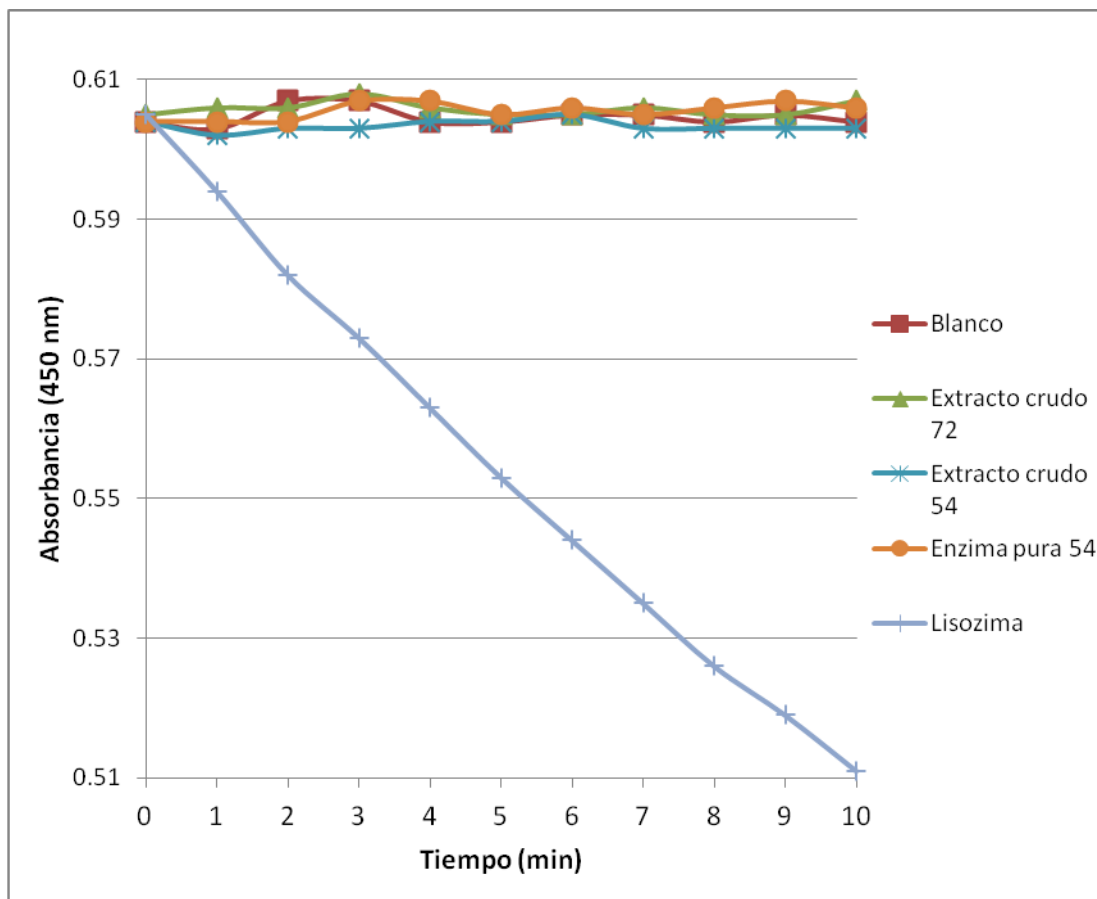


Figura 49. Cinética de la actividad de muramidasa. Control positivo: lisozima (62667 U).

En el análisis de las secuencias, ambas proteínas presentan dominios catalíticos con actividad de glucosaminidasa y no de muramidasa, por lo que se podían esperar resultados negativos para esta prueba. Sin embargo, el sustrato empleado en los zimogramas es el mismo microorganismo y en ellos se pueden observar claramente las bandas de actividad. Esto puede deberse a la sensibilidad del método, ya que puede detectarse actividad de enzimas en órdenes de nanogramos. Los zimogramas con células de *Micrococcus* spp. son ampliamente utilizados para la detección de actividad de peptidoglucano hidrolasas, sin importar el sitio de corte, ya que la pared celular de estos microorganismos es muy sensible al no haber alto grado de entrecruzamiento en el peptidoglucano.

### 8.11.1.2 Actividad de glucosaminidasa

Las dos proteínas en estudio poseen dominios catalíticos con actividad de glucosaminidasa teóricos, por lo que se esperaba obtener resultados positivos en esta prueba. Se analizaron los extractos crudos de ambas proteínas y P54 pura. No fue posible detectar la actividad de glucosaminidasa para P72, mientras que para P54, tanto el extracto crudo como la enzima pura, mostraron resultados positivos. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

**Tabla 24.** Purificación de P54 y medición de la actividad de glucosaminidasa.

Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante ultrafiltrado	177	8.58	20.6	1	100
Protino Ni-TED	56	0.84	66.7	3.23	31.63

### 8.11.1.3 Actividad de endopeptidasa

Se evaluó la actividad de endopeptidasa para los extractos crudos concentrados y P54 pura. Sin embargo, ninguna de las muestras analizadas presentó este tipo de actividad, ya que no fueron capaces de hidrolizar ninguno de los péptidos empleados como sustrato (datos no mostrados).

No fue posible detectar ningún tipo de actividad por métodos espectrofotométricos para P72. Esto pudiera deberse a que se haya degradado parcialmente y que haya disminuido su actividad. Esto es posible, ya que tampoco hubo reacción con los anticuerpos contra histidinas, por lo que pudiera faltarle uno o más dominios de unión a peptidoglucano. Sin embargo, se pudo observar actividad mediante zimografía debido a la sensibilidad del método.

### 8.11.2 Temperatura óptima

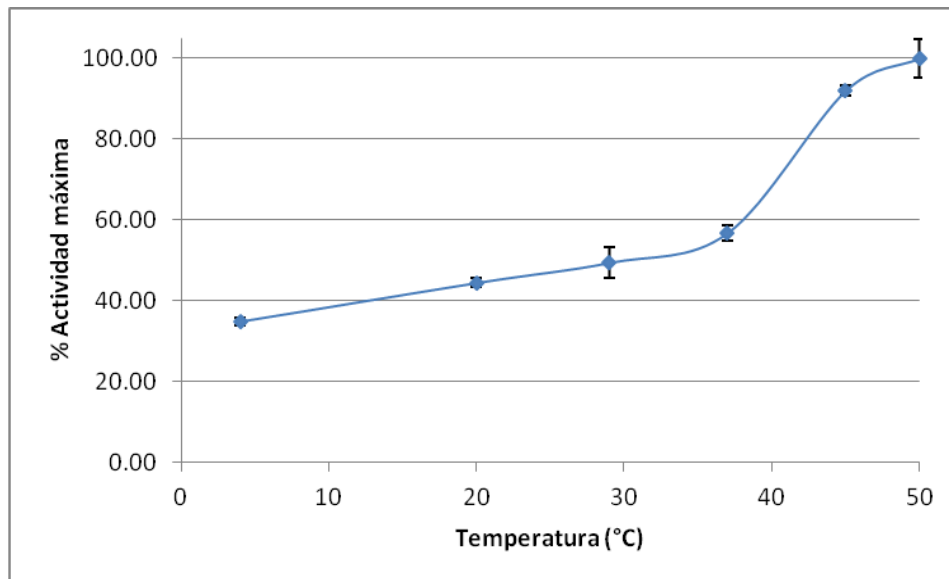
El ensayo para determinar la temperatura óptima de actividad se realizó únicamente para P54 pura mediante la medición de la actividad de glucosaminidasa. Los resultados se muestran en

la Tabla 25 y en la Figura 50. Puede observarse que la actividad se incrementó al aumentar la temperatura, mostrando la máxima actividad a 50°C. Adicionalmente se utilizó un blanco de reacción con el sustrato pero sin enzima para descartar que hubiera una influencia de la temperatura en la hidrólisis.

**Tabla 25.** Determinación de temperatura de actividad óptima.

Temperatura (°C)	Actividad (U/mg de proteína)	Porcentaje de actividad máxima
4	23.3	34.92
20	29.7	44.47
29	33.0	49.54
37	37.9	56.82
45	61.4	92.01
50	66.7	100.00

La mayoría de las glucosaminidasas presentan su actividad óptima a temperaturas entre 30 y 40°C (Tsfasman *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2012), sobretodo de bacterias ácido lácticas, como la enzima Mur de *Lactobacillus delbrueckii* que tiene una actividad óptima entre 30 y 40°C (Vasala *et al.*, 1995). Sin embargo, hay reportes de enzimas líticas de organismos termotolerantes que presentan su actividad óptima incluso a 70°C (Amutha *et al.*, 1998) y se sabe que los enterococos pueden crecer a 45°C e incluso resistir temperaturas de 62.5°C durante 30 min (Giraffa, 2003), por lo que la enzima puede presentar su actividad óptima a 50°C.



**Figura 50.** Gráfico de temperatura de actividad óptima de la proteína P54 recombinante (actividad de glucosaminidasa, sustrato: 4-nitrofenil N-acetil-β-D-glucosaminido, tiempo: 30 min).

### 8.11.3 Estabilidad a tratamientos térmicos

Se evaluó la estabilidad de las proteínas recombinantes a tratamientos a diferentes temperaturas y tiempos. Los extractos crudos de ambas proteínas fueron sometidos a tratamientos de 37, 50, 60, 70, 80 y 90°C, durante 30 y 60 min. La actividad fue observada mediante zimogramas contra *M. lysodeikticus*. P54 mostró gran estabilidad, ya que mantuvo la actividad intacta a 90° durante 30 min; aún durante 60 min conservó actividad (Figura 51 y Tabla 26). P72 mantuvo la actividad similar al control sin tratamiento térmico incluso a 70°C durante 30 min (Tabla 27).

Sin embargo, al realizar el ensayo espectrofotométrico, P54 pierde el 99% de la actividad tras un tratamiento a 50°C durante 1h (Figura 52). Esta diferencia en la termorresistencia observada entre los zimogramas y la medición de la actividad puede deberse a que, después de la electroforesis, el gel se incubaba en una solución renaturalizante y permite que la proteína recobre su conformación original y su actividad. Por el contrario, en el ensayo espectrofotométrico, tras el tratamiento térmico, es posible que se desnaturalicen las proteínas y no hay un paso de renaturalización.

Con base en los resultados espectrofotométricos, la proteína P54 mostró poca estabilidad a la temperatura comparada con otras PGHs que, con tratamientos a 60°C durante 30 minutos, mantienen hasta el 50% de la actividad; éstas son consideradas termorresistentes (Zhong *et al.*, 2011; Schmelcher *et al.*, 2012; Son *et al.*, 2012).



**Figura 51.** Estabilidad de P54 a diferentes temperaturas. Marcador de peso molecular (1), control sin tratamiento térmico (2), 37°C: 30 min (3), 60 min (4); 50°C: 30 min (5), 60 min (6); 60°C: 30 min (7), 60 min (8); 70°C: 30 min (9), 60 min (10); 80°C: 30 min (11), 60 min (12); 90°C: 30 min (13), 60 min (14). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

**Tabla 27.** Estabilidad de P54 a diferentes temperaturas.

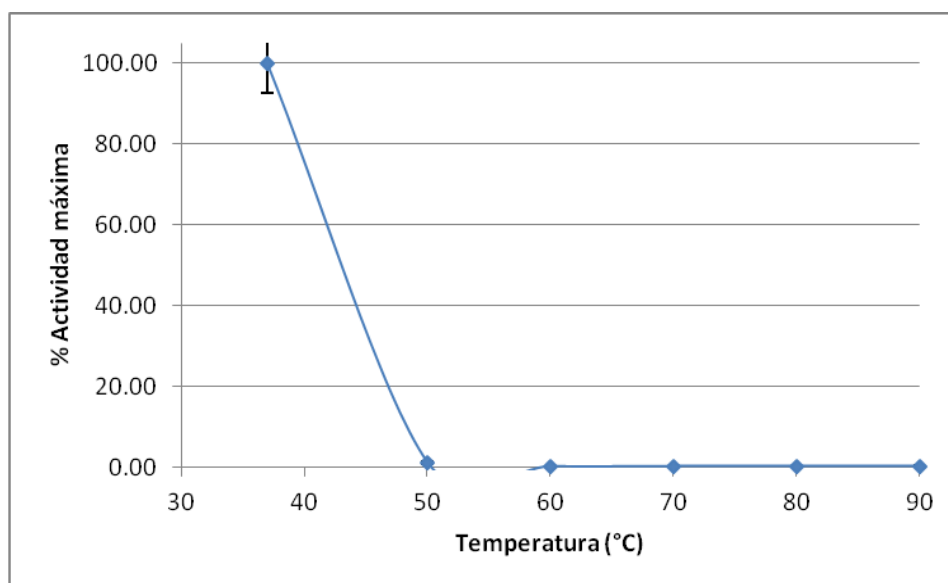
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad
Control		+++
37	30	+++
	60	+++
50	30	+++
	60	+++
60	30	+++
	60	+++
70	30	+++
	60	+++
80	30	+++
	60	++
90	30	++
	60	+

+++ mayor actividad, + menor actividad

**Tabla 28.** Estabilidad de P72 a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Actividad
Control		+++
37	30	+++
	60	+++
50	30	+++
	60	+++
60	30	+++
	60	+++
70	30	+++
	60	++
80	30	++
	60	+
90	30	+
	60	+

+++ mayor actividad, + menor actividad



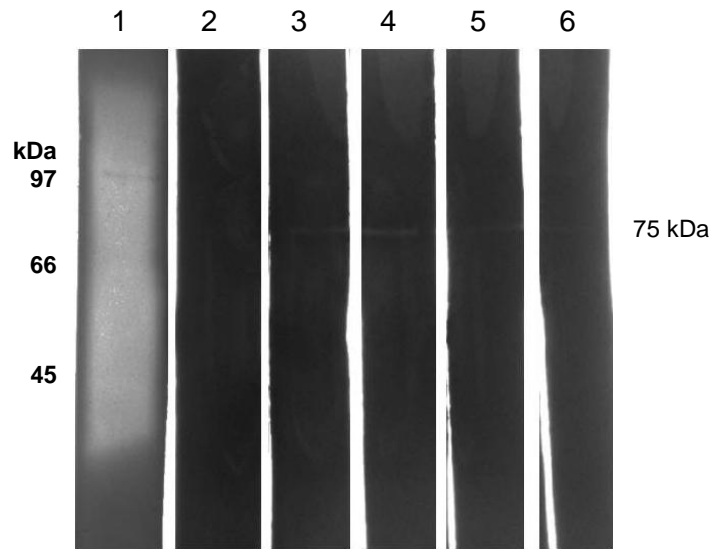
**Figura 52.** Gráfico de resistencia a tratamientos térmicos de la proteína P54 recombinante (actividad de glucosaminidasa, sustrato: 4-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido, tiempo: 30 min).

#### 8.11.4 Actividad a diferentes valores de pH

Se determinó la influencia del pH sobre la actividad de las proteínas mediante zimogramas contra *M. lysodeicticus* y por espectrofotometría. El rango de pH evaluado fue de 4 a 8; para los zimogramas se evaluó durante la renaturalización y para la medición de la actividad se modificó el pH durante la reacción.

P54 presentó la mayor actividad lítica a pH 7, seguido de pH 6. El pH al que se presentó la menor actividad fue 4 (Figuras 53, 54 y Tabla 29). Se obtuvieron resultados similares en ambos ensayos. Pese a que el pH de la fermentación de *E. faecalis* en el momento de la obtención de las enzimas se encuentra entre 4 y 5, su actividad óptima no es en estos valores.

P72 presentó la mayor actividad a pH 6, seguido de pH 7 y 8, siendo menores las actividades a pH 4 y 5 (Figura 55 y Tabla 30). Eckert *et al.* (2006) reportan que la máxima actividad de esta enzima se presenta a pH 7, seguido de 6, 8 y 9. Aunque la actividad óptima se observó a un pH diferente, los resultados son similares en cuanto a que el mejor rango va de 6 a 8 (hasta 9 en lo reportado por Eckert) y que el pH más bajo sí afecta a la actividad. Al contrario de lo que se pudiera pensar, considerando que en condiciones nativas, la fermentación de *E. faecalis* disminuye el pH del medio hasta 4.5. Es posible que P72 (o AtIA) esté involucrada en el recambio o la inserción de subunidades de peptidoglucano a la pared celular durante el crecimiento (fase exponencial) más que en la autólisis y la muerte, actuando en etapas tempranas del crecimiento cuando el pH no ha disminuido tanto.

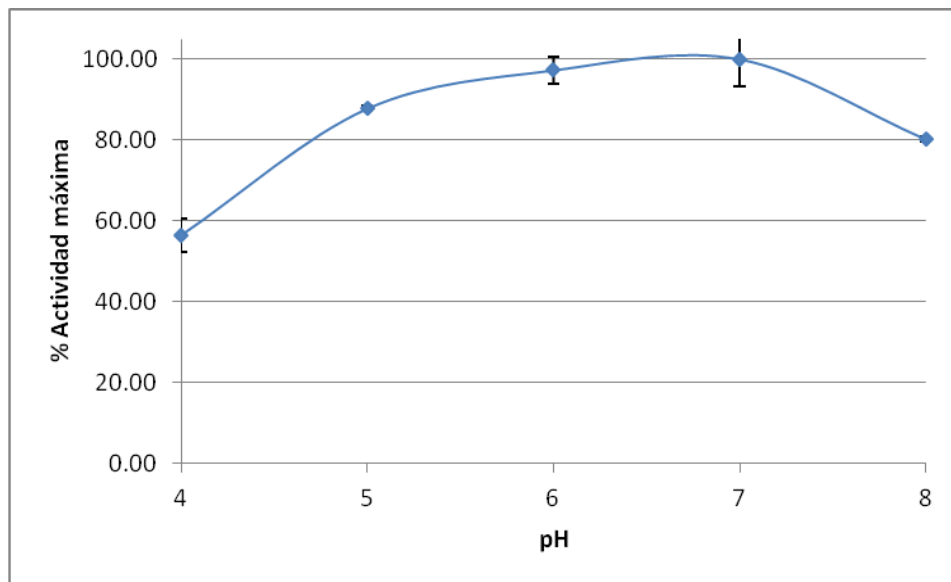


**Figura 53.** Actividad a diferentes valores de pH de P54. Marcador de peso molecular (1), pH: 4 (2), 5 (3), 6 (4), 7 (5) y 8 (6). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

**Tabla 29.** Actividad a diferentes valores de pH de P54.

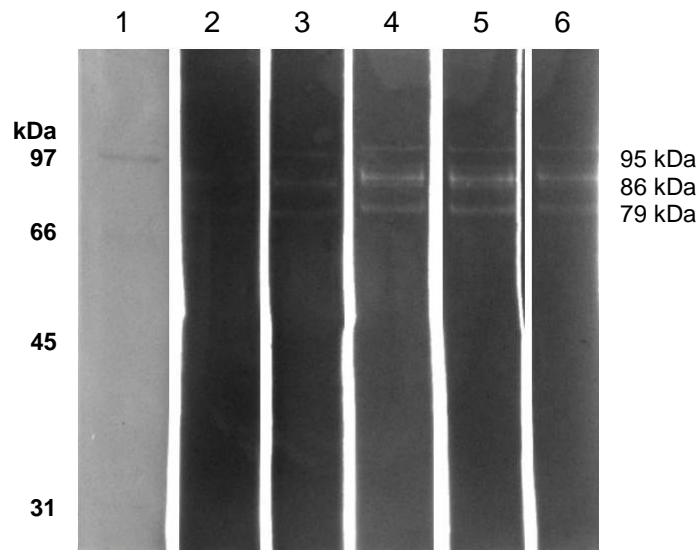
pH	Actividad
4	+
5	++
6	+++
7	+++
8	++

+++ mayor actividad, + menor actividad



**Figura 54.** Gráfico de pH de actividad óptima de P54 (actividad de glucosaminidasa, sustrato: 4-nitrofenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminido, tiempo: 30 min).

Hay varios reportes de peptidoglucano hidrolasas con un comportamiento similar a diferentes valores de pH, en el que la mayor actividad se presenta a pH's neutros y se mantiene a pH's básicos, pero que disminuye drásticamente a pH's ácidos, como la Cag $\gamma$  de *Helicobacter pylori* cuyo pH de actividad óptima es de 6 (Zhong *et al.*, 2011) o la CHAP $\kappa$  de *Staphylococcus aureus* que presenta la mayor actividad entre pH 6 y 11, disminuyendo por debajo de 5 (Fenton *et al.*, 2011). Aunque también existen reportes de PGHs que tienen su actividad óptima a pH neutro o ligeramente ácido y disminuye por arriba de 7.5 u 8 (Schmelcher *et al.*, 2012).



**Figura 55.** Actividad a diferentes valores de pH de P72. Marcador de peso molecular (1), pH: 4 (2), 5 (3), 6 (4), 7 (5) y 8 (6). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

**Tabla 30.** Actividad a diferentes valores de pH de P54.

pH	Actividad
4	+
5	++
6	++++
7	+++
8	+++

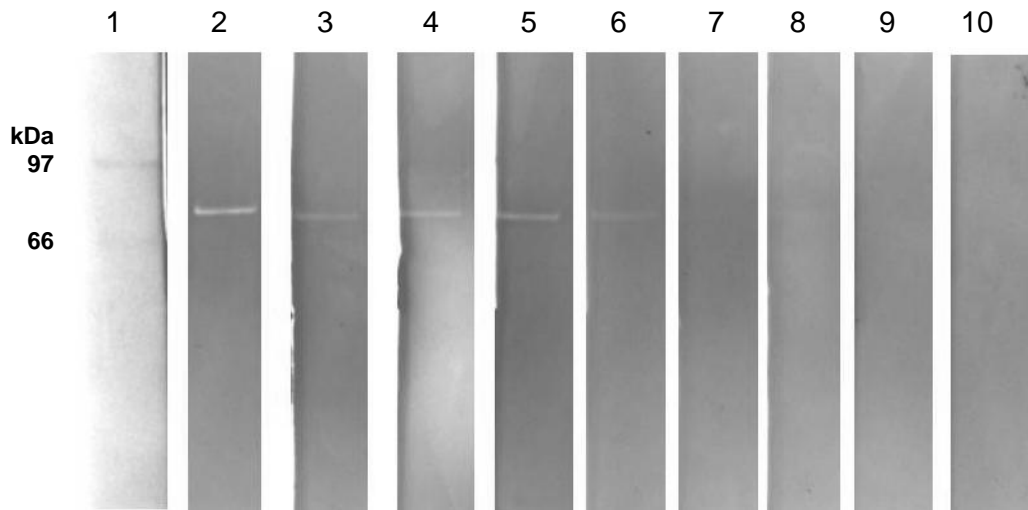
++++ mayor actividad, + menor actividad

### 8.11.5 Influencia de la fuerza iónica

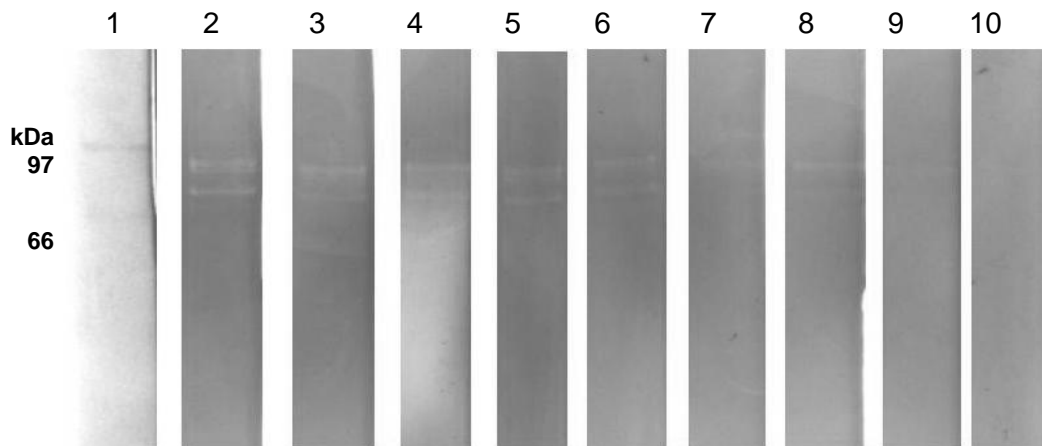
Las actividades líticas de las dos enzimas fueron determinadas mediante zimogramas agregando diferentes concentraciones de NaCl al amortiguador de renaturalización y para P54 pura mediante medición de actividad de glucosaminidasa, añadiendo distintas concentraciones de NaCl a la mezcla de reacción. Ambas enzimas mostraron una mejor renaturalización en ausencia de NaCl y al aumentar la fuerza iónica la actividad fue disminuyendo gradualmente,



manteniéndola aún a 500 mM de NaCl. Ninguna de las dos se pudo renaturalizar a una concentración de 1 M (Figuras 56 y 57).



**Figura 56.** Influencia de la fuerza iónica (NaCl) sobre P54. Marcador de peso molecular (1), control sin NaCl (2), 1 mM (3), 10 mM (4), 50 mM (5), 100 mM (6), 200 mM (7), 300 mM (8), 500 mM (9), 1 M (10). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.



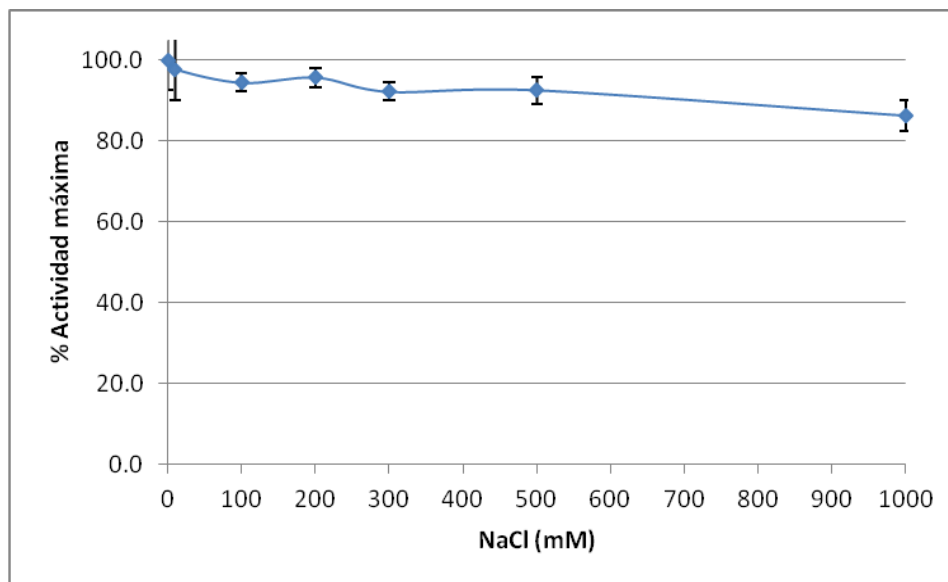
**Figura 57.** Influencia de la fuerza iónica (NaCl) sobre la proteína 72. Marcador de peso molecular (1), control sin NaCl (2), 1 mM (3), 10 mM (4), 50 mM (5), 100 mM (6), 200 mM (7), 300 mM (8), 500 mM (9), 1 M (10). Gel de poliacrilamida 10% con *M. lysodeikticus*.

Sin embargo, mediante espectrofotometría se pudo observar que P54 purificada mantuvo más del 90% de la actividad a 500 mM de NaCl e incluso 86% a 1 M (Figura 58), por lo que la fuerza iónica no tiene gran influencia. Esto es importante para determinar si estas enzimas pueden encontrarse activas en el queso, que posee por encima del 5% de NaCl, equivalente a 1 M.

La diferencia en la actividad que se presentó entre los zimogramas y los ensayos espectrofotométricos se puede deber a que en zimogramas se observa el efecto de la fuerza

iónica sobre la renaturalización de las proteínas y en el ensayo espectrofotométrico se observa sobre la desnaturalización de las mismas.

Existen reportes de peptidoglucano hidrolasas que presentan su máxima actividad en ausencia de NaCl, como la endopeptidasa CwlK de *Bacillus subtilis* (Fukushima *et al.*, 2007). Sin embargo, también hay enzimas cuya actividad óptima se presenta en presencia de NaCl, como la PlyV12 de bacteriófago de *Enterococcus faecalis* V12, que tiene su máxima actividad en condiciones fisiológicas, es decir, entre 130 y 150 mM de NaCl (Yoong *et al.*, 2004). O incluso a concentraciones mayores, entre 200 y 300 mM, como las endolisinas de fagos de *Listeria* HPL118, HPL500, HPL511 y HPLP35 (Schmelcher *et al.*, 2012), que pueden ser activas a las condiciones de los alimentos que pueden ser contaminados por *Listeria monocytogenes*.



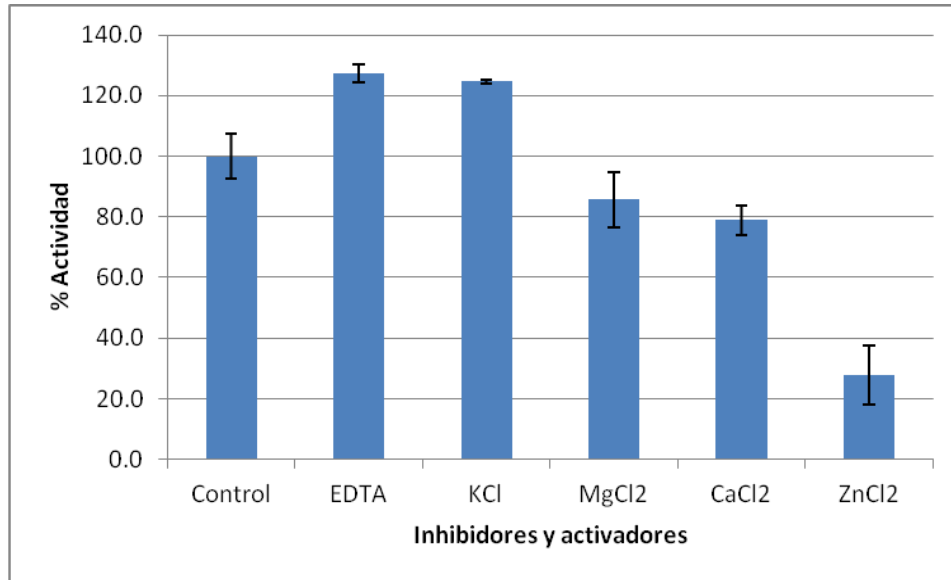
**Figura 58.** Gráfico de influencia de la fuerza iónica sobre P54.

#### 8.11.6 Efecto de activadores e inhibidores

Se determinó el efecto de algunos iones metálicos como activadores o inhibidores. Existen algunas peptidoglucano hidrolasas que requieren de la unión de un ion en el dominio catalítico para su funcionamiento. Por ejemplo, la endolisina LysB4 del bacteriófago B4 que infecta a *Bacillus cereus*, que requiere de iones  $Zn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . Además, en el análisis de su secuencia, LysB4 tiene tres residuos de coordinación a zinc (His 80, Asp 87 e His 133) y el dominio de unión a  $Zn^{2+}$  SxHxxGxAxD (Son *et al.*, 2012). Estos mismos sitios los posee la endolisina Ply500 de *Listeria monocytogenes* (Loessner *et al.*, 1995).

Al realizar un alineamiento de las secuencias de ambas enzimas con el dominio de unión a zinc, no fue encontrado en ninguna (análisis no mostrado). Pese a esto, es importante la realización de este ensayo, ya que no se conoce nada de P54.

Al retirar los iones metálicos con EDTA, la actividad se vio incrementada en 27% con respecto al control sin tratamiento. Al adicionarle un ion monovalente como el  $K^+$ , no se observó ningún efecto. Sin embargo, al adicionar iones divalentes, la actividad disminuyó aún más que la del control, observándose la disminución más drástica para el  $Zn^{2+}$  (Figura 59).



**Figura 59.** Gráfico del efecto de inhibidores y activadores sobre P54.

Este comportamiento no es común, ya que la mayoría de las enzimas de este tipo, al secuestrar los iones, la actividad disminuye o se mantiene constante y se puede recuperar al adicionar iones (Mikoulinskaia *et al.*, 2009, Schmelcher *et al.*, 2012). En el caso de P54, el comportamiento es al revés, los iones divalentes disminuyen la actividad. Existen reportes de otras PGH que pierden actividad en presencia de iones divalentes, como la lisina  $CHAP_K$  de *Staphylococcus aureus* (Donovan *et al.*, 2006; Fenton *et al.*, 2011).

Para P72 no fue posible realizar este ensayo debido a que no presentó actividad por métodos espectrofotométricos. Tampoco fue posible realizar la prueba por zimografía, ya que existe influencia de los activadores e inhibidores directamente sobre el gel, cambiando el grado de hidratación y el tamaño, lo que sesga la interpretación de los resultados

## 9 Conclusiones

Se determinó, mediante la secuenciación parcial del gen ADNr 16S, la identidad de la cepa de estudio, la cual es *Enterococcus faecalis*.

La banda con actividad de peptidoglucano hidrolasa, observada a 95 kDa, posiblemente está formada por dos proteínas independientes que migran juntas en una electroforesis en una y dos dimensiones. Un análisis del genoma de *Enterococcus faecalis* revela que se trata de dos proteínas independientes. Sin embargo, no se descarta aún la posibilidad de que se trate de una proteína nueva.

Los genes de estudio son del mismo tamaño y poseen la misma secuencia que los genes reportados en la base de datos. No poseen secuencias adicionales que ocasionen que las proteínas tengan un peso molecular mayor.

No fue posible desglicosilar a las proteínas enzimáticamente. Además, las proteínas recombinantes mostraron actividad sin estar glicosiladas. Por lo que, probablemente, las proteínas no se encuentran glicosiladas.

Se pudo clonar y expresar activa P54, aunque se observa con un peso molecular de 75 kDa. Es una proteína nueva no reportada previamente. No necesita glicosilación para ser activa. Su máxima actividad se presentó a pH 7 y no presenta termorresistencia, aunque se puede renaturalizar tras tratamientos de 90°C durante 30 min. Es más activa en ausencia de NaCl, aunque la fuerza iónica no presenta gran influencia. Presenta su mayor actividad en ausencia de cationes divalentes, siendo el  $Zn^{2+}$  el que más la disminuye.

Se pudo expresar P72 con actividad, observándose tres bandas entre 76 y 95 kDa. También se observó que no necesita glicosilación para ser activa. Mostró su actividad máxima a pH 6 y 7, que coincide con lo reportado previamente (Eckert *et al.*, 2006). Se puede renaturalizar después de un tratamiento de 70°C por 30 min. Es más activa en ausencia de NaCl, aunque continúa activa a una concentración de 500 mM.

## 10 Anexos

### 10.1 Anexo 1. Secuencias del ARNr 16S para la identificación de la cepa en estudio.

Secuencia obtenida con el cebador AGC 338F:

```
GNNCATNGNATGGANGAGTCTGACCGAGCACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT
GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATCAATCGGCTCTAATCGGGGGGAGCAAACGGGATTAGACACCCTGGTAGTCCCC
GCCGGACCCGAGAACTGCTAACTTTGGAGGGTTGCCGCCCTTCACTGCTGGCTCAATGCATTAGGCACTCCGC
CGGGAACTCCCAACGCAAGGTGAAAACCTATTCGAAAACACCTCAACCCGCCCAAGGGATGATCTTTGGGAGT
GGGCTCCAACCATAGCGAGGAATCCTACCCTGCCTTGACATCCTGTTCCACGCTCTATATCGAGGCCACCCC
CGAGGACACATCAACAGATTGCGGTTGGGTACCGTCATAGCACGCCTATTTAGAAATTTGAGCTTTTGCCATGGT
CTCCCTTCCCTGGGCATTCCCGGATTTTTTTGTTCTCCCCTGCCGAGAGTGCAGCTGACAACCCGACAACGTG
GGACTAACTCCATTCACCGCTCCCAGTATGGCGAAATAGCAAACCTGATGTGTGGGTGGTGGCCTTCGTT
```

Secuencia que obtenida con el cebador B518R:

```
NNANTNNNTNNTGGTTGAATNCGTCAGGGGAAGTTCAGTTACTAACGTNCTTGTCTTCTCAAACAGAGTTTTTA
CGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGCGTTGCTCGGTGACTTTTGTCCATTGCCGAAGATCCCTACTG
CTGCTCCCGTAGGAGTAGAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG
AAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTAT
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCGGGTGACTGGAACCCGGGAGCGGTTGATCCTGGGGGCCCTT
CGAAGGAACACCGAAACCTTACGCGGTCTTGACCCCTTGATCCTCGTAGATATAAGAGTCCCCCTCCGAGACC
AAATGGCTGGTGGTGTGTTGGGCGTCGGCAGCTCGGGGCGATAGATGGTTTGGTTAAGTCCCCCACGAACTTC
ACCCTTATTGGGAGTTGCCGATGATCTTGATTCGCACTCCTGCCAGACTGGCAGCGACAAACCGGAGGAACGC
GGGACTACATCACATCCTCGCGCCCTAGCAATGAAGAATAAAAAAAAAAAC
```

Secuencia obtenida con el cebador Pedio2:644:

```
NNNNNNNNNTAGTCTGATGTGAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC
AGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGCCGAAGGC
GGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACT
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTT
CCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGCTTGGGGGGCAATACNAAAGAAGCGGCGCCA
TTAATCCCGACGGGGGGTGGTGGTTTACGCGCTTTGTGACTGGCTACACTTTGCCAGCGACCTATCGCACACTC
CTTTTCGCTTTCTTTACATATAACAATTCACGACAGGTTCCACCATGCTTTACCATCAAGCTCAAATCGGGGGCTC
CACTTTAGGGATCCGAATTAATGCTGTTACTGGCACCTCGATCACCAAAAACCTTGATTAGGTGTGATGGTTTAC
ATCATCGGGCCCTCGACCTAATAAACGGTTTTTTCGCCCTTTGAAGTAGAAGTCCACCTTCCATAA
```

Secuencia obtenida con el cebador FirR:1244:

NNNNNGCNNNTCNCCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAA  
CAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC  
TGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTC  
GCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC  
GGTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAG  
CACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCGAGCCTCAGCGTC  
AGTTACAGACCAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTTCACCGCTACACATGGAA  
TTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGTTGAGCCGGGGGCTTTCACAT  
CAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCAAAAAATAAATAANTTCAA

## 11 Bibliografía

- Álvarez-Barajas R, Barragán-López E, Chombo-Morales P. 2005. Reglas de uso. Marca Colectiva. Queso Cotija Región de Origen. México. pp. 5-10.
- Amutha B, Khire JM, Khan MI. 1998. Characterization of a novel exo-*N*-acetyl-L-D-glucosaminidase from the thermotolerant *Bacillus* sp. NCIM 5120. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1425:300-310.
- Anantharaman V y Aravind L. 2003. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biology*. 4:87-98.
- Béliveau C, Potvin C, Trudel J, Asselin A, Bellemare G. 1991. Cloning, Sequencing, and Expression in *Escherichia coli* of a *Streptococcus faecalis* Autolysin. *Journal of Bacteriology*. 173:5619-5623.
- Bravo-Mendoza A. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F. pp. 5-14, 46-72.
- Castillo-Rodríguez F, Roldán-Ruiz MD, Blasco-Plá R, Huertas-Romera, MJ, Caballero-Domínguez FJ, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque-Romero M. 2005. Biotecnología Ambiental. Editorial Tébar. España. pp. 345.
- Cervantes-Escoto F, Villegas-de Gante A, Cesin-Vargas A, Espinoza- Ortega A. 2008. Los Quesos Mexicanos Genuinos –Patrimonio cultural que debe rescatarse-. 1ª edición. Mundi-Prensa México. pp. 149-162.
- Cibik R, Tailliez P, Langella P, Chapot-Chartier MP. 2001. Identification of Mur, an Atypical Peptidoglycan Hydrolase Derived from *Leuconostoc citreum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:858-864.
- Cibik R y Chapot-Chartier MP. 2004. Characterisation of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*. 38:459-463.
- Dolinger DL, Schramm VL, Shockman GD. 1988. Covalent modification of the beta-1,4-*N*-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium* with 5-mercaptouridine monophosphate. *PNAS*. 85(18):6667-6671.
- Dolinger DL, Daneo-Moore L, Shockman GD. 1989. The second peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* ATCC 9790 covalently binds penicillin. *Journal of Bacteriology*. 171(8):4355-4361.

- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology*. 88:165-188.
- Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. 2006. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiology Letters*. 265:133-139.
- Dube DH, Champasa K, Wang B. 2011. Chemical tools to discover and target bacterial glycoproteins. *Chemical Communications (Cambridge, England)*. 7(47):87-101.
- Eckert C, Lecerf M, Dubost L, Arthur M, Mesnage S. 2006. Functional Analysis of AtIA, the Major N-Acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*. 188:8513-8513.
- Fenton M, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. 2011. Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). *Journal of Applied Microbiology*. 111(4):1025-1035.
- Foulquié-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106:1-24.
- Fukushima T, Yao Y, Kitajima T, Yamamoto H, Sekiguchi J. 2007. Characterization of new L,D-endopeptidase gene product CwK (previous YcdD) that hydrolyzes peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *Molecular Genetics and Genomics*. 278(4):371-83.
- Garg SK y Mital BK. 1991. Enterococci in Milk and Milk Products. *Critical Reviews in Microbiology*. 18(1):15-45.
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88:215-222.
- Hernández-Alcántara AM. 2010. Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Kang OJ, Laberge S, Simard RE. 2003. Detection and Localization of a Peptidoglycan Hydrolase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science*. 86:96-104.
- Kawamura T y Shockman GD. 1983. Purification and Some Properties of the Endogenous, Autolytic N-Acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium*, a Bacterial Glycoenzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 258(15):9514-9521.



- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Layec S, Decaris B, Leblond-Bourget N. 2008. Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research in Microbiology*. 159:507-515.
- Lebeer S, Claes IJJ, Balog CIA, Schoofs G, Verhoeven TLA, Nys K, von Ossowski I, de Vos WM, Tytgat HLP, Agostinis P, Palva A, Van Damme EJM, Deelder AM, De Keersmaecker SCJ, Wuhler M, Vanderleyden J. 2012. The major secreted protein Msp1/p75 is O-glycosylated in *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Microbial cell factories*. 11:15.
- Leclerc D y Asselin A. 1989. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35(8):749-753.
- Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. 1995. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Molecular Microbiology*. 16:1231-1241.
- Lortal S y Chapot-Chartier MP. 2005. Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. 15: 857-871.
- Matamoros-Ortega SC. 2010. Influencia de compuestos extracelulares de bacterias ácido lácticas sobre *S. aureus* y *E. coli* en un medio lácteo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- Mesnage S, Chau F, Dubost L, Arthur M. 2008. Role of N-Acetylglucosaminidase and N-Acetylmuramidase Activities in *Enterococcus faecalis* Peptidoglycan Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. 283:19845-19853.
- Mikoulinskaia GV, Odinkova IV, Zimin AA, Lysanskaya VY, Feofanov SA, Stepnaya OA. 2009. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *The FEBS Journal*. 276(24):7329-7342.
- Moreno MRF, Leisner JJ, Tee LK, Ley C, Radu S, Rusul G, Vancanneyt M, De Vuyst L. 2002. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Applied Microbiology*. 92:147-157.

- Muyzer G, de Waal E, Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695-700.
- Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, Schneewind O. 1999. Multiple Enzymatic Activities of the Murein Hydrolase from Staphylococcal Phage  $\phi$ 11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:15847-15856.
- Ouzari H, Cherif A, Mora D. 2002. Autolytic phenotype of *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional Tunisian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*. 92:812-820.
- Rojas-Herrera R, Narváez-Zapata J, Zamudio-Maya M, Mena-Martínez ME. 2008. A Simple Silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from Soil and Sediments. *Molecular Biotechnology*. 40:13-17.
- Saito A, Ebise H, Orihara Y, Murakami S, Sano Y, Kimura A, Sugiyama Y, Ando A, Fujii T, Miyashita K. 2012. Enzymatic and genetic characterization of the DasD protein possessing *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*. doi: 10.1111/1574-6968.12069.
- Salminen S, von Wright A, Ouwehand A. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3ª edición. Marcel Dekker Inc. Estados Unidos. pp. 375-398.
- Sánchez B, Urdaci MC. 2012. Extracellular proteins from *Lactobacillus plantarum* BMCM12 prevent adhesion of enteropathogens to mucin. *Current Microbiology*. 64:592-596.
- Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 394-406.
- Schmelcher M, Waldherr F, Loessner MJ. 2012. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Applied Microbiology Biotechnology*. 93(2):633-643.
- Serrano-Maldonado CE. 2010. Caracterización de la actividad antibacteriana producida por bacterias ácido lácticas aisladas de un alimento artesanal mexicano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Shockman CD. 1992. The autolytic ('suicidase') system of *Enterococcus hirae*: from lysine depletion autolysis to biochemical and molecular studies of the two muramidases of *Enterococcus hirae* ATCC 9790. *FEMS Microbiology Letters*. 79:261-267.

- Smitsopoulou M, Vafopoulou A, Choli-Papadopoulou T, Alichanidis E. 1998. Purification and partial characterization of a tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9.2. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(12):4872-4876.
- Son B, Yun J, Lim JA, Shin H, Heu S, Ryu S. 2012. Characterization of LysB4, an endolysin from the *Bacillus cereus*-infecting bacteriophage B4. *BMC Microbiology*. 15:12-33.
- Tsfasman IM, Stepnava OA, Bazhanova NV, Kulaev IS. 2000. Intracellular glucosaminidase of the bacterium *Xanthomonas campestris* IBPM B-124: purification and properties. *Biochemistry (Mosc.)*. 65(9):1036-1040.
- Upreti RK, Kumar M, Shankar V. 2003. Bacterial glycoproteins: Functions, biosynthesis and applications. *Proteomics*. 3:363-379.
- Vasala A, Välikkilä M, Caldentey J, Alatossava T. 1995. Genetic and Biochemical Characterization of the *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* Bacteriophage LL-H Lysin. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(11):4004-4011.
- Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32:259–286.
- Yoong P, Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. 2004. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*. 186(14):4808-4812.
- Zhong Q, Shao S, Mu R, Wang H, Huang S, Han J, Huang H, Tian S. 2011. Characterization of peptidoglycan hydrolase in Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Biology Reports*. 38(1):503-509.
- Zúñiga-Bustos AB. 2009. Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el cotija por métodos moleculares. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. UNAM. México, D.F.