



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**‘IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS ACTIVOS DE LA MURAMIDASA
TRANSMEMBRANAL DE *Pediococcus acidilacti* ATCC 8042’**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q. A. VIANEY ANAHÍ SALAS VILLAGRÁN

TUTOR PRINCIPAL

DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRÉS GONZÁLEZ SARAIVIA
Facultad de Química. UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ROBERTO ALEJANDRO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
Instituto de Química. UNAM
DR. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
Instituto de Biotecnología. UNAM

Ciudad de México, Junio , 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Sergio Sánchez Esquivel.
Vocal:	Dr. José de Jesús García Trejo.
Vocal:	Dra. Romina Rodríguez Sanoja.
Vocal:	Dr. Enrique García Hernández.
Secretario:	Dr. Francisco Ruiz Terán.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González Saravia.

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de maestría, CVU: 896320), además de recibir apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para la realización de una estancia de investigación en la Universidad Estatal de Ohio, Estados Unidos. Se contó con el apoyo del programa PAPIIP-Facultad de Química 5000-9095.

**‘IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS ACTIVOS DE LA MURAMIDASA
TRANSMEMBRANAL DE *Pediococcus acidilacti* ATCC 8042’**

1.	RESUMEN	5
2.	INTRODUCCIÓN	6
2.1.	Resistencia a antibióticos.	6
2.2.	Bacterias ácido lácticas.	8
2.3.	Peptidoglucano hidrolasas (PGH).	12
3.	ANTECEDENTES	16
4.	HIPÓTESIS	24
5.	OBJETIVO	24
6.	OBJETIVOS PARTICULARES	24
7.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25
7.1.	Clonación de las tres regiones de manera independiente.	26
7.1.1.	Diseño de cebadores específicos.	26
7.1.2.	Extracción de plásmido.	28
7.1.3.	Amplificación del gen completo que codifica a la proteína de 110 kDa.	28
7.1.4.	Amplificación de las regiones de interés del gen que codifica para la proteína de 110 kDa.	29
7.1.5.	Visualización de los productos de PCR en gel.	30
7.1.6.	Elaboración de las construcciones con el plásmido TOPO 2.1.	30
7.1.7.	Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α , <i>E. coli</i> BL21.	30
7.1.8.	Transformación de células <i>E. coli</i> BL21.	31
7.1.9.	Elaboración de las construcciones con el plásmido pET-22b.	31
7.1.10.	Análisis de las transformantes.	32
7.1.11.	Secuenciación de las construcciones.	32
7.2.	Expresión de las proteínas recombinantes.	33
7.2.1.	Condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante.	33
7.2.2.	Ultrafiltración de la fracción citosólica.	33
7.2.3.	Cuantificación de proteína.	33

7.2.4.	Perfil proteico SDS-PAGE y zimograma.	33
7.2.5.	Western-blot.	34
7.2.6.	Determinación de la actividad de <i>N</i> -acetilmuramidasa.	35
7.2.7.	Extracción de peptidoglucano de <i>M. lysodeikticus</i> .	35
7.2.8.	Identificación de proteína por espectrometría de masas LC-MS/MS.	36
7.3.	Predicción de la estructura 3D de la proteína así como su análisis con programas bioinformáticos.	36
7.3.1.	Modelado y validación de la estructura tridimensional de la proteína.	36
7.3.2.	Predicción del sitio de unión a ligando, utilizando la herramienta de acoplamiento molecular.	36
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
8.1.	Clonación de las tres regiones de manera independiente.	37
8.1.1.	Extracción de plásmido.	37
8.1.2.	Subclonación de los fragmentos del gen de la proteína de 110 kDa.	37
8.1.3.	Elaboración de las construcciones en el vector TOPO 2.1	38
8.1.4.	Elaboración de las construcciones en pET-22b en <i>E. coli</i> BL21 (D3).	40
8.1.5.	Análisis de transformantes.	40
8.2.	Expresión de las proteínas recombinantes.	42
8.2.1.	Inducción de la expresión de la proteína de interés.	42
8.2.2.	Perfil proteico SDS-PAGE y Zimogramas	44
8.2.3.	Western-blot.	47
8.2.4.	Evaluación de la actividad de <i>N</i> -acetilmuramidasa	49
8.3.	Predicción y análisis de la estructura 3D de la proteína con programas bioinformáticos.	51
8.3.1.	Modelado y validación de la estructura tridimensional de la proteína.	51
8.3.2.	Predicción del sitio de unión a sustrato, utilizando la herramienta de Acoplamiento molecular.	58
9.	CONCLUSIONES	63
10.	PERSPECTIVAS	64
11.	REFERENCIAS	65

1. RESUMEN

Las peptidoglucano hidrolasas son enzimas cuya función es digerir el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias. Estructuralmente están organizadas en un dominio enzimáticamente activo, el cual es el responsable de la hidrólisis, y en un dominio de unión a carbohidratos, el cual normalmente tiene una función reguladora independiente y determina el espectro lítico al seleccionar elementos específicos de la pared celular.

Previamente en el grupo de trabajo se identificaron dos peptidoglucano hidrolasas, con pesos moleculares de 99 y 110 kDa, producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Se encontró que la proteína de 99 kDa correspondía a la primera peptidoglucano hidrolasa bifuncional reportada. Sin embargo, la proteína de 110 kDa fue identificada únicamente como un transportador tipo ABC, lo cual no explicaba su actividad lítica, además de no poseer ningún dominio reportado como antimicrobiano. La proteína fue clonada y expresada para estudiar su actividad y se observó una degradación en fragmentos de menor peso molecular, sin embargo no hubo pérdida de funcionalidad, sugiriendo que sólo un dominio era el responsable de la actividad lítica.

En este trabajo se buscó identificar el dominio catalítico de esta enzima, por lo que se dividió a la proteína en regiones, basándonos en un modelo de la estructura de la proteína en la membrana. Estas regiones se clonaron y expresaron de manera independiente en el sistema pET-22. Por otra parte, se realizó la predicción de su estructura 3D por medio de modelado *ab initio*, así como una predicción de unión a sustrato (cadena análoga de peptidoglucano) utilizando la herramienta de acoplamiento molecular. Se encontró que una de las regiones, con un peso aproximado de 30 kDa, presentó actividad lítica en zimograma contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, una actividad específica de *N*-acetilmuramidasa, además de que presentó la menor energía de afinidad en el acoplamiento molecular. Estos resultados sugieren que este fragmento contiene el sitio catalítico de la proteína de membrana de 110 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad de muramidasa.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Resistencia a antibióticos.

El descubrimiento y la implementación clínica de los antibióticos es uno de los más importantes logros en la historia de la medicina, ya que se redujo sustancialmente la mortalidad y la morbilidad en infecciones bacterianas graves, sin mencionar que muchos procedimientos médicos no podrían ser llevados a cabo de manera segura sin la presencia de estos (Leibovici et al., 2016; Watkins y Bonomo, 2016).

La resistencia de microorganismos a los antibióticos es un resultado evolutivo inevitable, persistente y multifactorial, ya que todos los organismos desarrollan mutaciones genéticas que les confieren insensibilidad a este tipo de fármacos. Algunos elementos genéticos móviles o la transferencia horizontal en bacterias, se encargan de esparcir estos genes de resistencia en patógenos, contribuyendo a la complejidad e impredecibilidad de la aparición de esta resistencia en poblaciones bacterianas (Pawlowski et al., 2018; Watkins y Bonomo, 2016). Las bacterias resistentes pueden circular en poblaciones de seres humanos y animales, a través de los alimentos, el agua y el medio ambiente, encontrándolas también en alimentos para animales y en productos destinados para el consumo humano. Estas bacterias resistentes a antibióticos pueden llegar a los consumidores de diversas maneras, por ejemplo: cuando los animales son sacrificados y procesados para alimentos, estas bacterias pueden contaminar estos productos como carne o lácteos derivados de los animales; también las frutas y verduras pueden contaminarse a través del contacto con tierra, agua o fertilizantes que contengan bacterias resistentes (CDC, 2021).

La aparición de bacterias multirresistentes a los antibióticos es un problema de salud pública cada vez mayor en todo el mundo y es un proceso complicado impulsado por múltiples factores, como puede ser la alta densidad bacteriana en las instalaciones de hospitales que se traduce en la transmisión de bacterias dentro de una comunidad y permite que surja la resistencia. La falta de saneamiento y los sistemas de agua contaminados pueden provocar la propagación de bacterias resistentes en aguas residuales, mientras que una prescripción inadecuada y

excesiva de antibióticos de amplio espectro en humanos puede ejercer una presión selectiva sobre bacterias comunes. Por otra parte, ha ocurrido un uso excesivo de antibióticos en la producción pecuaria, no para tratar enfermedades en el ganado sino para promover su crecimiento, y se ha observado una alta correlación entre el desarrollo de la resistencia con la frecuencia de uso de estos fármacos (Furusawa et al., 2018; Watkins y Bonomo, 2016; WHO, 2015).

Debido a que muchos antibióticos pertenecen a la misma clase de moléculas químicas, la resistencia a un antibiótico específico puede conducir a la resistencia a toda una clase relacionada. Combatir el aumento de esta resistencia es una preocupación mundial, por lo que la OMS (WHO) ha respaldado planes de acción para solucionar este problema (WHO, 2015).

En el 2017 la OMS publicó una lista de ‘patógenos prioritarios’ resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 especies o grupos taxonómicos de bacterias más peligrosas para la salud humana. La lista se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de microorganismos prioritarios resistentes a antibióticos.

Prioridad	Microorganismos	Resistencia
I. Crítica	- <i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Enterobacteriaceae	Carbapenémicos
II. Elevada	- <i>Enterococcus faecium</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Helicobacter pylori</i> - <i>Campylobacter</i> spp. - <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Vancomicina, metilicina, claritromicina, fluoroquinolonas, cefalosporina
III. Media	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Shigella</i> spp	Ampicilina y fluoroquinolonas

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes, especialmente peligrosas en hospitales, que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías; estas bacterias han adquirido resistencia a los mejores antibióticos disponibles para tratar bacterias multirresistentes.

Los niveles segundo y tercero de la lista (prioridades alta y media) contienen otras bacterias que exhiben farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes, como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias (WHO, 2017).

La falta de nuevos antibióticos en la línea de desarrollo farmacéutico representa un problema, además de que la mayoría de los antibióticos actualmente están dirigidos a patógenos Gram negativos, mientras que la mayoría de los casos de sepsis ahora son causados por patógenos Gram positivos (Dodds, 2017). Es por este motivo que se ha incrementado la búsqueda de otras opciones para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos, de los que un ejemplo son sustancias de naturaleza proteica con actividad antagónica producidas por bacterias ácido lácticas (BAL)

2.2. Bacterias ácido lácticas.

Las BAL constituyen un grupo de microorganismos muy extendido en la naturaleza los cuales se encuentran en hábitats ricos en nutrientes como cereales, frutas, vegetales, leche y carne. Estos microorganismos son generalmente considerados benéficos y algunas cepas, incluso, como bacterias promotoras de la salud (probióticos); son conocidos por su capacidad de producir ácido láctico como principal producto final de su metabolismo anaeróbico y por sintetizar una amplia gama de metabolitos, los cuales actúan de manera sinérgica para prevenir o eliminar la contaminación bacteriana, además de contribuir en las propiedades nutricionales, sensoriales y tecnológicas de productos alimenticios fermentados (Grosu-Tudor et al., 2014; Ruiz et al., 2019).

Las BAL forman parte de las bacterias Gram positivas, unidas por ciertas características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. Son anaerobias

aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativa, ácidotolerantes, con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo y estrictamente fermentativas obteniendo ácido láctico como unos de los principales productos durante la fermentación de carbohidratos. Según su clasificación taxonómica actual, pertenecen a la familia de los Firmicutes, clase Bacilli, en el orden de los Lactobacillales; constituyen un grupo bastante heterogéneo. Entre los géneros incluidos se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* (Tsakalidou, 2011; Salminen, 2004).

El papel principal de las BAL en un alimento fermentado es convertir azúcares en ácido láctico por medio de la fermentación. De este modo contribuyen con la seguridad del producto creando condiciones no favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos y de deterioro y tienen también un impacto en las características sensoriales y en la calidad del producto final (Kröckel, 2013).

Una característica importante de estas bacterias (BAL) es la producción de ácido láctico como el principal producto en la fermentación de los carbohidratos. Dado la falta de un sistema respiratorio funcional, las BAL obtienen su energía a través de fosforilación a nivel de sustrato siguiendo dos vías metabólicas para la fermentación de hexosas, homofermentativa y heterofermentativa. Como se muestra en la Figura 1, la vía homofermentativa se basa en la glucólisis con la producción de ácido láctico principalmente, mientras que la vía heterofermentativa, sigue la ruta de las pentosas fosfato, que se caracteriza por la producción de CO₂ y etanol o acetato además del ácido láctico (Mora-Villalobos et al., 2020; Salminen, 2004).

El tipo de fermentación es un criterio taxonómico importante. Por ejemplo los géneros de *Lactobacillus* y *Pediococcus* son homofermentativos obligatorios, así como los géneros *Carnobacterium*, *Leuconostoc* y *Weissella* son heterofermentativos obligatorios (Salminen, 2004).

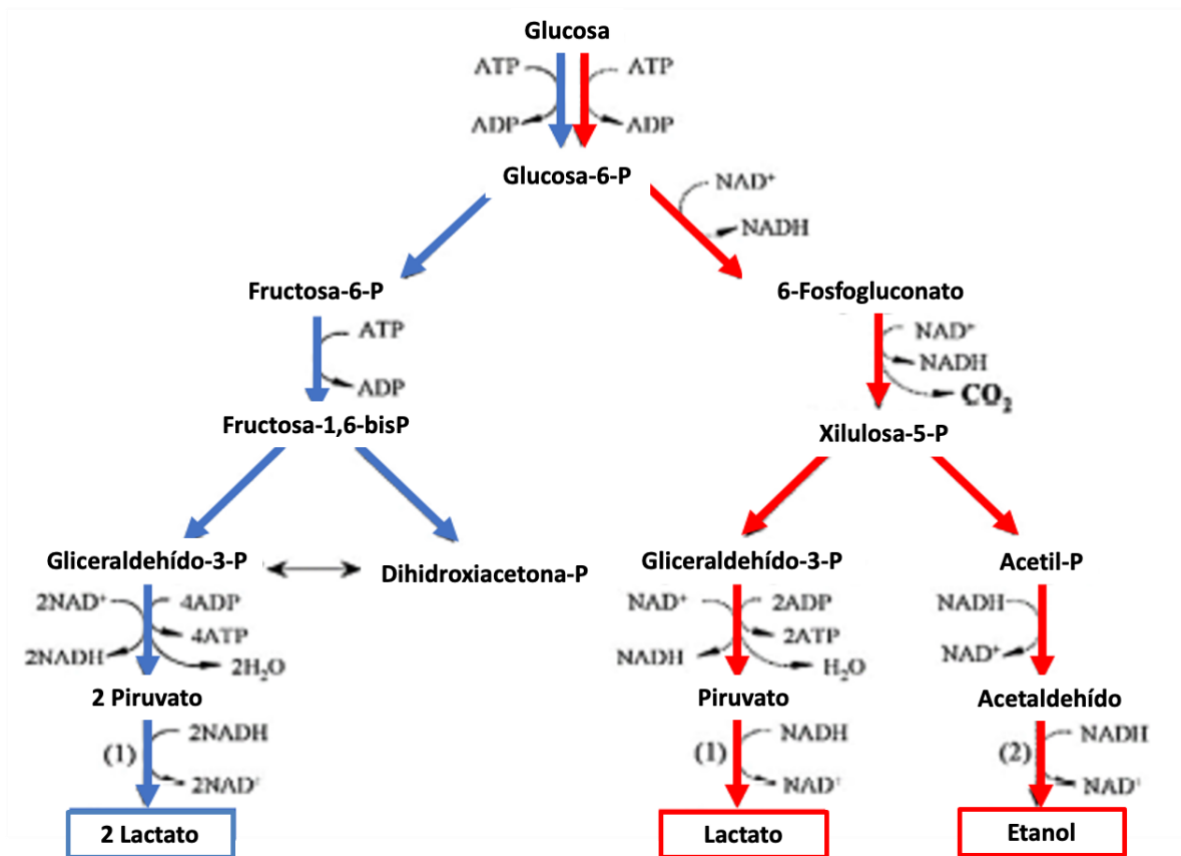


Figura 1. Tipo de fermentación de las bacterias ácido lácticas; fermentación láctica homofermentativa (línea azul), fermentación láctica heterofermentativa (línea roja) (Tomado y modificado de Endo et al., 2019).

Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de producir numerosos compuestos antimicrobianos que incluyen ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, alcohol y diacetilo. Estos compuestos antimicrobianos interactúan con las membranas celulares de los patógenos nocivos e inhiben su crecimiento mediante una disminución del pH intracelular y desnaturalizando las proteínas de la membrana produciendo una disfunción de la permeabilidad de membrana. Además de estos compuestos antimicrobianos de origen orgánico, producen compuestos de naturaleza proteica como pueden ser las bacteriocinas y las peptidoglucano hidrolasas (Gupta et al., 2018; Salminen, 2004).

Tabla 2. Lista de compuestos con actividad antimicrobiana producidos por BAL.

Compuestos con actividad antimicrobiana	Mecanismo de acción
<ul style="list-style-type: none"> - Ácidos orgánicos - Diacetilo - Etanol 	<p>La disminución del pH de las células puede afectar numerosos procesos y puede conducir a la desnaturalización interna de las enzimas, la mayor concentración de aniones dentro de la célula también puede conducir a un aumento en el transporte de iones de potasio a la célula, lo que modifica la osmolaridad de las células y, por lo tanto, inhibe el crecimiento celular.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Reuterina 	<p>Induce al estrés oxidativo ya que el aldehído reactivo en la reuterina reacciona con grupos tiol de pequeñas moléculas y proteínas, lo que puede conducir a su inactivación.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Peróxido de hidrógeno 	<p>Su mecanismo no se ha comprendido completamente, sin embargo, es muy probable que sea una combinación de daño en el DNA, oxidación de proteínas e interrupción membranal de la célula objetivo.</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Bacteriocinas 	<p>Péptidos sintetizados ribosomalmente que inhiben el crecimiento al hacer poros en la membrana de las bacterias y, por lo tanto, alterar su permeabilidad. Se han propuesto muchos sistemas de clasificación para bacteriocinas, uno de los cuales es el de Cotter, 2013.</p> <ul style="list-style-type: none"> -Clase I. Lantibióticos -Clase II. No-lantibióticos -Clase III. Bacteriolisinas
<ul style="list-style-type: none"> - Peptidoglucano hidrolasas 	<p>Son enzimas encargadas de hidrolizar el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias.</p>

(Cleusix et al., 2007; Cotter et al., 2013; Imlay et al., 1988; Schaefer et al., 2010; Tamarit et al., 1998).

2.3. Peptidoglucano hidrolasas (PGH).

Las peptidoglucano hidrolasas (PGH) son un grupo de agentes biológicos que tienen la capacidad de mejorar o potenciar muchos de los actuales fármacos contra diversas bacterias por ejemplo, micobacterias (Gustine, 2019), ya que estas enzimas son las responsables de hidrolizar los enlaces del peptidoglucano (PG) (Vollmer et al., 2008).

El PG es el principal componente de la pared celular de las bacterias, forma múltiples capas, presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida, garantizando la integridad y la forma de la célula. Está constituido por cadenas de glicano formados principalmente por los ácidos *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y *N*-acetilmurámico (MurNAc) unidos por el enlace β -1,4 (Rolain et al., 2012). Las cadenas peptídicas están unidas covalentemente a través de su *N*- terminal y el grupo lactil del MurNAc, y pueden variar en su composición dependiendo la especie bacteriana. En BAL, la secuencia consenso de aminoácidos del péptido del PG es L-Ala- γ -D-Glu-X-D-Ala, donde el tercer aminoácido (X) es un di-amino ácido, siendo frecuentemente L-Lys (*L. lactis* y en la mayoría de los lactobacilos) (Chapot-Chartier, 2014). Las subunidades del PG disacárido-pentapéptido son polimerizadas por la actividad de transglucosilasa de los complejos de síntesis de PG para formar cadenas de glucano (Wyckoff et al., 2012).

Cabe mencionar que la pared celular de las bacterias Gram positivas está más expuesta a la superficie celular, haciéndola más accesibles tanto a antibióticos, hidrolasas y toxinas, incluyendo autólisis dirigida y enzimas como la lisostafina, una enzima secretada por *Staphylococcus simulans*, que ataca la pared celular de *Staphylococcus aureus* (Kumar, 2008). También pueden estar asociados otro tipo de compuestos, como son los ácidos teicoicos, lipoteicoicos y/o polisacáridos, diferenciándola de la pared celular de las bacterias Gram negativas, en las cuales el peptidoglucano se encuentra protegido de este tipo de enzimas por la membrana externa y facilitan un reciclaje de PG eficiente, productos de renovación de PG y minimizan la liberación de fragmentos de la célula, además están constituidas por

una capa delgada y no contienen ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (Nigro et al., 2008, Wyckoff et al., 2012).

Estas enzimas pueden tener más de una función fisiológica (Figura 2), entre ellas, la regulación del crecimiento de la pared celular, el crecimiento celular, donde la separación de los enlaces del PG son necesarios para insertar el PG sintetizado, la separación de las células hijas durante la división celular, el proceso de autólisis, en particular cuando las células experimentan condiciones de estrés y para mantener la integridad de la célula (Vollmer et al., 2008, Chapot-Chartier, 2014).

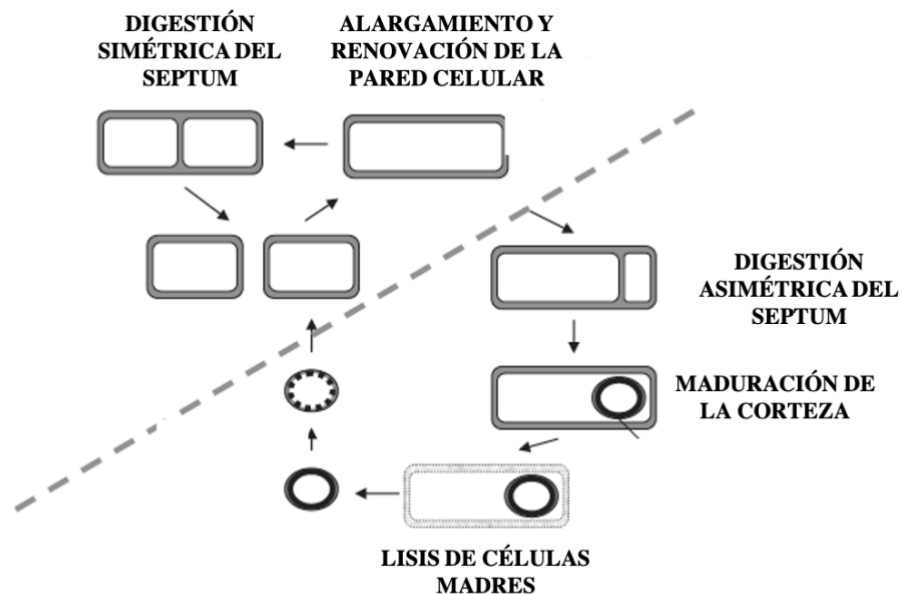


Figura 2. Funciones fisiológicas sobre la pared celular de las peptidoglucano hidrolasas (Tomado y modificado de Vollmer et al., 2008).

Estas enzimas pueden clasificarse en cuatro grupos, dependiendo del enlace del peptidoglucano que hidrolicen (Figura 3).

- i. ***N*-acetilglucosaminidasas (glucosaminidasas).** Hidrolizan el enlace β -1,4 entre el *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y el *N*-acetilmurámico (MurNAc) dejando un extremo *N*-acetilglucosamina reductor.

- ii. ***N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (amidasa)**. Hidrolizan el enlace entre el grupo lactil del *N*-acetilmurámico (MurNAc) y el α -amino del L-ala, el cual es el primer aminoácido de la cadena lateral peptídica.
- iii. **Peptidasas**. Hidrolizan varios enlaces del PG y dentro de esta clase se encuentran las endopeptidasas (rompen los enlaces formados por los péptidos) y las carboxipeptidasas (hidrolizan el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos).
- iv. ***N*-acetilmuramidasa (muramidasa)**. Hidrolizan el enlace β -1,4 entre el *N*-acetilmurámico (MurNAc) y el *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Este enlace se puede romper de dos maneras, la primera es como lo hacen las lisozimas, las cuales hidrolizan el enlace glucosídico, dejando como producto terminal un extremo ácido *N*-acetilmurámico reductor libre, por el contrario las transglucosilasas líticas rompen este enlace con una transglucosilación intramolecular resultando en la formación del anillo 1,6-anhidro en el residuo del *N*-acetilmurámico del producto.

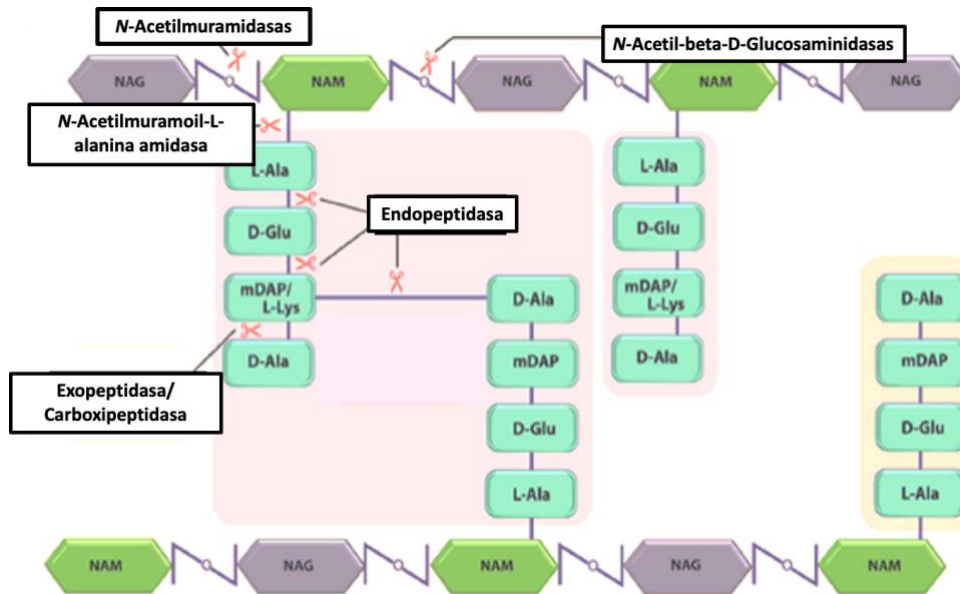


Figura 3. Sitios de acción de peptidoglucano hidrolasas sobre la pared celular bacteriana. (Tomado y modificado, Sharma et al., 2016).

Actualmente se están generando diversas herramientas computacionales para obtener una mejor clasificación e identificación de estas enzimas, ya que incluir en las categorías existentes a las nuevas peptidoglucano hidrolasas que van apareciendo a partir de datos genómicos y metagenómicos es difícil debido a la falta de similitud con las ya caracterizadas previamente (Sharma et al., 2016).

3. ANTECEDENTES

García-Cano, de nuestro grupo de trabajo, reportó en el 2013 dos proteínas producidas por la BAL *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 que presentaron actividad lítica en zimograma contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, con masas moleculares de 99 y 110 kDa, tras un proceso parcial de purificación (Figura 4). Estas proteínas también fueron evaluadas por el método de difusión en agar contra bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus paracasei*, *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*), las cuales mostraron un amplio espectro de inhibición.

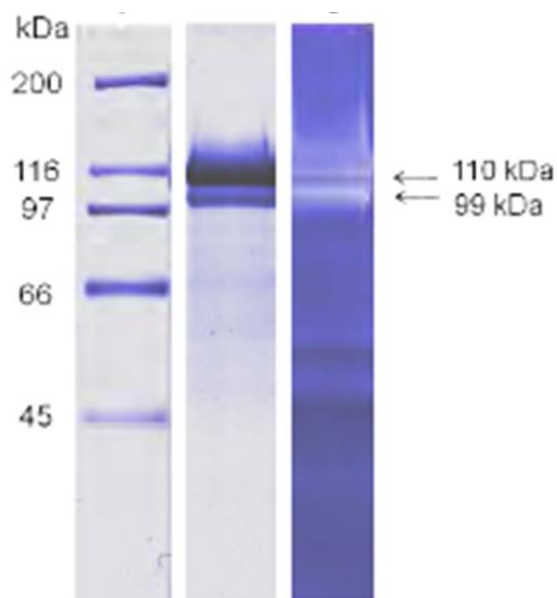


Figura 4. Detección de PGH en *P. acidilactici* ATCC 8042. SDS-PAGE y Zimograma contra *M. lysodeikticus* (Tomada de García-Cano et al., 2011).

Se determinó por espectrometría de masas la identidad de estas proteínas, y se obtuvo como resultado que la proteína que se observa en la masa molecular de 99 kDa corresponde a una *N*-acetilmuramidasa, con dos regiones conservadas correspondientes a dominios de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa, mientras que la proteína con masa molecular de 110 kDa fue identificada como un transportador tipo ABC.

Campos-Gómez (2015) identificó a la proteína de 99 kDa como la primera peptidoglucano hidrolasa bifuncional reportada en bacterias ácido lácticas y demostró que ambos dominios catalíticos identificados presentan actividad lítica de manera independiente.

Paralelo a esto, en el 2013 García-Cano comparó el espectro de inhibición de la proteína recombinante de 99 kDa con la mezcla de las proteínas nativas de *P. acidilactici* ATCC 8042 de 99 y 110 kDa. Se observó que en la proteína recombinante de 99 kDa se presenta una disminución en el espectro de inhibición en todos los casos, así como una pérdida total de la actividad antimicrobiana contra Gram negativos y *Bacillus* sp., los cuales se encuentran resaltados en amarillo en la Tabla 3 en comparación con la mezcla de ambas proteínas.

Este resultado sugeriría que la actividad contra este tipo de microorganismos está dada principalmente por la proteína de 110 kDa, a pesar de no haber sido identificado en la misma ningún dominio característico de una enzima con actividad antimicrobiana, como los que posee la proteína de 99 kDa y hasta el momento no existen reportes de transportadores tipo ABC que posean una actividad lítica contra diferentes microorganismos.

Para confirmar esta teoría y poder estudiar a mayor detalle la actividad lítica observada por la proteína de 110 kDa, Matamoros en el 2013 clonó y expresó el gen que codifica para esta proteína con ayuda de los vectores pCR®-XL-TOPO (vector de clonación) y pET 20+(b) (vector de expresión) y las cepas *E. coli* BL21 y *E. coli* BL21 pLysS.

La actividad lítica de la proteína recombinante se estudió en zimogramas que contenían células liofilizadas de *M. lysodeikticus* y *S. aureus*. En los geles con *S. aureus*, la proteína se degradó en varias bandas, sin verse afectada la actividad lítica; sin embargo para el caso de los zimogramas realizados contra *M. lysodeikticus* únicamente se observó actividad en masas moleculares por debajo de los 66 kDa (Figura 5).

Tabla 3. Comparación de espectro antimicrobiano de la mezcla de proteínas nativas de 99 y 110 kDa con la proteína recombinante de 99 kDa.

Mezcla de proteínas nativas de 99- y 110 kDa de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	Proteína recombinante de 99-kDa	
Gram-positivas		
	mm/mg proteína	mm/mg proteína
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B230	206.4	0.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	127.2	0.0
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	188.9	40.8
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	180.2	11.4
<i>Enterococcus faecium</i> QB	99.4	25.8
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	88.9	19.9
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	77.8	23.6
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	86.9	22.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	79.2	24.7
Gram-negativas		
<i>Salmonella</i> entérica serovar Typhimurium ATCC 14028	200.6	0.0
<i>Escherichia coli</i> DH5α	76.6	0.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0.0	0.0

(García-Cano, 2013)

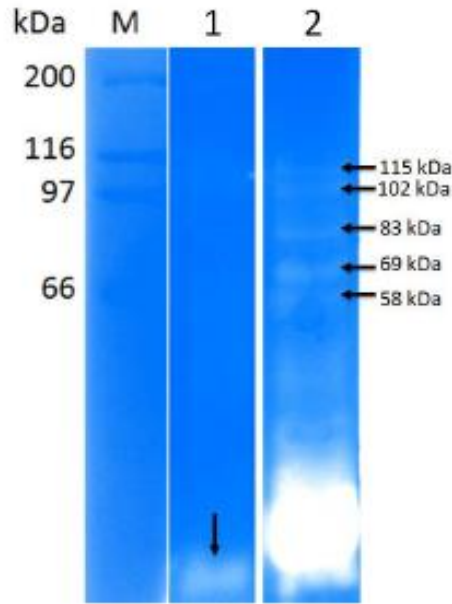


Figura 5. Actividad lítica en zimograma de la proteína recombinante producida en *E. coli* BL21pLysS. Carril M: marcador de alto peso molecular; 1: sobrenadante concentrado vs *M. lysodeikticus*; 2: sobrenadante concentrado vs *S. aureus* (Tomado de Matamoros, 2013).

El análisis de la información obtenida con las bases de datos, coinciden en que la característica más notable de la proteína es la presencia de una zona homóloga a un transportador ABC sinque se encuentren regiones características de muramidasa o amidasa (peptidoglucano hidrolasa), que expliquen la actividad lítica ya observada. Para poder entender de mejor manera a la proteína Matamoros (2013) realizó un modelado por homología utilizando el programa YASARA, el cual es un programa computacional que da información estructural de enzimas y contiene una gama de características adecuadas para ayudar al trabajo del modelado de proteínas (Land y Humble, 2018). Se identificó una región que presenta similitud estructural con la colicina Ia, proteína tóxica secretada por *E. coli* al medio extracelular, capaz de formar poros en la membrana y la cual ha sido reportada como poseedor de actividad lítica contra diversos microorganismos (Figura 6).

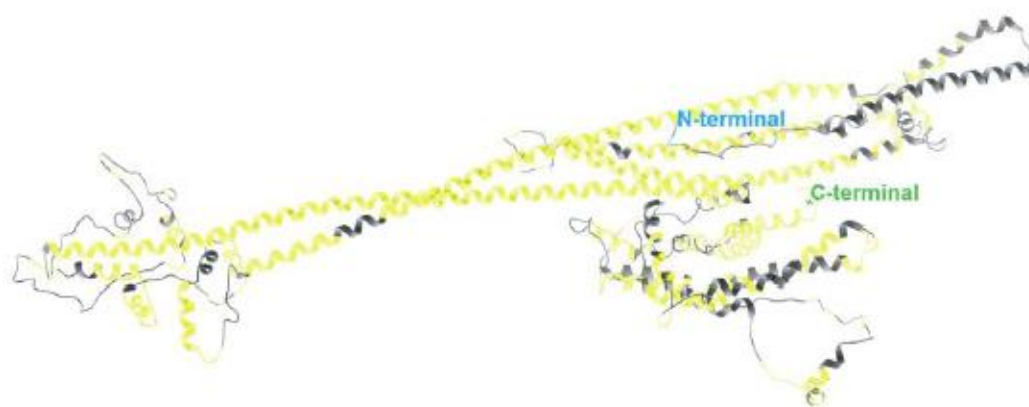


Figura 6. Modelado de la proteína de 110 kDa utilizando el programa YASARA (Matamoros, 2013).

Posteriormente, Barbosa en el 2018 identificó otros dominios de la proteína mediante análisis bioinformático, y encontró que la similitud más alta de esta proteína se encuentra en los siguientes dominios:

- Transportador ABC
- Aceptor quimiotáctico de metilos
- Proteína requerida para infección por fagos (YhgE)

De estos, el aceptor quimiotáctico de metilos es el dominio más variable en las proteínas homólogas a la de 110 kDa. Hasta el momento ninguno de estos dominios se ha reportado como antimicrobiano, bacteriostático, bactericida o bacteriolítico, además de que las proteínas que presentan similitud con la proteína de interés son hipotéticas y aún no hay informes de haber sido purificada, cristalizada o aislada, debido principalmente a la complejidad que lleva el análisis de las proteínas de membrana.

Entre las proteínas que tienen homología, la única con efecto antimicrobiano es la colicina la, sin embargo, el porcentaje de identidad es bajo (10%) y no cubre toda la secuencia de aminoácidos. Con la ayuda de diversos programas computacionales y tomando en cuenta diversos parámetros, se realizó la predicción estructural de la proteína (Figura 7), pero estos resultados no aportan información acerca de la

actividad lítica o antimicrobiana de la proteína. En la Figura 7 se observa la predicción estructural de la proteína, en la que se pueden observar tres regiones: dos interaccionan con la pared celular y uno transmembranal.

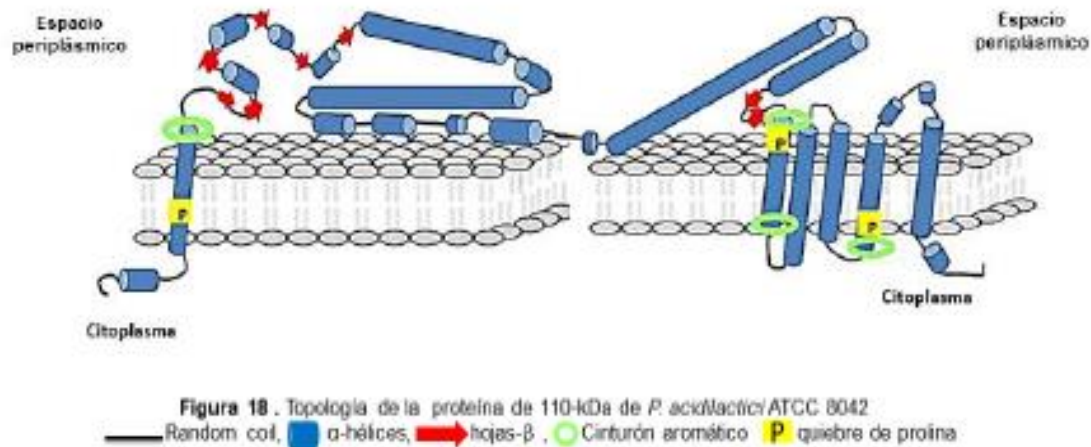


Figura 7. Predicción estructural de la proteína de 110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 (Tomado de Barbosa, 2018).

Posteriormente se clonó el gen que codifica para la expresión de la proteína y, con el fin de que esta se exprese completa y funcional, se planteó un sistema de expresión en el cual el vector no exporte la proteína al sobrenadante y de esta manera protegerla de su hidrólisis durante el proceso, lo cual se logra con el vector pET-19b. Se optimizaron las condiciones de producción de la proteína recombinante esperando que la proteína mantuviera su integridad y, principalmente, su funcionalidad durante el proceso. Los resultados en zimograma fueron parecidos a lo obtenido por Matamoros en el 2013, ya que se sigue observando una degradación de la proteína en dos o hasta tres bandas, pero a pesar de que la proteína se degrada sigue manteniendo actividad antimicrobiana, sólo contra *M. lysodeikticus* sino también contra *S. aureus*, como se muestra en la Figura 8 donde se verificó la actividad antimicrobiana de los restos celulares de la cepa *E. coli* BL21 pET19-110 solubilizados con diferentes detergentes, siendo los de mayor actividad los carriles 5, 6 y 7, los cuales fueron solubilizados como DOC 2%, TRITON 1% y CHAPS 0.429%, respectivamente.

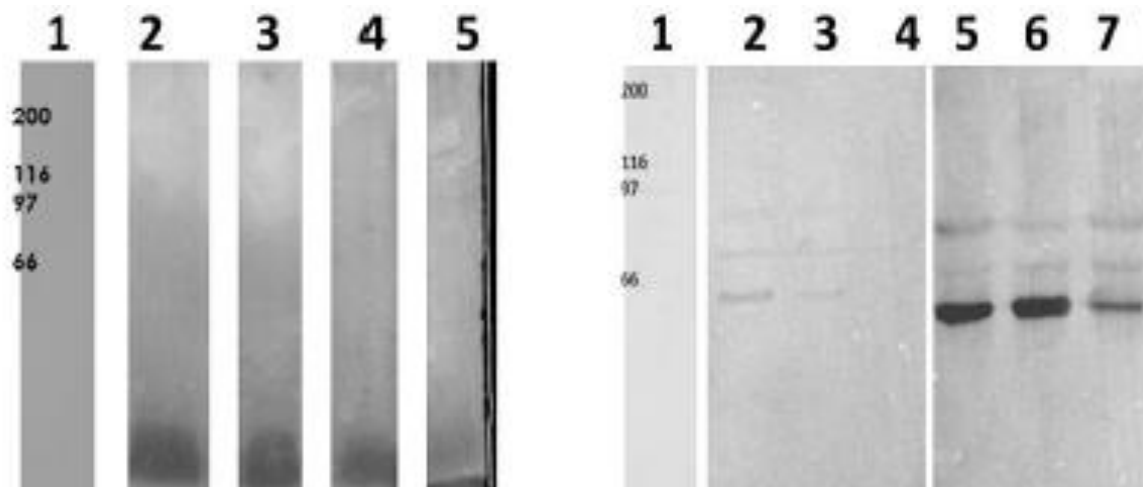


Figura 8. Zimogramas con actividad lítica contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus* y *S. aureus* (Tomado de Barbosa, 2018).

Para conocer si el mecanismo de acción de la proteína recombinante es análogo a una PGH se evaluó la actividad de la misma mediante pruebas con sustrato específico, dando únicamente un resultado positivo en el caso de las pruebas de muramidasa, a pesar de no tener los dos dominios típicos de lisozimas y tuvo efecto contra diversos patógenos, por lo que no se descarta que se trate de una muramidasa.

Pediococcus acidilactici es una bacteria ácido láctica de gran importancia en la industria de lácteos y cárnicos, debido a sus propiedades probióticas, por lo que es objeto de estudio en diversos grupos de trabajo los cuales han tratado de aislar y caracterizar PGH producidas por este microorganismo y han probado su actividad antagónica contra otras bacterias patógenas en alimentos, principalmente.

Gandhi y su grupo de trabajo en el 2020 estudiaron el genoma de *Pediococcus acidilactici* NCDC 252, en el cual se mostraba la presencia de dos genes que codificaban a la expresión de PGH con pesos moleculares de aproximadamente 105.5-kDa y 30.9 -kDa. Al estudiar su actividad mediante zimogramas contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus* observaron, al igual que en los trabajos previamente

mencionados de Barbosa (2018) y Matamoros (2013), bandas de actividad lítica a menores pesos moleculares (aproximadamente 11, 15, 23 y 35 kDa). Los autores sugieren que esta actividad se debe a productos de degradación de la proteína que retienen una actividad lítica muy baja, ocasionado por las condiciones experimentales utilizadas, cabe mencionar que estas enzimas no son recombinantes (Gandhi et al., 2020). Con estos resultados es posible comparar el comportamiento de esta proteína nativa reportada como una PGH producida por *Pediococcus acidilactici*, con la proteína de 110 kDa identificada en el grupo de trabajo como una proteína transportadora tipo ABC sin dominios homólogos a una PGH.

Por esta razón surge este trabajo, para resolver las siguientes incógnitas: ¿Por qué la proteína de 110 kDa tiene actividad de muramidasa, si su secuencia no es homóloga a ninguna peptidoglucano hidrolasa reportada en la base de datos?, ¿Cuál o cuáles son los dominios encargados de esta actividad lítica?

4. HIPÓTESIS

La actividad antimicrobiana de la proteína transmembranal de 110 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, radicará en uno solo de los tres dominios que se clonarán y expresarán de manera independiente

5. OBJETIVO

Determinar qué región o regiones de la enzima son la o las responsables de la actividad antimicrobiana, así como entender la relación entre la función y estructura de la proteína.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar cebadores que permitan la amplificación de las tres regiones de la proteína de 110 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.
- Clonar y expresar las tres regiones de manera independiente en *E. coli*. BL21.
- Mediante análisis bioinformático, Identificar la región o las regiones con actividad antimicrobiana.
- Predecir la estructura tridimensional de la proteína completa y/o de la región o las regiones antimicrobianas así como predecir el sitio de unión a ligando por medio de acoplamiento molecular.

7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

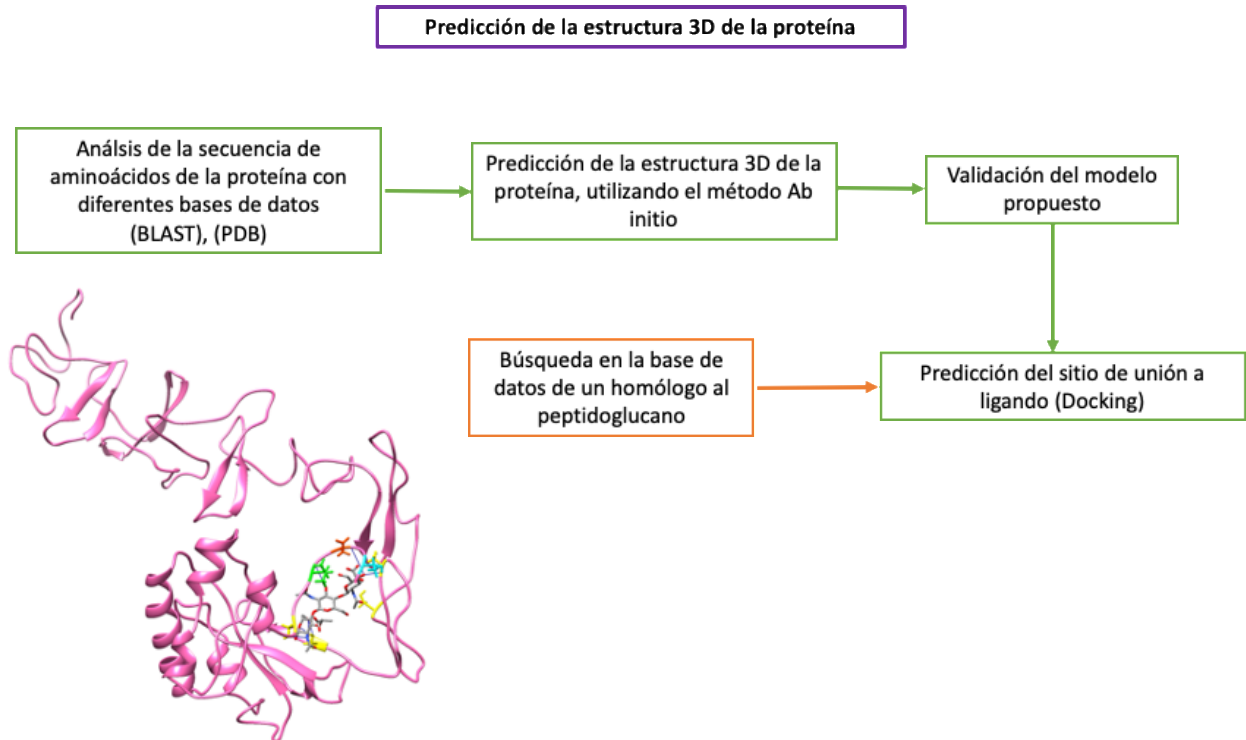
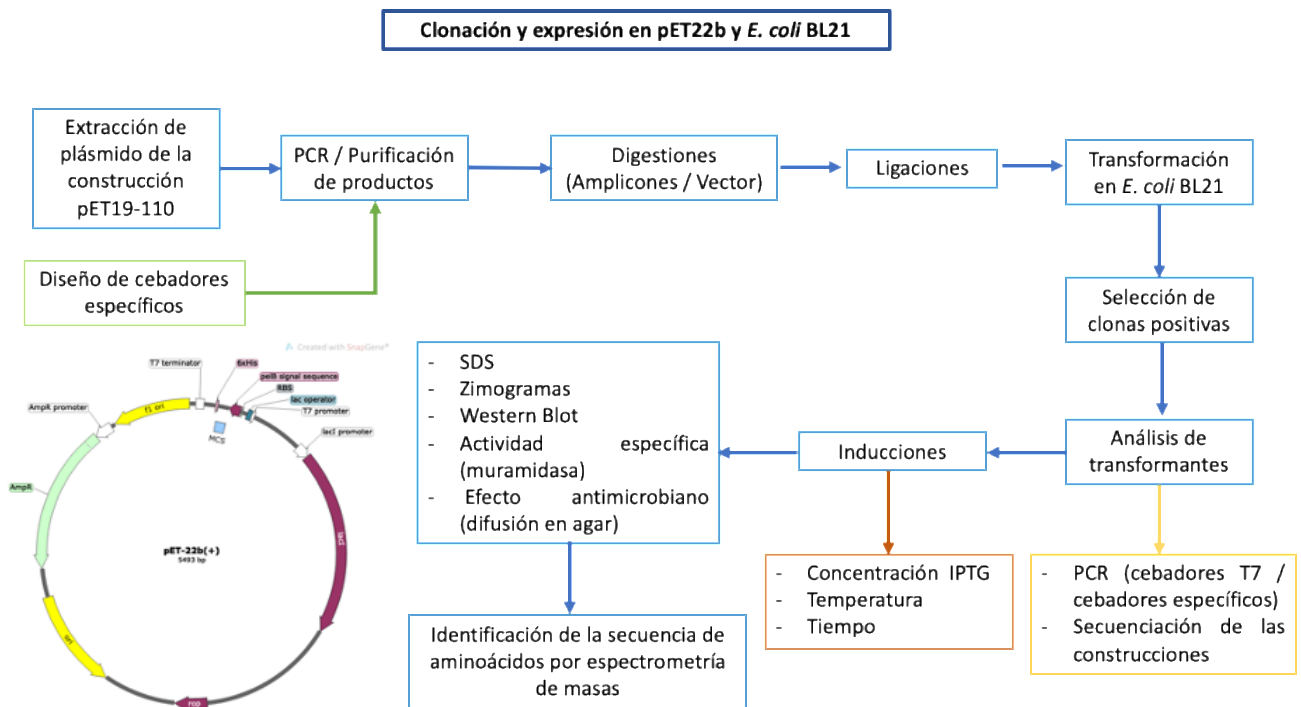


Figura 9. Esquema general de trabajo.

7.1. Clonación de las tres regiones de manera independiente.

7.1.1. Diseño de cebadores específicos.

En trabajos anteriores se han utilizado diferentes vectores de expresión para la clonación de esta proteína como son el pET-19b y el pET-20b. Por lo tanto, en este trabajo se propone el uso del vector de expresión pET-22b y en la Tabla 4 se muestran las diferencias entre este y los vectores usados previamente en el grupo de trabajo.

Tabla 4. Diferencias entre los vectores de clonación y expresión utilizados en trabajos anteriores y en esta propuesta.

Característica	pET-19b	pET-20b	pET-22b
Péptido señal	No	Si	Si
Promotor	T7 lac	T7	T7 lac
Tallo de histidinas	N-Ter	C-Ter	C-Ter
Antibiótico	Ampicilina	Ampicilina	Ampicilina
Tamaño	5.717 kb	3.716 kb	5.493 kb

Se utilizó la propuesta estructural de la proteína de 110 kDa de Barbosa (2018), la cual se dividió en tres dominios: dos que interactúan con la pared celular, uno de ellos con similitud a colicinas, y un dominio transmembranal, como se muestra en la Figura 10. Se diseñaron cebadores específicos con ayuda de los softwares como Clone Manager, SnapGene, SerialCloner y OligoCalc (Tabla 5), tomando en cuenta las enzimas de restricción presentes en el vector de expresión pET-22b para amplificar cada uno de los dominios previamente mencionados del gen de interés de *P. acidilactici* ATCC 8042 de manera independiente y de esta manera obtener distintas subclonas.

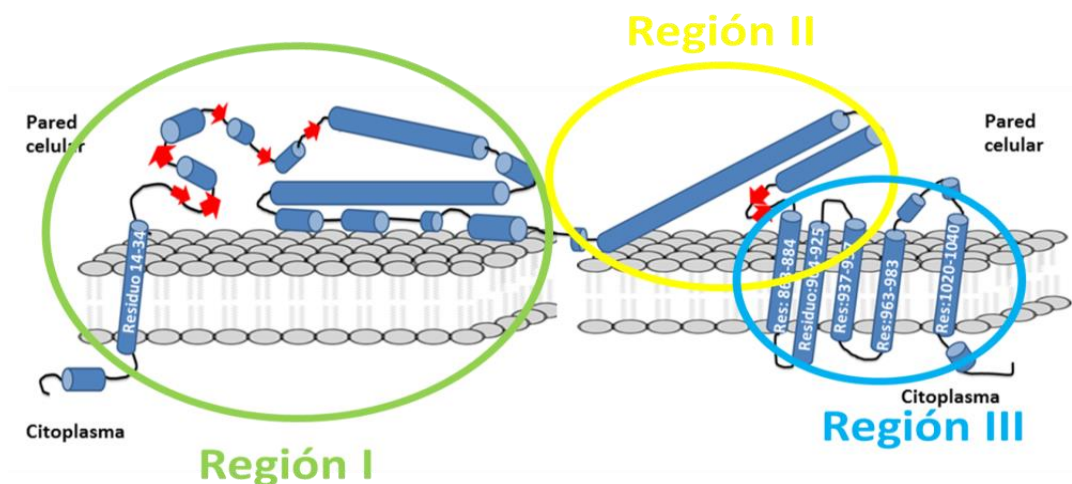


Figura 10. Predicción estructural de la proteína de 110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 dividida en las tres regiones para el diseño de cebadores.

Tabla 5. Cebadores diseñados para la amplificación de los tres dominios.

Región	Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tam. amplicón	Tm (°C)	PM (kDa)
Región I	RI-NcoI110f	GCG CCA TGG GAG TTC GCA AAG AGT GGA AAT T	~1502 pb	64.4	51.6
	RI-XhoI110r	CGC TCG AGG AAA TTA ATG GTT GCT TG		58.0	
Región II	RII-NcoI110f	ATT CCA TGG AGC AGG ATT AAG TGC AGA AGA	~1076 pb	60.3	34.9
	RII-XhoI110r	ATA CTC GAG TGC GGC AAA CAT GTT		55.7	
Región III	RIII-BamHI110f	CGG GAT CCG ACT AAA TTG AAA CAC AC	~683 pb	58.0	24.4
	RIII-XhoI110r	CGC CTC GAG TCT TTC AAC TTC TTG		57.4	

7.1.2. Extracción de plásmido.

Se realizó la extracción de plásmido pET19-110 que contiene al gen que codifica para la proteína de 110 kDa identificada previamente como un transportador ABC, para lo que se ocupó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo-Scientific), siguiendo las especificaciones señaladas por el proveedor.

7.1.3. Amplificación del gen completo que codifica a la proteína de 110 kDa.

Para la amplificación del gen completo de la proteína de 110 kDa se utilizaron los cebadores que se muestran en la Tabla 6 (Barbosa, 2018), utilizando como DNA templado el plásmido de la construcción pET19-110 (100 ng). Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0.3 μ M, los dNTP's (Thermo-Scientific) a 0.2 mM, la enzima se ocupó 1 U y el amortiguador de la enzima (10X PCR buffer, Thermo-Scientific, USA) se diluyó hasta llegar a una concentración final de 1X, se adicionó agua hasta llegar a un volumen final de 25 μ L por cada reacción. Las condiciones a las que se llevó a cabo la reacción de la PCR se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Cebadores para la amplificación del gen completo de la proteína de 110 kDa.

Cebadores	Tm (°C)	Secuencia (5'-3')
ExNco-110 (Fw)	64.4	GCG CCA TGG GAG TTC GCA AAG AGT GGA AAT T
E110RXho (Rv)	58.9	TGA CTC GAG TCT TTC AAC TTC TTG AAG CTT

Tabla 7. Condiciones de la PCR.

Etapa	Tiempo	T (°C)	Ciclo
Desnaturalización inicial	2 min	94	1x
Desnaturalización	1 min	94	
Alineamiento	1 min	55	25x
Extensión	1 min	72	
Extensión final	7 min	72	1x

7.1.4. Amplificación de las regiones de interés del gen que codifica para la proteína de 110 kDa.

Para la amplificación de las diferentes secuencias se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (Thermo Fisher Scientific) y se siguieron las recomendaciones del proveedor. Se utilizó la misma construcción que contiene el gen completo de la proteína de 110 kDa (pET19-110) como DNA templado (100 ng). Los reactivos se utilizaron a las concentraciones finales mencionadas previamente en la sección 7.1.3, siguiendo las condiciones de amplificación que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones utilizadas para la amplificación de las regiones de interés.

Etapa	Tiempo	T (°C)	Ciclo
Desnaturalización inicial	2 min	94	1X
Desnaturalización	30 s	94	
Alineamiento	30 s	55	35X
Extensión	1:30 min	72	
Extensión final	5 min	72	1X

7.1.5. Visualización de los productos de PCR en gel.

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) utilizando el amortiguador TAE 1X (Bio-Rad). La electroforesis se corrió a 90 V durante 1 h, el producto de PCR se purificó a partir de banda utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las especificaciones recomendadas por el proveedor.

7.1.6. Elaboración de las construcciones con el plásmido TOPO 2.1.

A partir de las regiones de interés amplificadas por PCR y utilizando las condiciones indicadas en el protocolo del kit de clonación del vector pCRTM2.1-TOPO[®] se generaron las construcciones para cada uno de los genes de interés. Esta técnica sigue la estrategia de clonación TA en un solo paso, con una inserción directa de los productos de PCR amplificados previamente con una taq polimerasa en el vector linearizado sin utilizar una ligasa. La enzima Taq polimerasa posee una actividad de transferasa terminal no dependiente del templado, lo cual le permite añadir una única desoxiadenosina (A) en los extremos 3' terminales de los productos de PCR. El vector linearizado posee una desoxitimidina (T) en el residuo terminal 3' y con ayuda de la topoisomerasa I, permiten las inserciones de PCR ligándolas de manera eficiente con el vector. La topoisomerasa I se une a la doble cadena de DNA en sitios específicos y divide el enlace fosfodiéster después de la secuencia 5' -CCCTT en una hebra (Shuman, 1992). La energía proveniente de esta ruptura es conservada por la formación de un enlace covalente entre el fosfato 3' de la hebra dividida y un residuo de tirosina (Tyr-274) de la topoisomerasa I, el enlace fosfotirosil entre el DNA y la enzima puede ser atacado por el hidroxil 5' de la hebra original, revirtiendo la reacción y de esta manera se libera la topoisomerasa I (Shuman, 1994).

7.1.7. Obtención de células competentes de *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21.

Se tomaron 100 μ L de células de *E. coli* que se adicionaron a un tubo con 3 mL de medio LB, incubándolo de 16-20 h a 37°C, 200 rpm, se tomó 1 mL y se sembró en 3 mL del mismo medio siguiendo las mismas condiciones de incubación por 1 h, alcanzando una DO_{600nm}= 0.4- 0.7, se alicuotó 1 mL de cultivo en un micro tubo de

1.5 mL, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se disolvió el pellet obtenido en 600 μ L de CaCl₂ 100 mM, se dejó reposar en hielo por 30 min. Posteriormente se centrifugó con las condiciones mencionadas previamente y se resuspendió nuevamente el pellet en 200 μ L de CaCl₂ 100 mM frío.

7.1.8. Transformación de células *E. coli* BL21.

La transformación consistió en mezclar 50 μ L de células competentes con 5 μ L de construcción que se dejó reposar en hielo 10 min, el tubo fue sometido a un choque térmico colocándolo en un baño de agua a 42°C por 2 min y pasado el tiempo se colocó inmediatamente en hielo por 5 min, posteriormente se agregó 1 mL de medio LB y se dejó incubar 1 h a 37°C y 200 rpm, se sembraron tres cajas de cada construcción de las células transformadas a una caja petri con medio LB y el antibiótico de selección, esparciéndolo con perlas de vidrio.

7.1.9. Elaboración de las construcciones con el plásmido pET-22b.

El vector pET-22b y las regiones de interés insertadas en el vector de clonación pCRTM2.1-TOPO®, fueron sometidos a dobles digestiones con las enzimas de restricción correspondientes, las cuales fueron tomadas en cuenta durante el diseño de todos los cebadores. El volumen de cada reacción fue de 20 μ L. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 1 h y posteriormente se inactivaron las enzimas a 80°C durante 20 min. El producto de ambas digestiones se sometió a electroforesis y posteriormente a su purificación a partir de gel en las condiciones mostradas previamente con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). El vector pET-22b, doblemente digerido y purificado fue sometido a una desfosforilación utilizando fosfatasa alcalina termosensible (Fast AP, Thermo Fisher) para evitar una posible recircularización.

Para generar cada construcción se utilizó la relación molar 3:1 (inserto:vector), para cada reacción se utilizaron aproximadamente 50 ng de vector, 1 U de T4 DNA Ligasa (Thermo-Scientific, USA) y el amortiguador de la enzima a una concentración final de 1X, cada reacción tuvo un volumen final de 20 μ L. La reacción de ligación

se llevó a cabo a temperatura ambiente por 12 h. El producto de la ligación se transformó en células de *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes. Las cepas de *E. coli* BL21 y sus derivados son por mucho las cepas más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes ya que presentan muchas ventajas comparadas con otras cepas, principalmente su rápido crecimiento, alto rendimiento de biomasa, y la baja expresión de proteasas (Wurm et al., 2016), carece de las proteasas Lon (citoplasma) y OmpT (membrana extracelular), posee baja producción de acetato a altos niveles de glucosa, contiene el lisogeno λ DE3 el cual contiene el gen para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5* el cual direcciona altos niveles de expresión de los genes clonados bajo el control del promotor T7 (Ahmad et al., 2018), promotor bajo el cual trabaja el sistema de expresión pET.

7.1.10. Análisis de las transformantes.

Las clonas positivas se sembraron en medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C por 12 h a 250 rpm, para cada una de ellas se realizó PCR de colonia, extracción de plásmido y utilizando como DNA templado los plásmidos extraídos de las colonias seleccionadas para cada construcción, se realizó la PCR con los cebadores universales T7, T7 promotor (5´- TAATACGACTCACTATAGGG -3´) y T7 terminador (5´- GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3´) los cuales están presentes en la secuencia del vector y tienen una Tm de 55 °C, utilizando la enzima Platinum Taq Polimerasa. Paralelamente se realizaron las reacciones de PCR con los cebadores específicos, es decir, los diseñados para cada uno de los fragmentos. Para este caso se utilizó la misma enzima, con las condiciones descritas previamente en la Tabla 7.

7.1.11. Secuenciación de las construcciones.

Los plásmidos puros de las construcciones obtenidas fueron enviados para su secuenciación a los laboratorios de MacroGen Inc (Seúl, Corea del Sur). Posteriormente cada una de las secuencias fue sometida a un alineamiento múltiple utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para nucleótidos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

7.2. Expresión de las proteínas recombinantes.

7.2.1. Condiciones óptimas de producción de la proteína recombinante.

Se preparó un preinóculo de la cepa con las construcciones el cual se incubó a 37°C, 250 rpm durante 12 h, el preinóculo se resembró tomando una alícuota del 2% en matraces de Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL), siguiendo las mismas condiciones de incubación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0.6-0.8, se adicionó IPTG como inductor en las concentraciones (0.4 y 1mM). Una vez adicionado el inductor la fermentación se siguió 18 h a 22°C y 250 rpm. Concluido el tiempo, se separaron las células del sobrenadante centrifugando los cultivos a 4000 rpm, 30 min a 4°C, obteniendo dos fracciones: sobrenadante y células enteras, las cuales fueron resuspendidas en Tris-HCl pH 8.0 50 mM y se sonicaron a una amplitud de 30 Hz con 20 ciclos de 20 segundos cada uno e intervalos de descanso de 20 segundos a 4°C.

El sonicado se centrifugó a 15000 rpm por 30 min a 4°C, obteniendo dos fracciones: citosol, y restos celulares, los cuales se resuspendieron en el mismo amortiguador.

Cada una de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE y zimogramas de actividad líticas contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus*.

7.2.2. Ultrafiltración de la fracción citosólica.

La fracciones de citosol obtenidas se sometieron a ultrafiltración con membranas de tamaño de corte de 10 y 50 kDa (Amicon® Millipore). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.2.3. Cuantificación de proteína.

La concentración de proteína se determinó en cada una de las fracciones utilizando el método de Bradford con un kit comercial (Bradford Protein Assay, Bio-Rad).

7.2.4. Perfil proteico SDS-PAGE y zimograma.

La determinación del perfil proteico de las proteínas de interés se llevó a cabo por electroforesis en geles de poliacrilamida co-polimerizada en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se prepararon SDS-PAGE Tris-glicina al 12.5% con los reactivos necesarios (Bis-acrilamida 30 %, Tris-HCl 2 M, pH 8.8, SDS 10 %,

H₂O, TEMED y APS 10 %). Se tomaron 30 µL de la muestra a evaluar y se les adicionaron 10 µL de amortiguador de carga (50 mM de Tris-HCl, pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol, 0.5 % β-mercaptoetanol y 0.5 % de azul de bromofenol). Los geles se colocaron en un cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad). El gel se corrió a 80 V durante 30 min y 120 V durante 1.5 h. Después de la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada y se tiñó con azul de Coomassie (0.1 % azul de Coomassie G-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glacial, 80 % agua desionizada (v/v) y se destiñó con 10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80 % agua (v/v). El peso molecular de las bandas de proteína se determinó por la comparación con un marcador preteñido de proteínas que varían de 10- a 180-kDa (Thermoscientific).

Para la elaboración del zimograma se prepararon geles SDS al 12.5 % de poliacrilamida co-polimerizada con 0.2 % de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich) como sustrato. Posteriormente, las células se resuspendieron con los reactivos necesarios para la elaboración de los geles. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada y se incubó a 37°C con amortiguador de renaturalización (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 con Tritón X-100 1 %) durante 12 h. Finalmente el gel se tiñó con azul de metileno (0.01 % de KOH y 0.1 % de azul de metileno) durante 20 min y se destiñó con agua destilada.

7.2.5. Western-blot.

Se realizó un ensayo de Western-blot utilizando el anticuerpo específico para el tallo de histidinas del vector de expresión utilizado (pET-22), anti-his acoplado a fosfatasa alcalina (Anti-His(C-term)-AP (Invitrogen). Se corrió un SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida y posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno en un equipo Trans Blot Turbo, Transfer System (Bio-Rad). La membrana se bloqueó con Skim milk (Difco) al 3% en buffer TBS-T (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5, Tween-20 0.05 %) y en agitación suave a temperatura ambiente durante 4 h. La membrana se lavó con buffer TBS-T tres veces durante 15 min y se le adicionó el anticuerpo en una dilución 1:5000 en el mismo buffer incubándolo durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Se

repiteieron los lavados de la membrana, para finalmente adicionar 15 mL de la solución reveladora de NBT/BCIP:agua (50:50), que se dejó actuar hasta la aparición de bandas moradas, indicando la presencia de la proteína recombinante.

7.2.6. Determinación de la actividad de *N*-acetilmuramidasa.

Para la determinación de la actividad de *N*-acetilmuramidasa se utilizaron 75 μ L de peptidoglucano (sección 7.2.7) tratado enzimáticamente y diluido en agua a una concentración de 4 mg/mL, 25 μ L de la muestra y 400 μ L de agua. La reacción se dejó a 37°C por 24 h a 300 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó 1 min a 14,000 rpm para eliminar el peptidoglucano insoluble. De cada tubo se tomaron 400 μ L que se aforaron hasta tener un volumen de 500 μ L con 100 μ L de agua. Cada muestra se colocó en un tubo de vidrio de un volumen de 15 mL, a cada tubo se le adicionaron 3 mL de H₂SO₄ concentrado y se calentó a ebullición por 10 min. Una vez transcurrido el tiempo, se agregó a cada tubo 50 μ L de CuSO₄ (4 %) y 100 μ L de pPp (p-fenilfenol, Sigma-Aldrich) (1.5 % en etanol al 96 %). La reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente y la actividad se cuantificó a 570nm. Este método mide el ácido láctico y otros compuestos como el ácido murámico y el gliceraldehído que liberan acetaldehído en la incubación en ácido sulfúrico caliente. (Taylor, 1996).

7.2.7. Extracción de peptidoglucano de *M. lysodeikticus*.

Se obtuvo un cultivo bacteriano de *M. lysodeikticus* en medio BHI incubado 12 h a 37°C y 250 rpm y se centrifugó a 8500 rpm por 15 min a 4°C para cosechar las células. Las células se lavaron con agua estéril (1/10, p/v) hasta la obtención de un precipitado blanco, el cual se disolvió en ácido tricloroacético (TCA) al 10% y se colocó en ebullición por 60 min, tras lo cual la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C.

El pellet se resuspendió e incubó con un amortiguador de acetatos (ácido acético 0.5 M y acetato de sodio 0.2 M pH 4.5), cloroformo y metanol en una relación 4:5:10, pH 4.6 toda la noche y después se centrifugó a 8,500 rpm por 10 min a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 con 4000 U de tripsina (Sigma-Adrich) y se incubó en baño de agua a 37°C y 140 rpm por 12 h.

Una vez transcurrido el tiempo la solución se centrifugó a 8,500 rpm por 20 min a 4°C. El sedimento se lavó 4 veces con agua estéril, se liofilizó y se almacenó a 20°C (Tian et al., 2015).

7.2.8. Identificación de proteína por espectrometría de masas LC-MS/MS.

La banda correspondiente a la actividad observada en el zimograma se cortó manualmente del gel preparado para la secuenciación y se almacenó a -20 °C hasta su envío a la Unidad de Proteómica de la universidad estatal del Ohio, Estados Unidos, donde se llevó a cabo un análisis de masas en tándem (LC-MS/MS) para la identificación de la proteína. El análisis de identificación de las proteínas se realizó a través de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), además de realizar un análisis *in silico* para predecir el comportamiento de la enzima así como buscar un homólogo de esta proteína cristalizado.

7.3. Predicción de la estructura 3D de la proteína así como su análisis con programas bioinformáticos.

7.3.1. Modelado y validación de la estructura tridimensional de la proteína.

Se determinó la estructura *in silico* de las regiones de la proteína y de la proteína de membrana completa de 110 kDa de *Pediococcus acidilactici* utilizando los programas Modeller, Robetta (*ab initio*), I-TASSER y Phyre2. Los modelos generados fueron validados con ayuda de diferentes softwares computacionales y la minimización de energía de los modelos se llevó a cabo con el programa Chimera.

7.3.2. Predicción del sitio de unión a ligando, utilizando la herramienta de acoplamiento molecular.

Se prepararon los archivos de los modelos generados y validados de cada uno de los dominios y de la proteína de membrana completa así como el ligando, el cual es una cadena homóloga de peptidoglucano (NAM-NA-NAM), el cual fue tomado de una lisozima co-cristalizada con este ligando depositado en la base de datos de proteínas (PDB) con el código de acceso 9LYZ. Una vez que se tuvieron los archivos se llevó a cabo la predicción del sitio de unión por medio de la herramienta de acoplamiento molecular utilizando el programa AutoDock Vina.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Clonación de las tres regiones de manera independiente.

8.1.1. Extracción de plásmido.

Se realizó la extracción de plásmido 110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 generada por Barbosa (2018) para verificar que todavía se tuviera el inserto. Se realizó la amplificación del gen por medio de una PCR utilizando los cebadores específicos sintetizados por Barbosa (2018). Estos cebadores deben amplificar un producto del tamaño de 3198 pb que corresponde al gen de la proteína de interés y que servirá como templado para la subclonación de las tres regiones previamente mencionadas. Como se observa en la Figura 11, se obtuvo una banda en el tamaño esperado lo que nos indica que sí se tiene el gen en la construcción.

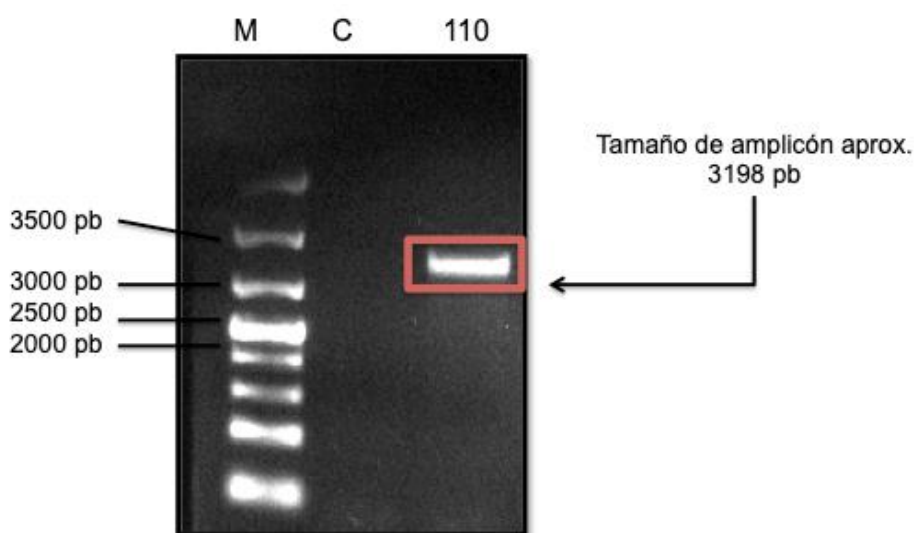


Figura 11. Amplificación de la construcción pET19-110 de *P. acidilactici* ATCC 8042. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo-Scientific), **C:** Control negativo (pET-19 s/inserto), **110:** Construcción pET19-110. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

8.1.2. Subclonación de los fragmentos del gen de la proteína de 110 kDa.

A partir del gen recombinante de la proteína de 110 kDa utilizando los cebadores específicos diseñados para este trabajo, se amplificaron las tres regiones en las que se subdividió la proteína, de acuerdo con el modelo estructural previamente

propuesto (RI, RII, RIII) (Tabla 5). Se obtuvieron los tres amplicones esperados los cuales correspondían con el tamaño de las regiones previamente mencionadas (una región transmembranal y dos con interacción a pared celular) (Figura 12).

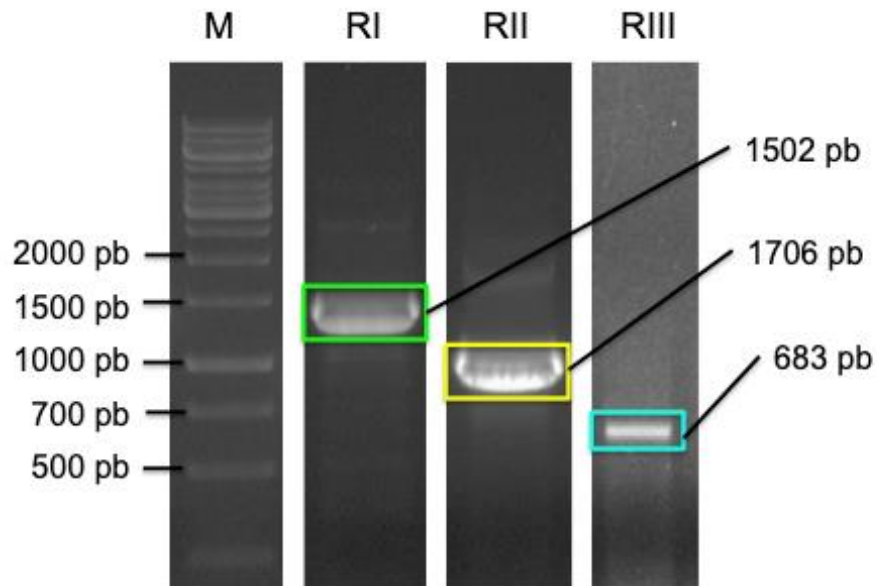


Figura 12. Amplificación de los fragmentos de interés de la construcción pET19-110 de *P. acidilactici* ATCC 8042. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo-Scientific), **RI:** Región I tamaño esperado 1502 pb, **RII:** Región II tamaño esperado 1076 pb, **RIII:** Región III tamaño esperado 683 pb. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

8.1.3. Elaboración de las construcciones en el vector TOPO 2.1

Los amplicones obtenidos se purificaron y posteriormente se clonaron en el vector TOPO 2.1, siguiendo la metodología descrita por el proveedor. De esta manera se obtuvieron las construcciones mostradas en la Tabla 9 las cuales se transformaron en la cepa de mantenimiento *E. coli* DH5 α . Para confirmar que se tenían las construcciones en las colonias positivas se realizó una PCR de colonia con los cebadores específicos de cada región.

Tabla 9. Construcciones generadas en TOPO 2.1.

Región I	TOPO 2.1-110RI
Región II	TOPO 2.1-110RII
Región III	TOPO 2.1-110RIII

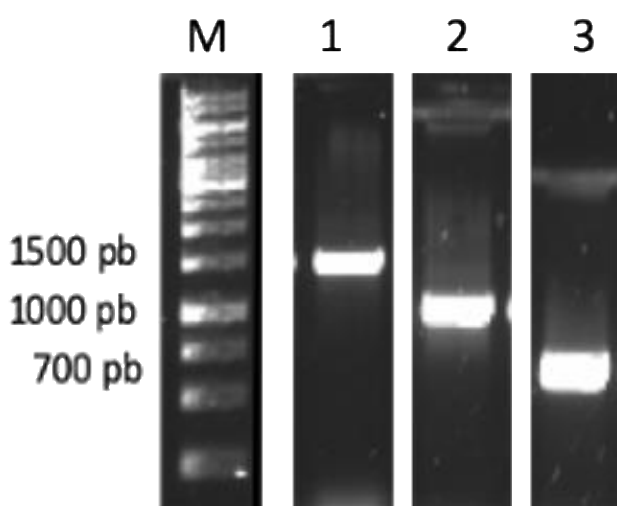


Figura 13. PCR de colonia. Amplificación de las construcciones. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb (Thermo-Scientific), **carril 1:** TOPO 2.1-110RI, **carril 2:** TOPO 2.1-110RII, **carril 3:** TOPO 2.1-110RIII. Gel de agarosa 1% teñido con SYBR Safe (Thermo Scientific).

Como se observa en la Figura 13, la mayoría de las colonias evaluadas presentaron amplicones con el tamaño esperado para cada una de las regiones de interés, excepto dos colonias correspondientes a la construcción TOPO 2.1-RI.

Las colonias obtenidas positivas se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio LB con ampicilina ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) y glicerol (20%) el cual es un agente crioprotector que tiene como objetivo el mantenimiento, la viabilidad y la funcionalidad de las células a bajas temperaturas (Ávila-Portillo et al., 2006).

8.1.4. Elaboración de las construcciones en pET-22b en *E. coli* BL21 (D3).

Se realizó la extracción de plásmido de cada una de las construcciones en TOPO 2.1 y junto con el vector de expresión pET-22, se sometieron a una doble digestión. Los productos digeridos se visualizaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con SYBR, las bandas fueron purificadas y el vector (pET-22) fue desfosforilado, para posteriormente utilizarlos en la mezcla de la reacción de ligación.

Para corroborar que el gen se clonó de manera exitosa, se seleccionaron colonias positivas al azar y se sembraron en 5 mL de medio LB adicionado con ampicilina (100 µg/mL), se realizó la extracción de plásmido de cada una de ellas y se llevó a cabo el análisis de transformantes para verificar que la colonia seleccionada presentara el gen de interés en el vector de expresión pET-22.

8.1.5. Análisis de transformantes.

Se realizó la extracción de plásmido de todas las colonias correspondientes a cada construcción (pET22-110RI, pET22-110RII, pET22-RIII). En la Figura 14 se observan los amplicones obtenidos utilizando los cebadores específicos.

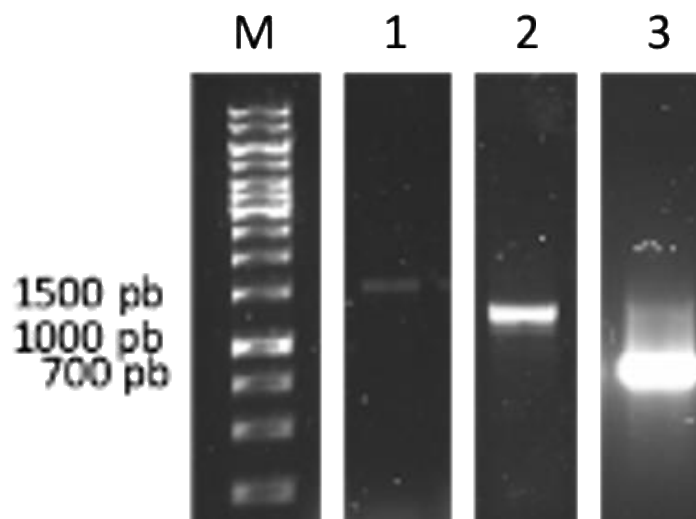


Figura 14. Amplificación de plásmido de las colonias seleccionadas como positivas para las construcciones generadas en pET-22. **M:** Marcador de peso molecular 1kb (Thermo-Scientific), **carril 1:** pET22-110RI, **carril 2:** pET22-110RII y **carril 3:** pET22-110RIII. Gel de agarosa 1% teñido con SYBR safe (Thermo Scientific).

Como se observa en la imagen, cada una de las construcciones evaluadas presenta amplicones con el tamaño esperado. Sin embargo, en el caso de la construcción pET22-110RI el amplicón se observa con una menor intensidad comparándolo con las demás regiones, lo cual indicaría que posiblemente se tiene una concentración de plásmido muy baja, o que las condiciones de amplificación deben ser modificadas. Para evaluar esta región se usaron también los cebadores universales T7; T7 promotor (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') y T7 terminador (5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG -3') los cuales están presentes en la secuencia del vector sin embargo en este último solamente fue posible observar una banda en un tamaño de aproximadamente 250 pb, lo que correspondería a que el vector se encuentra vacío.

Se intentaron más transformaciones en este vector disminuyendo la temperatura de incubación y probando diferentes relaciones inserto:vector, sin embargo no fue posible obtener una clona positiva en el vector de expresión pET-22b. Para futuros trabajos se propone dividir esta región en dos para disminuir el tamaño del fragmento ya que, en principio, esto estabilizaría la construcción.

Para corroborar que los genes de las proteínas recombinantes se encuentren en marco de lectura y no se haya dado ninguna mutación, se mandaron a secuenciar a MacroGen (Seúl, Corea del Sur). La secuencia obtenida en pares de bases se tradujo en secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta BLAST (blastx) y se realizó un alineamiento entre la secuencia de aminoácidos original y la obtenida en este trabajo. En las Figuras 15 y 16 se pueden observar las comparaciones correspondientes a las construcciones pET22-110RII y pET22-110RIII (región transmembranal) que no presentan ningún cambio en aminoácidos ni en el marco de lectura. Para la región transmembranal la construcción solamente carece de los primeros 14 aminoácidos de la secuencia, los cuales no podemos saber si son aminoácidos esenciales para la actividad catalítica de esta proteína.

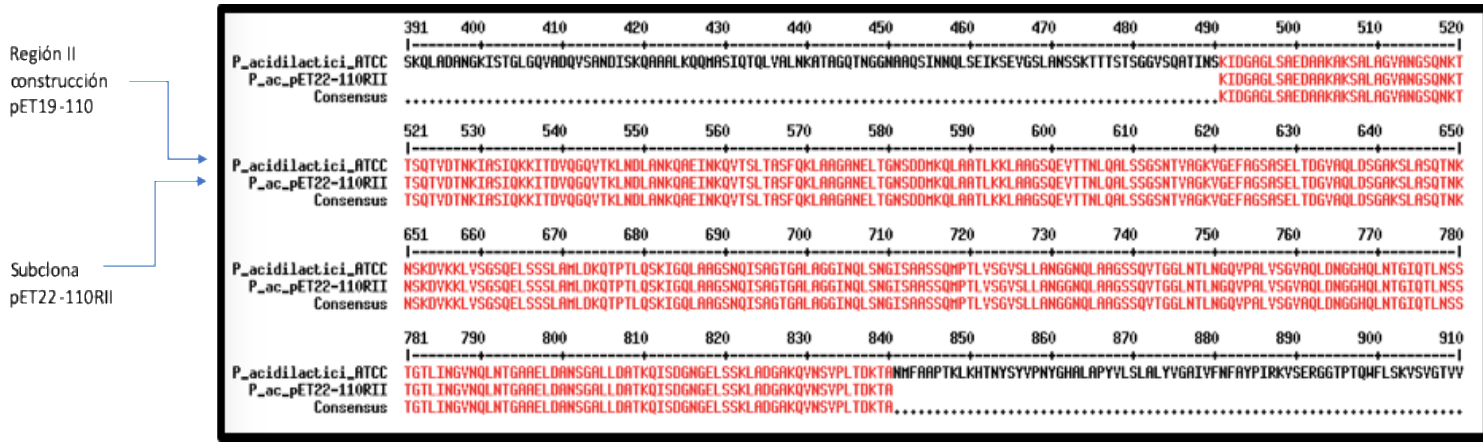


Figura 15. Alineamiento de la secuencia en aminoácidos de la región II correspondiente a la construcción pET19-110 (arriba) y la subclona correspondiente a la misma región (abajo).

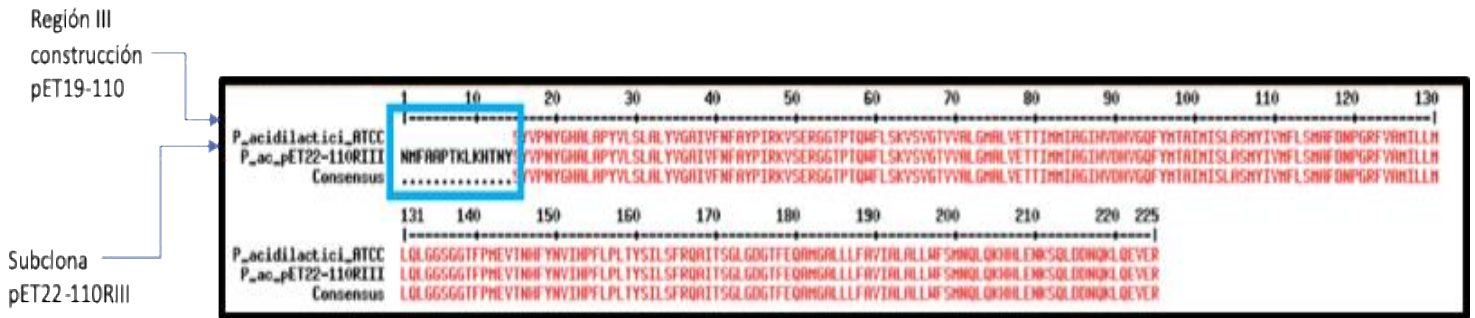


Figura 16. Alineamiento de la secuencia en aminoácidos de la región III correspondiente a la construcción pET19-110 (arriba) y la subclona correspondiente a la misma región (abajo). (En el recuadro se marcan los aminoácidos ausentes en la clona obtenida).

8.2. Expresión de las proteínas recombinantes.

8.2.1. Inducción de la expresión de la proteína de interés.

En el vector utilizado pET, el gen de interés es clonado en el vector después de un promotor reconocido por el fago T7 RNA polimerasa y se coloca a menudo en el genoma bacteriano bajo el control transcripcional de un promotor *lacUV5*, como es la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Studier y Moffatt, 1986), lo que permite la inducción en ambas cepas por lactosa o por su análogo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las subclonas obtenidas, pET22-110RII y pET22-110RIII, son proteínas

recombinantes que pueden ser tóxicas para *E. coli* antes o después de la inducción. Esta toxicidad puede ser minimizada cambiando diferentes parámetros durante la inducción de las proteínas como son la concentración de inductor (IPTG), pues dependiendo de la dosis es posible el control del nivel de expresión de la proteína recombinante, por lo que se usaron distintas concentraciones de IPTG (0.1, 0.4 y 1 mM). Estas condiciones se probaron a tres temperaturas diferentes (4, 22 y 37 °C), variando los tiempos de inducción (4, 8, 18 y 24 h), se probaron las mismas condiciones para el control negativo que es la cepa utilizada (*E. coli* BL21) transformada con el vector pET-22b sin inserto.

Para el caso de la subclona pET22-110RI, la cual no fue posible expresar, por métodos bioinformáticos se realizó un análisis de su secuencia de aminoácidos, ya que al tratarse del fragmento más grande de las tres regiones seleccionadas también es la más inestable. Para realizar este análisis se utilizó el servidor XtalPred-RF el cual se basa en estadísticas sobre proteínas de origen microbiano y es útil en el diseño de construcciones (Figura 17).

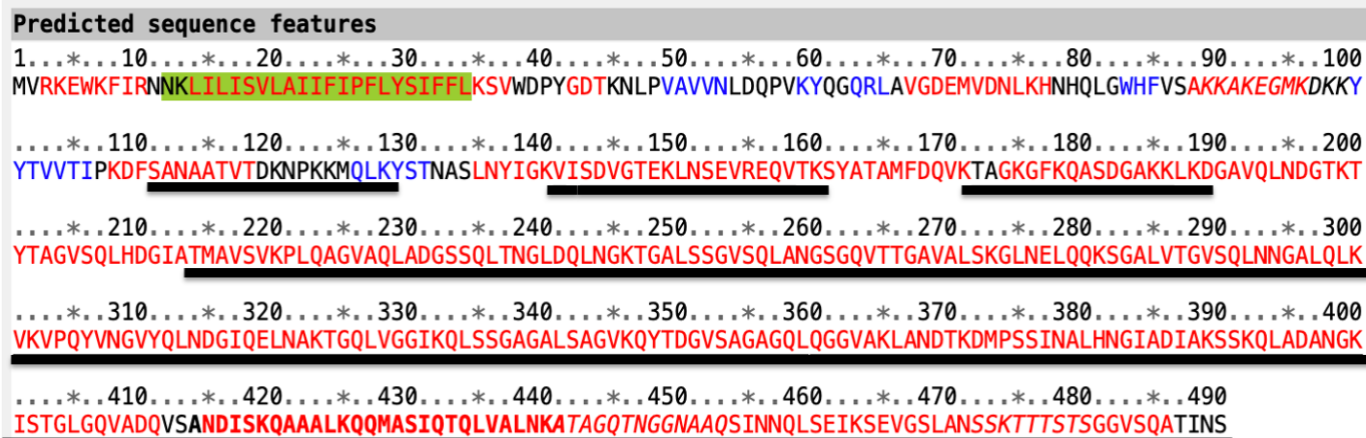


Figura 17. Análisis de las características presentes en la secuencia de aminoácidos de la región I de la proteína transmembranal de *P. acidilactici* ATCC 8042.

En la Figura 17 se observa la imagen obtenida en el servidor XtalPred-RF, correspondiente a la región I de la proteína de 110 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042, los aminoácidos subrayados corresponden a la región intrínsecamente desordenada predicha de aproximadamente 277 aminoácidos. También se realizó un análisis utilizando la secuencia de aminoácidos de la proteína completa (datos no mostrados) y se observó el mismo patrón, en el cual el desorden predominaba en la región correspondiente a la región I. Esto explicaría por qué la construcción es muy inestable, además de ser demasiado tóxica para el hospedero.

8.2.2. Perfil proteico SDS-PAGE y Zimogramas

Se analizaron tres fracciones: citosol ultrafiltrado, sobrenadante y restos celulares, obtenidas en cada inducción para cada proteína recombinante, así como del control, mediante SDS-PAGE al 10% de acrilamida (Figura 18). Se observó que la mayor expresión de ambas proteínas recombinantes (pET22-110RII y pET22-110RIII) se obtenía en la fracción de citosol y de restos celulares (Figura 17) en las siguientes condiciones: 18 h, concentración de IPTG 0.4 mM, temperatura de 22 °C. El vector utilizado posee un péptido señal que exporta la proteína a periplasma (*peIB*) por lo que aumentar la duración del tiempo de inducción influye en favorecer la expresión de proteína en medio soluble, controlando los niveles de expresión, toxicidad, estabilidad, evitando la agregación de la proteína recombinante y la formación de cuerpos de inclusión, que es lo que frecuentemente sucede al tratar de expresar proteínas de membrana (Ahmad et al., 2018).

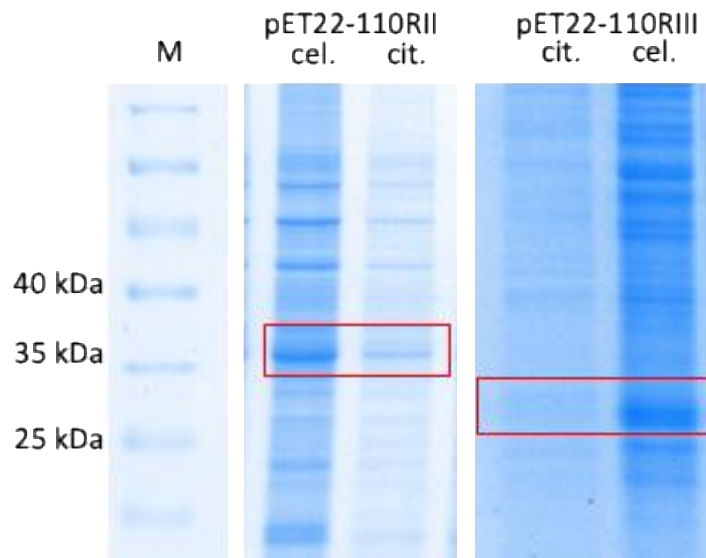


Figura 18. SDS-PAGE 10% de poliacrilamida de fracciones citosólicas y restos celulares. **M**; marcador de alto peso molecular, **pET22-110RII**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares) y **pET22-110RIII**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares).

Se intentó detectar actividad lítica por medio de zimogramas contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus* de las fracciones correspondientes a citosol y restos celulares obtenidas en cada inducción. Para el caso de la proteína recombinante pET22-110RII, la cual corresponde a uno de los fragmentos que tienen interacción con pared celular, se observó una banda de actividad lítica aproximadamente a los 30 kDa, como se observa en la Figura 19. Las peptidoglucano hidrolasas tienen como blanco bacterias Gram positivas como lo es *M. lysodeikticus*; el tamaño aproximado de estas enzimas típicamente se encuentra entre los 25 – 40 kDa y emplean una estructura modular, en donde el dominio activo enzimáticamente se encuentra en el extremo *N*-terminal unido a un dominio con unión a pared celular en el *C*-terminal (Heselpoth et al., 2018). Comparando la estructura de Barbosa (2018) con la estructura general de las peptidoglucano hidrolasas y la actividad lítica observada, podría sugerirse que este es el dominio activo de la proteína. Para el caso de la proteína recombinante pET22-110RIII no se observó actividad lítica en zimograma y cabe mencionar que esta región corresponde al dominio transmembranal de la proteína. Las proteínas de membrana desempeñan un papel

muy importante en la fisiología celular y aproximadamente el 25% de los genes identificados en genomas secuenciados son conocidos por codificar para este tipo de proteínas, pero la mayoría no tienen una función conocida (Frelet-Barrand et al., 2010). La expresión de estas proteínas en sistemas heterólogos representa un reto ya que frecuentemente son proteínas tóxicas para su hospedero, sus niveles de expresión son muy bajos y tienden a presentar un mal plegamiento o a que la proteína se encuentre totalmente desplegada, ocasionando su inactivación (Bernaudat et al., 2011). Un transportador ABC típico está organizado en cuatro unidades funcionales, dos dominios de unión a nucleótidos (NBDs) y dos dominios transmembranales (TMDs). Estos dominios pueden encontrarse de manera individual o en combinación, como es el caso de la proteína de 110 kDa, en la cual la región III corresponde al dominio transmembranal de esta proteína con 6 α -hélices. Usualmente este tipo de dominios se empaquetan de manera que forman un poro que es accesible desde el citoplasma. A pesar de que este dominio corresponde a la secuencia conservada de la proteína de 110 kDa, generalmente en los transportadores ABC esta secuencia no muestra ser conservada significativamente, pero comparte una topología similar con otros transportadores; la falta de conservación de la estructura primaria probablemente se deba a la naturaleza diversa de los sustratos de transporte (Wilkins, 2015). Algunas peptidoglucano hidrolasas poseen un dominio de anclaje en la membrana en el extremo C-terminal, como ya se mencionó previamente, y se han descrito algunos provenientes de diferentes bacterias ácido lácticas, las cuales incluyen los dominios tipo LPXTG (Dieye et al., 2001), lipoproteínas (Zadravec et al., 2014) y los dominios LysM (Visweswaran et al., 2014), los cuales son los más frecuentes en este tipo de enzimas. A pesar de todas estas opciones disponibles, hasta la fecha ninguno de estos dominios ha demostrado poseer una actividad lítica, por lo que posiblemente el anclaje sea la función de la región III y por esta razón no se observó una actividad antagónica contra las células de *M. lysodeikticus*.

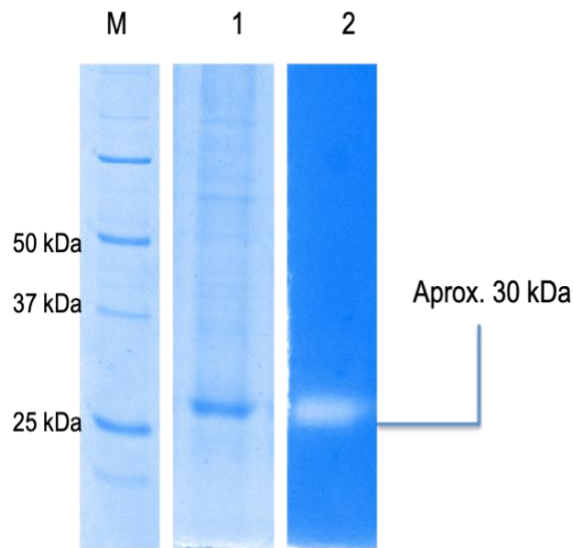


Figura 19. Construcción RII. **M:** marcador de alto peso molecular, **carril 1:** SDS-PAGE 10%, **carril 2:** zimograma contra células de *M. lysodeikticus*.

8.2.3. Western-blot.

Las fracciones citosólicas y los restos celulares de las proteínas producidas, así como del control negativo, fueron analizadas en un ensayo de western-blot. Este es un sistema muy sensible para la detección de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre un antígeno, que en este caso es la secuencia His-tag localizada en el C-terminal de las proteínas recombinantes producidas previamente, y un anticuerpo monoclonal, que posee la ventaja de ser específico en sus interacciones, uniéndose únicamente a la región del antígeno detectando la unión antígeno-anticuerpo mediante un sustrato cromogénico (De la Fuente et al., 2007). En la Figura 20 se presenta el ensayo obtenido y se observa señal negativa en los carriles correspondientes al control negativo y señales positivas en los pesos de 30- y 24-kDa, aproximadamente, correspondientes a las subclonas pET22-110RII y pET22-RIII respectivamente, tanto en la fracción citosólica, seguida por restos celulares, confirmando que se tienen las proteínas recombinantes esperadas.

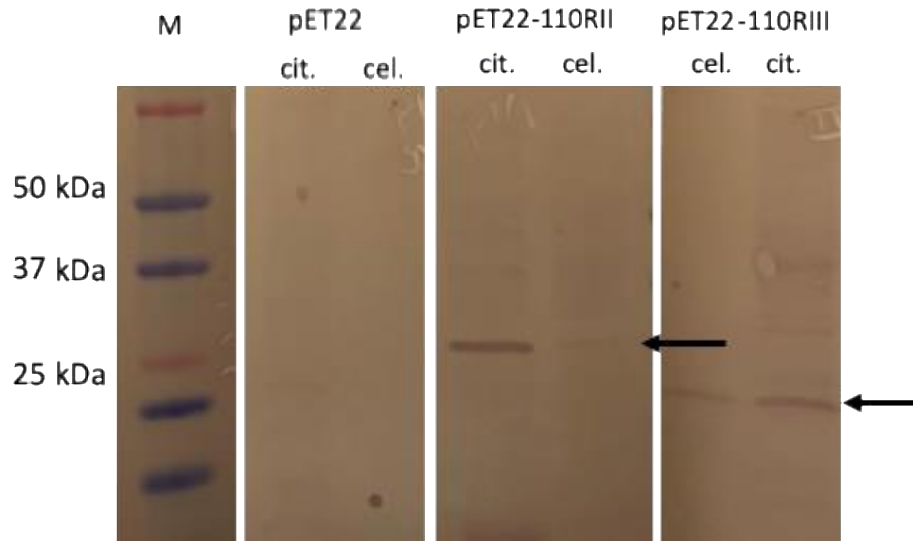


Figura 20. Western-blot. **M**; marcador de alto peso molecular, **pET22** (control negativo); cit (fracción citosólica), cel (restos celulares), **pET22-110RII**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares) y **pET22-110RIII**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares). SDS-PAGE, 10% de poliacrilamida.

Con la finalidad de encontrar el dominio activo de la proteína de 110 kDa, de la cual ya se mencionó previamente que al momento de su expresión se degradaba en fragmentos de menor peso molecular, se reprodujeron las condiciones reportadas por Barbosa (2018) para la inducción de la expresión de esta proteína con el objetivo de mandar a secuenciar los posibles fragmentos que presentaran una actividad lítica en zimograma y de esta manera obtener su secuencia en aminoácidos.

En la Figura 21 se observa la expresión de la proteína correspondiente a la construcción pET19-110, la cual presenta una actividad lítica en un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. Se obtuvo el perfil proteico y se señala la banda que corresponde a la actividad lítica con un recuadro rojo. Se mandó a secuenciar a la unidad de proteómica de la Universidad de la universidad estatal de Ohio, sin embargo los resultados obtenidos no representan los aminoácidos correspondientes a las regiones con las que se está trabajando, por lo que no fue posible comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína completa, con la secuencia de la región II de interés en este trabajo, la cual hasta el momento es el único dominio identificado como posible dominio catalítico.

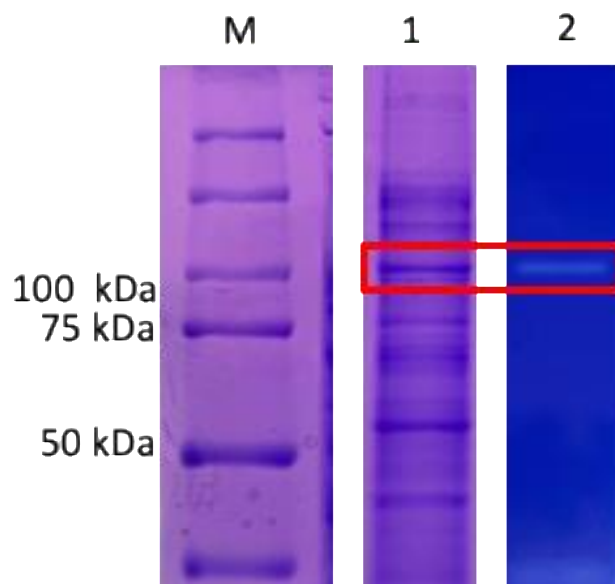


Figura 21. M; marcador de alto peso molecular, 1. SDS al 10% de poliacrilamida de la proteína correspondiente a la construcción pET19-110 (fracción citosólica), 2. Zimograma al 10% de poliacrilamida de la proteína correspondiente la construcción pET 19-110 (fracción citosólica).

8.2.4. Evaluación de la actividad de *N*-acetilmuramidasa

Las peptidoglucano hidrolasas se pueden clasificar ya sea en endopeptidasas, *N*-acetilglucosaminidasas, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasas, y *N*-acetilmuramidasa, dependiendo del tipo de enlace que se hidrolice. En trabajos previos se determinó que la proteína de 110 kDa presentaba una actividad de *N*-acetilmuramidasa, por lo que en este trabajo solamente se realizaron ensayos de esta actividad.

Se evaluaron las fracciones de citosol y restos celulares de las proteínas pET22-110RII, pET22-RIII, la construcción de la proteína completa pET19-110, el control negativo (el cual es la cepa de *E. coli* BL21 con el vector de expresión vacío) y se usó lisozima como control positivo, siguiendo el método de Taylor (1996). Este es un ensayo colorimétrico que mide de manera indirecta la hidrólisis del enlace β -1,4 entre el *N*-acetilmurámico (MurNAc) y el *N*-acetilglucosamina (GlcNAc). Una vez que se da esta hidrólisis y se tiene un residuo ácido libre de *N*-acetilmurámico (MurNAc) a través de un tratamiento ácido es posible pasar de ácido murámico a ácido láctico hasta formar acetaldehído, el cual es liberado y reacciona con cobre y

con p-fenilfenol (pPP) para producir un cromógeno, el cual absorbe en una longitud de onda de 570 nm.

En la Figura 22 se observan los valores obtenidos en la cual una unidad se puede definir como la cantidad de enzima necesaria para producir un cambio en la absorbancia de 0.01 unidades por minuto. Los valores que se muestran fueron ajustados con un blanco sin enzima. La columna que muestra mayor actividad corresponde al control positivo, el cual es la lisozima, y nos sirve para verificar el método.

Se observa una actividad en el control negativo, siendo esta una unidad mayor comparándola con los valores de actividad obtenidos al evaluar la proteína completa pET19-110, por lo que no representa diferencia significativa; esta actividad puede explicarse debido a que se han reportado en las bases de datos muramidasa nativas en esta cepa de *E. coli*, las cuales participan en funciones fisiológicas en este microorganismo.

La región II pET22-110RII en la fracción celular muestra una actividad hasta tres unidades mayor que el control negativo y la proteína completa pET19-110, confirmando que este dominio presenta una actividad enzimática de *N*-acetilmuramidasa.

Actividad específica de *N*-acetilmuramidasa

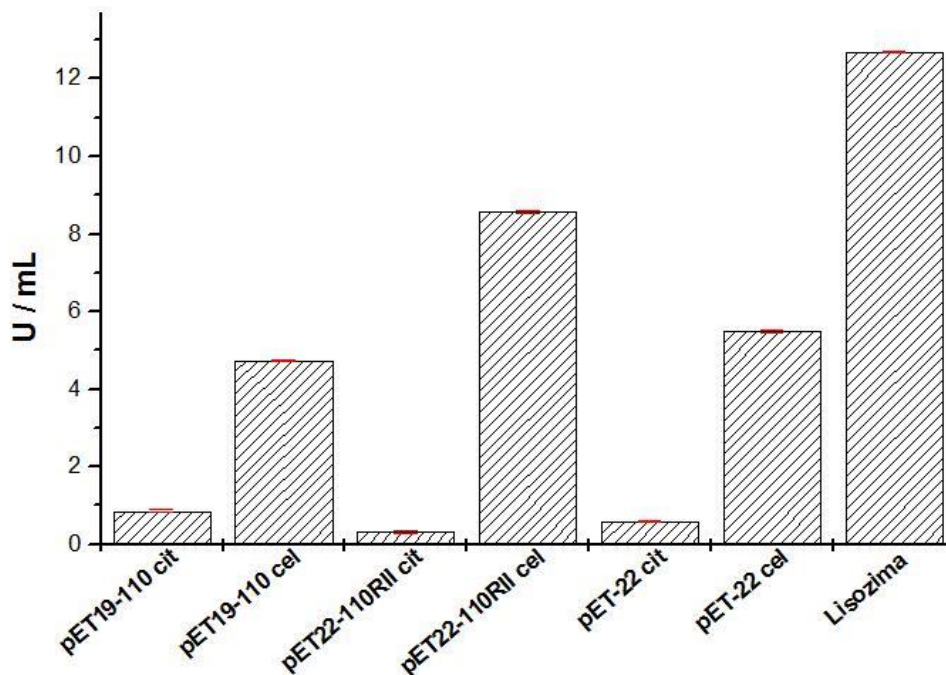


Figura 22. Actividad específica de muramidasa, **pET22** (control negativo); cit (fracción citosólica), cel (restos celulares), **pET19-110**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares) y **pET22-110Rii**; cit (fracción citosólica), cel (restos celulares), **Lisozima** (control positivo).

8.3. Predicción y análisis de la estructura 3D de la proteína con programas bioinformáticos.

8.3.1. Modelado y validación de la estructura tridimensional de la proteína.

La sobreexpresión heteróloga de las proteínas de membrana recombinantes es una estrategia que permite el estudio de varias estructuras de estas proteínas a nivel molecular. Sin embargo, su estudio presenta un gran reto debido a su inestabilidad intrínseca, su entorno hidrofóbico como las bicapas celulares y sus funciones a menudo implican contactos con lípidos, lo que resulta en la paradoja de que las proteínas de membrana necesitan lípidos para funcionar, pero también necesitan la adición de detergentes para purificarse. Cuando las proteínas se asocian en

complejos de una manera funcional, su estabilización a menudo es difícil en los protocolos de purificación y requiere numerosos pasos de prueba y error. Actualmente solo un pequeño número de estructuras de proteínas de membrana han sido determinadas y la mayoría son transportadores. Debido a lo poco compatibles que son con estudios estructurales, otra manera de estudiarlas es generando *in silico* una predicción estructural de las proteínas (Bernaudat et al., 2011, Semmes, 2011).

La predicción de la estructura en 3D de una proteína transmembranal puede abordarse mediante dos enfoques: el modelado por homología y el modelado *ab initio* (Rigden, 2009). En este trabajo se generaron las estructuras *in silico* de la proteína de 110 kDa y de las tres regiones de la proteína transmembranal producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Se realizó una búsqueda de homólogos cristalizados contra la base de datos del PDB con la herramienta BLAST, usando la secuencia de la proteína, así como de cada una de las regiones. La única secuencia encontrada tuvo un porcentaje de cobertura demasiado bajo, el cual no era suficiente para realizar la predicción de la estructura de la proteína por homología con el programa Modeller. Este necesita un porcentaje de identidad mayor al 30%, ya que este método se basa en la observación de que la estructura de la proteína se conserva más que la secuencia de aminoácidos, por lo tanto, incluso las proteínas que han divergido significativamente en la secuencia, pero aún comparten similitud detectable, también pueden compartir propiedades estructurales comunes, particularmente el plegamiento general (Martí-Renom et al., 2000). Por tal motivo, se decidió llevar a cabo el modelado *ab initio* o modelado *de novo*, el cual involucra la construcción de un modelo en 3D en ausencia de cualquier información estructural relacionada a la proteína de interés o un homólogo. Se utilizó el algoritmo ROSETTA, implementado en el servidor ROBETA, que es un servidor de modelado *ab initio* que utiliza funciones potenciales para calcular la estructura de energía más baja para una secuencia de aminoácidos, modelando secuencias cortas cuando no hay moldes que se alineen con la secuencia de interés usando fragmentos de 9 aminoácidos de longitud (Contreras-Moreira, 2018, Rigden, 2009, Rohl et al., 2004).

El objetivo de este método exhaustivo se logra cuando el plegamiento es cercano a la estructura nativa correspondiente al mínimo de energía global (Shewry, 2001).

Los modelos generados se presentan en las Figuras 23, 24 y 25. La evaluación de la calidad estereoquímica de los modelos es de los pasos más importantes en el modelado tridimensional de proteínas y para este propósito se utilizó el servidor SAVEs v0.5, con el cual se puede evaluar la calidad del modelo usando diferentes fuentes de información, por ejemplo PROCHECK, que evalúa la calidad estereoquímica de una estructura proteica dada, con parámetros derivados de estructuras bien refinadas y de alta resolución (Laskowski et al., 1993). Otro es VERIFY3D, que sigue un método estándar para asignar la estructura secundaria a los aminoácidos de una proteína basándose en coordenadas dadas por resolución atómica de ésta (Bowie et al., 1991), mientras WHATCHECK es un programa de verificación de estructuras de proteínas que arroja un análisis detallado de la proteína especificando residuos posiblemente problemáticos; utiliza una representación gráfica de resultados y de esta manera permite obtener una visión general rápida de la estructura (Hooft et al., 1996). PROVE es un procedimiento de validación de estructuras que se basa en los volúmenes atómicos y proporciona una medida independiente y sensible de la calidad de una estructura proteica (Pontius y Wodak, 1996) y, finalmente, ERRAT es un método estadístico que sirve para diferenciar entre regiones de estructuras proteicas determinadas correcta e incorrectamente en función de interacciones atómicas características (Colovos, 1993). Se puede calcular la gráfica ERRAT a partir de la cual podemos saber qué residuo o residuos están creando problemas en el modelo y de esta manera refinarlos para obtener el modelo con el valor mínimo de energía usando el programa Chimera. Los resultados, además, se validaron con el protocolo Rd. HMM, basado en los modelos ocultos probabilísticos de Markov utilizados para la inferencia estadística de secuencias homólogas, proporcionando un alineamiento de alta calidad y la base para las frecuencias de aminoácidos específicos de posición, espacio y parámetros de longitud en el perfil HMM. Este perfil se busca en una gran colección de secuencias basada en Uniprot Knowledgebase (Uniprotkb) para encontrar todos los miembros de una familia de proteínas (Alcorlo et al., 2017),

para verificar su relevancia biológica y saber qué tan parecido es el plegamiento generado con la realidad. Determinar la calidad del modelo determina la información funcional que se puede deducir de ella.

En los modelos generados para las regiones I y II se encontró una similitud a una proteína de membrana, sin embargo, para la región III se encontró la similitud con la secuencia reportada a la secuencia de aminoácidos de la proteína completa (110 kDa), como una proteína integral de membrana correspondiente a *Pediococcus acidilactici*. Posiblemente esto se deba a que en esta región se encuentra el dominio conservado de la proteína y es la región transmembranal, la cual es la que posee una mayor estabilidad en comparación con las regiones I y II ya que, como se mencionó previamente, esta proteína posee regiones intrínsecamente desordenadas, las cuales representan una clase estructural de proteínas que no tienen una estructura 3D bien definida, lo cual se confirma con los métodos de biología estructural como son la cristalografía de rayos X y la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) revelando que estas proteínas no adoptan estructuras plegadas compactas, incluso en condiciones fisiológicas. Dos rasgos característicos de este tipo de proteínas que las distinguen de los estados proteicos globulares estables son la ausencia de un pliegue compacto y la heterogeneidad conformacional, además de que poseen un alto grado de flexibilidad, polimorfismo conformacional en sus cadenas polipeptídicas y a menudo tienen poca estructura secundaria (Goda et al., 2015, Uversky, 2019). Esta podría ser la razón por la que no se tiene una similitud con el plegamiento nativo de la proteína en estas regiones.

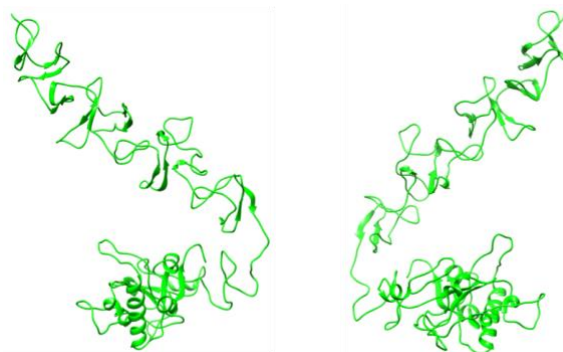


Figura 23. Modelo 3D de la estructura correspondiente a la Región I de la proteína de 110 kDa, utilizando el programa computacional Rosetta *ab initio*.

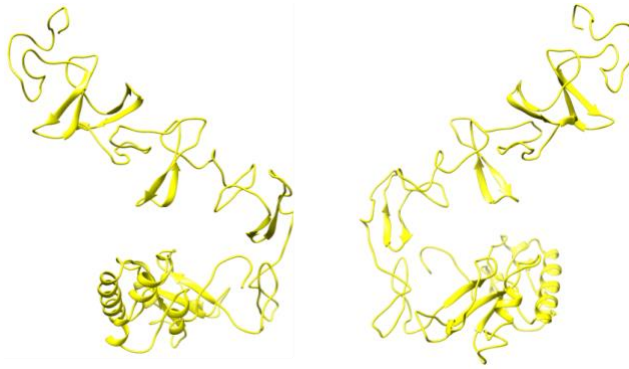


Figura 24. Modelo 3D de la estructura correspondiente a la Región II de la proteína de 110 kDa, utilizando el programa computacional Rosetta *ab initio*.

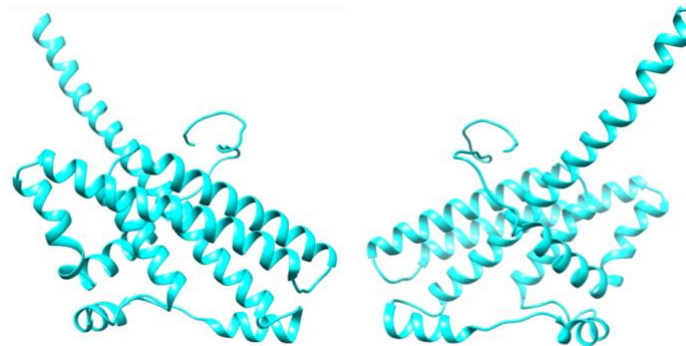


Figura 25. Modelo 3D de la estructura correspondiente a la Región III de la proteína de 110 kDa, utilizando el programa computacional Rosetta *ab initio*.

Se puede observar que las regiones I y II tienen una estructura similar a un gancho. Actualmente hay un aumento en la búsqueda exhaustiva de nuevas peptidoglucano hidrolasas, sin embargo en la literatura hasta el momento solo se ha reportado una lisozima cristalizada que posee esta estructura, la cual es una autolisina LytC proveniente de *S. pneumoniae* y tiene el código de acceso 2WWD en la base de datos del PDB. Su estructura cristalina fue obtenida en complejo con un muropéptido y una molécula de colina, revelando una conformación inusual de gancho y que se trata de una proteína multimodular, es decir, tiene un módulo de unión a colina y un módulo catalítico, el cual restringe la hidrólisis de cadenas de peptidoglucano no entrelazadas. Esta estructura en específico explicaría cómo la bacteria regula la actividad lítica de esta autolisina (Pérez-Dorado et al., 2010).

Para el caso de la proteína completa (110 kDa) al ser una proteína demasiado grande y, por lo tanto, tener una secuencia de aminoácidos demasiado larga, fue imposible modelarla con los programas previamente mencionados. Se realizó un modelo utilizando el servidor I-TASSER, que es una plataforma en línea que implementa algoritmos para predecir la estructura de proteínas así como sus funciones y permite generar automáticamente predicciones de modelos de alta calidad de la estructura 3D y la función biológica de las moléculas de proteínas a partir de sus secuencias de aminoácidos. Para predecir la función biológica de la proteína, el servidor compara los modelos predichos con las proteínas en tres bibliotecas independientes que consisten en proteínas de clasificación enzimática conocida, ontología génica, vocabulario y sitios de ligando. Los resultados finales de las predicciones de función se deducen del consenso de las mejores estructuras con las puntuaciones de función calculadas sobre la base de la puntuación de confianza de los modelos estructurales de I-TASSER, la similitud estructural entre el modelo, las plantillas evaluadas y la secuencia de identidad en las regiones estructuralmente alineadas (Roy y Zhang, 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008).

El modelo generado con el servidor I-TASSER, al igual que los otros modelos, fue analizado con el servidor SAVES y la molécula fue refinada hasta obtener la estructura con el mínimo de energía y que representara una funcionalidad comparable a la realidad. Se muestran dos vistas de la estructura generada en la Figura 26. Se puede observar que la estructura de la proteína es un homodímero, además de resaltar que está formada en su mayoría por α -hélices las cuales forman una pequeña cavidad. Esta estructura suele ser muy común en los transportadores tipo ABC, lo cual permite el transporte de pequeños compuestos (Kieuvongngam et al., 2020). También se observa una estructura α -helicoidal en toda la proteína, una característica de esta estructura es que permiten hidrolizar la naturaleza hidrofílica de los enlaces peptídicos en sí de las proteínas, lo que permite que la molécula sea anfipática y eso forma las regiones transmembranales y las regiones hidrofílicas que sobresalen en la cara externa de la membrana. Además, estas α -hélices sirven de anclaje a la bicapa lipídica y es lo que les permite producir un cambio conformacional y formar el canal por el que pueden transportar diversas sustancias

(Rodwell, 2019). De esta manera podríamos decir que, estructuralmente, la proteína de 110 kDa sí correspondería a una proteína transportadora tipo ABC, ya que hasta el momento no se han reportado PGH con esta estructura 3D.

Existen otro tipo de enzimas llamadas transglicosilasas líticas las cuales rompen el mismo enlace que las *N*-acetilmuramidasa (muramidasa). Sin embargo, estas enzimas realizan una transglucosilación intramolecular y forman un anillo 1,6-anhidro en el residuo *N*-acetilmurámico; pueden existir en su forma soluble nombradas como *SIts* o en su forma unida a la membrana nombradas, como *MIts* (Domínguez-Gil et al., 2016, Scheurwater et al., 2008). Estas enzimas han sido descritas en bacterias Gram negativas y en algunas bacterias Gram positivas se ha demostrado que están involucradas, principalmente, en la remodelación del peptidoglucano.

Recientemente se ha descrito el primer caso de regulación alostérica de una transglicolasa lítica unida a membrana producida por *P. aeruginosa* (*MItsF*), que tiene la función de renovar el peptidoglucano de la pared celular. Esta enzima comprende de dos módulos, un modulo catalítico y un transportador tipo ABC, el cual funciona como regulador de la actividad lítica, ya que se ha demostrado que controla la actividad del sitio activo y permite la lisis continua del peptidoglucano insoluble a una velocidad constante. (Domínguez-Gil et al., 2016).

Actualmente este es el único caso reportado en el que un transportador tipo ABC se encuentre relacionado con la actividad enzimática de una PGH, sin embargo esta actividad es únicamente fisiológica para el microorganismo productor y no presenta una actividad lítica contra otros microorganismos.

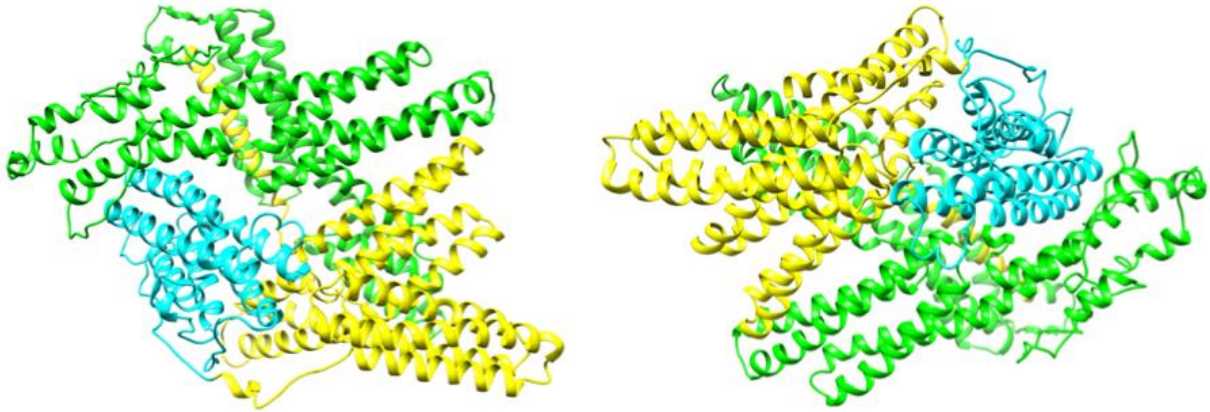


Figura 26. Modelo 3D de la estructura correspondiente a la proteína de 110 kDa, utilizando el servidor I-TASSER. **Verde:** Región I; **Amarillo:** Región II y **Azul:** Región III.

8.3.2. Predicción del sitio de unión a sustrato, utilizando la herramienta de Acoplamiento molecular.

Los modelos de las regiones I, II y III de la proteína de 110 kDa que fueron generados previamente por el método *ab initio*, fueron utilizados para llevar a cabo la predicción del sitio de unión a sustrato, para el cual se utilizó una cadena homóloga del peptidoglucano (NAM-NAG-NAM) con el código de acceso 9LYZ obtenida en la base de datos del PDB. La molécula se preparó, al igual que las estructuras generadas, utilizando la herramienta AutoDock Tools y se realizó un acoplamiento molecular ‘ciego’ con ayuda del programa AutoDock Vina (Trott y Olson, 2010), usando una ‘caja de búsqueda’ la cual consistió en toda la superficie de la molécula, debido a que al no tener mucha información de la proteína nos enfocamos en buscar la región con mayor afinidad al sustrato y que podría ser la candidata a ser el sitio activo.

Se eligieron los acoplamiento moleculares que presentaban la mejor energía de afinidad y son los que se muestran en las Figuras 27, 28 y 29.

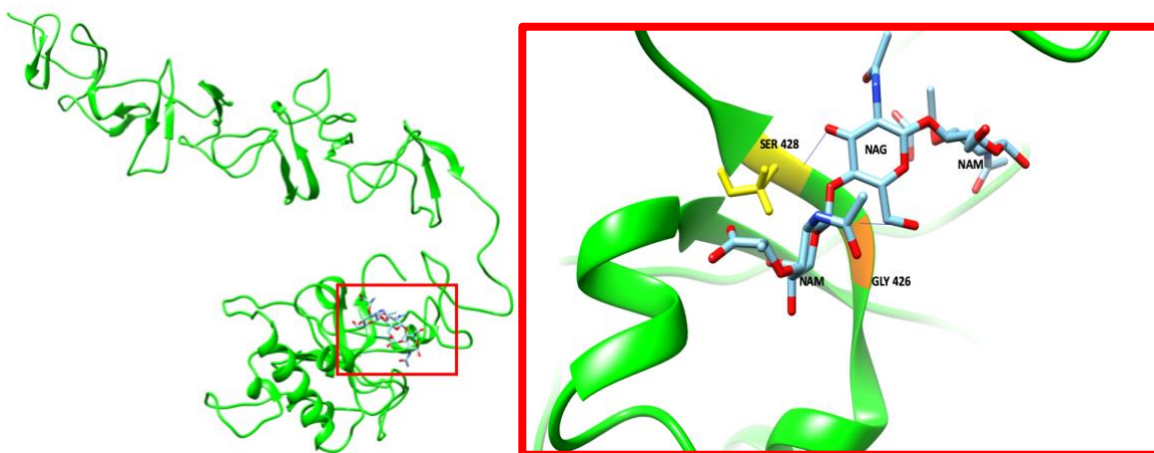


Figura 27. Acoplamiento molecular ciego con menor energía de afinidad (-7.2 Kcal/mol) de la región I con el ligando (NAM-NAG-NAM). Líneas azules representan los puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos de aminoácidos que interactúan.

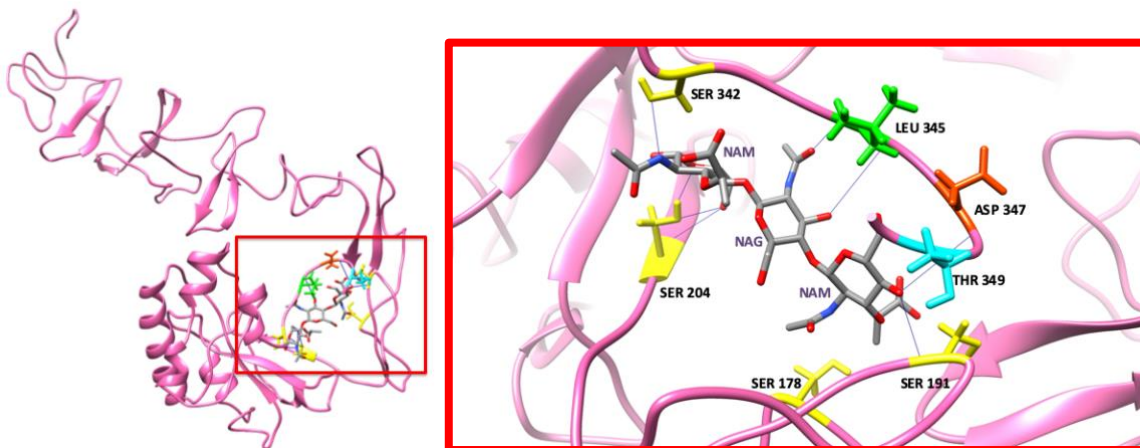


Figura 28. Acoplamiento molecular ciego con menor energía de afinidad (-7.6 Kcal/mol) de la región II con el ligando (NAM-NAG-NAM). Líneas azules representan los puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos de aminoácidos que interactúan.

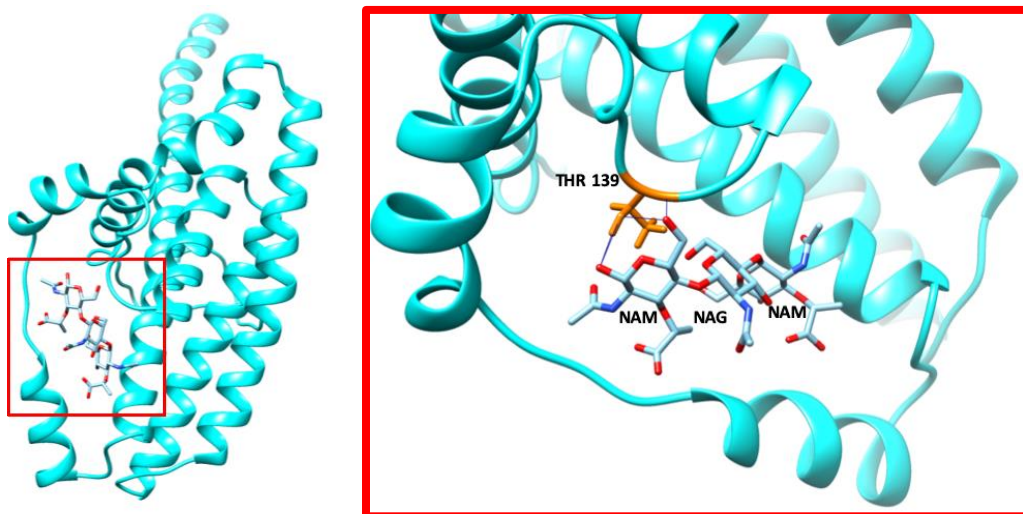


Figura 29. Acoplamiento molecular ciego con menor energía de afinidad (-6.5 Kcal/mol) de la región III con el ligando (NAM-NAG-NAM). Líneas azules representan los puentes de hidrógeno entre el ligando y los residuos de aminoácidos que interactúan.

Se puede observar que la región que posee una menor energía de afinidad es la correspondiente a la región II con una energía de -7.6 Kcal/mol, además de que es la región donde se tiene la mayor cantidad de puentes de hidrógeno, lo que nos indicaría que posiblemente hay una mayor interacción con el sustrato. Los residuos de aminoácidos que se predijeron estar involucrados en la unión mediante esta herramienta fueron los siguientes: Ser342, Ser204, Ser191, Ser178, Leu345, Asp347 y Thr349. Se puede observar que participa en la unión un ácido aspártico, el cual es uno de los aminoácidos principales para que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis de las peptidoglucano hidrolasas, las cuales necesitan de un residuo ácido en su sitio catalítico. Este modelo coincide con lo obtenido experimentalmente, en donde solamente en la región II se observó actividad lítica contra células liofilizadas de *M. lysodeikticus*.

Cabe mencionar que, al ser una proteína de membrana, intrínsecamente desordenada y no tener mucha información sobre alguna región conservada reportada en la base de datos o en la literatura con actividad antimicrobiana se vuelve un poco más complicada la búsqueda del dominio catalítico, sin embargo a

pesar de la dificultad para el estudio se siguen haciendo intentos para predecir sus funciones.

La abundancia de las peptidoglucano hidrolasas y las diferencias en las especificaciones del sustrato entre las familias de estas enzimas reflejan que hay una gran variedad de funciones fisiológicas específicas aún no identificadas.

Estudios recientes sobre la biología estructural de las peptidoglucano hidrolasas revelan una gran diversidad en estas enzimas. A pesar de la diversidad, éstas han evolucionado para poseer elementos estructurales como 'loops' o dominios que permiten su regulación y el reconocimiento de carbohidratos específicos en las cadenas de peptidoglucano. Si consideramos la relevancia de la pared celular bacteriana como principal objetivo para los agentes antimicrobianos, conocer los mecanismos moleculares que se llevan a cabo durante la interacción es esencial en la lucha contra el creciente problema de la resistencia a antibióticos.

Diversos estudios han demostrado que algunas de estas enzimas, cuando se prueban como proteínas purificadas recombinantes, poseen actividad lítica, ya sea como agentes únicos o en combinaciones con otros antimicrobianos, mostrando de esta manera sinergias "*in vitro*" y actividades mayores que los agentes individuales solos, ofreciendo una mayor eficacia. Estas sinergias pueden darse tanto con antibióticos, péptidos antimicrobianos e incluso otras peptidoglucano hidrolasas (Wittekind, 2016).

Entre los primeros estudios de sinergia entre dos peptidoglucano hidrolasas con diferentes especificidades se encuentra la combinación de lisostafina y la lisozima las cuales corresponden a una endopeptidasa y una muramidasa, respectivamente. Esta combinación mostró una actividad lítica contra 10 especies de *Staphylococcus* (Cisani et al., 1982). Posteriormente se probó la combinación de dos lisinas con actividad contra pneumococo, las cuales también tienen especificidades diferentes, Cpl-1 con actividad de muramidasa y Pal con actividad de amidasa y se mostró que la actividad reportada de esta combinación fue mucho mayor que la reportada por las lisinas de manera individual (Loeffler, 2003; Rodríguez-Cerrato et al., 2007), otro

ejemplo de este tipo de combinaciones es la reportada por Rodríguez-Rubio y colaboradores (2012) que demuestra actividad lítica de la combinación de dos enzimas quiméricas que mostraron tener una actividad sinérgica con la lisostafina atacando la mastitis de glándulas mamarias en un modelo murino causada por *S. aureus*. Por ello, no se descarta que la actividad producida por la región II observada en este trabajo aumente y actúe de manera sinérgica con la proteína de 99 kDa previamente reportada por García-Cano (2013). Sin embargo, los mecanismos por los que estos tipos de sinergia se llevan a cabo permanecen inexplorados por lo que son necesarios futuros estudios para elucidar el mecanismo de acción y las propiedades sinérgicas entre las peptidoglucano hidrolasas.

9. CONCLUSIONES

La clonación y expresión independiente de las tres regiones en que fue dividida la proteína transmembranal de 110 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* permitió determinar que la región II genera una banda de actividad antimicrobiana de aproximadamente 30 kDa la cual, al ser evaluada en los ensayos de sustrato específico mostró una actividad característica de muramidasa

Esto coincide con lo obtenido en las evaluaciones de acoplamiento molecular, donde la región que posee la menor energía de afinidad corresponde a la región II, indicando que posiblemente existe una relación entre la función y la estructura de la proteína y que en esta región se encuentra el dominio activo de la proteína de 110 kDa.

Sin embargo no se descarta la posibilidad de que la región I, la cual no pudo ser clonada y expresada en este trabajo, también posea actividad antimicrobiana, ya que estructuralmente estas dos regiones son muy similares.

10. PERSPECTIVAS

- Reinsertar el gen correspondiente a la región I y se evaluará su actividad antimicrobiana.
- Obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína de pET19-110 optimizando sus condiciones de expresión.
- Purificar la proteína recombinante obtenida correspondiente a la región II y realizar pruebas de difusión en agar contra microorganismos patógenos para confirmar la actividad de la región II.
- Obtener la secuencia de aminoácidos de la región II y su estructura secundaria por medio de dicroísmo circular.

11. REFERENCIAS

- Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., Ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). **Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli***. *Protein Expression and Purification*, *144*, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>.
- Alcorlo, M., Martínez-Caballero, S., Molina, R., & Hermoso, J. A. (2017). **Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases**. *Current Opinion in Structural Biology*, *44*, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.01.001>.
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., & Gómez, C. et al. (2006). **Fundamentos de criopreservación**. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *57*(4), 291-300. <https://doi: 10.18597/rcog.468>.
- Barbosa González, P. A. (2018). **Caracterización de la actividad antimicrobiana de la proteína recombinante de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 de 110-kDa**. Facultad de Química UNAM: Tesis de Maestría.
- Bernaudat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., Rioux, J. B., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Richaud, P., Joyard, J., Pignol, D., Sabaty, M., Desnos, T., Pebay-Peyroula, E., Darrouzet, E., Vernet, T., & Rolland, N. (2011). **Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host**. *PloS one*, *6*(12), e29191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029191>.

- Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). **A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure.** *Science*, 253(5016), 164–170. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>.

- Bradford M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

- Campos-Gómez, M. A. (2015). **Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Facultad de Química UNAM: Tesis de Maestría.

- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. **La resistencia a los antibióticos, los alimentos y los animales de producción | CDC.** Cdc.gov. (2021). Revisado 31 Mayo 2021, de <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/challenges/antibiotic-resistance.html>.

- Chapot-Chartier, M. P., & Kulakauskas, S. (2014). **Cell wall structure and function in lactic acid bacteria.** *Microbial Cell Factories*, 13 Suppl 1(Suppl 1), S9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9>.

- Cisani, G., Varaldo, P., Grazi, G., & Soro, O. (1982). **High-level potentiation of lysostaphin anti-staphylococcal activity by lysozyme.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(4), 531-535. <https://doi.org/10.1128/aac.21.4.531>.

- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., & Le Blay, G. (2007). **Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria.** *BMC Microbiology*, 7, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-101>.

- Colovos, C., & Yeates, T. O. (1993). **Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions.** *Protein science* 2(9), 1511–1519. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.
- Contreras-Moreira, B. (2018) **Algoritmos en bioinformática estructural.** doi:10.20350/digitalcsic/8544.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2013). **Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics?** *Nature Reviews Microbiology*,11(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>.
- De la Fuente González, A., Rodríguez Lozano, J., & Fonseca Capdevila, E. (2007). **Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot).** *Piel*,22(5), 252-258. [https://doi.org/10.1016/s0213-9251\(07\)73064-2](https://doi.org/10.1016/s0213-9251(07)73064-2).
- Dieye, Y., Usai, S., Clier, F., Gruss, A., & Piard, J. C. (2001). **Design of a protein-targeting system for lactic acid bacteria.** *Journal of Bacteriology*,183(14), 4157–4166. <https://doi.org/10.1128/JB.183.14.4157-4166.2001>.
- Dodds D. R. (2017). **Antibiotic resistance: A current epilogue.** *Biochemical Pharmacology*,134, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>.
- Domínguez-Gil, T., Lee, M., Acebrón-Avalos, I., Mahasenan, K. V., Heseck, D., Dik, D. A., Byun, B., Lastochkin, E., Fisher, J. F., Mobashery, S., & Hermoso, J. A. (2016). **Activation by allostery in cell-wall remodeling by a modular membrane-bound lytic transglycosylase from *Pseudomonas aeruginosa*.** *Structure (London, England: 1993)*,24(10), 1729–1741. <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.07.019>.

- Endo, A., Tanizawa, Y., & Arita, M. (2019). **Isolation and identification of lactic acid bacteria from environmental samples.** *Methods in Molecular Biology*, 1887, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8907-2_1.

- Frelet-Barrand A., Boutigny S., Kunji E.R.S., & Rolland N. (2010) **Membrane protein expression in *Lactococcus lactis*.** In: Mus-Veteau I. (eds) Heterologous Expression of Membrane Proteins. *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 601. Humana Press. págs. 67-85.

- Furusawa, C., Horinouchi, T., & Maeda, T. (2018). **Toward prediction and control of antibiotic-resistance evolution.** *Current Opinion in Biotechnology*, 54, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.026>.

- Gandhi, D., Chanalia, P., Bansal, P., & Dhanda, S. (2020). **Peptidoglycan hydrolases of probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252: Isolation, physicochemical and *in silico* characterization.** *International Journal Of Peptide Research And Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-10008-3>.

- García-Cano, I. (2013). **Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042; detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano.** Facultad de Química UNAM: Tesis de Doctorado .

- García-Cano., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez, S., Mendoza- Hernández, G., Llorente-Bousquets, A., & Farrés, A. (2011). **Detection, celular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** *Journal of Applied Microbiology*, 111, 607-615.

- Goda, N., Shimizu, K., Kuwahara, Y., Tenno, T., Noguchi, T., Ikegami, T., Ota, M., & Hiroaki, H. (2015). **A method for systematic assessment of intrinsically disordered protein regions by NMR.** *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15743–15760. <https://doi.org/10.3390/ijms160715743>.

- Grosu-Tudor, S. S., Stancu, M. M., Pelinescu, D., & Zamfir, M. (2014). **Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(9), 2459–2469. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1671-7>.

- Gupta, R., Jeevaratnam, K., & Fatima, A. (2018). **Lactic acid bacteria : probiotic characteristic , selection criteria , and its role in human health (A Review).** *Journal of Emerging Technologies and Innovative Research*, 5 (October), 411–424.

- Gustine, J., Au, M., Haserick, J., Hett, E., Rubin, E., Gibson, F., & Deng, L. (2019). **Cell wall hydrolytic enzymes enhance antimicrobial drug activity against Mycobacterium.** *Current Microbiology*, 76(4), 398-409. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1620-z>

- Heselpoth R.D., Swift S.M., Linden S.B., Mitchell M.S., & Nelson D.C. (2018) **Enzybiotics: Endolysins and bacteriocins.** In: Harper D., Abedon S., Burrowes B., McConville M. (eds) *Bacteriophages*. Springer 910.

- Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., & Abola, E. E. (1996). **Errors in protein structures.** *Nature*, 381(6580), 272. <https://doi.org/10.1038/381272a0>.

- Imlay, J. A., Chin, S. M., & Linn, S. (1988). **Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro.** *Science* 240(4852), 640–642. <https://doi.org/10.1126/science.2834821>.

- Kieuvongngam, V., Olinares, P., Palillo, A., Oldham, M. L., Chait, B. T., & Chen, J. (2020). **Structural basis of substrate recognition by a polypeptide processing and secretion transporter.** *eLife*, 9, e51492. <https://doi.org/10.7554/eLife.51492>.

- Kröckel, L. (2013). **The role of lactic acid bacteria in safety and flavor development of meat and meat products.** En M. Kongo (ed). *Lactic Acid Bacteria- R&D for Food, Health and Livestock Purposes*,. INTECH Croatia, págs. 129-152.

- Kumar J. K. (2008). **Lysostaphin: an antistaphylococcal agent.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(4), 555–561. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1579-y>.

- Land H., Humble M.S. (2018) **YASARA: A tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations.** In: Bornscheuer U., Höhne M. (eds) Protein Engineering. *Methods in Molecular Biology*, 1685. Humana Press, New York, NY, págs. 43-67.

- Laskowski, R., MacArthur, M., Moss, D., & Thornton, J. (1993). **PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures.** *Journal of Applied Crystallography*, 26(2), 283-291. <https://doi.org/10.1107/s0021889892009944>.

- Leibovici, L., Paul, M., Garner, P., Sinclair, D. J., Afshari, A., Pace, N. L., Cullum, N., Williams, H. C., Smyth, A., Skoetz, N., Del Mar, C., Schilder, A. G., Yahav, D., & Tovey, D. (2016). **Addressing resistance to antibiotics in**

- systematic reviews of antibiotic interventions.** *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,71(9), 2367–2369. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw135>.
- Loeffler, J., & Fischetti, V. (2003). **Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,47(1), 375-377. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.375-377.2003>.
 - Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., & Sali, A. (2000). **Comparative protein structure modeling of genes and genomes.** *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*,29, 291–325. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.291>.
 - Matamoros Ortega, S.C. (2013). **Identificación de la actividad lítica de la proteína similar a transportador ABC en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** Facultad de Química UNAM: Tesis de Maestría.
 - Mora-Villalobos, J., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., & Redondo-Solano, M. et al. (2020). **Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review.** *Fermentation*,6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>.
 - Nigro, G., Fazio, L. L., Martino, M. C., Rossi, G., Tattoli, I., Liparoti, V., De Castro, C., Molinaro, A., Philpott, D. J., & Bernardini, M. L. (2008). **Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*.** *Cellular Microbiology*,10(3), 682–695. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01075.x>.

- Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., & Wright, G. D. (2018). **The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes.** *Nature Communications*,9(1), 112. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02680-0>.

- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., Mobashery, S., García, J. L., Martínez-Ripoll, M., García, P., & Hermoso, J. A. (2010). **Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC.** *Nature Structural & Molecular Biology*,17(5), 576–581. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1817>.

- Pontius, J., Richelle, J., & Wodak, S. J. (1996). **Deviations from standard atomic volumes as a quality measure for protein crystal structures.** *Journal of Molecular Biology*, 264(1), 121–136. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0628>.

- Rigden, D. (2009). **From protein structure to function with bioinformatics.** Springer, Dordrecht. 324.

- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., del Prado, G., & Gracia, M. et al. (2007). **Pneumococcal LytA autolysin, a potent therapeutic agent in experimental peritonitis-sepsis caused by highly β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,51(9), 3371-3373. <https://doi.org/10.1128/aac.00137-07>.

- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Donovan, D., & García, P. (2012). **Enhanced staphylolytic activity of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB_SauS-philPLA88 HydH5 virion-associated peptidoglycan hydrolase: fusions, deletions, and synergy with LysH5.** *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2241-2248. <https://doi.org/10.1128/aem.07621-11>.

- Rodwell, V. (2019). **Harper Bioquímica ilustrada** (pp. 481-483). McGraw-Hill.
- Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M., & Baker, D. (2004). **Protein structure prediction using Rosetta**. *Methods in Enzymology*, 383, 66–93. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)83004-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)83004-0).
- Rolain, T., Bernard, E., Courtin, P., Bron, P., Kleerebezem, M., Chapot-Chartier, M., & Hols, P. (2012). **Identification of key peptidoglycan hydrolases for morphogenesis, autolysis, and peptidoglycan composition of *Lactobacillus plantarum* WCFS1**. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 137. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-137>.
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). **I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction**. *Nature protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). **Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina**. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1091. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>.
- Salminen, S., & Wright, A. (2004). **Lactic acid bacteria** (pp. 20-40). Taylor & Francis Ltd. 656.
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., & Britton, R. A. (2010). **The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups**. *Microbiology*, 156(6), 1589–1599. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035642-0>.

- Scheurwater, E., Reid, C. W., & Clarke, A. J. (2008). **Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*,40(4), 586–591. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.03.018>.

- Semmes, O.J. (2011), **Membrane protein structure determination: methods and protocols.** Jean-Jacques Lacapère (Editor) Series: *Methods in Molecular Biology*,654 Humana Press, Springer Protocols, 1st Edn., XII, 2010, pp. 459 ISBN: 978-1-60761-761-7. *Proteomics*, 11: 3435-3435. doi:10.1002/pmic.201190080.

- Sharma, A., Kumar, S., K., H., Dhakan, D., & Sharma, V. (2016). **Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins.** *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2753-8>.

- Shen, Y., Kalograiaki, I., Prunotto, A., Dunne, M., Boulos, S., Taylor, N. M. I., & Loessner, M. J. (2020). **Molecular basis for recognition of Listeria cell wall teichoic acid by the pseudo-symmetric SH3b-like repeats of a bacteriophage endolysin.** *BioRxiv*, 2020.06.05.136911. <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136911>.

- Shuman S. (1992). **DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase I.** *The Journal of Biological Chemistry*,267(12), 8620–8627.

- Shuman S. (1994). **Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.** *The Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32678–32684.

- Shewry, P.R. (2001). **Protein structure prediction: Methods and protocols.** *Methods in Molecular Biology*,143. David M. Webster (ed.).2000. *Plant Growth Regulation* 34,251. <https://doi.org/10.1023/A:1013342930377>.

- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). **Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.** *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).
- Tamarit, J., Cabiscol, E., & Ros, J. (1998). **Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress.** *The Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 3027–3032. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.3027>.
- Taylor, K. (1996). **A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 56,49-58.
- Tian, P. J., Li, B. L., Shan, Y. J., Zhang, J. N., Chen, J. Y., Yu, M., & Zhang, L. W. (2015). **Extraction of peptidoglycan from *L. paracasei* subsp. *paracasei* X12 and its preliminary mechanisms of inducing immunogenic cell death in HT-29 cells.** *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 20033–20049. <https://doi.org/10.3390/ijms160820033>.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of molecular docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading.** *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Tsakalidou, E. (2011). **Part III: Milk and dairy foods.** En L.M. Nollet & F. Toldra (ed)s. *Microbial flora. Safety Analysis of Foods of Animal Origin* CRC Press, Boca Raton, págs. 781-798 .
- Uversky, V. N. (2019). **Intrinsically disordered proteins and their “Mysterious” (meta)physics.** *Frontiers in Physics*. <https://doi.org/10.3389/fphy.2019.00010>.

- Visweswaran, G. R., Leenhouts, K., van Roosmalen, M., Kok, J., & Buist, G. (2014). **Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4331–4345. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5633-7>.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). **Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases.** *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 259–286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>.
- Watkins, R. R., & Bonomo, R. A. (2016). **Overview: Global and local impact of antibiotic resistance.** *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.001>.
- Wilkens S. (2015). **Structure and mechanism of ABC transporters.** *F1000prime reports*, 7, 14. <https://doi.org/10.12703/P7-14>.
- Wittekind, M., & Schuch, R. (2016). **Cell wall hydrolases and antibiotics: exploiting synergy to create efficacious new antimicrobial treatments.** *Current Opinion In Microbiology*, 33, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.006>.
- World Health Organization (WHO). 2015. **Global action plan on antimicrobial resistance.** WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO). 2017. **Antimicrobial resistance. Global report on Surveillance.** WHO, Geneva, Switzerland.
- Wurm, D. J., Veiter, L., Ulonska, S., Eggenreich, B., Herwig, C., & Spadiut, O. (2016). **The *E. coli* pET expression system revisited-mechanistic correlation between glucose and lactose uptake.** *Applied Microbiology*

and *Biotechnology*,100(20), 8721–8729. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7620-7>.

Wyckoff, T. J., Taylor, J. A., & Salama, N. R. (2012). **Beyond growth: novel functions for bacterial cell wall hydrolases.** *Trends in Microbiology*,20(11), 540–547. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.08.003>.

- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). **The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction.** *Nature Methods*,12(1), 7–8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- Zadavec, P., Mavrič, A., Bogovič Matijasic, B., Štrukelj, B., & Berlec, A. (2014). **Engineering BmpA as a carrier for surface display of IgG-binding domain on *Lactococcus lactis*.** *Protein Engineering, Design & Selection*27(1), 21–27. <https://doi.org/10.1093/protein/gzt059>.
- Zhang Y. (2008). **I-TASSER server for protein 3D structure prediction.** *BMC Bioinformatics*,9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>.