



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ELEMENTOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS PARA EL ANÁLISIS DE LA
PEPTIDOGLUCAN HIDROLASA BIFUNCIONAL DE 99-KDA DE
PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI ATCC 8042**

TESIS MANCOMUNADA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IBARRA DOMÍNGUEZ KATYA PAOLA

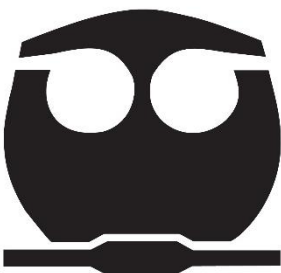
LUNA AVILA LAURA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA

SUPERVISOR TÉCNICO

Q.A. VIANEY ANAHÍ SALAS VILLAGRÁN



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

VOCAL: Profesor: AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA

SECRETARIO: Profesor: GLORIA DÍAZ RUIZ

1er. SUPLENTE: Profesor: BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

2° SUPLENTE: Profesor: ALEIDA MINA CETINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto "E", Facultad de Química, Circuito de la Investigación Científica s/n, Ciudad Universitaria, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.A. Vianey Anahí Salas Villagrán

SUSTENTANTES:

Katya Paola Ibarra Domínguez

Laura Luna Avila

La sustentante Katya Paola Ibarra Domínguez participó en el Subprograma 127 en el año 2020-2021.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 312 del Conjunto E, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González-Saravia durante la realización del mismo se contó con el financiamiento del Programa PAIP (5000-9095) y con el apoyo técnico de M en C. Cindy Estrada Hernández y M en C. Sandra Pérez Munguía.

La sustentante Katya Paola Ibarra Domínguez también reconoce el apoyo económico del Subprograma 127 "Formación básica en investigación" de la Facultad de Química de la UNAM para la realización de la tesis durante el período 2020-2021.

Agradecimientos Katya Paola Ibarra Domínguez

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme la oportunidad de ser parte de ella, por ser mi segunda casa, por brindarme una formación tanto personal como profesional.

A la Facultad de Química, por abrirme las puertas al conocimiento, por brindar los recursos para la realización del trabajo de investigación en sus instalaciones y por el apoyo económico para el proyecto.

A mi tutora la Dra. Amelia, por su dirección, generosidad y confianza a lo largo de la investigación, así como también por sus aportaciones y consejos para mi desarrollo académico. Siempre recordaré su predisposición a ayudar, la amabilidad y bondad con la que me trató constantemente.

A mi asesora técnica Vianey, por todo su apoyo, paciencia y guía para el proyecto, por su dedicación, compromiso y profesionalismo siendo un ejemplo a seguir, por compartir sus conocimientos incondicionalmente y por la sincera amistad que me brindo día a día.

A los miembros del Jurado, por su entusiasmo e interés para revisar el trabajo de investigación, así como por las observaciones y sugerencias para enriquecer su contenido.

A mis padres Rocío y Jesús, por ser los pilares más importantes de mi vida, por todo el amor, apoyo y cuidado que me han brindado, su esfuerzo y dedicación ha contribuido inmensamente en la persona que soy, además de su constante confianza en mis capacidades que ha impulsado el logro de muchos objetivos. A mi hermano Kevin por estar presente, apoyarme y por todas las buenas experiencias que hemos vivido. Así como también a la valiosa familia a la que pertenezco.

A mis amigos, que aún a la distancia y después de muchos años me siguen acompañando y animando. A Francisco, que siempre ha tenido fe en mí, por su amor y apoyo incondicional en todos mis ideales y metas.

A mis compañeros del laboratorio 312, por sus grandes recomendaciones y consejos, así como también por los buenos momentos que compartimos.

Agradecimientos Laura Luna Avila

Primeramente quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México – Facultad de Química por haberme formado profesionalmente, brindándome todas las aptitudes y herramientas necesarias. Agradezco profundamente ser parte de esta esta institución.

A la Dra. Amelia Farrés por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por ser mi guía a lo largo de este proyecto, inicialmente como profesora y posteriormente como mi tutora. Gracias por la confianza el apoyo incondicional y la motivación.

A la Q.A. Vianney Anahí Salas Villagrán, quien estuvo siempre al pendiente de este proyecto, enseñándome y preparándome con todo lo necesario para poder llevarlo a cabo y concluirlo con éxito, de igual manera a Katya Ibarra ya que sin ella este proyecto no hubiese podido llevarse a cabo, resultado de tiempo, perseverancia y trabajo en equipo.

A mi familia por la confianza que depositaron en mí, por estar pendientes, apoyándome y respaldándome todo el tiempo, muchos de los logros se los debo a ustedes entre los cuales se incluye este. Ustedes son mi principal motivación día a día, sin embargo, quiero hacer un agradecimiento especial a mi madre Leticia Avila González por haber sido mi ejemplo a seguir desde pequeña con este sueño de convertirme en científica. Gracias por todo tu apoyo a lo largo de mi trayectoria académica, ya que para mí eres y siempre serás la mejor científica e investigadora que puedo tener en mi vida.

A mis amigos Pamela Flores y Víctor Salas, por el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de la carrera y durante la realización de este proyecto, gracias por la motivación y entusiasmo que siempre depositaron en mi para poder seguir adelante.

Índice

Resumen	8
1. Introducción	9
1.1 Peptidoglucano.....	9
1.2 Estructura del peptidoglucano	9
1.3 Peptidoglucan hidrolasas.....	11
1.4 Clasificación de peptidoglucan hidrolasas.....	12
1.5 Aplicación en alimentos.....	13
1.6 Caracterización mediante análisis bioinformático	14
2. Antecedentes	18
2.1 Bacterias Acido lácticas.....	18
2.2 Enzimas líticas de <i>Pediococcus acidilactici</i>	18
2.3 Subclonación de la proteína bifuncional	20
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivo general	26
5.1 Objetivos específicos	26
6. Metodologías	27
6.1 Verificación de clonas	28
6.1.1 Cepas utilizadas	28
6.1.2 Extracción de ADN plasmídico.....	28
6.1.3 Amplificación del gen de interés por PCR.....	28
6.2 Inducción de la expresión de la proteína recombinante	29
6.2.1 Optimización de condiciones de almacenamiento.....	29
6.2.2 Optimización de la solubilización de la proteína recombinante	29
6.2.3 Cuantificación de proteína	30
6.3 Determinación del perfil proteico por SDS y actividad lítica en zimograma con <i>Micrococcus lysodeikticus</i>	30
6.4 Determinación de actividad específica.....	31
6.4.1 N-acetilglucosaminidasa.....	31
6.4.2 N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.....	31
6.5 Análisis Bioinformático	31
6.5.1 Alineamiento con secuencias molde	31
6.5.2 Optimización y evaluación de modelos.....	32
6.5.3 Selección y preparación de proteínas receptoras	32
6.5.4 Selección y preparación de ligandos	32
6.5.5 Acoplamiento molecular (docking) del dominio y subclona modelados.....	33

7. Resultados y discusión	34
7.1 Verificación de clonas	34
7.2 Inducción de la expresión de proteína recombinante.....	35
7.2.1 Optimización de condiciones de almacenamiento.....	38
7.2.2 Optimización de la solubilización de la proteína recombinante	40
7.3 Análisis bioinformático	42
7.3.1 Alineamiento con secuencias molde e identificación de proteínas homologas.....	42
7.3.2 Optimización y evaluación de modelos.....	46
7.3.3 Docking del dominio y su respectiva subclona.....	49
8. Conclusiones	54
9. Perspectivas	55
10. Referencias	56

Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se usan como cultivos iniciadores para conservar alimentos procesados, ya que producen una amplia gama de metabolitos antibacterianos, entre los cuales destacan las peptidoglucan hidrolasas (PGH), las cuales son enzimas que hidrolizan los enlaces glicosídicos o peptídicos que se encuentran en el peptidoglucano de todas las bacterias, provocando lisis celular.

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 es una BAL utilizada como cultivo iniciador en productos cárnicos, la cual tiene un efecto bioconservador conferido por la actividad de peptidoglucano hidrolasa intracelular. Con el objetivo de analizar con más detalle el mecanismo de hidrólisis se plantea una estrategia de investigación que involucra la producción en cantidades suficientes de las fracciones que tienen actividad antimicrobiana y el análisis estructural de las mismas para utilizar la información en la caracterización y diseño de nuevos antimicrobianos.

En el presente proyecto se trabajó con las subclonas recombinantes Ami 123 y Glu 32 de la peptidoglucan hidrolasa bifuncional de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 previamente obtenidas por el equipo de trabajo. En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas de inducción, producción y almacenamiento para cada una de las subclonas obteniendo como resultado una concentración de 0.4 mM de IPTG a 22°C por 18 h correspondientes a la inducción y producción de ambas subclonas, y una temperatura de 4°C para su almacenamiento. Posteriormente, se generaron los modelos tridimensionales de ambas subclonas, con el objetivo de determinar su interacción con el peptidoglucano mediante el uso de acoplamiento molecular (docking molecular). Los acoplamientos moleculares realizados únicamente confirmaron que existen residuos encargados de la unión a carbohidrato, sin embargo, no dan información sobre los residuos catalíticos. Por otra parte, se encontró que para ambas subclonas la región de asparaginas está vinculada con la interacción del ligando, destacando la región 3 como la más importante para la subclona Glu 32 y la región 2 y 3 para el caso de la subclona Ami 123.

1. Introducción

1.1 Peptidoglucano

El peptidoglucano (PG) o mureína, es un heteropolímero tridimensional de naturaleza glucopeptídica. Se encuentra rodeando la membrana citoplasmática de la mayoría de las bacterias y es el responsable del mantenimiento de la estructura de la célula; de hecho, la inhibición de su biosíntesis, o su degradación, durante la fase de crecimiento bacteriano produciría la lisis celular (Vollmer et al., 2008).

Es uno de los componentes esenciales de la pared celular, que protege a la célula de la ruptura como resultado de la presión osmótica (turgor) del citoplasma y que mantiene la forma específica (esfera, varilla, espiral u otra) de la célula bacteriana (Vollmer et al., 2010). Aunque la composición química varía en diferentes especies, el peptidoglucano está siempre hecho de hebras de glucano que están entrecruzadas por péptidos cortos.

Debido a las diferencias en la longitud de la cadena, secuencia de aminoácidos, nivel de entrecruzamiento y la presencia o ausencia de modificaciones secundarias tanto en las cadenas de glucanos como en los péptidos, existe una gran variabilidad del peptidoglucano bacteriano entre especies, cepas, condiciones de crecimiento y/o estadio celular, factores ambientales y es independiente del grosor del PG (Rico, 2015).

1.2 Estructura del peptidoglucano

El peptidoglucano consta de hebras lineales de glucano entrecruzadas por cadenas laterales de péptidos (contienen l- y d-aminoácidos y tiene la estructura general l-Ala-d-iGlu-l-Lys (o meso-A2pm) -d-Ala-d-Ala). Las hebras de glucano están formadas por unidades repetitivas del ácido N-acetil-d-glucosamina (GlcNac) y ácido N-acetilmurámico (MurNac) enlazados en β -1,4 (Vollmer et al., 2010).

Presente tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, forma una estructura flexible, similar a la red, que determina la forma celular y proporciona resistencia mecánica y estabilidad osmótica. En las bacterias Gram negativas (figura 1a), el péptido principal es un pentapéptido L-Ala-D-iGlu-m-DAP-D-Ala-D-Ala, donde iGlu y m-DAP corresponden a iso-glutamato y ácido meso-diaminopimélico, respectivamente. Este quimiotipo PG se ha denominado A1y y rara vez se encuentra en bacterias Gram-positivas (figura 1b), donde a menudo el residuo D-iGlu en la posición dos se amida, lo que da como resultado D-iGln, y L-Lys reemplaza a m-DAP en la posición tres (Porfirio et al., 2019).

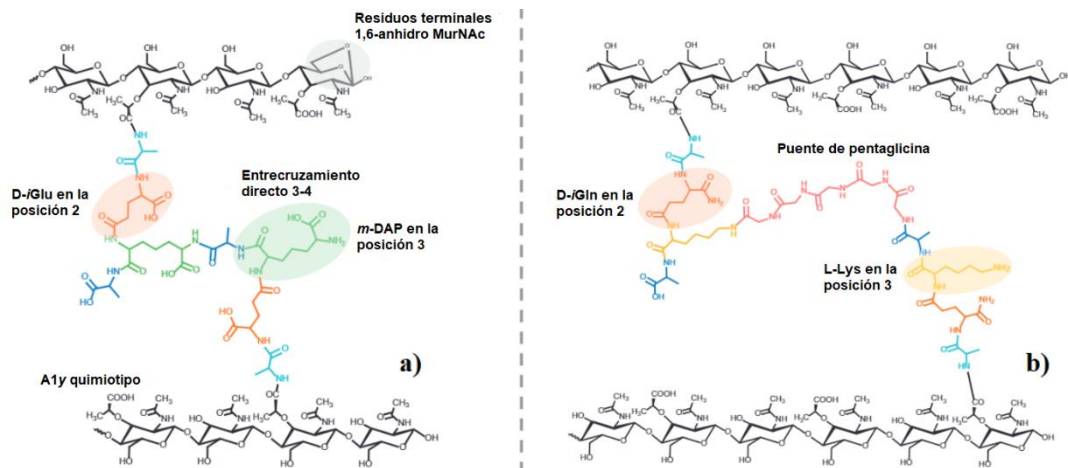


Figura 1. Estructura del peptidoglucano en (a) bacterias Gram negativa y (b) Gram positiva (Porfirio et al., 2019).

Como se observa en la figura 2a en las bacterias Gram negativas, el peptidoglucano forma una capa delgada que rodea la célula y está anclada a ambas membranas celulares por lipoproteínas. La pared celular es compleja y está formada por dos bicapas lipídicas (membranas interna y externa) que cierran el espacio periplásmico donde se encuentra el peptidoglucano. La membrana externa está impregnada de porinas, a través de las cuales las moléculas pueden difundirse. Por otra parte, el lipopolisacárido (LPS), es el principal componente de la superficie de las bacterias Gram negativas (figura 2b), el cual contribuye en gran medida a la integridad estructural de la célula.

En las bacterias Gram positivas, la capa de peptidoglucano es mucho más gruesa que en las Gram negativas y solo hay una membrana celular rodeando la pared celular. De manera similar a las Gram negativas, el peptidoglucano se une a la membrana celular a través de una lipoproteína. También funcionalizan su pared celular con polímeros de superficie como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos que desempeñan un papel fundamental en la determinación de la forma celular, la regulación de la división celular, la patogenicidad y la resistencia a los antibióticos (Porfirio et al., 2019).

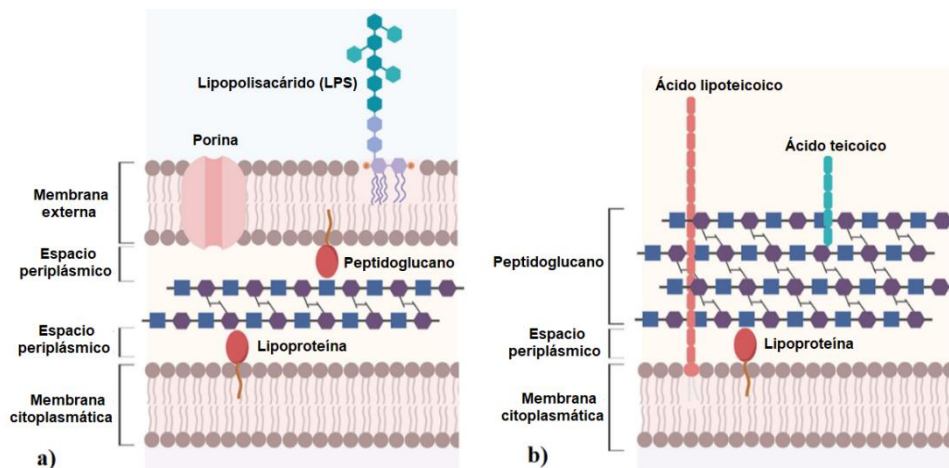


Figura 2. Pared celular de bacterias (a) Gram negativa y (b) Gram positiva (Porfirio et al., 2019).

Muchos patógenos Gram positivos modifican sus cadenas de glucanos mediante N-glicosilación, N-acetilación y / o O-acetilación. Estas modificaciones, así como la unión de otros polímeros de la pared celular, contribuyen a niveles más altos de resistencia a la lisozima (enzima que escinde la hebra de glucanos), que es un importante factor de defensa del sistema inmunológico innato (Vollmer et al., 2010).

1.3 Peptidoglucan hidrolasas

Las peptidoglucan hidrolasas (PGH) o también denominadas peptidoglucano hidrolasas, son enzimas con propiedades antimicrobianas que están involucradas en varias funciones, incluyendo la maduración del peptidoglucano, recambio, reciclaje, autólisis, escisión del septum durante la división celular y resistencia a antibióticos (Alcorlo et al., 2017). También participan en el crecimiento de la pared celular bacteriana y su regulación y también en diferentes fenómenos de lisis.

Debido a que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces que forman la red del peptidoglucano, componente principal de la pared celular de las bacterias, se han vuelto de gran interés como antibacterianos en productos alimenticios, debido a la alta especificidad y acción contra microorganismos patógenos que pueden presentar (Vollmer et al., 2008).

Al ser enzimas capaces de escindir enlaces en sáculos y/o sus fragmentos solubles, se dividen en varias clases (figura 3), definidas en función de su especificidad para los enlaces covalentes. Pueden escindir el enlace glucosídico (glucosidasas) o amida (peptidasas) en el peptidoglucano.

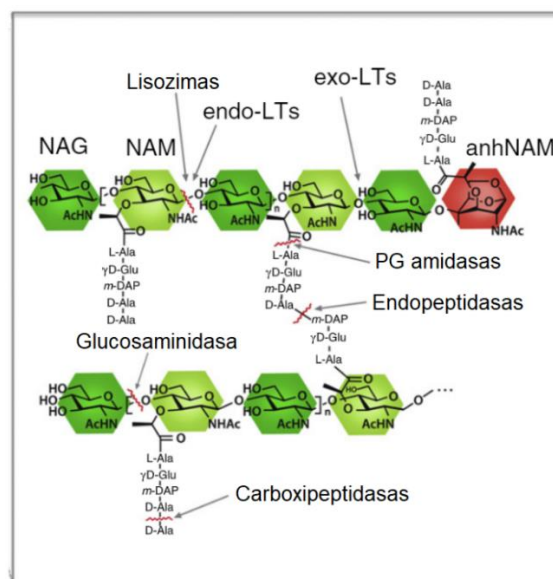


Figura 3. Esquema detallado del peptidoglucano y las diversas peptidoglucan hidrolasas implicadas en el procesamiento del peptidoglucano (Alcorlo et al., 2017).

1.4 Clasificación de peptidoglucan hidrolasas

Las PGH se clasifican de acuerdo con el tipo de enlace que hidrolizan en el peptidoglucano:

En cuanto a las glicosidasas, se pueden distinguir subgrupos diferentes: glucosaminidasas, lisozimas y transglicosilasas líticas (Alcorlo et al., 2017). Mientras que las glucosaminidasas hidrolíticas escinden el enlace β -(1,4) glucosídico entre GlcNAc y MurNAc, las muramidasas que se dividen en lisozimas (enzimas hidrolíticas) y las transglicosilasas líticas (enzimas no hidrolíticas) escinden el enlace β -(1,4) glucosídico entre MurNAc y GlcNAc secuenciales.

Glucosaminidasas. Las N-acetil- β -D-glucosaminidasas (glucosaminidasas) hidrolizan enlaces glucosídicos β -(1,4) entre GlcNAc y otros monosacáridos, dejando un extremo N-acetilglucosamina reductor. Esto implica que estas enzimas pueden actuar sobre el peptidoglucano, pero también sobre otros sustratos como la quitina, el quitosano o los N-glucanos (Porfirio et al., 2019).

Muramidasas. Las N-acetil- β -D-muramidasas (muramidasas) son enzimas que escinden el enlace β -(1,4)-glucosídico entre los residuos de MurNAc y GlcNAc en el peptidoglucano. (Vollmer et al., 2008). Este enlace se puede escindir de dos formas diferentes:

Las *lisozimas* hidrolizan el enlace glucosídico, dando como resultado un producto con un residuo MurNAc reductor terminal. Las lisozimas rompen el enlace entre las subunidades de sacáridos secuenciales MurNAc (ubicada en la posición -1 del sitio activo) y GlcNAc (ubicada en la posición +1) en el PG.

Las *transglicosilasas líticas* (LT) rompen el enlace glucosídico con una reacción de transglicosilación intramolecular, lo que da como resultado la formación de 1,6-anhidro en el residuo de MurNAc. Los LT existen solubles (denominados SIts) o formas unidas a la membrana (denominados MIts).

En cuanto a las peptidasas, se pueden distinguir dos grupos diferentes, amidasas y peptidasas, dependiendo de la naturaleza y localización del enlace amida a hidrolizar.

Amidasas. N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas (amidadas) hidrolizan el enlace amídico entre MurNAc y el N-terminal de la L-Ala, separando la cadena de glucanos de los péptidos, y liberando péptidos del tallo (Porfirio et al., 2019). Esta familia de enzimas es una de las más utilizadas para hidrolizar las muestras de PG.

Peptidasas. Dependiendo de la posición del enlace amida a escindir, las peptidasas se subdividen en carboxipeptidasas que eliminan los residuos C-terminales y endopeptidasas que se escinden dentro del péptido, con los prefijos DD-, LD- o DL que se refieren a la

estereoquímica de los dos residuos de aminoácidos. constituyendo el sitio de escisión. (Alcorlo et al., 2017)

Las LD-carboxipeptidasas se escinden entre m-A2pm (posición 3) y D-Ala (posición 4) en un tetrapéptido para eliminar el residuo de D-Ala terminal.

Las DD-endopeptidasas hidrolizan los puentes cruzados D-Ala-meso-A2pm, que se habían formado por transpeptidación de DD en peptidoglucano naciente por las proteínas de unión a penicilina de alto PM.

1.5 Aplicación en alimentos

Las peptidoglucan hidrolasas tienen el potencial de ser utilizadas en la industria alimentaria para la conservación, en la agricultura para lograr resistencia contra bacterias fitopatógenas y como agentes antibacterianos (Sharma et al., 2016). Podrían convertirse en una nueva clase de agentes antibacterianos para contrarrestar el problema de la resistencia a los antibióticos en organismos patógenos. Considerando la relevancia de la pared celular bacteriana como un objetivo principal de los antibióticos, las PGH serán esenciales en la lucha contra el creciente problema de la resistencia a múltiples fármacos.

Cuando se prueban como proteínas purificadas recombinantes, han demostrado tener actividades bactericidas tanto como agentes individuales como en combinaciones con otros antimicrobianos, mostrando sinergias *in vitro* y actividades potentes en modelos animales de infección mayores que los agentes individuales solos (Wittekind, 2016). Se describen algunos tipos de combinaciones:

Combinaciones con antibióticos contra bacterias Gram positivas en biopelículas: se demostró que las combinaciones de lisostafina con antibióticos (vancomicina, oxacilina) eran más efectivas en el tratamiento de infecciones basadas en biopelículas que cualquiera de los agentes solos. También puede cumplir funciones en el entorno de la biopelícula al debilitar las paredes celulares de las células persistentes (lo que permite su muerte por el antibiótico). (Walencka et al., 2006)

Combinaciones entre PGH contra bacterias Gram positivas: Los primeros estudios de sinergia con diferentes especificidades fueron para la combinación lisostafina-lisozima. Se observó actividad sinérgica *in vitro* contra diez especies de estafilococos, aunque la concentración de lisozima requerida fue alrededor de 1000 veces mayor que la requerida para la lisostafina (Cisani et al., 1982)

Actualmente la única PGH aprobada como aditivo alimentario es la lisozima (muramidasa), aunque se busca que otras enzimas antimicrobianas provengan de bacterias que no sean

consideradas patógenas para que sea seguro su consumo (Carrillo, 2013). También se han implementado conjugados como la lisozima con la goma arábica (hidrocoloide) para crear productos multifuncionales con propiedades funcionales y antimicrobianas mejoradas, se aplica a productos alimenticios como conservante natural, aplicable en sectores de la industria alimentaria, como la producción de mayonesa (Hashemi et al., 2018).

Otro ejemplo de PGH con posible aplicación (principalmente clínica) es la lisostafina, es una endopeptidasa que rompe los puentes cruzados de pentaglicina en el peptidoglucano de diversas especies de *Staphylococcus* (Boksha, 2016). Debido a que proviene de una bacteria patógena aún no hay aplicaciones en alimentos como bioconservador. Una alternativa es el uso de organismos iniciadores utilizados en la producción de alimentos fermentados (como las bacterias ácido-lácticas) para la expresión y secreción de antimicrobianos en el producto deseado (Haddad Kashani et al., 2017).

1.6 Caracterización mediante análisis bioinformático

Estudios recientes sobre la biología estructural de las PGH (Alcorlo et al., 2017) revelan una gran diversidad en la forma en que las peptidoglucan hidrolasas, esenciales para la supervivencia bacteriana, se regulan y realizan sus actividades catalíticas.

En el caso de las glucosaminidasas, la NagZ de *Vibrio cholerae* (figura 4a) es la única N-acetilglucosaminidasa citoplasmática identificada hasta ahora que puede romper no solo su sustrato natural sino también GlcNAc-MurNAc, participa en el reciclaje de la pared celular en bacterias Gram-negativas. En *Streptococcus pneumoniae* (figura 4b), la glucosaminidasa LytB es una proteína de unión a colina, tiene un papel fundamental en la división celular. La hidrólisis de LytB se produce en sitios con restos de GlcNAc totalmente acetilados, lo que sugiere un mecanismo asistido por sustrato.

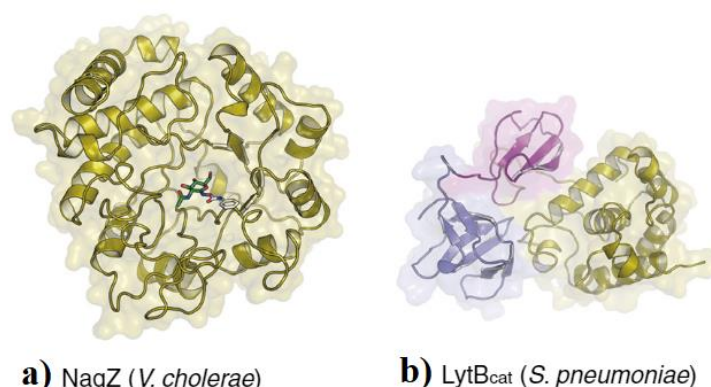


Figura 4. La estructura cristalina de la glucosaminidasa a) NagZ de *V.cholerae* en complejo con PUGNAc (código PDB20XN) y el dominio catalítico de b) LytB de *S.pneumoniae*. Los dominios catalíticos se muestran en verde, mientras que los dominios WW y SH3b en LytB están coloreados en púrpura y azul, respectivamente. (Modificado Alcorlo et al., 2017).

En el caso de las lisozimas (figura 5), se han reportado algunas estructuras de lisozimas bacterianas como la autolisina LytC de *S. pneumoniae* o lisozimas de fagos como SPN1 y Psm. La LytC es una proteína con unión a colina que está relacionada con un mecanismo de depredación programado por competencia de células hermanas no competentes. Su rara conformación restringe la hidrólisis del peptidoglucano a cadenas no entrecruzadas.

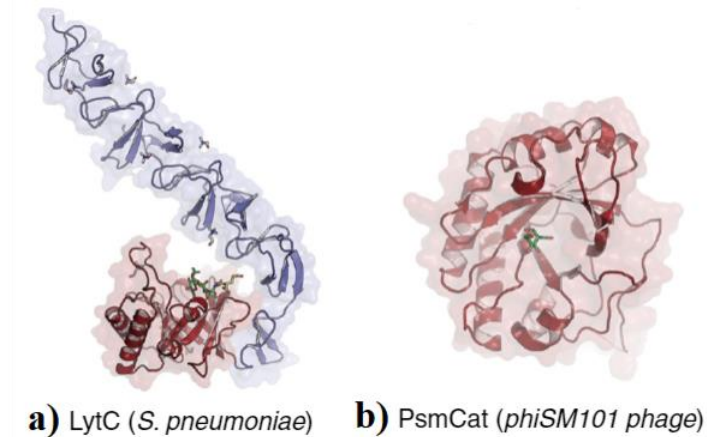


Figura 5. Las estructuras cristalinas de la lisozima a) LytC de *S.pneumoniae* en un complejo con un fragmento PG (código PDB2WWD), y el dominio catalítico de b) Psm de *phiSM101* en un complejo con NAG (código PDB4KRU). Los dominios catalíticos y de unión se colorean en rojo y azul, respectivamente. (Modificado Alcorlo et al., 2017).

Las LT tienen funciones importantes en la aptitud bacteriana, como el crecimiento, la división, la inserción de pili o el reciclaje de la pared celular y sus actividades también están directamente relacionadas con el efecto letal de los antibióticos β -lactámicos.

SltB3 de *Pseudomonas aeruginosa* (figura 6b) tiene cuatro dominios dispuestos en una conformación anular única con el sustrato de peptidoglucano lineal polimérico que pasa a través de la abertura del anillo de la enzima.

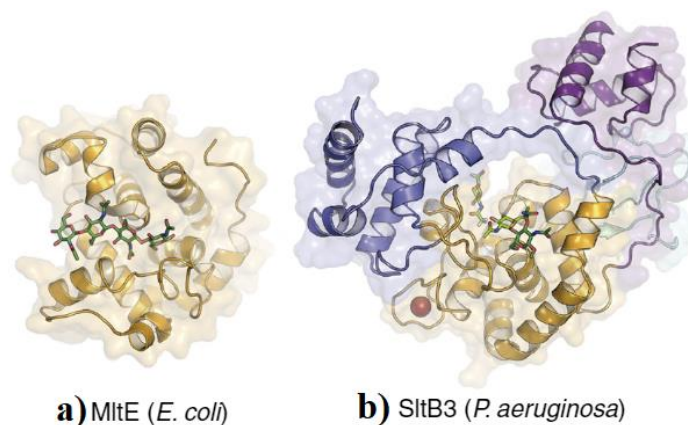


Figura 6. Las estructuras cristalinas de las transglucosilasas líticas. Los dominios catalíticos son de color naranja. a) MltE (PDB 4HJZ) se muestra con quitopentaosa unida (verde oscuro) y b) SltB3 en complejo con pentapéptido NAG-NAM (PDB 5A08). Todos los ligandos están representados en barras con péptidos en cadenas amarillas y de glicanos en verde oscuro, verde claro o salmón correspondientes a NAG, NAM o anhNAM, respectivamente. (Modificado Alcorlo et al., 2017).

Las amidasas (figura 7) desempeñan funciones importantes en la división celular (AmiA, AmiB y AmiC de *Escherichia coli*, AmiE en *Staphylococcus epidermidis*), en la resistencia a los antibióticos (AmpDh2 y AmpDh3 de *Pseudomonas aeruginosa*), en el reciclaje de PG (*AmpD* de bacterias Gram-negativas), o en autólisis bacteriana y lisis fratricida (LytA de *S.pneumoniae*).

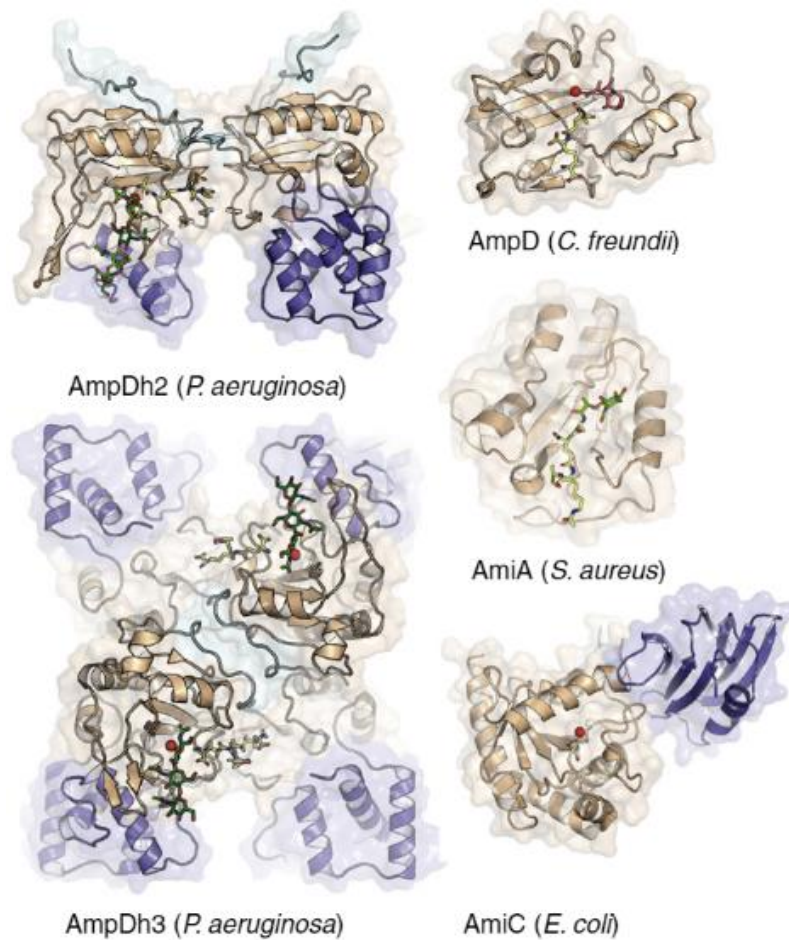


Figura 7. Las estructuras cristalinas de las amidasas. Dominios catalíticos coloreados en marrón claro y dominios restantes en azul (Alcorlo et al., 2017).

Las carboxipeptidasas tienen un papel crucial en la biosíntesis y el reciclaje de la pared celular bacteriana. Es importante destacar que la reutilización de péptidos en la vía de síntesis de mureína se limita a tripéptidos y, de hecho, se requiere una actividad L, D-carboxipeptidasa para reutilizar los componentes de la pared celular.

VanXYc es una D, D-carboxipeptidasa dependiente de Zn^{2+} , que hidroliza tanto dipéptidos como pentapéptidos (figura 8a). La estructura de VanXYc revela la base molecular de su especificidad hacia los precursores sensibles a la vancomicina y explica la función dual de VanXYc.

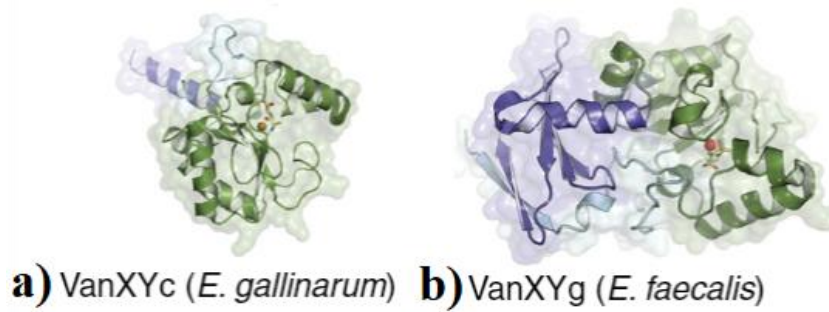
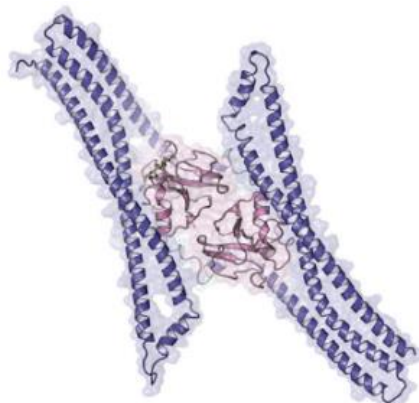


Figura 8. Las estructuras cristalinas de carboxipeptidasas. a) VanXYc en complejo con D-Ala (PDB 4MUT) y b) VanXYg en complejo con D-Ala-D-Ala (PDB 4OAK). Dominios catalíticos coloreados en marrón claro y dominios restantes en azul. (Modificado Alcorlo et al., 2017).

Las endopeptidasas están involucradas en múltiples procesos considerados esenciales para las bacterias, incluido el crecimiento y la división celular. Algunas de estas proteínas son miembros de la denominada superfamilia CHAP que incluye las familias de peptidasas CHAP y NlpC / p60. Los datos de la literatura indican que las proteínas NlpC / p60 y CHAP rompen enlaces peptidoglucanos distintos. De particular interés es PcsB de *S. pneumoniae* (figura 9), una proteína modular involucrada en la división celular que contiene un dominio CHAP y una bobina principal en espiral.



PcsB (*S. pneumoniae*)

Figura 9. La estructura cristalina de la endopeptidasa PcsB (PDB code 4CGK). Dominios catalíticos coloreados en marrón claro y dominios restantes en azul. (Modificado Alcorlo et al., 2017).

La futura determinación de la estructura tridimensional de las PGH proporcionará información valiosa para elucidar los mecanismos moleculares subyacentes al reconocimiento del sustrato. La identificación y caracterización de nuevas hidrolasas de peptidoglucano también proporcionará información para comprender mejor la fisiopatología de varios patógenos.

2. Antecedentes

2.1 Bacterias Acido lácticas

Las bacterias acido-lácticas (BAL) presentan un gran potencial para su uso en el proceso de producción de alimentos, debido a su seguridad en su consumo (GRAS), así como por su capacidad de bioconservación debido a que estas bacterias pueden producir compuestos con actividad antimicrobiana como ácidos orgánicos que provocan la disminución del pH, el cual permite la inhibición de bacterias; y compuestos de naturaleza proteica tales como bacteriocinas y peptidoglucan hidrolasas. También que contribuyen en la producción de compuestos responsables de algunas de las características organolépticas (aroma, sabor, textura) y nutricionales de los alimentos (Sagdic et al., 2016).

2.2 Enzimas líticas de *Pediococcus acidilactici*

El género *Pediococcus* está conformado por bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, no esporuladas, homofermentativas; la especie *P. acidilactici* se ha utilizado en fermentaciones naturales y controladas de verduras y embutidos, además esta especie produce compuestos antimicrobianos que pueden utilizarse como cultivos protectores o biopreservantes en alimentos por el uso de los cultivos o sus productos (Papagianni, 2009).

Pediococcus acidilactici ATCC 8042 es una bacteria ácido-láctica utilizada como cultivo iniciador en productos cárnicos maduros en los que ha presentado efecto bioconservador e inhibidor del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y de mesófilos aerobios (Rivera et al., 2004) dicho efecto bioconservador es conferido por la actividad de peptidoglucano hidrolasa intracelular (García-Cano et al, 2011).

En investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo se reportó la producción de dos proteínas por parte de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 localizadas mayoritariamente en la fracción correspondiente a las proteínas unidas a membrana capaces de hidrolizar células de *Micrococcus lysodeikticus*. Se reportaron dos bandas con actividad lítica a los 110- y 99-kDa en extractos celulares de esta cepa evaluados por zimografía contra *M. lysodeikticus*.

La actividad antimicrobiana de dichas enzimas en conjunto se determinó con pruebas de difusión en agar contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus paracasei*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli*; por turbidimetría, contra *M. lysodeikticus* y por zimograma, contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con resultados positivos (García-Cano et al., 2011; Velasco Pérez, 2010; García-Cano, 2013).

Ambas proteínas también fueron secuenciadas y se determinó utilizando el programa BLAST que aquella con peso molecular de 99-kDa presentaba dos dominios conservados: uno de N-acetilglucosaminidasa y otro de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa, típicos en las peptidoglucan hidrolasas; mientras que la proteína de 110-kDa tenía regiones características de un transportador ABC con un 47% de cobertura y un 100% de identidad.

```

1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
61 TLAKPATVKA SSSAAVTAQSA APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV
121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
181 NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
241 TNNKIIVAHA VGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
301 WANENAPVQV ELAQYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT
361 EHVWGNHVDP YGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN
421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNNHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
541 KGKSYKVIQT NGNRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNGN NHHNNGNTES
601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDKVISWI NKGDVHLPGS
661 NGSQNNNNNN NNHANNNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYYGVKGKT YKVIQMNGNR
721 LLLDKVISWI NKGDVYVPGS SNNNSNSN NHNNNGSNYH FTNQNWTAQ TQNFVNSIASD
781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
901 TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

```

Figura 10. Secuencia en aminoácidos de la enzima de 99-kDa reportada en el genoma de *P.acidilactici* 7_4. Verde: péptido señal Rojo: dominio de la N-acetilmuramil-L-alanina amidasa Azul: dominio de N-acetilglucosaminidasa [RefSeq: WP_002829921; NCBI] (Campos, 2015).

Posteriormente la proteína de 99-kDa se clonó y expresó en el vector pET-19b, se purificó por medio de columna de exclusión molecular, posteriormente se realizó otro espectro antimicrobiano, en el que disminuyó el número de cepas susceptibles, sobre todo en Gram negativas (Tabla 1) [García-Cano et al, 2011].

Tabla 1. Inhibición de cepas bacterianas por PGHs provenientes de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 [García- Cano et al, 2011].

Cepa		Extracto con las PGHs 110 y 99-kDa	PGH recombinante de 99-kDa
Gram positivas	<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	✓	✓
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	✓	✓
	<i>Lactobacillus paracasei</i> CFQ-B-90	✓	✓
	<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	✓	✓
	<i>Enterococcus faecalis</i> QB	✓	✓
	<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	✓	ND
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	✓	ND
Gram negativas	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 27853	✓	ND
	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	✓	ND
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ND	ND

ND= no detectable

2.3 Subclonación de la proteína bifuncional

La proteína de 99-kDa se encuentra reportada como peptidoglucan hidrolasa bifuncional (GenBank: AKD44141) por presentar dos dominios catalíticos: de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y de N-acetilglucosaminidasa.

Existen reportes de enzimas con actividad bifuncional que contienen los dominios de N-acetilmuramil-L-alanina y N-acetilglucosaminidasa producidas por el género *Staphylococcus* (Yokoi et al, 2008). En la tabla 2 se presentan varios ejemplos de otras enzimas bifuncionales provenientes de distintas bacterias con actividades similares a la PGH bifuncional de 99-kDa, de acuerdo a su espectro antimicrobiano tienen actividad lítica contra algunos microorganismos reportados en la tabla 1. Estas enzimas presentan una secuencia de aminoácidos entre los dominios catalíticos, las cuales se denominan secuencias repetidas y se han relacionado con el anclaje a membrana celular. Algunos autores han generado proteínas recombinantes con un solo dominio catalítico variando la longitud de la región intermedia, además estas enzimas han tenido actividad lítica de manera independiente (Bourgeois et al, 2009).

Tabla 2. Peptidoglucan hidrolasas bifuncionales

Gen	Tipo de PGH	Descripción	Espectro antimicrobiano
AtIL de <i>Staphylococcus lugdunensis</i> (Bourgeois et al., 2009)	Autolisina	Con dominio N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa. Gen de 3837 pb, péptido señal de 29 aminoácidos.	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>S. lugdunensis</i>
Del bacteriófago estreptocócico grupo B (GBS) (Pritchard et al., 2004)	Muramidasa (lizosima) y endopeptidasa	Con dominio N-acetilmuramidasa asociado con la actividad de la lisozima, y un dominio CHAP (cisteína, amidohidrolasas / peptidasas dependientes de histidina) asociado con actividad endopeptidasa	Estreptococo b-hemolítico grupos A,B,C,E y G
AtIL de <i>Staphylococcus aureus</i> (Oshida et al., 1995)	Autolisina	Con dominio N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y endo- β - N-acetilglucosaminidasa	<i>M.luteus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>

También las enzimas líticas provenientes de fagos han sido muy estudiadas respecto a las peptidoglucan hidrolasas (tabla 3). La literatura revela un gran potencial de las enzimas de fagos en la atención de la salud humana y la medicina veterinaria para el control de patógenos y el tratamiento de diversas infecciones sistémicas (Rodríguez et al., 2013).

Las endolisinas de bacteriófago son enzimas mureolíticas que degradan enlaces específicos (peptidoglucanos en la pared celular bacteriana), son codificadas por el genoma del bacteriófago, se sintetizan al final del ciclo de vida del fago lítico y se dirigen a la lisis de la célula huésped y la liberación de viriones recién producidos (Patiagia et al., 2013). Además de esta "lisis desde dentro", las endolisinas de los fagos de los huéspedes Gram positivos también pueden lisar rápidamente las bacterias tras la aplicación exógena. Reciben el nombre de hidrolasas asociadas a viriones y endolisinas.

Tabla 3. Principales características de hidrolasas asociadas al virión (Modificado Rodríguez et al., 2013).

Fago	Hospedero	Proteína	Localización	Características
T4	<i>Escherichia coli</i>	Pb2	Fibras	Dominio lisozima
P68	<i>Staphylococcus aureus</i>	P17	Desconocida	Actividad contra aislados de <i>S.aureus</i>
phiMR11	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gp61	Tallo	Dominios CHAP y LYZZ
SP-β	<i>Bacillus subtilis</i>	CwIP	Desconocida	Actividad endopeptidasa y muramidasa
phiIPLA88	<i>Staphylococcus aureus</i>	CHAPSH3b	Desconocida	Sinergia con endolisina LysH5

Con estos antecedentes bibliográficos, se generaron 8 subclonas que contenían un dominio catalítico y una parte de la región intermedia reportada como rica en asparaginas (Campos, 2015), para la elaboración de las construcciones se empleó el vector pET-22b y la transformación se realizó con *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS.

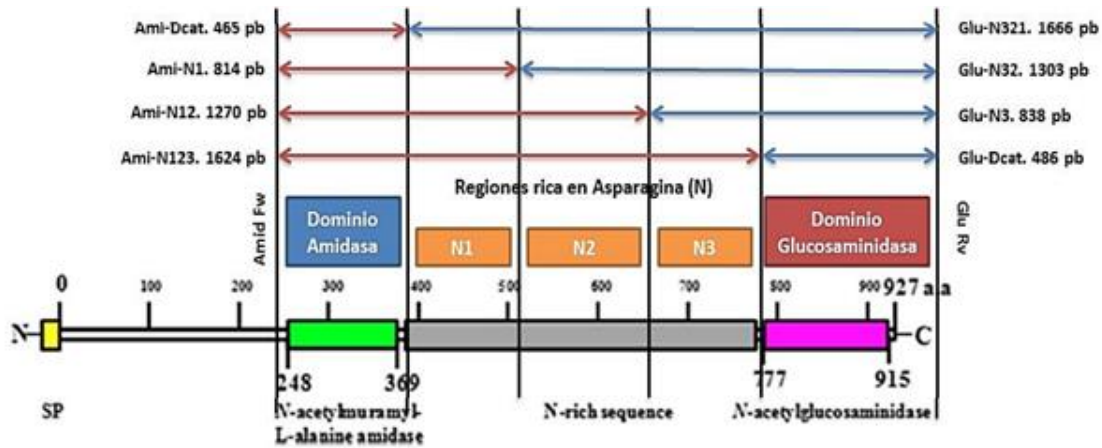


Figura 11. Subclonas de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa (Campos, 2015).

Al momento de nombrar las subclonas generadas se les asignó el prefijo Ami (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa) o Glu (N-acetilglucosaminidasa) dependiendo del dominio catalítico que contenían, Dcat si sólo contenía el dominio catalítico y N1, N12 o N123 de acuerdo con la región intermedia que abarcaba la construcción. Así, las construcciones generadas fueron las siguientes.

Tabla 4. Subclonas generadas para ambos dominios [Campos, 2015].

Subclona Dominio amidasa	Peso molecular kDa	Subclona Dominio glucosaminidasa	Peso molecular kDa
AmiDcat	20	GluDcat	22
AmiN1	31	GluN3	31
AmiN12	55	GluN32	51
AmiN123	65	GluN321	65

Se demostró que ambos dominios catalíticos (N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa) presentan actividad lítica independiente. Del dominio de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa la única subclona que presentó actividad lítica fue AmiN123 y del dominio de N-acetilglucosaminidasa las 3 subclonas que contienen región espaciadora (GluN3, GluN32 y GluN321) presentaron actividad lítica en zimograma contra *M. lysodeikticus* (Campos, 2015).

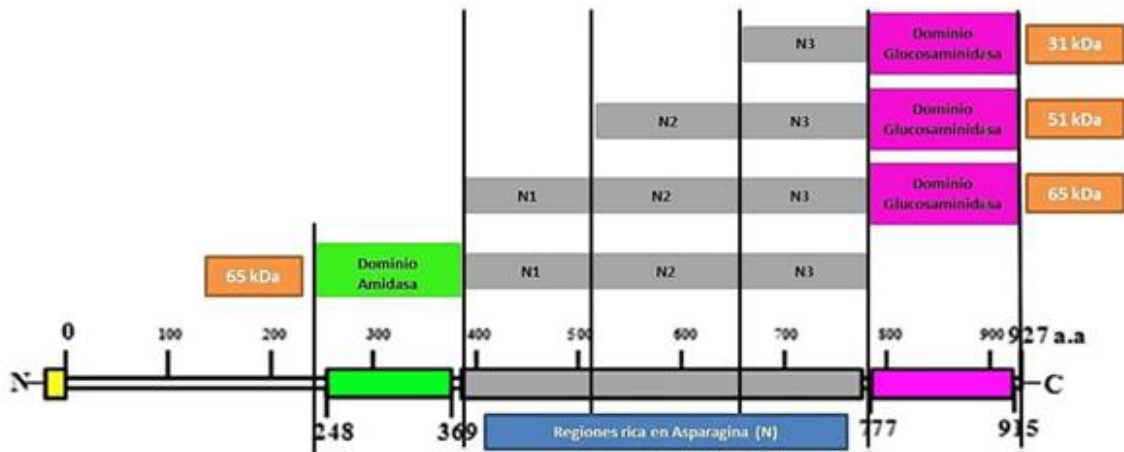


Figura 12. Subclonas en las cuales se detectó actividad lítica en zimogramas contra *M.lysodeikticus*. La masa molecular (kDa) se muestra en el recuadro naranja (Campos, 2015).

Se seleccionaron las subclonas AmiN123 y GluN32 para determinación del espectro antimicrobiano al ser las que mostraron mayor actividad lítica en zimogramas, este se comparó con el espectro generado por la proteína recombinante intacta, así como con el de la mezcla de dos enzimas producidas por el microorganismo (110-kDa y 99-kDa) (Ortega, 2017). Por el método de difusión en agar se encontró actividad antimicrobiana de la subclona GluN32 (Glu 32), del dominio de N-acetilglucosaminidasa, contra *S. aureus* y *L. monocytogenes* y de la subclona AmiN123 (Ami 123), del dominio de N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa, contra *L. paracasei* y *E. faecalis*.

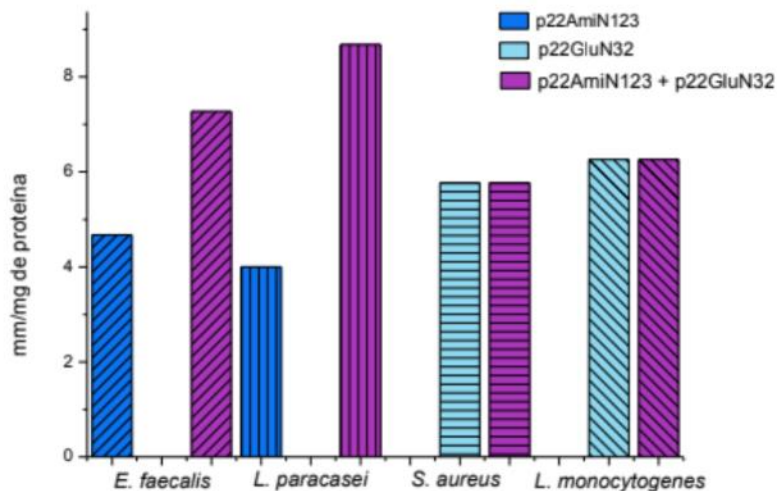


Figura 13. Comparación de la actividad inhibitoria de las subclonas de ambos dominios y la mezcla de las mismas por el método de difusión en agar (Ortega, 2017).

El perfil antimicrobiano es diferente dependiendo el dominio, de acuerdo con la tabla 5 y 6 se observa que, para ambos dominios su espectro antimicrobiano abarca principalmente bacterias Gram positivas y en menor medida bacterias Gram negativas. Por lo que al usarse en combinación es probable que su espectro antimicrobiano sea más amplio.

Tabla 5. Comparación de espectro antimicrobiano con el dominio N-acetilglucosaminidasa

Bacteria	Peptidoglucan hidrolasa	Referencia
Gram +	AtID: <i>E. faecium</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>M. lysodeikticus</i> , <i>L. innocua</i> y <i>S. aureus</i>	Serrano-Maldonado et al., 2018
	NAGasa: <i>A. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. agalactiae</i>	Hussain et al., 1992
Gram -	NAGasa: <i>P. aeruginosa</i>	Hussain et al., 1992

Tabla 6. Comparación de espectro antimicrobiano con el dominio N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

Bacteria	Peptidoglucan hidrolasa	Referencia
Gram +	LytA: <i>S. pneumoniae</i>	Rodríguez-Cerrato et al., 2007
	PL3: <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pseudopneumoniae</i> , <i>S. oralis</i> , and <i>S. mitis</i>	Blázquez et al., 2016
	UAM-MG-3: <i>E. faecium</i> , <i>M. lysodeikticus</i> , <i>L. innocua</i>	Lopez-Arvizu et al., 2021
	CwlA: <i>B. subtilis</i>	Kuroda and Sekiguchi, 1992
	PGRP-SB1: <i>B. megaterium</i>	Mellroth et al., 2006
	AmiLysM4: <i>L. mesenteroides</i>	Arvizu et al., 2019
Gram -	UAM-MG-3: <i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i>	Lopez-Arvizu et al., 2021
	PGRP-SB1: <i>E. coli</i>	Mellroth et al., 2006
Ácido-lácticas	UAM-MG-3: <i>P. acidilactici</i> , <i>W. viridescens</i>	Lopez-Arvizu et al., 2021
	AmiLysM4: <i>W. viridescens</i>	Arvizu et al., 2019

En el caso de la proteína de 99-kDa, cuando se mezclaron ambas enzimas hubo un aumento en la actividad contra las bacterias ácido lácticas (*L. paracasei* y *E. faecalis*), lo que sugiere que el dominio de N-glucosaminidasa, aunque por sí sólo no tiene efecto contra éstas, si tiene un impacto sobre las mismas. La mezcla de ambas enzimas comparada con la enzima recombinante completa de 99-kDa tiene el mismo espectro, a excepción de que ésta última también tiene actividad contra *P. acidilactici* (Ortega, 2017).

3. Justificación

La industria de alimentos busca obtener productos más seguros, mínimamente procesados, con calidad lista para comer y una mayor vida útil. Hoy en día las técnicas tradicionales de conservación de los alimentos alteran su estado y pierden algunos nutrientes, por lo tanto, las técnicas modernas, tales como la bioconservación o irradiación de alimentos son más adecuadas para poder lograr la seguridad y la calidad de los alimentos. Por otra parte, el crecimiento en la demanda de alimentos menos procesados, así como el aumento en la venta de alimentos listos para su consumo requieren una amplia y compleja cadena de producción, lo cual incrementa el riesgo de contaminación microbiológica (García et al., 2011).

A pesar de las tecnologías modernas, buenas prácticas de fabricación, el control de calidad y los conceptos de higiene y seguridad, durante los últimos años se han registrado aumentos significativos en la incidencia de las enfermedades provocadas por microorganismos transmitidos por alimentos. Estas enfermedades se encuentran entre las más graves y costosas preocupaciones de salud pública en todo el mundo, siendo una importante causa de morbilidad, generando que se busquen nuevas alternativas para su control.

La bioconservación busca la extensión de la vida de anaquel, y seguridad de un alimento a través del uso de cultivos microbianos controlados y/o de sus compuestos con actividad antimicrobiana, como son las peptidoglucan hidrolasas (PGH) (De la Fuente et al., 2010). Por otra parte, se logra un alimento con gran calidad y mínimas pérdidas nutricionales y organolépticas (Singh et al., 2018). Las peptidoglucan hidrolasas, enzimas encargadas de hidrolizar el peptidoglucano (principal componente de la pared celular de bacterias), presentan una alternativa, siendo que su mecanismo de acción es diferente al de los antibióticos (Olvera et al., 2015). Existe entonces la posibilidad de diseñar enzimas con un amplio espectro antimicrobiano que puedan emplearse en la industria de alimentos para combatir el problema de resistencia a antibióticos. Además, podrían ser empleadas como antimicrobiano sobre superficies o bien directo sobre el alimento.

El presente proyecto tiene como objetivo determinar cuáles son las condiciones óptimas de inducción, producción y almacenamiento de las subclonas recombinantes Ami 123 y Glu 32 correspondientes a la peptidoglucan hidrolasa bifuncional de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, como etapa previa a la caracterización bioquímica.

Por otra parte se generarán los modelos de interacción con el peptidoglucano para ambas clonas por separado para poder dilucidar si la actividad de peptidoglucan hidrolasa correspondiente a cada subclona requieren la región de asparaginas para que se manifieste la actividad lítica, o si sólo se debe a alguno de los dos dominios presentes en la secuencia de aminoácidos, y cómo se da su interacción con el peptidoglucano, con el fin de contar con elementos para el diseño de proteínas líticas de amplio espectro antimicrobiano.

4.Hipótesis

Los dominios N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa de la proteína de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, así como las subclonas Ami123 y Glu32 tendrán diferencias en su sitio de interacción con peptidoglucano, así como en sus regiones catalíticas que explicarán sus diferentes espectros de acción antimicrobiana.

5.Objetivo general

Determinar características estructurales y bioquímicas de ambos dominios de la proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 que participan en la interacción con el peptidoglucano mediante análisis bioinformático y bioquímico.

5.1 Objetivos específicos

- Obtener las condiciones óptimas de producción de las proteínas Ami 123 y Glu 32.
- Determinar la actividad antimicrobiana mediante zimogramas y actividad específica.
- Definir las condiciones de almacenamiento óptimas para la actividad enzimática de las proteínas recombinantes Ami 123 y Glu 32.
- Caracterizar bioquímicamente la proteína de 99-kDa y sus 2 dominios catalíticos.
- Generar un modelo estructural de las subclonas y de sus dominios por separado e identificar sus interacciones con el peptidoglucano.

6. Metodologías

Caracterización de la actividad glucosaminidasa y amidasa de la peptidoglican hidrolasa de 99-kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

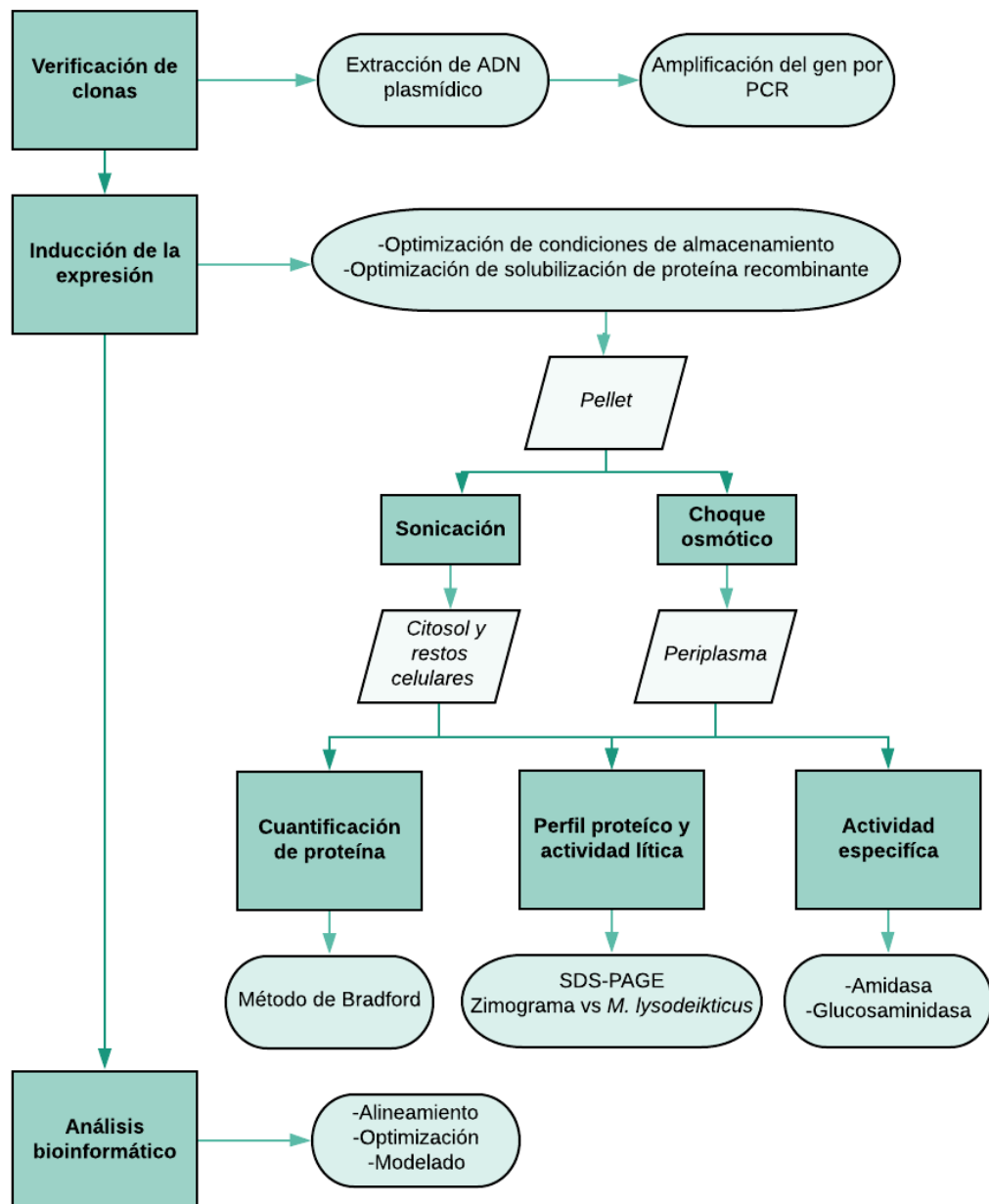


Figura 14. Diagrama de la metodología general.

6.1 Verificación de clonas

6.1.1 Cepas utilizadas

Las cepas usadas se describen en la siguiente tabla:

Tabla 7. Descripción de las cepas y plásmidos utilizados

Cepa / Plásmido	Observaciones
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	Cepa de colección ATCC
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa de clonación y expresión
pET 22b	Vector de expresión, resistencia a ampicilina promotor T7 lac, Hi-Tag en el amino terminal, péptido señal <i>pelB</i> leader, tamaño 5.493 kb (Novagen, USA)

6.1.2 Extracción de ADN plasmídico

Para verificar que las cepas todavía tuvieran el inserto deseado (p22Ami123 y p22Glu32) se realizó una extracción del ADN plasmídico utilizando el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones señaladas por el proveedor.

6.1.3 Amplificación del gen de interés por PCR

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del gen que codifica a los dominios de la proteína recombinante de 99-kDa por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como templado el ADN plasmídico previamente extraído y los cebadores específicos (tabla 8) diseñados por Campos (2015). Los cebadores utilizados son los siguientes:

Tabla 8. Cebadores específicos para los dominios de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y N-acetilglucosaminidasa.

Dominio	Primer	Dirección	Secuencias (5'-3')	Long.	Tm (°C)
Amidasa	Amid Fw	Forward	CTCGAGCTCAGGTAGCGATCAAAAG	25	59.3
	N123 Rv	Reverse	CAGAAGCTTTTGAGCAGCCGTCCA	24	59.1
Glucosaminidasa	N32 Fw	Forward	CTGAGCTCTTCCGGTTCGTCAAACAA	26	59.5
	Glu 32 Rv	Reverse	CGGAAGCTTCAACGAAATTGCTGAG	25	57.7

Las condiciones térmicas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 9. Condiciones térmicas de la PCR de ADN plasmídico

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineamiento	55	30 s	
Extensión	72	4 min	
Extensión final	72	10 min	1

El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 % (m/v) utilizando amortiguador TAE 1x. Los productos obtenidos de la PCR se mezclaron con amortiguador de carga 6x. La electroforesis se corrió a 90 V durante 1 hora y el gel se reveló con bromuro de etidio al 0.01 % sobre un transiluminador de luz UV.

6.2 Inducción de la expresión de la proteína recombinante

6.2.1 Optimización de condiciones de almacenamiento

Se realizó un preinóculo partiendo de las clonas transformadas con los genes (Ami 123 y Glu 32) y la cepa *E. coli* BL21+ pET-22b vacío (control negativo), en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (100 µg/mL). Se incubó a 37°C, 250 rpm por 12 horas. El preinóculo se resembró tomando una alícuota del 1% con respecto al volumen de inducción (25 mL del medio LB) con las mismas condiciones de incubación hasta tener una DO_{600nm} entre 0.4-0.6. Después se realizó la inducción con 1 mM IPTG a 22°C, 250 rpm por 18 horas.

Al terminar la inducción se obtuvieron dos fracciones: pellet (células) y sobrenadante al centrifugar el medio a 7500 rpm, 20 min a 4°C. El sobrenadante se desechó, las células se resuspendieron en Tris-HCl pH=8 100 mM (20 mL por cada gramo de pellet húmedo) y se sonicaron por 7 minutos (Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer, Fisher Scientific, USA) empleando pulsos de 20 segundos e intervalos de descanso de 40 segundos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C, obteniéndose dos fracciones: citosol y restos celulares (finalmente se resuspendieron en 300 µL de Tris-HCl pH=8 100 mM).

6.2.2 Optimización de la solubilización de la proteína recombinante

Buffer previo a sonicación

Se realizó una metodología previa a la sonicación para obtener una mayor cantidad de la proteína de interés. De acuerdo a Scheurwater (2007), el pellet de células se resuspendió en buffer $NaPO_4$ 50 mM pH=8, NaCl 300 mM (20 mL de buffer por cada gramo de pellet húmedo).

Posteriormente se agregó un inhibidor de proteasas PMSF 100 mM solubilizado en isopropanol, se adicióno 200 µL por cada 20 mL de células resuspendidas. Finalmente por cada 20 mL de células resuspendidas se agregaron 50 µL DNAsa y 250 µL de RNAsa, la mezcla se mantuvo en agitación ligera en un baño de hielo por 30 minutos, una vez terminado el tiempo se procedió a sonicar por 7 minutos (Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer, Fisher Scientific, USA) empleando pulsos de 20 segundos intervalos de descanso de 40 segundos a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 15 minutos a 4°C, obteniéndose dos fracciones: citosol y restos celulares que finalmente se resuspendieron en 300 µL de Tris-HCl pH=8 100 mM.

Choque osmótico (obtención de fracción periplásmica)

Mediante el protocolo de choque osmótico (Manual de PET) se obtuvieron las proteínas de interés en la fracción periplásmica, siendo una alternativa a la sonicación. Las células obtenidas de la inducción se resuspendieron en 30 mL Tris-HCl 30 mM sacarosa al 20% pH=8, posteriormente se agregó 60 mL 0.5 M EDTA pH=8 y se mezclaron lentamente por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, se deshecho el sobrenadante. El sedimento se resuspendió lentamente en 30 mL MgSO₄ 5 mM por 10 min en baño de hielo. Finalmente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido corresponde a la fracción periplásmica

6.2.3 Cuantificación de proteína

Se determinó para cada una de las muestras usando el método de Bradford (1976) con un kit comercial (Protein Assay Bio-Rad), se hizo una curva patrón con albúmina sérica bovina; para las muestras se colocaba en el pozo con agua destilada teniendo un volumen final de 160 µL, finalmente se agregó 40 µL de reactivo de Bradford, se homogeneizo y se colocó en un lector de microplacas.

6.3 Determinación del perfil proteico por SDS y actividad lítica en zimograma con

Micrococcus lysodeikticus

Cada una de las fracciones se analizó mediante SDS-PAGE según la metodología descrita por Laemmli (1970) y el Manual MINI-PROTEAN 3. El gel se preparó con distintos reactivos (Acrilamida al 30%, Tris-HCl 2 mM pH=8.8, Tris-HCl 1 mM pH=6.8, agua destilada, SDS al 10%, TEMED y APS al 10%), posteriormente fue teñido con azul de coomassie y finalmente se utilizó una solución desteñidora (metanol, ácido acético glacial y agua destilada). A las bandas obtenidas se les determinó el peso molecular por la comparación con el marcador de peso molecular Page-Ruler de 10-180 kDa de Thermo Scientific.

Cada una de las fracciones se analizó mediante zimogramas, el gel se preparó de igual forma que el SDS con células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* de acuerdo a la metodología descrita por Leclerc y Asselin (1989), el gel se incubó con solución renaturalizante (Tris-HCl pH=8 100mM con 1% Triton) por 12 h y posteriormente se tiñó el gel con azul de metileno al 0.1% por 15 minutos, se destiñó con agua destilada hasta la observación de bandas de actividad lítica

6.4 Determinación de actividad específica

6.4.1 N-acetilglucosaminidasa

Se determinó la actividad de N-acetilglucosaminidasa a la proteína recombinante solubilizada en Tris-HCl pH 8 empleando como control la cepa *E. coli* BL21+ pET22b vacío, siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® para la detección de enzimas con actividad de N-acetilglucosamidasa y modificado por García Cano (2013). Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se adicionaron 80 µL de amortiguador de citrato de sodio pH 4.8 100 mM, 10 µL de una solución de 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosamina (1 mg/mL) y 10 µL de la muestra. La actividad enzimática de la muestra se cuantificó en un lector de placas a 405 nm por 30 minutos (EPOCH Biotek).

6.4.2 N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa

Se determinó la actividad de amidasa a la proteína recombinante solubilizada en Tris-HCl pH 8 empleando como control la cepa *E. coli* BL21+ pET 22b vacío, siguiendo el protocolo descrito por Sigma Aldrich® y por García Cano et al. (2015) para la detección de enzimas con dicha actividad. Se utilizó una microplaca de 96 micropozos. Para cada prueba se adicionaron 80 µL de buffer Tris-HCl pH 8, 10 µL de una solución de hidrocloreuro de L-alanin-p-nitroanilina (1 mg/mL) y 10 µL de la muestra. La actividad enzimática de la muestra se midió con un lector de placas a 405 nm por 30 minutos (EPOCH Biotek).

6.5 Análisis Bioinformático

6.5.1 Alineamiento con secuencias molde

La secuencia de la proteína se obtuvo de la base de datos de secuencias de proteínas del NCBI con el número de acceso WP_036672225.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_036672225.1). La proteína contiene 927 aminoácidos, presenta dos dominios catalíticos: de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa y de N-acetilglucosaminidasa. Una búsqueda en el banco de datos de proteínas RCSB confirmó que la estructura cristalina de rayos X de las peptidoglucan hidrolasas de *P. acidilactici* no está disponible. La búsqueda comenzó con el hallazgo de una serie de secuencias

relacionadas mediante el programa BLAST para revelar estructuras tridimensionales relacionadas con las PGH como molde. Se seleccionaron los moldes más adecuados para el estudio.

6.5.2 Optimización y evaluación de modelos

Después de alinear con la ayuda de BLAST, la consulta y las secuencias de moldes se utilizaron para generar varios modelos provenientes de distintos softwares (ROBETTA, Swiss, Phyre2, PSIPRED y I-TASSER) y así obtener las estructuras de las proteínas en el programa Chimera 1.15.

Posteriormente se optimizaron los modelos al minimizar la energía para aliviar las colisiones y tensiones estéricas (longitudes de unión, ángulos de unión, ángulos de torsión) sin alteraciones significativas en la estructura general con ayuda de Swiss-PDB Viewer. La proteína modelada fue validada por ERRAT, Verify3D, PROCHECK y WHATCHECK por SAVES (el servidor de análisis y verificación de estructuras) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

6.5.3 Selección y preparación de proteínas receptoras

La visualización de las proteínas se llevó a cabo utilizando PyMOL (<http://www.pymol.org/>), una vez que habían sido validados sus modelos. Inicialmente a cada modelo seleccionado optimizado se les removieron los cofactores, H₂O y disolventes, posteriormente se les agregaron los hidrógenos (Forli et al., 2016) para obtener los archivos adecuados al ser las proteínas receptoras que se utilizan en los acoplamientos moleculares.

6.5.4 Selección y preparación de ligandos

Para obtener el ligando deseado, se seleccionaron 2 cristales que contenían distintos tipos de peptidoglucano que posteriormente se obtendrían al remover la proteína y eliminarles H₂O por medio de PyMOL. De cada ligando se obtuvo un archivo con las torsiones deseadas para realizar los acoplamientos moleculares (Forli et al., 2016). Los ligandos utilizados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Ligandos para acoplamientos moleculares

Cristal de referencia	Ligando extraído	PDB
Unión de la pared de células bacterianas a lisozima	Peptidoglucano (NAM-NAG-NAM)	9LYZ
Complejo lisostafina SH3b P4-G5	Peptidoglucano de <i>Staphylococcus aureus</i>	6RJE

6.5.5 Acoplamiento molecular (docking) del dominio y subclona modelados

Para la predicción del sitio de unión de las proteínas, así como para la determinación de las afinidades de unión de los compuestos en los sistemas proteicos se realizaron acoplamientos moleculares de los modelos seleccionados con los ligandos. Se utilizó el software Autodock Vina que realiza el acoplamiento sobre la base de un optimizador global de búsqueda local iterado.

Inicialmente se realizó un docking ciego debido a que no se conoce el sitio de unión para definir las dimensiones de la grid box. Se obtuvo información sobre todos los residuos que interactuaban y que estaban en contacto con cualquiera de los átomos de la proteína. Por lo que se decidió realizar un re-acoplamiento con dimensiones establecidas de la grid box para confirmar los residuos que presentan interacciones.

Todos los ligandos se acoplaron alrededor de la región de unión identificada del receptor. Como resultado, se obtuvieron nueve conformaciones predeterminadas de cada ligando. Se tuvo en cuenta la afinidad de unión máxima de cada ligando acoplado. El análisis de los resultados se realizó en el archivo de resultados de AutoDock Vina utilizando Autodock Tools y Chimera.

7. Resultados y discusión

7.1 Verificación de clonas

Se emplearon las clonas generadas por Campos (2015) correspondientes al dominio N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa (Ami 123) y de N-acetilglucosaminidasa (Glu 32). Se encontró que estaban contaminadas por lo que se realizó una transformación bacteriana con los plásmidos que codifican para cada dominio (Ortega, 2017) y utilizando una nueva cepa hospedera (*E.coli* BL21). Fue necesario corroborar nuevamente después de la transformación si se encontraba la presencia del inserto de interés por medio de la extracción del DNA plasmídico y PCR.

En la figura 15 A, se observan los amplicones reportados por Campos (2015) y resaltado en un rectángulo amarillo el amplicón de interés para el dominio N-acetilmuramil-L-alanina amidasa (Ami 123), como se observa en la figura 15 B se presenta el tamaño esperado de 1624 pb, concluyendo la presencia del inserto dentro de la transformante. De igual manera se corroboró la presencia del inserto de la clona Glu 32 con dominio N-acetilglucosaminidasa, en la figura 16 A se observan los amplicones reportados por Campos (2015) y resaltado en un rectángulo rojo el amplicón de interés (Glu 32) con un tamaño esperado de 1103 pb, en la figura 16 B se puede apreciar que se obtuvo el amplicón esperado.

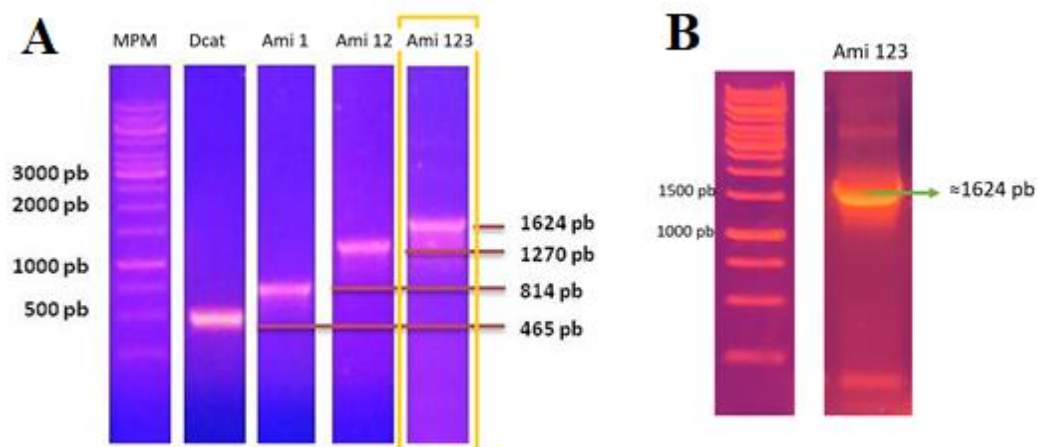


Figura 15. Comparación de productos de amplificación para el dominio N-acetilmuramil-L-alanina amidasa de las subclonas obtenidas por A) Campos Gómez (2015) y B) Ibarra-Luna (2021).

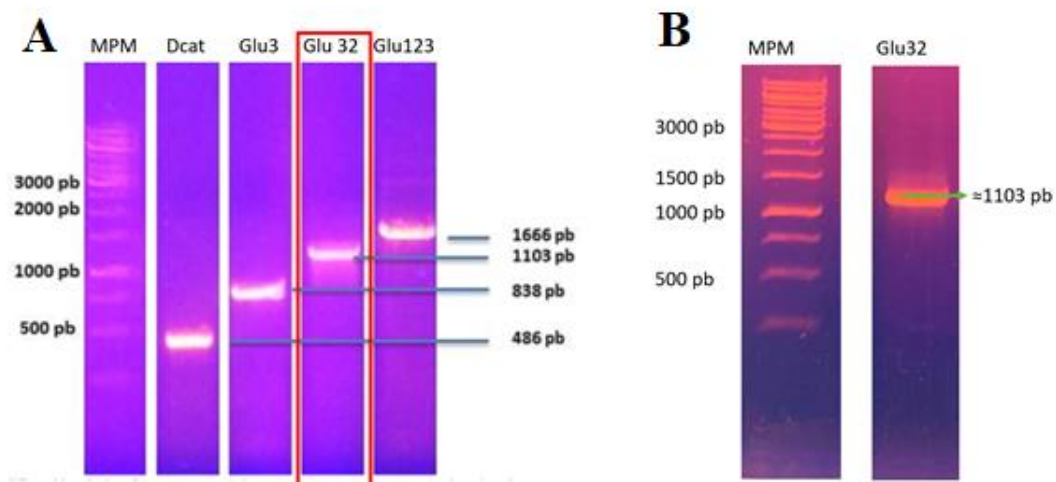


Figura 16. Comparación de productos de amplificación para el dominio N-acetilglucosaminidasa de las subclonas obtenidas por A) Campos Gómez (2015) y B) Ibarra-Luna (2021).

7.2 Inducción de la expresión de proteína recombinante

Se probaron distintas concentraciones de inductor con el objetivo de encontrar la mejor condición para la nueva cepa hospedera. Para la inducción de la expresión de la proteína recombinante, se probaron las concentraciones 0.1, 0.4 y 1 mM del inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 37°C, -250 rpm por 4 h, obteniendo las siguientes fracciones: I. Restos celulares, II. Fracción citosólica y III. Sobrenadante ultrafiltrado.

Como puede observarse en la figura 17 A, correspondiente a la fracción de restos celulares el SDS-PAGE presenta una banda de peso molecular aproximadamente de 65-kDa, la cual corresponde con el peso esperado para la subclona Ami 123 de acuerdo con Campos (2015). Para todas las fracciones correspondientes a Ami 123, se aprecia que las más intensas recaen en la concentración de 0.1 mM y 0.4 mM de IPTG.

En zimograma (figura 17 B) no se observa ninguna banda con actividad lítica, aunque en el perfil proteico se observa la presencia de la proteína. Cabe mencionar que altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* pueden resultar en acumulaciones de las mismas como cuerpos de inclusión (Ortega, 2017) y esto podría ser la razón por la cual la actividad lítica no se observa en zimograma. En el caso de la fracción citosólica y la fracción extracelular ultrafiltrada no se observa la banda al peso molecular esperado en SDS-PAGE ni en zimograma.

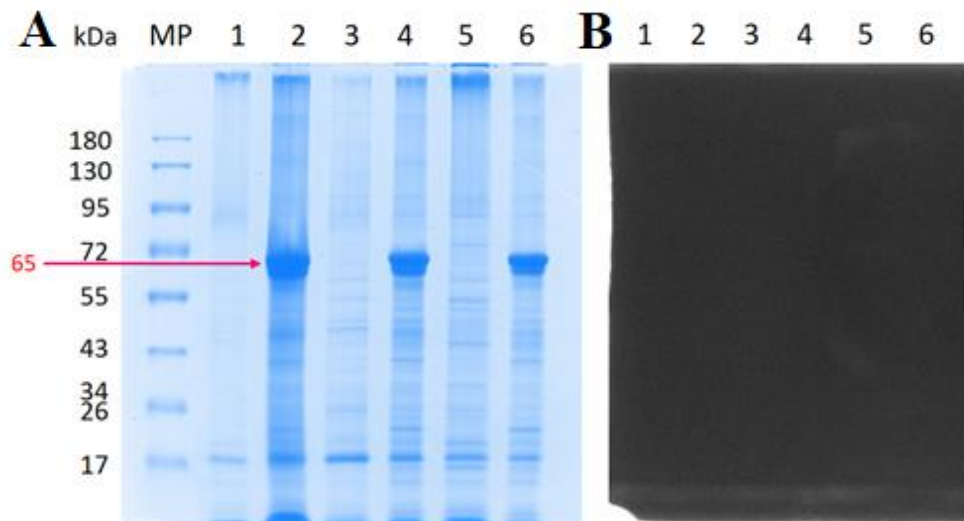


Figura 17. A) SDS-PAGE 10%, B) Zimograma contra *M. lysodeikticus* fracción restos celulares, MP: Marcador de peso molecular, 1. BL21+ P22 0.1 mM IPTG, 2. AMI 123 0.1mM IPTG,3. BL21+P22 0.4 mM, 4. AMI 123 0.4mM IPTG, 5. BL21+P22 1mM, 6. AMI 123 1mM IPTG

Un factor que puede estar afectando la expresión de la proteína es la temperatura de incubación durante la inducción (37°C). Se ha reportado que el crecimiento de *E. coli* a esta temperatura es ideal, sin embargo, muchas proteínas logran ser inducidas a bajas temperaturas o temperaturas extremas para *E. coli*, disminuyendo su velocidad de crecimiento (Jones, et al 1987). El uso de bajas temperaturas tiene las ventajas combinadas de reducir los niveles de transcripción y traducción y de reducir la fuerza de las interacciones hidrófobas que contribuyen al desdoblamiento de proteínas, por lo que cambiar la temperatura de inducción a 4°C podría ser una opción viable para lograr inducir en mayor concentración la proteína de interés.

Posteriormente se determinó el tiempo óptimo de inducción de ambas proteínas recombinantes al inducir con 0.4 mM IPTG, a 4 °C y 250 rpm durante 4, 8, 18 y 24 horas, obteniendo las siguientes fracciones: I. Restos celulares y II. Fracción citosólica.

Al realizar la determinación de actividad específica amidasa se obtuvo una mayor actividad en la fracción de restos celulares comparada con la fracción citosólica (figura 18), evidenciando que la proteína Ami 123 y su actividad específica recaen en la fracción citosólica, aun cuando la inducción se llevó a cabo a una temperatura baja (4°C) comparada con la primera inducción realizada a 37°C, la modificación de la temperatura se realizó con la finalidad de producir proteínas correctamente plegadas y así evitar la formación de cuerpos de inclusión (LaVallie, 1995). Sin embargo, se ha reportado que las proteínas recombinantes sobre-expresadas pueden no adquirir una conformación correcta y sufrir degradación proteolítica o bien se asocien para formar cuerpos de inclusión, lo cuales son agregados insolubles de proteínas no nativas (Baneyx et al., 2004), siendo la razón por la cual la proteína

casi no presenta actividad enzimática en la fracción citosólica, recayendo toda en la fracción de restos celulares.

Por otra parte, en lo que respecta al tiempo de inducción (4, 8, 18 y 24 horas) se empleó como control la cepa *E. coli* BL21+P22 vacío para descartar la actividad específica que no corresponda a la proteína de interés. Se ha reportado que en *E. coli* han sido identificadas al menos 35 PGH y clasificadas en distintas familias, entre las cuales se incluyen principalmente glucosidasas, endopeptidasas y N-acetilmuramil-L-alanina amidasas (Van Heijenoort, 2011). Se ha reportado cerca de cinco N-acetilmuramil-L-alanina amidasas, motivo por el cual resulta importante detectar la actividad amidasa proveniente de las PGH de *E. coli* y no de la proteína de interés (Ami 123). En la figura 18 se puede observar que el tiempo de inducción para el cual se tiene una mayor actividad específica es de 8 horas en la fracción de restos celulares, mientras que en la fracción citosólica no existe una gran diferencia entre 8 y 18 horas de inducción.

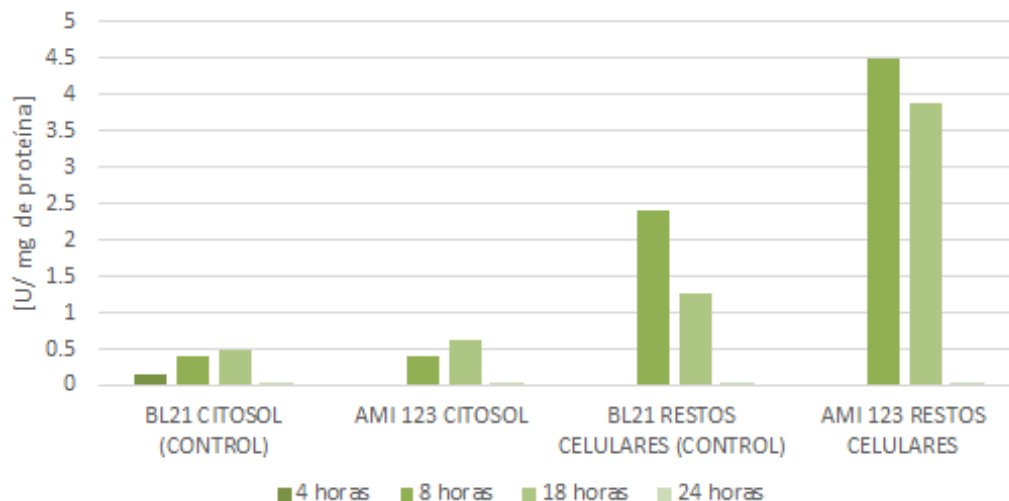


Figura 18. Determinación del tiempo óptimo de inducción de acuerdo a la actividad específica amidasa de la proteína recombinante Ami 123.

Se realizó la determinación de actividad específica glucosaminidasa empleado como control *E. coli* BL21+P22 al igual que para Ami 123, como se mencionó anteriormente *E. coli* por si sola presenta PGH, específicamente una N- acetilglucosaminidasas reportada como β -N-acetilglucosaminidasa (Cheng et al., 2000), siendo necesario detectar la actividad de la misma para poder diferenciarla de la proteína Glu 32. Después de realizar la inducción de la proteína recombinante Glu 32, se puede apreciar que se obtiene una mayor actividad específica (glucosaminidasa) en la fracción de restos celulares comparada con la fracción citosólica (figura 19), atribuible a una posible formación de cuerpos de inclusión por sobre-expresión de la proteína, como se mencionó anteriormente para Ami 123. Por otra parte, el tiempo de inducción donde se obtuvo el valor de más alto de

actividad específica es a las 18 horas, por lo que se concluye que el tiempo óptimo de inducción es de 18 horas.

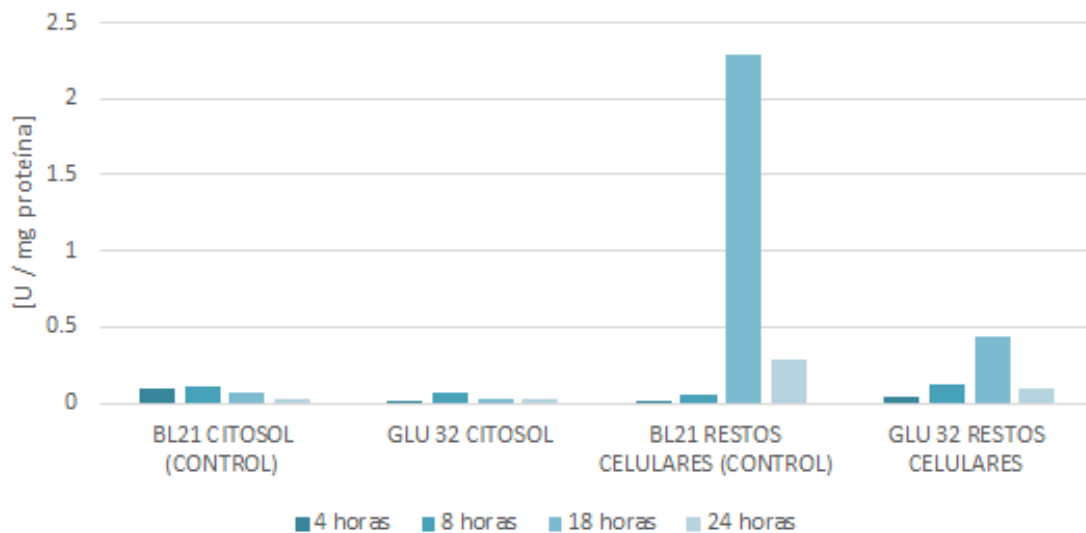


Figura 19. Determinación del tiempo óptimo de inducción actividad específica glucosaminidasa de la proteína recombinante Glu 32.

De acuerdo con lo obtenido se determinó que la concentración óptima de inductor es 0.4 mM con una menor temperatura de inducción para evitar la formación de cuerpos de inclusión y con un tiempo de inducción de 18 h para ambas subclonas.

7.2.1 Optimización de condiciones de almacenamiento

Para la optimización de las condiciones de almacenamiento, se probaron distintas temperaturas de almacenamiento (-18°C y 4°C) de las fracciones obtenidas (restos celulares y citosol) al inducir con 0.4 mM IPTG, 22°C, 250 rpm por 18 h.

En cuanto a la concentración de proteína que se obtuvo de las distintas fracciones que se evaluaron, se observó que la fracción citosólica, tanto de Ami 123 (figura 20 A) como de Glu 32 (figura 21 A), presenta la concentración más alta de proteína almacenándola a 4°C respecto a la obtenida a -18°C. Aunque se obtuvo elevada concentración de proteína en ambas clonas no necesariamente es atribuible todo a la proteína de interés o a su actividad, por lo que se determinó la actividad específica de ambas fracciones de cada clona.

En el caso de la actividad amidasa, se observa que la refrigeración (figura 20 A) es la condición óptima de almacenamiento al tener la mayor actividad específica (61.9 U/mg proteína). Cabe recalcar que en ambas condiciones de almacenamiento hay una mayor actividad específica en la fracción de restos celulares que en la fracción citosólica.

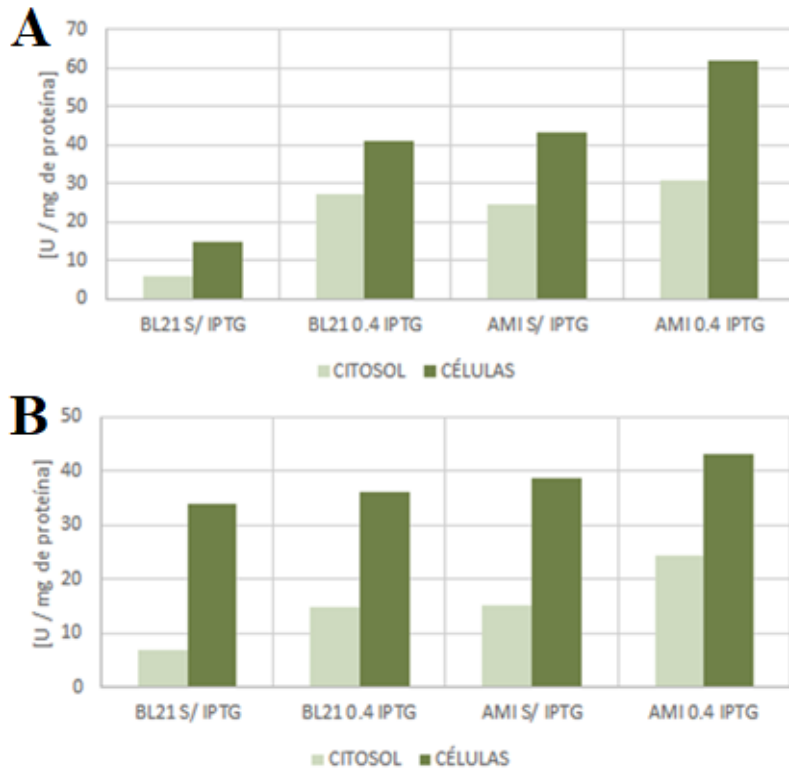


Figura 20. Actividad específica amidasa de la proteína recombinante AMI 123. A) En condiciones de refrigeración (4°C) B) En condiciones de congelación (-18°C)

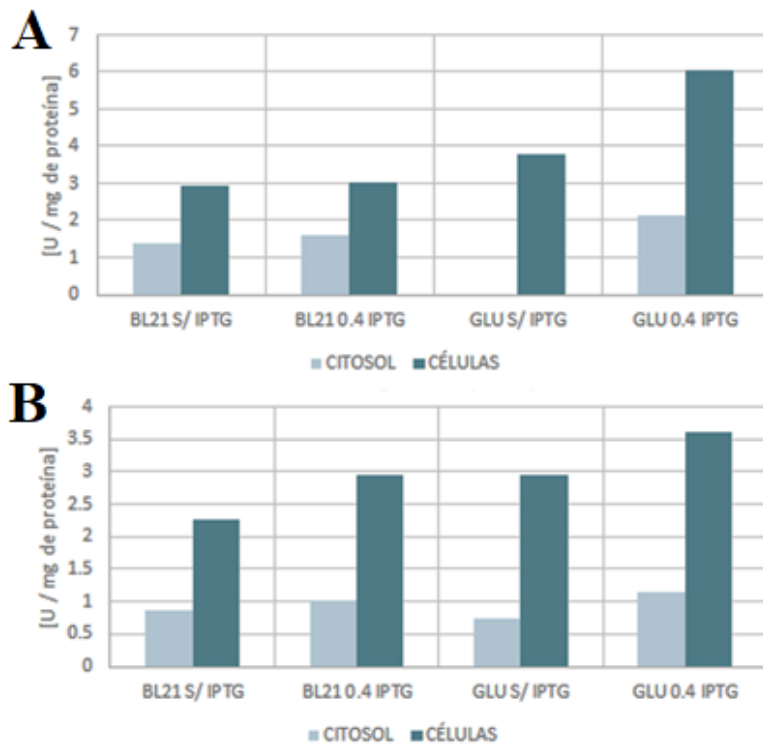


Figura 21. Actividad específica glucosaminidasa de la proteína recombinante GLU32. A) En condiciones de refrigeración (4°C) B) En condiciones de congelación (-18°C)

En el caso de la actividad glucosaminidasa (figura 21), se observa un comportamiento similar que en amidasa. Al comparar ambas condiciones existe una gran diferencia en los valores de actividad específica, siendo también la condición óptima de almacenamiento la refrigeración (figura 21 A).

7.2.2 Optimización de la solubilización de la proteína recombinante

Debido a que ambas proteínas presentan una mayor actividad específica en la fracción de restos celulares, se probaron distintas metodologías para incrementar la cantidad de proteína solubilizada. Se utilizó un buffer previo a la sonicación para obtener mayor concentración de la proteína de interés (Scheurwater et al., 2007). También se implementó la metodología de choque osmótico como alternativa a la sonicación, ya que es una metodología simple y rápida, además la proteína localizada en esa fracción es más sencilla su purificación posterior.

Para esto se realizaron geles de SDS-PAGE, los resultados que se presentan en la figura 22, nuevamente se observa que la proteína está localizada en los restos celulares, en el peso esperado de 65-kDa para la subclona Ami123, pero a diferencia de las anteriores ocasiones hay una mayor intensidad de la banda, que se observa en el carril 6 (figura 22 B).

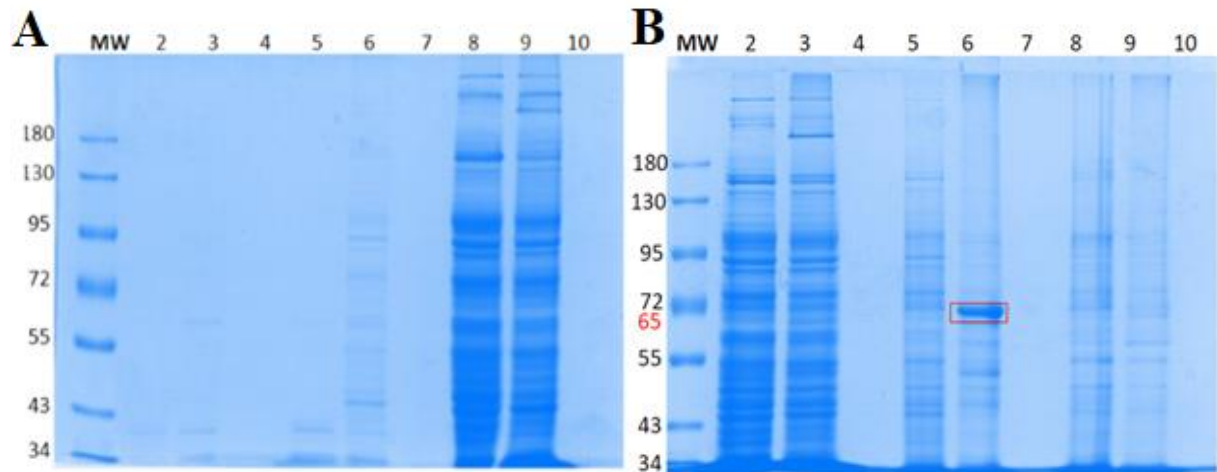


Figura 22. SDS-PAGE 10%. MP: Marcador de peso molecular, **Gel A. PERIPLASMA** 2. AMI 123 S/ IPTG, 3. AMI 123 0.4mM IPTG, 5. BL21 S/ IPTG, 6. BL21 0.4mM IPTG, CITOSOL 8. BL21 S/ IPTG, 9. BL21 0.4 mM IPTG. **Gel B. CITOSOL** 2. AMI 123 S/ IPTG, 3. AMI 123 0.4mM IPTG, **CÉLULAS** 5. AMI 123 S/ IPTG, 6. AMI 123 0.4mM IPTG, 8. BL21 S/ IPTG, 9. BL21 0.4 mM IPTG.

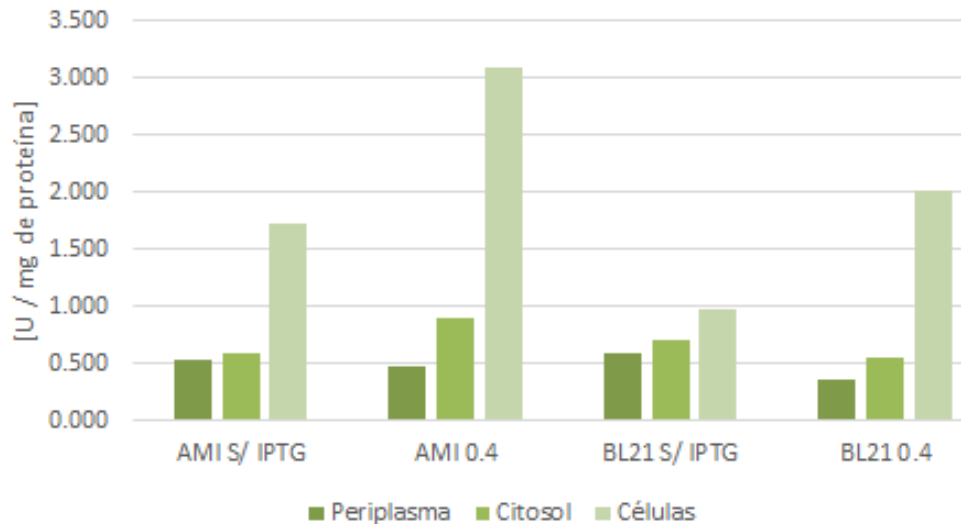


Figura 23. Determinación de actividad específica amidasas de la proteína recombinante Ami 123

En lo referente a la actividad amidasas (figura 23) la fracción donde se obtuvo una mayor actividad fue nuevamente restos celulares, lo que concuerda con lo obtenido en el SDS-PAGE ya que fue donde se obtuvo la banda más intensa

En el caso de Glu 32, se puede observar en la figura 24 B, carril 3 (fracción citosólica) y carril 6 (fracción de restos celulares) una banda en 52-kDa que correspondiente al peso molecular esperado para la clona, a diferencia de los experimentos anteriores en donde no se empleó el buffer previo a sonicación, ahora se logra obtener una banda en la fracción citosólica que antes no era perceptible y que únicamente era evidente en la fracción de restos celulares.

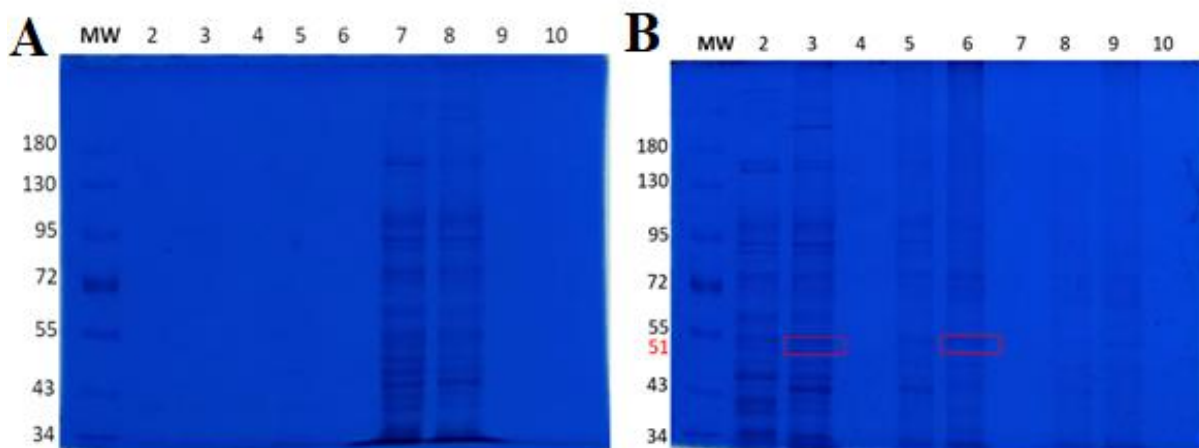


Figura 24. SDS-PAGE 10%. MP: Marcador de peso molecular, **Gel A. PERIPLASMA** 2. GLU 32 S/ IPTG, 3. GLU 32 0.4mM IPTG, 4. BL21 S/ IPTG, 5. BL21 0.4mM IPTG, **CITOSOL** 7. BL21 S/ IPTG, 8. BL21 0.4 mM IPTG. **Gel B. CITOSOL** 2. GLU 32 S/ IPTG, 3. GLU 32 0.4mM IPTG, **CÉLULAS** 5. GLU 3 S/ IPTG, 6. GLU 32 0.4mM IPTG, 8. BL21 S/ IPTG, 9. BL21 0.4 mM IPTG.

Como puede observarse en la figura 25 correspondiente a la actividad glucosaminidasa la fracción con mayor actividad específica es la periplásmica, sin embargo, esto no concuerda

con lo obtenido en el SDS-PAGE, ya que como puede verse en la figura 24 no se logra apreciar una banda en su carril correspondiente, pero al momento de medir la actividad específica resulta ser la de mayor actividad.

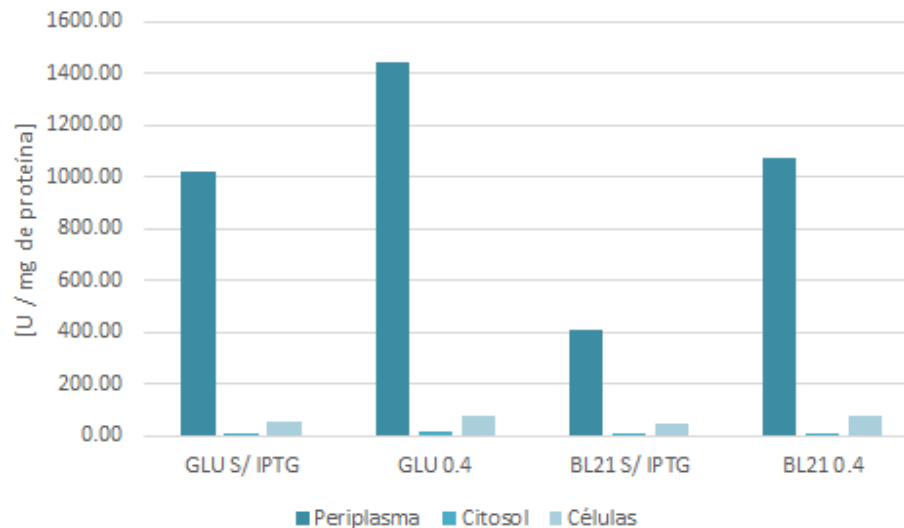


Figura 25. Actividad específica glucosaminidasa de la proteína recombinante Glu 32

La metodología más adecuada para obtener mayor concentración de proteína de ambas subclonas, es la utilización del buffer previo a la sonicación debido a que contienen DNAsas y RNAsas que ayudan a degradar otros componentes que no son relevantes en nuestro estudio. Para posteriores inducciones, se recomienda implementar el uso del buffer.

7.3 Análisis bioinformático

7.3.1 Alineamiento con secuencias molde e identificación de proteínas homologas

Se buscó la secuencia reportada por Campos en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543563/>) para hacer los alineamientos, pero no se encontraba actualizada debido a una corrección en la anotación de la secuencia por lo que se tuvo que ocupar la secuencia sugerida por NCBI con el número de acceso WP_036672225.1 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_036672225.1). En la figura 26 se observa la secuencia contiene 935 aminoácidos, y se distinguen por presentar dos dominios catalíticos: de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa y de N-acetilglucosaminidasa, además de un péptido señal.

MEIKKHYK **MFKSGKKW** AFASIATASLGLVALNTNAEKAHADSDAQANTNSASQLDQQTKTAPVNEKQV
 TLAKPATVKASSAAVTAQSAAPAPSAAQSAAKVNADSTAKADQHSAAAKVGTKATTSSAV
 KPAKEAASANA VKAAPASSAAKVVSTSVASSAAPSSAASKTVTSAAVKDSAAKEAVSSAA
 NVKSSSAAAKTSVNSSAVSEAAKKDAKAEKTAEKKTDNSSKDYTIDNTYRLADNEGSDQK
 TNNK **IIVAHAVGQYSSARDVAIYEKREWDSSETYVQYIVGDGGRVYAVGEEGYVAWGAGK**
WANENAPVQVELAQTYSDSQFKKDYQTYVNLRRDSAKKWNIPPTLDSDEYTGKISHVWVT
EHVWGNHVDPYGYL **GTHGITKEQFAHDLAYGFDNDAANDNQNNNQDNHQNDNQNNQNNN**
HQNDSSNNHGNQNNQSYHVGDKVTIKNSASHWATGQSIYNGVKGHTYKIIQTNGHKLLLD
QVISWINDGDVYKAGSNSGSSNNHNNHHTTNNADIKVGTVTINNNASHWATGQSIYSGV
KGKSYKVIQTNGNRLLLDKVISWINKGDVHVPGSNSNNNSGNQNHNNGNHNNNGNTES
IHVGSKVTINNAKRWATGQNIYSGVKGKTYTVIQMNGSRLLLDKVISWINKGDVHLPGS
NGSQNNNNNNNNHANNNDGTIRVGTNVTIKPSAKRWATGQNIYGVKGYKVIQMNGNR
LLLDKVISWINKGDVYVPGSSNNNNNSNSNNHNNNGSNYHFTNQNWTAQAQTNFVNS
IASDVMNVCQNNHLYASVAMAQAVVESAYGASTLAQEAHNLFGIKADSTWHGATYTKNTQEVIN
GRVVTISA AFRKYDSFKDSIADYAKKLESRPQYANAFSNHAHNYVESVKAIKAGGYATAP
TYVSSIVNCINNYGFYKLDGLNSAISL

Figura 26. Secuencia en aminoácidos de la enzima N-acetilmuramidasa reportada en el genoma de *P. acidilactici* (glucosaminidase domain-containing protein). Rojo: péptido señal. Morado: dominio de N-acetilmuramil-L-alanina amidasa. Recuadro amarillo: las 3 regiones ricas en asparaginas (N1: naranja, N2: café y N3: amarillo). Verde: dominio de N-acetilglucosaminidasa.

Para verificar la diferencia entre ambas secuencias, se compararon en el software Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), y se determinó que los aminoácidos que fueran diferentes serían color rojo y de color verde si eran similares. Se obtuvo el 100% de consenso al no haber variación de aminoácidos entre ellas (figura 27), por lo que se decidió usar la nueva secuencia como molde para el alineamiento.

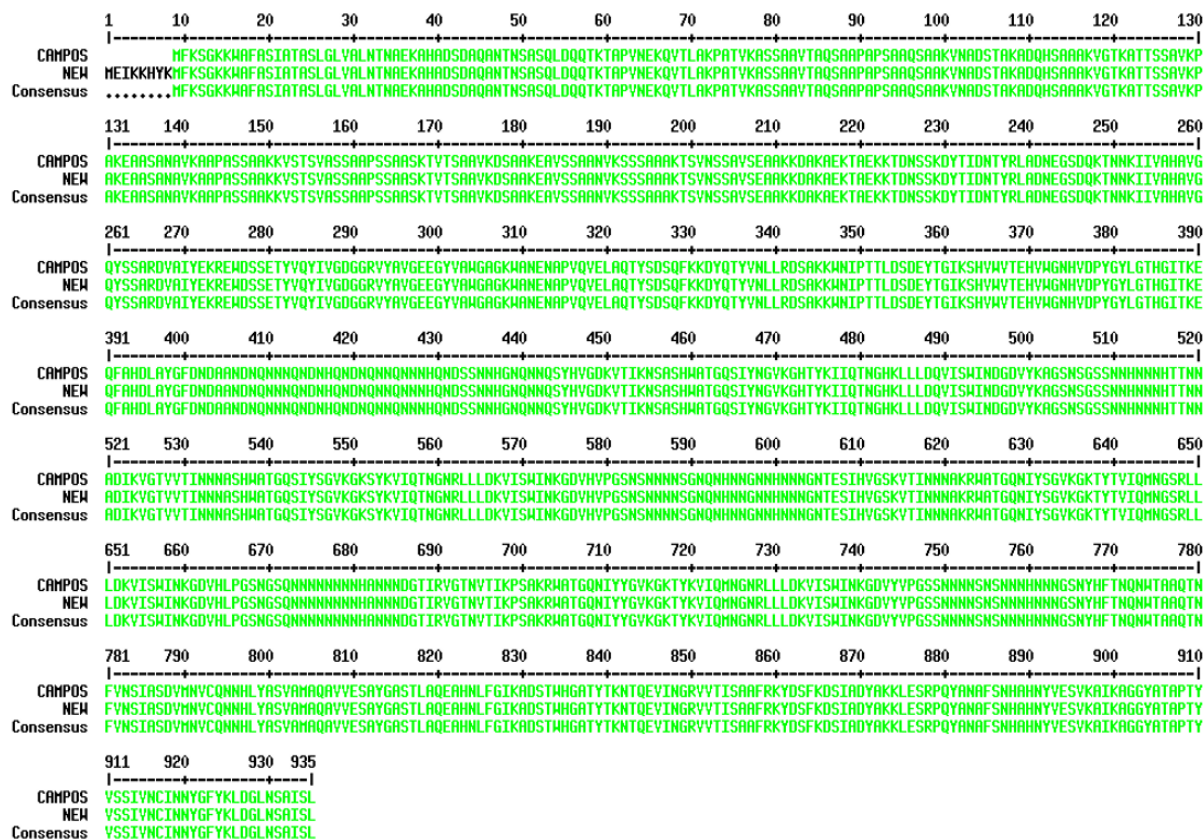


Figura 27. Comparación de secuencias de Campos (2016) y Nambu (2020)

Posteriormente se buscó en la base de datos del NCBI si existía alguna secuencia en aminoácidos parecida con ayuda de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), y los resultados obtenidos arrojaron que esa secuencia de aminoácidos pertenece al grupo de las peptidoglucan hidrolasas (tabla 11).

Tabla 11. Alineamiento de la secuencia completa de la proteína de 99-kDa en BLAST

Dirección	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Chain A, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein SAOUHSC_02979 [<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> NCTC 8325]	85.9	85.9	15%	2.00E-17	35.95 %
Catalytic amidase domain of the major autolysin LytA from <i>Streptococcus pneumoniae</i> [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	80.5	80.5	15%	9.00E-17	36.67 %
Catalytic domain of LytA, the major autolysin of <i>Streptococcus pneumoniae</i> , (C60A, H133A, C136A mutant) complexed with peptidoglycan fragment [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	76.6	76.6	15%	2.00E-15	36%
Crystal structure of the autolysin LytA from <i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	75.1	75.1	15%	5.00E-14	36.18 %

Crystal structure of peptidoglycan hydrolase mutant from <i>Sphingomonas sp. A1</i> [<i>Sphingomonas sp. A1</i>]	71.6	71.6	15%	6.00E-14	31.94 %
Crystal structure of peptidoglycan hydrolase from <i>Sphingomonas sp. A1</i> [<i>Sphingomonas sp. A1</i>]	71.2	71.2	15%	9.00E-14	31.94 %
E185A mutant of peptidoglycan hydrolase from <i>Sphingomonas sp. A1</i> [<i>Sphingomonas sp. A1</i>]	68.6	68.6	15%	9.00E-13	31.25 %

Se realizó una evaluación de similitud entre secuencias para cada dominio por separado. En el caso del dominio amidasa se encontró que hay similitud con una autolisina de *S. pneumoniae* mientras que para el dominio glucosaminidasa, se asocia a una peptidoglucan hidrolasa general de *Sphingomonas sp. A1* (tabla 12).

Tabla 12. Alineamiento de la secuencia de los dominios de la proteína de 99-kDa en BLAST

Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Dominio Amidasa Catalytic amidase domain of the major autolysin LytA from <i>Streptococcus pneumoniae</i> [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	64.3	64.3	97%	2.00E-13	35.11%
Dominio Glucosaminidasa Crystal structure of peptidoglycan hydrolase mutant from <i>Sphingomonas sp. A1</i> [<i>Sphingomonas sp. A1</i>]	70.9	70.9	83%	7.00E-16	34.71%

De igual manera se hizo la comparación con las subclonas de cada dominio por separado (tabla 13). En el caso de la subclona Ami123 se obtuvieron los mismos resultados respecto a su dominio, pero en el caso de Glu32 se obtuvo un resultado diferente a su dominio. Ambas subclonas tuvieron menor porcentaje de Query cover porque contienen las regiones ricas en asparaginas que provocan que el porcentaje de la secuencia alineada sea menor en cuanto a la secuencia de la base de datos.

Tabla 13. Alineamiento de la secuencia de las subclonas de la proteína de 99-kDa en BLAST

Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident
Subclona Ami123 Catalytic amidase domain of the major autolysin LytA from <i>Streptococcus pneumoniae</i> [<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4]	80.1	80.1	26%	7.00E-17	36.67%
Subclona Glu32 Chain A, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain-containing protein SAOUHSC_02979 [<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> NCTC 8325]	86.3	86.3	34%	5.00E-18	35.95%

7.3.2 Optimización y evaluación de modelos

Al determinarse que tanto la secuencia completa como los dominios por separado presentaban la identidad esperada, se procedió al modelado por homología con ayuda de distintos softwares (Swiss Model, Robetta, Phyre2, PSIPRED, I-TASSER) y así definir los más adecuados para su estructura tridimensional.

Una vez que se obtuvieron los modelos de cada software se empleó SAVES (el servidor de análisis y verificación de estructuras) (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) para validar la proteína modelada mediante ERRAT, Verify3D, PROCHECK y WHATCHECK. Se obtuvieron los valores para los modelos de proteínas sin realizar ninguna modificación.

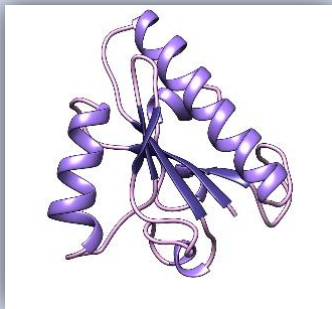
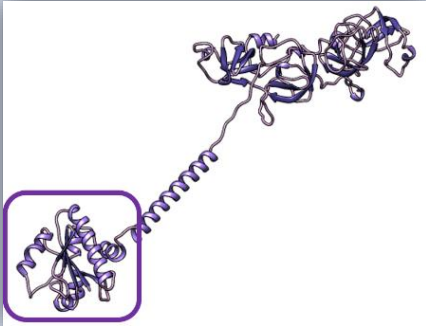
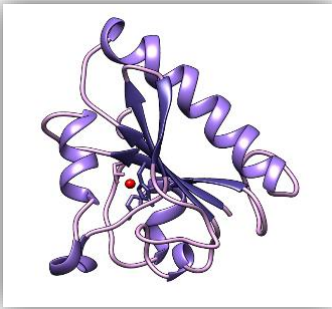
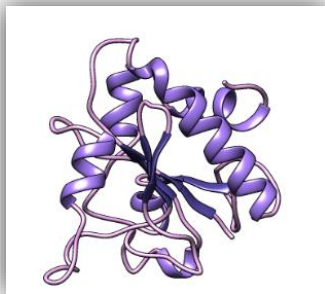
Posteriormente se procedió a modificar cada modelo minimizando la energía de los aminoácidos que SAVES marcaba como errores con ayuda de Swiss-PDB Viewer, con el fin de disminuir los impedimentos estéricos de la estructura de la proteína obtenida ya que la minimización de la energía es esencial para determinar la disposición molecular adecuada en el espacio (Roy et al., 2015). Posteriormente se eligieron los modelos que contenían la energía más pequeña y, finalmente se eligieron los mejores modelos modificados validándolos nuevamente mediante ERRAT, Verify3D, PROCHECK y WHATCHECK.

DOMINIO AMIDASA Y SU SUBCLONA

Respecto al dominio de amidasa y su subclona, se obtuvieron distintos modelos tridimensionales del software Swiss model y Robetta (tabla 14), siendo los de menor energía aquellos que fueron seleccionados para los acoplamientos moleculares posteriores (Robetta).

Se observa que el dominio está conformado por α -hélices externas, mientras que las hojas- β se encuentran en el centro junto con el ión Zn^+ (rojo) y la zona de loops. Además, la estructura tridimensional presentada adoptó un pliegue similar a la N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa LytA, una proteína cristalizada proveniente de *Streptococcus pneumoniae* (4IVV), que contiene una hoja central de siete hebras y seis hélices flanqueantes, todas juntas formando un dominio globular elíptico (Mellroth et al., 2014). Ambos modelos del software Swiss model son similares debido a que este software solo utiliza como plantillas a cristales en la base de datos PDB y la región de asparaginas aún no ha sido cristalizada por lo que es coherente con los resultados.

Tabla 14. Comparación de modelos del dominio AMIDASA y su clona

Software	Dominio	Clona (AMI 123)
Robetta	 <p>-6193.221 KJ/mol</p>	 <p>-35556.164 KJ/mol</p>
Swiss	 <p>-5956.201 KJ/mol</p>	 <p>-6994.334 KJ/mol</p>

En cuanto a los modelos generados por Robetta, se obtuvieron estructuras similares a las presentadas por Swiss, pero en la subclona se observa que en cuanto a la región de asparaginas se pudo generar una sección predominante de “loops” aunque también hay α -hélices y hojas- β , correspondientes a la región rica en asparaginas, esto concuerda con que el software de Robetta realiza el modelado *de novo* estándar para regiones que no pudieron alinearse con templados de proteínas cristalizadas (Song et al., 2013).



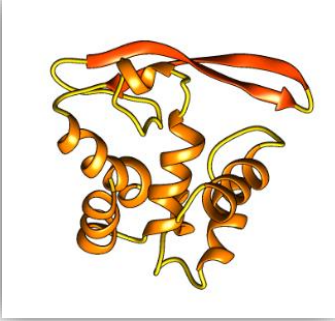

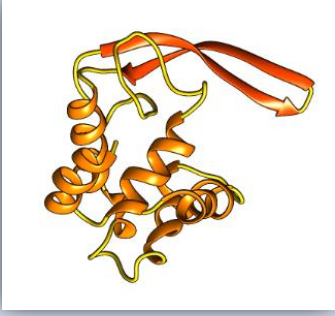

DOMINIO GLUCOSAMINIDASA Y SU SUBCLONA

En cuanto al dominio de glucosaminidasa y su subclona, se obtuvieron distintos modelos tridimensionales del software Swiss model y Robetta (tabla 15), siendo los de menor energía aquellos que fueron seleccionados para los acoplamientos moleculares posteriores.

Se observa que el dominio muestra un plegamiento de tipo lisozima (α/β) con dos regiones diferenciadas que consisten en un lóbulo α y otro β , entre los cuales se crea un sitio de unión

para el sustrato. Todos los modelos albergan un dominio de hoja- β largo en la parte superior de la estructura (Bai et al., 2014). Estas características concuerdan con lo reportado sobre la familia de las glicosil hidrolasas 73 (CAZy: GH73) que incluye a las N-acetilglucosaminidasas, principalmente la región de hoja- β larga distingue las enzimas GH73 de sus homólogos de lisozima al contribuir a la formación de un surco de unión largo y extendido.

Tabla 15. Comparación de modelos del dominio glucosaminidasa y su clona

Software	Dominio	Clona (GLU32)
Robetta	 <p>-8012.982 KJ/mol</p>	 <p>-27238.648 KJ/mol</p>
Swiss	 <p>-7491.961 KJ/mol</p>	 <p>-8764.156 KJ/mol</p>
Phyre2	 <p>-7117.298 KJ/mol</p>	 <p>-12983.4 KJ/mol</p>

El modelo de la subclona generado por Robetta, incluye también la región rica en asparaginas, a diferencia de Swiss model y Phyre2 que solo modelan la secuencia alineada con una proteína cristalizada, Robetta puede modelar regiones que no pudieron ser alineadas con el templado de referencia.

7.3.3 Docking del dominio y su respectiva subclona

Una vez seleccionados los modelos finales tanto para los dominios como para las subclonas, se realizó el docking ciego, se refiere al acoplamiento de un ligando a toda la superficie de una proteína sin ningún conocimiento previo del objetivo (grid box), también implica varias pruebas antes de encontrar una postura favorable del complejo proteína-ligando.

En general, el proceso de acoplamiento consiste primero en predecir la conformación del ligando (poses) y segundo en la evaluación de la afinidad de unión de todas las poses. La estructura del complejo ligando-receptor afecta profundamente la especificidad y eficiencia de la acción de las proteínas.

El docking molecular se realizó con el modelo de Robetta para ambos dominios (amidasa y glucosaminidasa) con sus correspondientes clonas, como ligandos se ocuparon la estructura del peptidoglucano general y la estructura del peptidoglucano de *Staphylococcus aureus*. En lo referente a las poses, se generaron 9 poses para cada docking molecular dominios y sus correspondientes subclonas, eligiendo la de menor energía (KJ/mol) para el posterior análisis.

Se decidió ocupar como ligando no solo al peptidoglucano general, sino también de algún patógeno que fuera parte del espectro antimicrobiano de las enzimas con distinta actividad catalítica. De acuerdo con Ortega (2017) hay actividad lítica contra *Staphylococcus aureus*, por lo que también se utilizó para los acoplamientos moleculares. Aunque había más microorganismos por probar no se encontraron estructuras cristalizadas de su peptidoglucano para utilizarlas como ligandos. En cuanto a las 9 poses generadas, de cada docking de los dominios y sus correspondientes subclonas, se eligió la de menor energía (KJ/mol) para el posterior análisis.

En la figura 28 A, se observan las interacciones que presentó el dominio amidasa con el peptidoglucano general (color azul) y 28 B con el peptidoglucano de *Staphylococcus aureus* (color verde). De acuerdo con Bourgeois (2008) el gen Atl, gen que codifica para una peptidoglucan hidrolasa bifuncional de *Staphylococcus lugdunensis* presenta secuencias repetidas presentes entre los dos dominios catalíticos (amidasa y glucosaminidasa) siendo estas un dipéptido de glicina – triptófano, sin embargo, comparándola con la enzima

bifuncional de *Pediococcus acidilactici*, en el docking solo se puede apreciar uno de los dos aminoácidos (triptófano) en la figura 28.

Se cree que las repeticiones interactúan con los polímeros de la pared celular (ácidos teicoico o lipoteicoico) que a su vez participan en dirigir a las enzimas a su sustrato, es decir, el peptidoglucano.

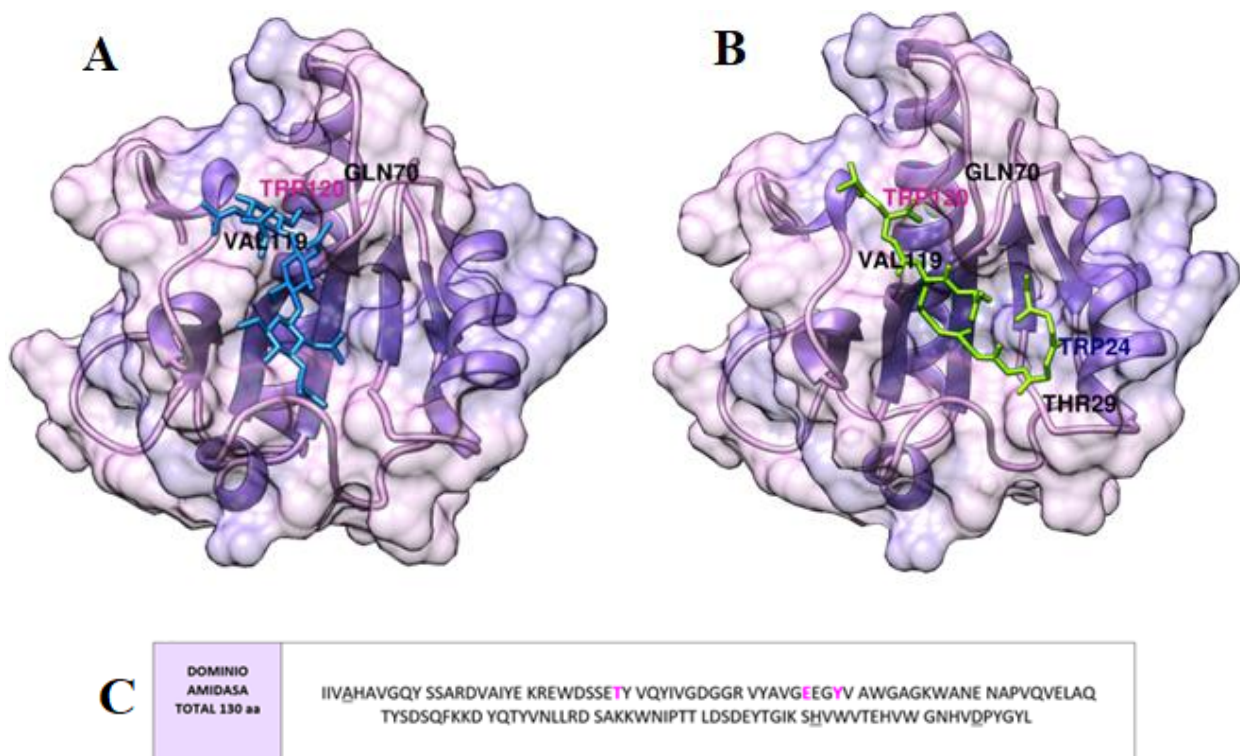
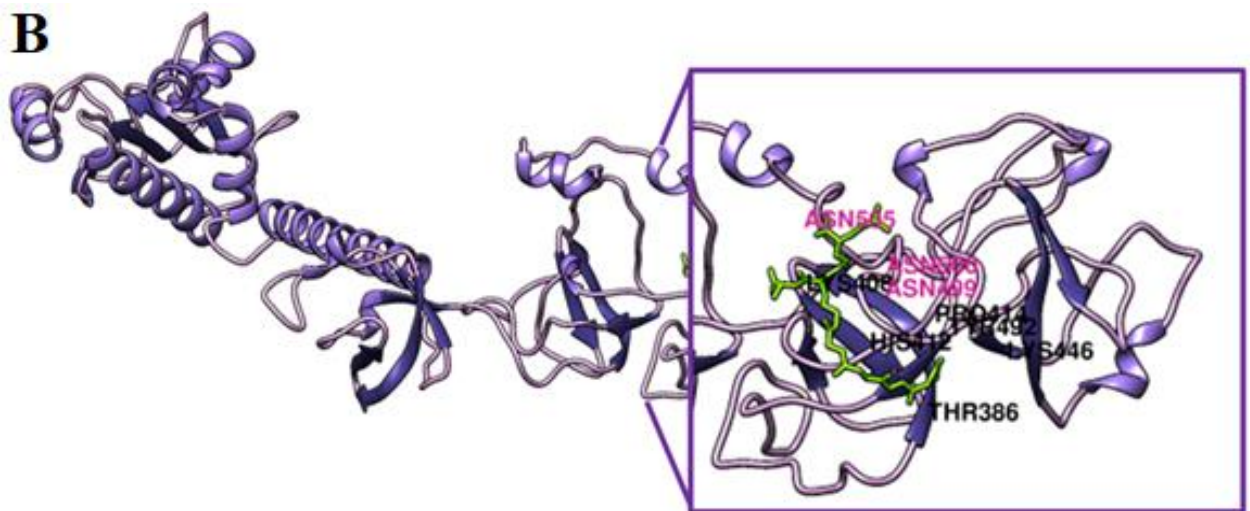
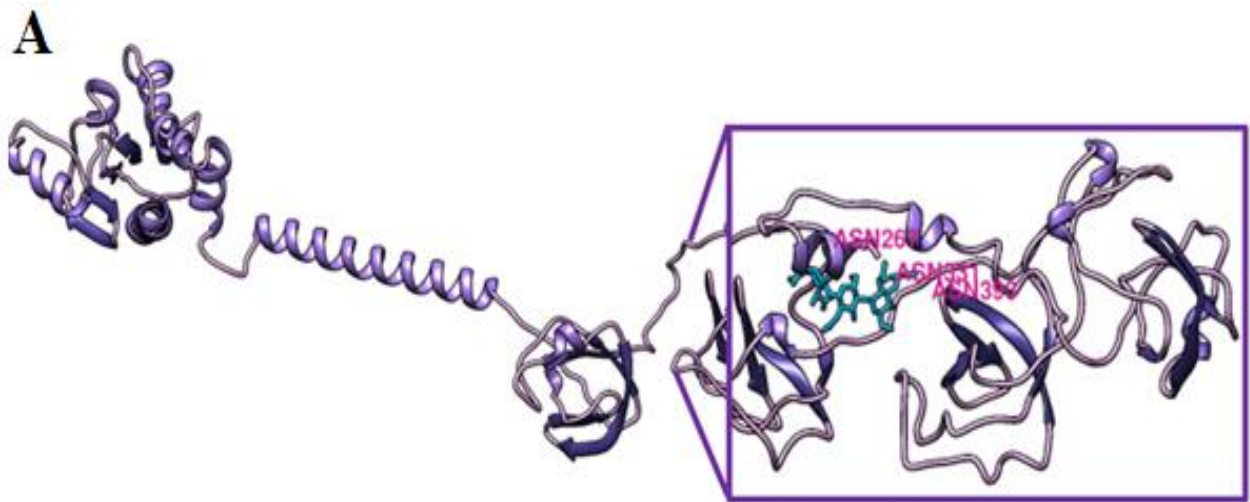


Figura 28. Interacciones entre dominio amidasa y el ligando correspondiente al peptidoglucano general (A) y de *Staphylococcus aureus* (B). Secuencia del dominio e interacciones que se presentaron en ambos docking; rosa (C)

Para el caso del docking de la clona de Ami 123 figura 29A peptidoglucano general y 29B peptidoglucano de *S. aureus* los aminoácidos que interactúan son principalmente asparaginas, siendo asparaginas correspondientes a la región rica en asparaginas (figura 29C) sobresaliendo la región 2 y 3 confirmando lo que Ortega (2017) sugiere, es decir, que esta región tiene un papel en la actividad lítica, probablemente de tipo conformacional y de unión al peptidoglucano, debido a que en el docking no se visualiza interacciones con el dominio.



C

<p>AMI123 TOTAL: 532 aa</p>	<p>IIVAHAVGQY SSARDVAIYE KREWDSSEY VQYIVGDGGR VYAVGEEGYV AWGAGKWANE NAPVQVELAQ TYSDSQFKKD YQTYVNLRLD SAKKWNIPPT LDSDEYTGK SHVWVTEHVW GNHVDPYGYL</p>
	<p>Asp1:GTHGITKEQF AHDLAYGFDN DAANDNQNNN QNDNHQNDNQ NNQNNNHQND SSNNHGNQNN QSYHVGDKVT IKNSASHWAT GQSIYNGVKG HTYKIIQTNG HKLLDQVIS WINDGDVYKA GSN5GS</p>
	<p>Asp2:SNNHNNHHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV KGKSYKVIQT NGRLLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNNNGN NHHNNGNTES IHVGSKVITIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLLDK</p>
<p>Asp3: VISWINGDV HLPGSNGSQN NNNNNNNHAN NNDGTIRVGT NVTIKPSAKR WATGQNIYYG VKGKTYKVIQ MNGNRLLLLDK VISWINKGDV YVPGSSNNN SNSNNNHNNN GSNYHFTNQN WTAAQTNFVN S</p>	

Figura 29. Interacciones entre la subclona AMI123 y el ligando correspondiente al peptidoglucano general (A), Interacciones entre la subclona AMI123 y el ligando correspondiente al peptidoglucano de *Staphylococcus aureus* (B), Secuencia de la subclona e interacciones que se presentaron en ambos docking; rosa (C)

En la familia de las glucosidasas hidrolasas 73, el ácido general catalítico es un glutamato, estrictamente conservado en la familia GH73, este aminoácido se conserva estrictamente en las secuencias de las enzimas GH73, pero está situado a 13 Å del ácido general Glu en el sitio activo, a su vez la familia GH73 contiene un residuo Tyr altamente conservado, muy cerca del catalizador general, esto puede observarse en la figura 30B donde en rojo se destaca la interacción con dos tirosinas, mientras que en la figura 30C se puede observar que estas dos tirosinas (Tyr 97 y Tyr 120) que se observan interaccionando en docking se encuentran muy cerca de un ácido glutámico (Glu 110) lo que podría sugerir que la enzima pertenece a la familia de las glucosidasas hidrolasas 73.

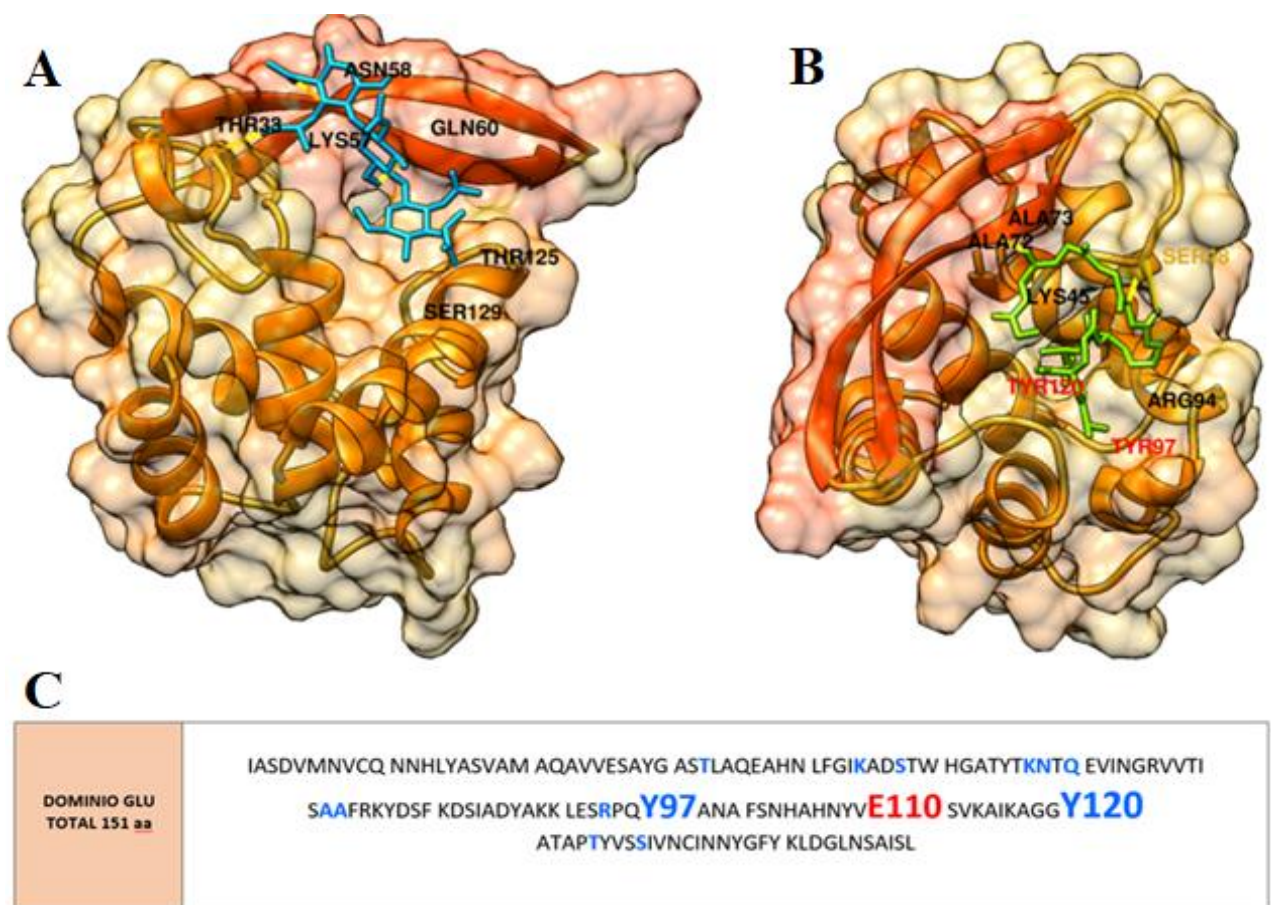


Figura 30. Interacciones entre dominio glucosaminidasa y el ligando correspondiente al peptidoglucano general (A) y de *Staphylococcus aureus* (B). Secuencia del dominio e interacciones que se presentaron en ambos docking; azul (C)

En el caso de la subclona de Glu 32 las interacciones que destacan en el docking son asparaginas (figura 31 A y B), mientras que en la figura 31 C se observa que todos los aminoácidos con los que se presenta interacción con el peptidoglucano pertenecen a la región

rica en asparaginas, reforzando nuevamente la idea de que esta región tiene un papel importante en la actividad lítica, probablemente de tipo conformacional y de unión al peptidoglucano como anteriormente se mencionó para la subclona Ami 123.

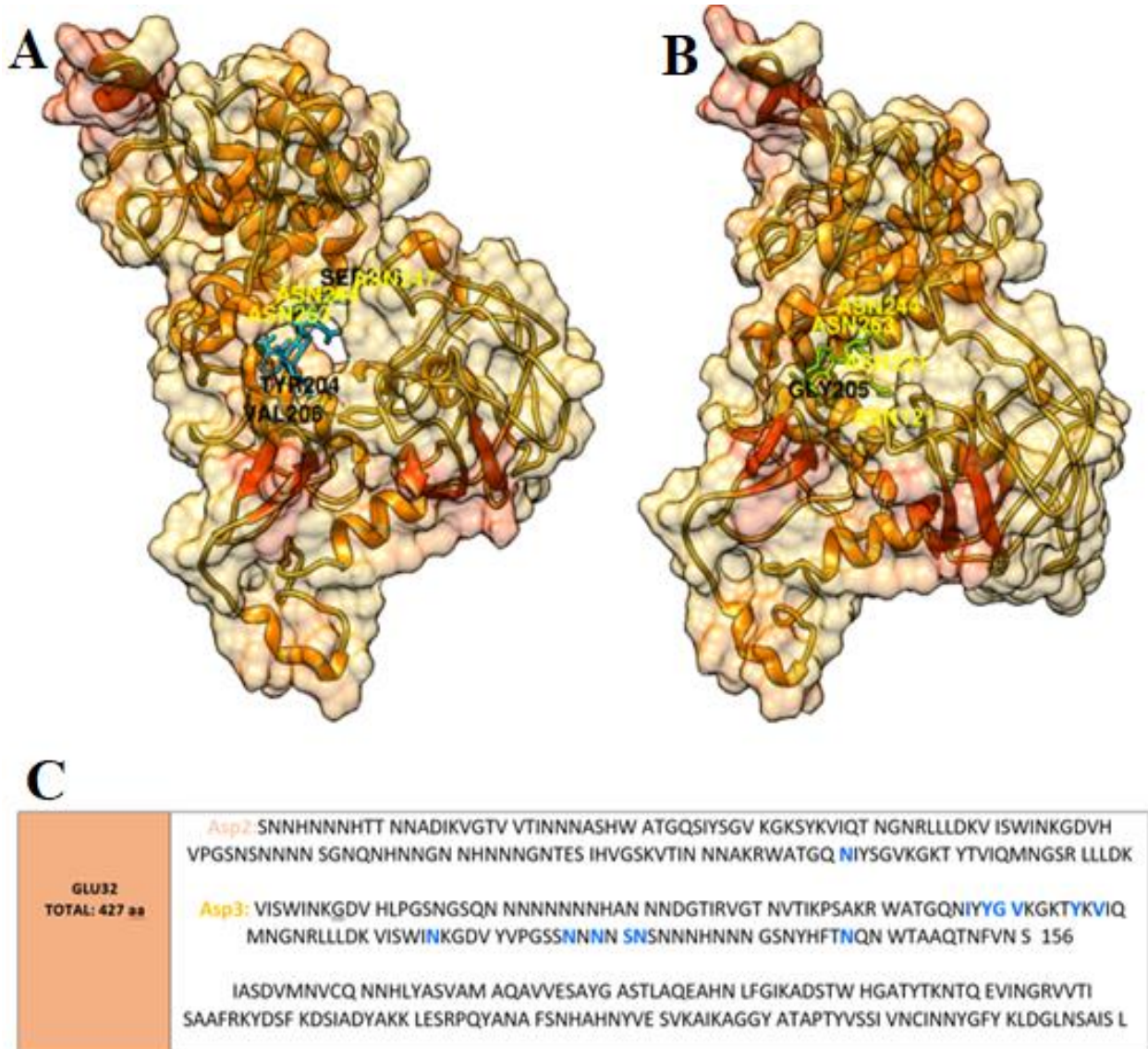


Figura 31. Interacciones entre la subclona GLU32 y el ligando correspondiente al peptidoglucano general (A) y de *Staphylococcus aureus* (B). Secuencia de la subclona e interacciones que se presentaron en ambos docking; azul (C)

8. Conclusiones

- Las condiciones de inducción óptimas son 0.4 mM de IPTG, a 22 °C por 18 h y las condiciones óptimas de almacenamiento son de 4°C (refrigeración) de acuerdo a los valores obtenidos en cuanto a la actividad específica de cada subclona (N-acetilglucosaminidasa y L-alanina amidasa).
- Se optimizó la extracción de proteína al observar que la fracción con mayor concentración de ambas proteínas recombinantes corresponde a restos celulares en comparación con las demás fracciones, obtenida con el buffer previo a la sonicación compuesto por DNAsas y RNAsas.
- Se obtuvieron las estructuras tridimensionales del dominio y subclona correspondiente que contienen conformaciones similares a estructuras cristalizadas de proteínas con la misma actividad lítica.
- Los acoplamientos moleculares realizados solo confirman que hay residuos encargados de la unión a carbohidratos, pero no dan información sobre los residuos catalíticos. Aunque se pueden visualizar residuos que podrían intervenir en la catálisis del peptidoglucano.
- En el caso del dominio amidasa, la presencia de residuos Trp podrían interactúan con los polímeros de la pared celular y que a su vez participan en dirigir a las enzimas a su sustrato, es decir, el peptidoglucano.
- En el caso del dominio glucosaminidasa los residuos de Tyr (97 y 120) que presentaron interacción en el docking sugieren que Glu 110 podría actuar como ácido general catalítico.
- Para ambas subclonas la región rica en asparaginas está vinculada con la interacción del ligando, siendo la región 3 la más importante para la subclona GLU32 y las regiones 2 y 3 para la subclona AMI123.

9. Perspectivas

Conociendo las condiciones de inducción (0.4mM IPTG, 18h a 22°C), producción (condiciones de extracción) y almacenamiento (4°C), además de la formación de la interacción. Esto serviría de base para caracterizar bioquímicamente la proteína de 99-kDa y sus 2 dominios catalíticos determinando el efecto de iones, condiciones de estabilidad térmica y de pH. Posteriormente diseñar diferentes antimicrobianos con distintas proporciones de las subclonas Sin embargo, se sugiere realizar una mutagénesis dirigida a Tyr (dominio glucosaminidasa), Trp (dominio amidasa) y Asp (ambas subclonas) para verificar los residuos catalíticos y de sitio de unión propuestos para contar con una interacción más específica.

10. Referencias

- Alcorlo M., Martínez-Caballero S., Molina R., Hermoso J. (2017). Carbohydrate recognition and lysis by bacterial peptidoglycan hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. Volume 44, Pages 87-100.
- Arvizu, L. A. L., Cano, I. G., Farres, A., & Alquicira, E. P. (2019). Antimicrobial activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase produced by *Lactobacillus sakei*, against *Leuconostoc mesenteroides* and *Weissella viridescens*. *Journal of Biotechnology*, 305, S79.
- Bai, X.-H., Chen, H.-J., Jiang, Y.-L., Wen, Z., Huang, Y., Cheng, W., ... Zhou, C.-Z. (2014). Structure of Pneumococcal Peptidoglycan Hydrolase LytB Reveals Insights into the Bacterial Cell Wall Remodeling and Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(34), 23403–23416.
- Baneyx, F., & Mujacic, M., (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399–1402.
- Blázquez, B., Fresco-Taboada, A., Iglesias-Bexiga, M., Menéndez, M., & García, P. (2016). PL3 Amidase, a Tailor-made Lysin Constructed by Domain Shuffling with Potent Killing Activity against Pneumococci and Related Species. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Boksha, I. S., Lavrova, N. V., Grishin, A. V., Demidenko, A. V., Lyashchuk, A. M., Galushkina, Z. M., Karyagina, A. S. (2016). *Staphylococcus simulans* recombinant lysostaphin: Production, purification, and determination of antistaphylococcal activity. *Biochemistry (Moscow)*, 81(5), 502–510.
- Bourgeois, I., Camiade, E., Biswas, R., Courtin, P., Gibert, L., Götz, F., Pestel-Caron, M. (2009). Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with N-acetylglucosaminidase and N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 105–113.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254
- Campos M. (2015). Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Carrillo Terán, Wilman. (2013). Lisozioma: Actividad antibacteriana y alergenidad. *Actualización en Nutrición*. 14(4), 314-326.

- Cheng, (2000). Molecular Characterization of the beta -N-Acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and Its Role in Cell Wall Recycling. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4836–4840
- Cisani, G., Varaldo, P. E., Grazi, G., & Soro, O. (1982). High-level potentiation of lysostaphin anti-staphylococcal activity by lysozyme. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 21(4), 531–535. doi:10.1128/aac.21.4.531
- De la Fuente N. et al, 2010. Inocuidad y bioconservación de alimentos, *Acta Universitaria*, 20(1), 43-45.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919.
- García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-Hernandez G., Farrés A. (2011). Detection, cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology*. 111: 607-615.
- García-Cano I. (2013). Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Haddad Kashani, H., Schmelcher, M., Sabzalipoor, H., Seyed Hosseini, E., & Moniri, R. (2017). Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(1).
- Hashemi, M. M., Aminlari, M., Forouzan, M. M., Moghimi, E., Tavana, M., Shekarforoush, S., & Mohammadifar, M. A. (2018). Production and Application of Lysozyme-Gum Arabic Conjugate in Mayonnaise as a Natural Preservative and Emulsifier. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 68(1), 33–43.
- Hussain, A. M., Daniel, R. C. W., & Frost, A. J. (1992). The bactericidal effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase on bacteria. *Veterinary Microbiology*, 32(1), 75–80.
- Jones P., VanBogelen, R. A., & Neidhardt, F. C. (1987). Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*. 169(5) 2092-2095.
- Kuroda A, Sekiguchi J (1992). Characterization of the *Bacillus subtilis* CwbA protein which stimulates cell wall lytic amidases. *Federation of European Microbiological Societies, Lett* 95:109–113.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

- LaVallie, E. R., (1995). Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*. Current Protocols in Protein Science, 5.1.1–5.1.8.
- Leclerc, D., & Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. Canadian Journal of Microbiology, 35, 749-753.
- Lopez-Arvizu, A., Rocha-Mendoza, D., Ponce-Alquicira, E., & García-Cano, I. (2021). Characterization of antibacterial activity of a N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase produced by *Lactobacillus sakei* isolated from salami. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 37(4), 196-207.
- Mellroth, P., & Steiner, H. (2014). PGRP-SB1: An N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 350(4), 994–999.
- Olvera M. et al, (2015). Detección de proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Acido Lácticas. BioTecnología, 19 (1), 25-27
- Ortega, A. (2017). Actividad antimicrobiana de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Oshida, T., Sugai, M., Komatsuzawa, H., Hong, Y. M., Suginaka, H., & Tomasz, A. (1995). A *Staphylococcus aureus* autolysin that has an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase domain and an endo-beta-N-acetylglucosaminidase domain: cloning, sequence analysis, and characterization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(1), 285–289.
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. Microbial Cell Factories, 8(1), 3.
- Pastiglia M, R. Schuch, VA. Fischetti, DB. Huang. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. Journal of Medical Microbiology. 1506-1516
- Porfirio, S., Carlson, R. W., & Azadi, P. (2019). Elucidating Peptidoglycan Structure: An Analytical Toolset. Trends in Microbiology 27(7), 607-622
- Pritchard, D. G., Dong, S., Baker, J. R., & Engler, J. A. (2004). The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30. Microbiology (Reading, England), 150(Pt 7), 2079–2087.
- Rico, P. (2015). Caracterización estructural y funcional de la glucosaminidasa LytB de *Streptococcus pneumoniae*. Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
- Rivera J. (2004) Evaluación del efecto de bioconservador en Salmis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM.

- 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*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3371–3373.
- Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Donovan, D. M., Rodríguez, A., & García, P. (2013). Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Crit Rev Microbiol.*, 39(4), 427–434.
- Roy, K., Kar, S., & Das, R. N. (2015). Computational Chemistry. Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment, 151–189.
- Sagdic, O., Tornuk, F., Karasu, S., Durak, M. Z., & Arici, M. (2016). Microbial ecology of mayonnaise, margarine, and sauces. *Quantitative Microbiology in Food Processing*,
- Scheurwater M., Pfeffer M., Clarke, J. (2007) Production and purification of the bacterial autolysin N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *ScienceDirect, Protein Expression & Purification* 56(1) 129 –131
- Serrano-Maldonado, C. E., García-Cano, I., González-Canto, A., Ruiz-May, E., Elizalde-Contreras, J. M., & Quirasco, M. (2018). Cloning and Characterization of a Novel N-acetylglucosaminidase (AtID) from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 14–27.
- Sharma, A. K., Kumar, S., K., H., Dhakan, D. B., & Sharma, V. K. (2016). Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins. *BMC Genomics*, 17(1).
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104.
- Song, Y., DiMaio, F., Wang, R. Y.-R., Kim, D., Miles, C., Brunette, T., ... Baker, D. (2013). High-Resolution Comparative Modeling with RosettaCM. *Structure*, 21(10), 1735–1742.
- Van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(4), 636–663.
- **A)** Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., y Foster, S., (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32, 259-286.
- **B)** Vollmer, W., & Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in Microbiology*, 18(2), 59–66.
- **C)** Vollmer, Waldemar & Born, Petra. (2010). Bacterial Cell Envelope Peptidoglycan. *Microbial Glycobiology*. 2, 15-28.

- Walencka, E., Sadowska, B., Różalska, S., Hryniewicz, W., & Różalska, B. (2006). *Staphylococcus aureus* biofilm as a target for single or repeated doses of oxacillin, vancomycin, linezolid and/or lysostaphin. *Folia Microbiologica*, 51(5), 381–386.
- 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.
- Yokoi K., Sugahara K., Iguchi A., Nishitani G., Ikeda M., Shiada T., Inagaki N., Yamakawa A., Taketo A., Kodaria K. (2008). Molecular properties of the putative AtIWM encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*. 416: 66-76.