



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Caracterización molecular de la peptidoglucano hidrolasa  
bifuncional de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC  
8042”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Manuel Alberto Campos Gómez**

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amelia Farrés González Saravia - Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Ismael Bustos Jaimes - Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros - Instituto de Química, UNAM

MÉXICO, D. F. Enero, 2016



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: Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Inv. Biomédicas
Vocal: Dra. Romina Rodríguez Sanoja	Instituto de Inv. Biomédicas
Vocal: Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química
Vocal: Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química
Secretario: Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Instituto de Biotecnología

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría de la Dra. Amelia Farrés González Saravia. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de maestría, CVU: 508115), además también se recibió apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir a un congreso.

# Índice

1. Introducción .....	5
1.1. Peptidoglucano .....	5
1.2. Estructura del peptidoglucano.....	5
1.3. Cambios en la composición del peptidoglucano .....	6
1.4. Peptidoglucano hidrolasas (PGH's).....	8
1.5. Clasificación de las Peptidoglucano Hidrolasas .....	9
1.6. Regulación de la actividad de las peptidoglucano hidrolasas.....	10
1.7. Aplicaciones de las peptidoglucano hidrolasas en la clínica.....	10
1.8. Aplicaciones de las peptidoglucano hidrolasas en Alimentos .....	11
1.9. Clonación y expresión de peptidoglucano hidrolasas.....	13
2. Antecedentes .....	15
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos .....	21
5. Metodología.....	22
5.1. Generación de las subclonas de ambos dominios catalíticos.....	23
5.1.1. Cepas y plásmidos .....	23
5.1.2. Extracción de ADN genómico de <i>P. acidilactici</i> ATCC 8042.....	23
5.1.3. Diseño de cebadores.....	23
5.1.4. Amplificación de las regiones de interés de ambos dominio .....	24
5.1.5. Elaboración de las construcciones .....	25
5.1.6. Preparación de células competentes.....	25
5.1.7. Transformación .....	26
5.1.8. Análisis de las transformantes .....	26
5.1.9. Secuenciación de las construcciones .....	26
5.1.10. Conservación de las cepas.....	27
5.2. Expresión.....	27
5.2.1. Inducciones .....	27
5.2.2. Determinación del perfil electroforético y de actividad lítica por zimogramas.....	27
5.2.3. Western-Blot .....	28

6. Resultados y discusión .....	29
6.1. Dominio de <i>N</i> -acetilmuramil- <i>L</i> -alanina amidasa .....	29
6.1.1. Subclonación de los fragmentos del gen <i>paci99</i> para el dominio de <i>N</i> -acetilmuramil- <i>L</i> -alanina amidasa.....	29
6.1.2. Elaboración de las construcciones .....	29
6.1.3. Análisis de las transformantes .....	30
6.1.4. Secuenciación de las construcciones .....	30
6.1.5. Expresión de las proteínas recombinantes con el dominio de <i>N</i> -acetilmuramil- <i>L</i> -alanina amidasa .....	32
6.2. Dominio de <i>N</i> -acetilglucosaminidasa.....	35
6.2.1. Subclonación de los fragmentos del gen <i>paci99</i> para el dominio de <i>N</i> -acetilglucosaminidasa .....	35
6.2.2. Elaboración de las construcciones .....	35
6.2.3. Análisis de las transformantes .....	35
6.2.4. Secuenciación de las construcciones .....	36
6.2.5. Expresión de las proteínas recombinantes con el dominio de <i>N</i> -acetilglucosaminidasa	36
7. Conclusiones .....	46
8. Perspectivas .....	47
9. Bibliografía .....	48

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PEPTIDOGLUCANO

El peptidoglucano es el principal componente de la pared celular de las bacterias [Huard *et al.*, 2004]. Esta estructura es un heteropolímero de azúcares y aminoácidos, sintetizados solamente por Eubacterias, que sirve como protección a diferentes tipos de estrés a los cuales se encuentran sometidas las células bacterianas, principalmente a la presión osmótica. Esta barrera natural se encuentra alrededor de la membrana citoplasmática y también mantiene la forma especie-específica. Las cadenas de peptidoglucano no son sintetizadas *de novo* en cada generación; durante el proceso de la división celular la estructura ya existente de este heteropolímero es elongada mediante la incorporación de nuevas subunidades, proceso denominado recambio de la pared celular [Vollmer *et al.*, 2015].

## 1.2. ESTRUCTURA DEL PEPTIDOGLUCANO

La composición del peptidoglucano consiste generalmente en cadenas de glucano unidas por el entrecruzamiento de pequeños péptidos [Vollmer *et al.*, 2008a]. Las cadenas de glucano están formadas por residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acilmurámico (MurNAc) unidos mediante un enlace glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). El grupo D-lactoilo de cada residuo de MurNAc es sustituido por un péptido cuya composición generalmente es L-Ala-Y-D-Glu-(meso-A<sub>2</sub>pm o L-Lys)-D-Ala-D-Ala (A<sub>2</sub>pm, ácido 2,6-diaminopimélico). Esta subunidad del disacárido unido al tetrapéptido es considerada como el monómero de la estructura del peptidoglucano (Figura 1).

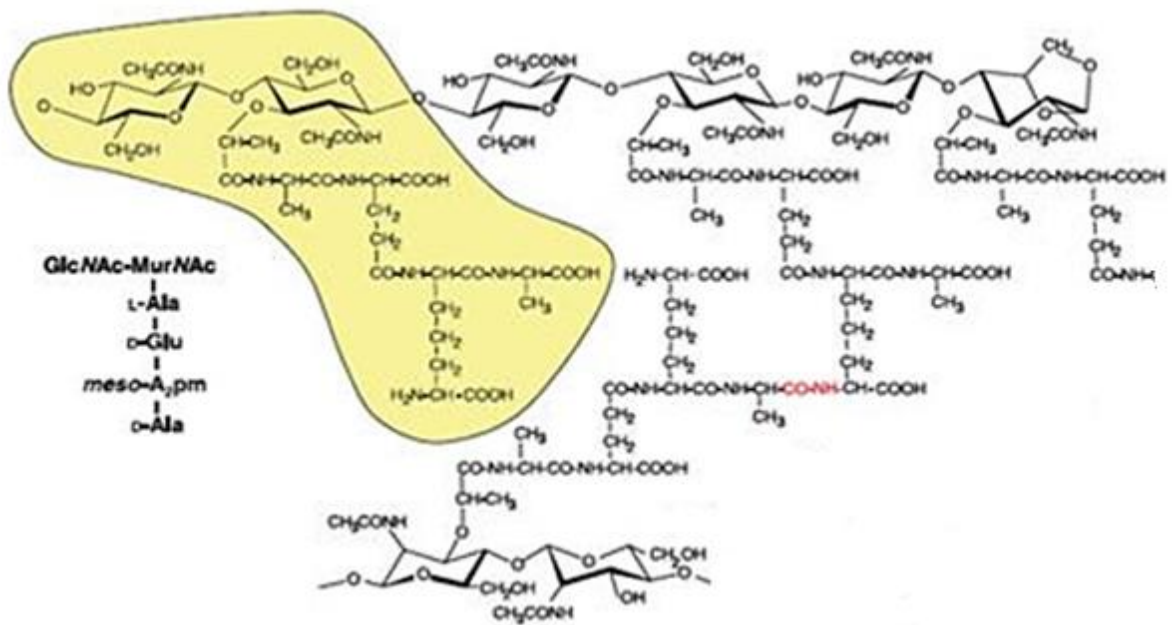


Figura 1. Estructura de la pared celular de *E. coli*. [Vollmer *et al.*, 2008b]. La parte sombreada en color amarillo indica el monómero de la estructura del peptidoglucano.

Sin embargo, existen variaciones en la composición, inclusive dentro de la misma especie, provocadas por diversos factores, por ejemplo: las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento en la cual las células se encuentran, la composición del medio de cultivo, la presencia de antibióticos, entre otros [Vollmer *et al.*, 2008b]. Algunos de ellos se describen a continuación.

### 1.3. CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN DEL PEPTIDOGLUCANO

Estas variaciones se han reportado en numerosos microorganismos, y prácticamente en todos los aminoácidos de la cadena peptídica excepto en la posición 4, por ejemplo en la posición 1 donde la mayoría de las especies bacterianas se encuentra una L-Ala en el caso específico de *Mycobacterium leprae* y *Brevibacterium imperiale* hay una Gly y en el caso de *Butyribacterium rettgeri* existe una L-Ser. En la Tabla 1 se muestran otros ejemplos en la composición de la cadena peptídica del peptidoglucano.

**Tabla 1.** Cambios en los aminoácidos de la cadena peptídica [Modificado: Vollmer *et al.*, 2008b].

Posición	Residuo encontrado	Ejemplos
<b>1</b>	L-Ala	Mayoría de especies bacterianas
	Gly	<i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Brevibacterium imperiale</i>
	L-Ser	<i>Butyribacterium rettgeri</i>
<b>2</b>	D-Isoglutamato	Mayoría de especies de Gram-negativas
	D-Isoglutamina	Mayoría de Gram-positivas, Mycobacteria
	<i>threo</i> -3-Hidroxyglutamato	<i>Mycobacterium lacticum</i>
<b>3</b>	meso-A <sub>2</sub> p <sub>m</sub>	Mayoría de Gram-negativas, Bacilli, Mycobacterium
	L-Lys	Mayoría de Gram-positivas
	L-Orn	<i>Thermus thermophilus</i>
	L-Lys/L-Orn	<i>Bifidobacterium globosum</i>
	L-Lys/D-Lys	<i>Thermotoga maritima</i>
	L-Homoserina	<i>Corynebacterium poinsettiae</i>
<b>4</b>	L-Glu	<i>Arthobacter</i> J. 39
	D-Ala	Todas las bacterias

Estos cambios en la composición del peptidoglucano no sólo se dan en la cadena peptídica, también se presentan en la cadena de GlcNAc [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)] MurNAc. Por ejemplo las cadenas de glucano en las bacterias Gram-negativas tienen un anillo 1,6-anhidro en el MurNAc terminal, mientras que las bacterias Gram-positivas se unen con otros compuestos de la pared celular (ej.: ácidos teicoicos) mediante enlaces tipo fosfodiéster a los residuos GlcNAc o MurNAc [Vollmer, 2007]. Existen 3 principales modificaciones en los residuos de GlcNAc o MurNAc de la cadena de glucano: *N*-desacetilación, *O*-acetilación y *N*-glicosilación.

**N-desacetilación.** Esta modificación se puede realizar en ambos residuos de la cadena de glucano: GlcNAc o MurNAc (Figura 2. Flecha azul). La presencia de azúcares desacetilados en el peptidoglucano reduce de manera considerable la hidrólisis mediante peptidoglucano hidrolasas, específicamente por las que tienen actividad tipo muramidasa (ej. Lisozima). Muchas bacterias patógenas como *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes* o *B. anthracis* aparentemente desacetilan el peptidoglucano como mecanismo de resistencia [Vollmer, 2007]. Además, esta modificación introduce cargas positivas en la pared celular, afectando la unión de proteínas y otros compuestos, fenómeno que incrementa la resistencia a péptidos antimicrobianos catiónicos [Perschel *et al.*, 2002].

**O-acetilación.** Esta modificación solo ocurre en el residuo de MurNAc y consiste en la presencia de un grupo acetil adicional unido al grupo hidroxilo del C6 para formar 2,6-*N*, *O*-diacetil-ácido murámico (Figura 2. Flecha verde) [Vollmer, 2007]. Este fenómeno ha sido ampliamente estudiado para el género *Staphylococcus*, donde se encontró que las cepas patógenas resistentes a lisozima presentaban un grado de *O*-acetilación, mientras que las cepas no patógenas en las que no se encontró esta modificación eran sensibles a lisozima [Bera *et al.*, 2006]. En la Tabla 2 se muestra el porcentaje de las dos modificaciones antes descritas reportadas en la literatura para algunas especies.

**Tabla 2.** Incidencia de modificaciones en el peptidoglucano [Modificado Vollmer, 2007].

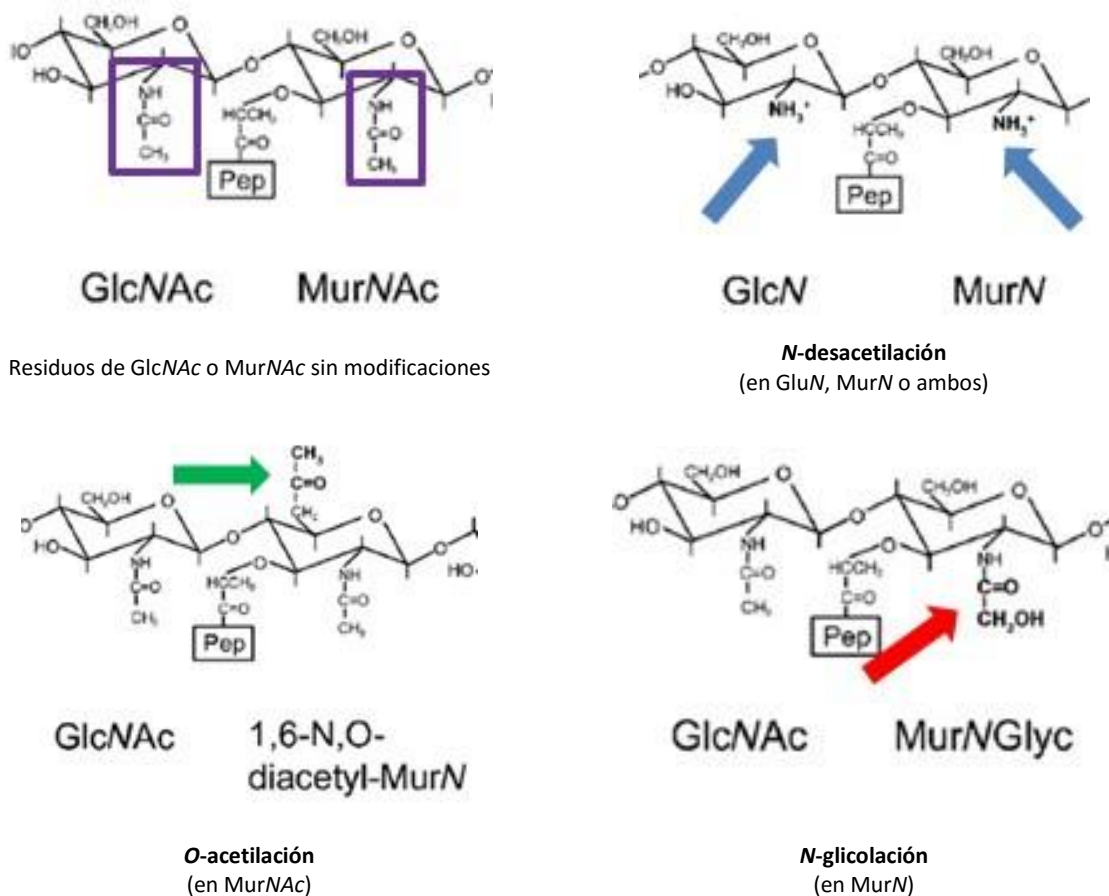
Modificación	Especie	Porcentaje de modificación
<b>N-desacetilación</b>	<i>Bacillus anthracis</i>	88 % (GluN); 34 % (MurN)
	<i>B. cereus</i>	77 % (GluN); 50 % (MurN)
	<i>B. thuringensis</i>	88 %; 26 %
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	ND (mayoría de GluN)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	ND (GluN)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	40-80 % (GluN), 10 % (MurN)
<b>O-acetilación (MurNAc)</b>	<i>Bacillus cereus</i>	24.7 %
	<i>Bacteroides fragilis</i>	69.4 %
	<i>Campylobacter jejuni</i>	62.7 %
	<i>Enterococcus faecalis</i>	19.1 %-58.3 %
	<i>E. faecium</i>	46.3 % / 57.1 % (fase estacionaria)
	<i>E. hirae</i>	26.2 %-68.3 %
	<i>Helicobacter pylori</i>	45.6 %
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	60 %-70 %
	<i>L. fermentum</i>	ND*
	<i>Staphylococcus aureus</i>	35 %-90 %

\*ND. No determinado

**N-glicolación.** Se da cuando existe la presencia de un residuo de glicolato en lugar del acetato en el ácido murámico (Figura 2. Flecha roja), fenómeno descrito por primera vez en *Mycobacterium*



*smegmatis*. Posteriormente se encontraron otras especies donde también se presenta, las cuales pertenecen a los géneros: *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, entre otros. Sin embargo el efecto de esta modificación aún no está descrito. La única diferencia que existe entre el residuo de acetato y glicolato es un grupo hidroxilo extra [Vollmer, 2007]. En el caso de *M. smegmatis* se deletó el gen de la proteína que lleva a cabo esta modificación (*namH*) y se observó que la cepa fue hipersensible a la lisozima y a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos [Raymond *et al.*, 2005].



**Figura 2.** Modificaciones en la cadena de glucano [Modificado Vollmer, 2007].

Estas modificaciones en la estructura del peptidoglucano, ya sea en la cadena de glucano o en los aminoácidos de la cadena peptídica, sirven para aumentar la resistencia a las enzimas que hidrolizan los diferentes tipos de enlaces presentes en esta red. Un grupo de este tipo de proteínas son las peptidoglucano hidrolasas que se describen a continuación.

#### 1.4. PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS (PGH's)

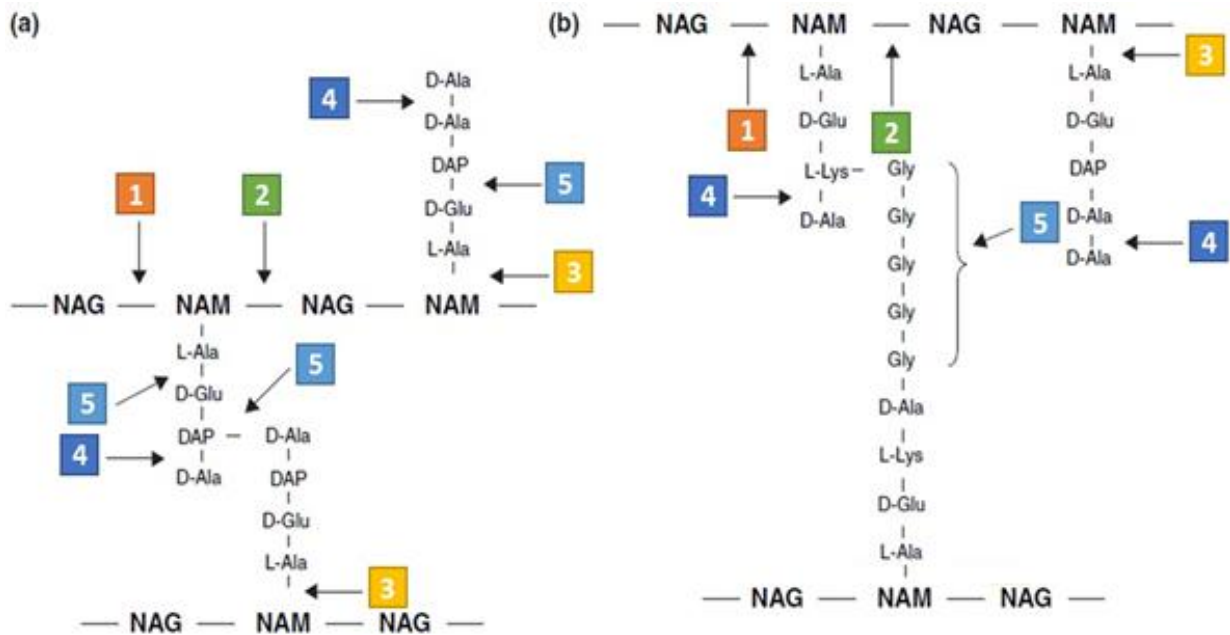
Son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos del peptidoglucano [Huard *et al.*, 2004]. Las PGH's están involucradas en diferentes funciones celulares, como el crecimiento, la división y la autólisis, además de poseer roles determinantes en procesos más específicos en la célula, como la formación del poro donde se produce el ensamblaje de los flagelos (Tabla 3) [Smith *et al.*, 2000; Huard *et al.*, 2004; Vollmer *et al.*, 2008a].

**Tabla 3.** Principales funciones de las peptidoglucano hidrolasas [Modificado Vollmer *et al.*, 2008a].

Función	Observaciones
<b>Extensión del peptidoglucano</b>	Ruptura de enlaces que permiten expandir el peptidoglucano
<b>Recambio del peptidoglucano</b>	Desarrollo de fragmentos solubles de peptidoglucano durante el crecimiento
<b>Separación celular durante y antes de la división celular</b>	Ruptura de la pared celular durante la división celular en bacterias Gram-negativas. Ruptura del entrecruzamiento después de la división en bacterias Gram-positivas
<b>Lisis de células</b>	Secreción de peptidoglucano hidrolasas para degradar el peptidoglucano de células blanco
<b>Formación de biopelículas</b>	Las peptidoglucano hidrolasas son necesarias para la construcción inicial de células con superficies hidrofóbicas

### 1.5. CLASIFICACIÓN DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

Dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen se clasifican en: *N*-acetilmuramidasa (muramidasa), *N*-acetilglucosaminidasa (glucosaminidasa), *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa (amidasa) y peptidasas [Lortal *et al.*, 1997; Loessner, 2005; Vollmer *et al.*, 2008a, Callewaert *et al.*, 2011] (Figura 3). Las peptidasas, dependiendo de su especificidad, se clasifican en carboxipeptidasas y endopeptidasas, e hidrolizan los enlaces peptídicos formados entre los aminoácidos característicos del peptidoglucano. Las carboxipeptidasas hidrolizan la ruptura del aminoácido ubicado en el carboxilo terminal (D-Ala) (Figura 3. 4) y las endopeptidasas hacen una escisión dentro de la cadena peptídica entre cualquier aminoácido (Figura 3. 5).



**Figura 3.** Actividades enzimáticas de las PGH's en el peptidoglucano de: (a) *E. coli* (b) *S. aureus*. 1. *N*-acetilglucosaminidasa. 2. *N*-acetilmuramidasa. 3. *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. 4 y 5. Peptidasas. NAG. *N*-acetilglucosamina. NAM. Ácido *N*-acetilmurámico. DAP. Ácido 2,6-diaminopimélico [Modificado Callewaert *et al.*, 2011].

Existe otra clasificación la cual se agrupan en dos clases dependiendo en donde se localiza la secuencia codificante [Lortal *et al.*, 2005]:

**Autolisinas.** Son enzimas codificadas en el cromosoma de las bacterias. La gran mayoría contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, el cual externaliza a la proteína. El peptidoglucano de la pared celular es degradado en sitios específicos durante el desarrollo de la célula. Como las autolisinas son peligrosas para la integridad de la célula, su expresión o actividad debe estar bien reguladas. Una vez producida la PGH, su regulación se lleva a cabo por algunas proteasas asociadas a la pared celular que disminuyen drásticamente su actividad autolítica.

**Endolisinas.** Esta clase de proteínas están codificadas en bacteriófagos y son exportadas por holinas (pequeños polipéptidos que se insertan dentro de la membrana citoplasmática de la bacteria hospedera). La función de las endolisinas es la hidrólisis completa de la pared celular para la liberación de los bacteriófagos.

#### 1.6. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

Este tipo de enzimas son potencialmente letales debido a que degradan la pared celular, por lo que deben de estar altamente reguladas para evitar la lisis celular. La regulación de la expresión y actividad de las enzimas líticas ocurre a múltiples niveles, desde el transcripcional al postraducciona, aunque existen poco ejemplos descritos de este tipo de regulación [Vollmer *et al.*, 2008a]. Un caso de regulación a nivel genético se describe en *B. subtilis*, donde la mayor actividad de peptidoglucano hidrolasa relacionada con la autólisis de las células se produce en la fase estacionaria de crecimiento [Foster, 1992], la cual está dada por dos enzimas: LytC (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa) y LytD (*N*-acetilglucosaminidasa) [Margot *et al.*, 1992; Margot *et al.*, 1994]. La mayor producción de estas dos proteínas coincide con la presencia de marcados cambios morfológicos (formación de flagelo) y fisiológicos (motilidad), los cuales están corregulados por el factor sigma SigD [Serizawa *et al.*, 2004], el cual probablemente también afecte el nivel de expresión de las peptidoglucano hidrolasas. Un ejemplo de regulación postraducciona es el procesamiento proteolítico de este tipo de enzimas para alcanzar su actividad óptima. En *S. aureus* la principal autolisina, llamada AtlA, es producida como proenzima de 138 kDa (Pro-AtlA), y mediante proteólisis genera dos enzimas extracelulares con mayor actividad, una *N*-acetilglucosaminidasa de 51 kDa y una *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amida de 62 kDa [Foster, 1995; Oshida *et al.*, 1995]. Además de estos ejemplos, se han propuesto otros mecanismos de regulación de la actividad de las peptidoglucano hidrolasas como cambios conformacionales y modificaciones covalentes del sustrato de estas enzimas [Atrih *et al.*, 1998; Bera *et al.*, 2005].

#### 1.7. APLICACIONES DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS EN LA CLÍNICA

Este tipo de enzimas se emplea como nuevos agentes antimicrobianos con aplicaciones clínicas [Fenton *et al.*, 2010; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015]. Numerosas peptidoglucano hidrolasas han sido reportados para el control de patógenos en biopelículas y superficies de algunas mucosas [Pastagia *et al.*, 2013]. Un ejemplo de esta aplicación clínica es el uso de dos endolisinas, PlyG y PlyPH, contra el tratamiento de infecciones por *Bacillus anthracis*, microorganismo altamente tóxico para los humanos. En algunos reportes la administración de las dos enzimas en ratones de prueba, impidió que murieran después de la infección por las células de *Bacillus* [Schuch *et al.*, 2002; Yoong *et al.*, 2006]. Otros

autores indican que las peptidoglucano hidrolasas tienen potencial uso terapéutico contra patógenos Gram-positivos resistentes a antibióticos [Fischetti 2010; Briers *et al.*, 2014], además de ser usados como desinfectantes de material médico para prevenir la colonización y evitar las infecciones post-quirúrgicas. En la Tabla 4 se muestran diferentes reportes del uso clínico de algunas peptidoglucano hidrolasas.

**Tabla 4.** Uso clínico potencial de endolisinas [Modificado Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015].

Enzima	Tratamiento o prevención	Microorganismo blanco
<b>PlyC</b>	Colonización de vías respiratorias	Streptococci (Grupo A)
<b>Cpl-1</b>	Endocarditis, meningitis, neumonía	<i>S. pneumoniae</i>
<b>PlyPy</b>	Bacteremia	<i>S. pyogenes</i>
<b>PlyG</b>	Infecciones	<i>B. anthracis</i>
<b>PlyPH</b>	Infecciones	<i>B. anthracis</i>
<b>MV-L</b>	Muerte séptica	MRSA*
<b>LysGH15</b>	Muerte séptica	MRSA*
<b>P27/HP</b>	Bacteremia	<i>S. aureus</i>

\*MRSA. *S. aureus* resistente a metilina

Debido al incremento de las enfermedades y decesos provocados por bacterias patógenas en los alimentos como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Listeria*, las peptidoglucano hidrolasas han surgido como una herramienta biotecnológica para el control de este problema [Loessner, 2005; García *et al.*, 2008; Callewaert *et al.*, 2011; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015].

### 1.8. APLICACIONES DE LAS PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS EN ALIMENTOS

La globalización del mercado de alimentos, los nuevos procesos de manufactura, el crecimiento en la demanda de alimentos menos procesados y 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.*, 2010]. A su vez la resistencia a antibióticos se ha extendido entre las bacterias presentes en los alimentos por transmisión horizontal de genes, a partir del uso indiscriminado de los mismos. Por esta razón se ha complicado el control de las enfermedades producidas por bacterias, provocando que la causa de mortandad por estas aumente a nivel mundial [García *et al.*, 2010; Moellering, 2011]. Esto ha llevado a la investigación, desarrollo y diversificación de alternativas para el control de bacterias patógenas [Donovan *et al.*, 2006a; Fischetti, 2008].

Las PGH's son una alternativa para los problemas antes mencionados ya que cuentan con una potente actividad *in vivo* e *in vitro* especialmente contra bacterias Gram-positivas, además de contar con actividad contra bacterias resistentes a antibióticos debido a que su mecanismo de acción es totalmente diferente al de los antibióticos [Parisien *et al.*, 2008; García *et al.*, 2010; Callewaert *et al.*, 2011; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015]. En la Tabla 5 se enumeran algunas de las ventajas y desventajas de este tipo de enzimas.

**Tabla 5.** Ventajas y desventajas del uso de PGH's en alimentos.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poca probabilidad a que se genere resistencia</li> <li>• No afecta a las propiedades organolépticas del alimento</li> <li>• Activos contra microorganismo resistentes a antibióticos</li> <li>• Mejoramiento de la actividad mediante ingeniería de proteínas</li> <li>• Termoestabilidad a los procesos térmicos, activos bajo condiciones de refrigeración de los productos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Susceptibilidad a la pérdida de actividad en pH's extremos</li> <li>• Susceptibilidad a la actividad proteolítica de los microorganismos propios del producto</li> <li>• Altos costos de producción</li> <li>• Pobre normatividad de este tipo de compuestos en alimentos</li> </ul>

Debido a todas las funciones que desempeñan en la célula las peptidoglucano hidrolasas son producidas por un gran número de bacterias y han sido reportadas en numerosas bacterias ácido lácticas (BAL's) presentes en diversos alimentos, ya sea por fermentación espontánea o por su adición como cultivos iniciadores en productos cárnicos y lácteos. Se ha reportado que algunas BAL's producen más de una enzima con actividad de peptidoglucano hidrolasa, y en algunos casos la misma proteína llega a poseer más de un tipo de actividad conferida por dos dominios catalíticos dentro de la misma secuencia [García-Cano, 2011]. En la Tabla 6 se presentan algunos ejemplos de PGH reportadas en BAL, con sus respectivas actividades enzimáticas encontradas *in vitro*.

**Tabla 6.** PGH's reportadas en bacterias ácido lácticas.

BACTERIA ÁCIDO LÁCTICA	ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DETECTADAS <i>IN VITRO</i>	REFERENCIA
<i>L. casei</i>	Glucosaminidasa	Cappa <i>et al.</i> , 1996
<i>L. helveticus</i>	Muramidasa	Lortal <i>et al.</i> , 1997
<i>P. pentosaceus</i>	Endopeptidasa	Mora <i>et al.</i> , 2003
<i>L. pentosus</i>	Glucosaminidasa y Endopeptidasa	Cibik <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactococcus lactis</i>	Glucosaminidasa, Muramidasa y Endopeptidasa	Huard <i>et al.</i> , 2004
<i>P. acidilactici</i>	Glucosaminidasa y Amidasa	García-Cano <i>et al.</i> , 2011
<i>Enterococcus spp.</i>	Glucosaminidasa	García-Cano <i>et al.</i> , 2014

Por otra parte, las endolisinas tienen el potencial de usarse en la conservación de alimentos para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos, debido a su alta especificidad contra ciertos microorganismos. Por esta razón son considerados como una opción viable y segura, además de representar una alternativa contra el uso de sustancias químicas que pudieran cambiar las características sensoriales y nutrimentales del alimento [Donovan *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015]. Algunos autores denominan a los endolisinas como enzibióticos [Borysowski *et al.*, 2006]. Ya se cuenta con numerosos reportes del efecto de diferentes enzibióticos en alimentos (Tabla 7) donde diferentes matrices de prueba fueron inoculados de manera intencional con microorganismos no deseados.

**Tabla 7.** Aplicaciones de enzibióticos en alimentos.

MICROORGANISMO BLANCO	ENZIMA	MATRIZ DE PRUEBA	REFERENCIA
<i>L. monocytogenes</i>	Ply511	Leche fermentada	Gaeng <i>et al.</i> , 2000
<i>Erwinia amylovora</i>	phiEalh	Superficie de frutas	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>S. aureus</i>	phi11	Leche	Donovan <i>et al.</i> , 2006b
<i>S. uberis</i>	Ply700	Leche	Celia <i>et al.</i> , 2008
<i>S. aureus</i>	LysH5	Leche pasteurizada	Obeso <i>et al.</i> , 2008
<i>L. monocytogenes</i>	CBDP40	Leche y quesos	Schmelcher <i>et al.</i> , 2011b
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	phiCTP1	Leche semi-descremada	Mayer <i>et al.</i> , 2010
<i>L. monocytogenes</i>	Lys	Leche de soya	Zhang <i>et al.</i> , 2012

La HEWL (Hen Egg White Lysozyme) es una enzima de origen no bacteriano, la cual es el único agente antibacteriano aprobado como bioconservador en Estados Unidos y otros países por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) y la OMS (Organización Mundial de Salud). El uso de este aditivo es principalmente para prevenir el crecimiento de *C. tyrobutyricum* en quesos madurados y para controlar el crecimiento de bacterias no deseadas en los vinos. Esta enzima solo es activa contra los organismos Gram-positivos [Callewaert *et al.*, 2011]. Otro ejemplo de una peptidoglucano hidrolasa cuya actividad antibacteriana en alimentos ha sido demostrada es la lisostafina [Szweda *et al.*, 2007], aunque su uso como bioconservador aún no ha sido aprobado por ningún organismo regulatorio. El blanco natural de la lisostafina es el enlace peptídico de la pentaglicina y su actividad es altamente específica contra a *Staphylococcus aureus* y especies relacionadas. Es una enzima de 27 kDa dependiente de zinc producida por *Staphylococcus simulans* biovar *staphylolyticus* [Fedorov *et al.*, 2003; Turner *et al.*, 2007]. Debido a que la lisostafina proviene de un género que no es reconocido como GRAS (Generally Recognized As Safe), se ha optado por la clonación y expresión heteróloga de este tipo de enzimas, por ejemplo en bacterias ácido lácticas para poderlas ocupar como cultivos iniciadores en la industria alimentaria. Por ejemplo, el gen *lss* que codifica para la lisostafina ha sido clonado y expresado en *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake*, para su potencial uso en alimentos cárnicos [Cavadini *et al.*, 1996]. Esto representa una opción para la sobreproducción, purificación y caracterización de este tipo de enzimas para su posterior aplicación en los alimentos.

### 1.9. CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE PEPTIDOGLUCANO HIDROLASAS

En muchos casos la cantidad de proteína de interés producida por la bacteria suele ser baja, la cual depende de distintos factores (ej. condiciones de cultivo, presencia de antibióticos, estrés metabólico, etc.). Una opción para la producción, su posterior estudio y en algunos casos llegar hasta la aplicación en los alimentos, es la clonación y expresión en sistemas heterólogos. La producción heteróloga de este tipo de enzimas es complicado ya que degradan el peptidoglucano del hospedero y resultan tóxicas para el mismo. La gran mayoría de reportes de peptidoglucano hidrolasas clonadas y

expresadas utilizan como hospedero a distintas cepas de *E. coli*, pero también se han utilizado BAL's para su producción y su potencial uso de alimentos [Cavadini *et al.*, 1996].

En las Tablas 8 y 9 se muestran reportes de este tipo de enzimas (autolisinas y endolisinas) clonadas y expresadas en sistemas heterólogos. Como se puede observar se utilizan diferentes vectores de expresión, siendo el más común, el sistema de expresión pET (Novagen, USA). Otro aspecto a resaltar es que en todos los reportes mostrados, la proteína de interés es intracelular, y para obtenerla es necesario lisar las células mediante sonicación y la ayuda de distintos buffers [Anzengruber *et al.*, 2014]. Esto probablemente se debe a que la mayoría de este tipo de enzimas tiene un dominio catalítico activo y un dominio que se une a la pared celular [Vollmer *et al.*, 2008a]. Algunos autores indican que para evitar la formación de cuerpos de inclusión, además de evitar la degradación del hospedero, es necesario disminuir la temperatura de expresión, la cual generalmente es de 37 °C [Obeso *et al.*, 2008; Zoll *et al.*, 2010; Tillman *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015].

**Tabla 8.** Ejemplos de autolisinas clonadas y expresadas.

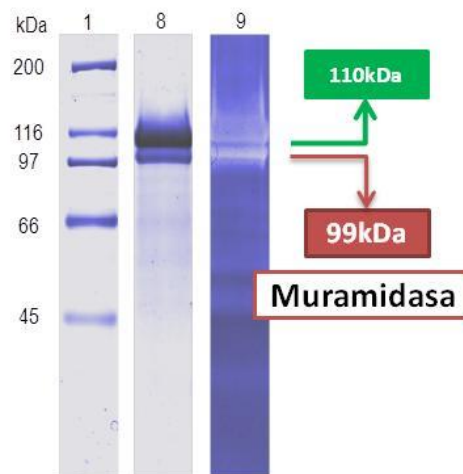
Referencia	Zoll <i>et al.</i> , 2010	Mehta <i>et al.</i> , 2013	Tillman <i>et al.</i> , 2013	Anzengruber <i>et al.</i> , 2014	Xu <i>et al.</i> , 2015
<b>Enzima</b>	<b>AtIE</b>	<b>AmiBA2446</b>	<b>PlyCpAmi</b>	<b>LbGH25</b>	<b>AclB</b>
<b>Fuente</b>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. casei</i>
<b>Vector utilizado</b>	pGEX 4T-3	pGS-21a	pET21a	pET28a	pET22b
<b>Cepa expresión</b>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)
<b>Inductor/ [Conc.]</b>	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 0.25 mM	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 0.1 mM

**Tabla 9.** Ejemplos de endolisinas clonadas y expresadas.

Referencia	Yoon <i>et al.</i> , 2005	Donovan <i>et al.</i> , 2006b	Obeso <i>et al.</i> , 2008	Park <i>et al.</i> , 2012	Briers <i>et al.</i> , 2014
<b>Enzima</b>	<b>PlyL</b>	<b>phi11</b>	<b>LysH5</b>	<b>LysBPS13</b>	<b>Art-085</b>
<b>Fuente</b>	Fago λBa02	Bacteriófago de <i>S. aureus</i>	Fago ΦH5	Fago BPS13	Fago ΦKZ
<b>Vector utilizado</b>	pET22b	pET21a	pUC18/ pRSETB	pET15b	pET21a
<b>Cepa expresión</b>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLys	<i>E. coli</i> BL21 Star (DE3)	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLys
<b>Inductor/ [Conc.]</b>	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 1 mM	IPTG/ 0.5 mM

## 2. ANTECEDENTES

*Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, es una bacteria ácido láctica que tiene un efecto bioconservador en productos cárnicos [Rivera, 2004]. Esta cepa no codifica para la producción de pediocinas [Mora *et al.*, 2000], por lo que el efecto bactericida que presenta se debe a otro tipo de metabolitos. La función de PGH en esta especie es desconocida, probablemente esté relacionada con los procesos de autólisis [Mora *et al.*, 2003]. Sin embargo, en extractos celulares de esta cepa evaluados en zimogramas contra *Micrococcus lysodeikticus* se reportaron dos bandas con actividad lítica a los 110 y 99 kDa (Figura 4). La banda de 110-kDa es una proteína putativa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7\_4 que contiene a una región conservada de transportador ABC, mientras que la banda de 99 kDa obtuvo un 100 % de identidad con una *N*-acetilmuramidasa reportada en un cluster de proteínas altamente conservadas en el género de *Pediococcus* (Figura 5). Con el extracto que contenía las dos proteínas se realizó un espectro antibacteriano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mediante la técnica de difusión en agar, y se encontró actividad contra algunas bacterias no deseables en alimentos, entre las que resaltan: *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* [García-Cano *et al.*, 2011].



**Figura 4.** Detección de actividad de PGH en *P. acidilactici* ATCC 8042. 1. Marcador de peso molecular. 8. SDS-PAGE 9. Zimograma contra *M. lysodeikticus*. Modificado García-Cano *et al.*, 2011.

Organism	Protein name	Accession	Locus_tag	Length (aa)	Identical group
<i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4	<i>N</i> -acetylmuramidase	WP_002829921	HMPREF9024_00876	927	WP_002829921
<i>Pediococcus acidilactici</i> D3	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ, flgJ	WP_005919257	PAD3_1521	370	WP_005919257
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	<i>N</i> -acetylmuramidase	WP_004166676	HMPREF0623_1669	935	WP_004166676
<i>Pediococcus acidilactici</i> MA18/5M	<i>N</i> -acetylmuramidase	WP_002831131	KIW_02218	935	WP_002831131
<i>Pediococcus lolii</i> NGRI 0510Q	<i>N</i> -acetylmuramidase	WP_008841826	PLO_1325	929	WP_008841826
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	<i>N</i> -acetylmuramidase	WP_011673076	PEPE_0453	859	WP_011673076
<i>Pediococcus pentosaceus</i> IE-3	<i>N</i> -acetylmuramoyl-L-alanine amidase family protein	WP_002834075	PCPN_1331	940	WP_002834075

**Figura 5.** Cluster de proteínas (*N*-acetilmuramidasa) conservado en *Pediococcus* (NCBI).



El análisis de las secuencias de estas proteínas se realizó tomando como referencia el genoma de *P. acidilactici* 7\_4, primer genoma reportado para esta especie. En éste, la secuencia de la *N*-acetilmuramidasa contiene 927 aminoácidos, y se distinguen por presentar dos dominios catalíticos: de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y de *N*-acetilglucosaminidasa, además de un péptido señal de 22 aminoácidos. Algunos autores denominan a este tipo de enzimas con dos dominios de diferente tipo de actividad de PGH's como autolisinas bifuncionales, las cuales han sido reportadas y caracterizadas principalmente en el género *Staphylococcus* [Oshida *et al.*, 1995; Bourgeois *et al.*, 2009; Zoll *et al.*, 2010]. En la Figura 6 se muestra la secuencia en aminoácidos de la proteína reportada de 99 kDa, donde se pueden observar ambos dominios catalíticos. Además dentro del dominio de amidasa se encuentran identificados los aminoácidos involucrados en la actividad anotados en la base de datos (sitios de unión al sustrato, sitios de unión a Zn<sup>2+</sup> y residuos catalíticos).

```

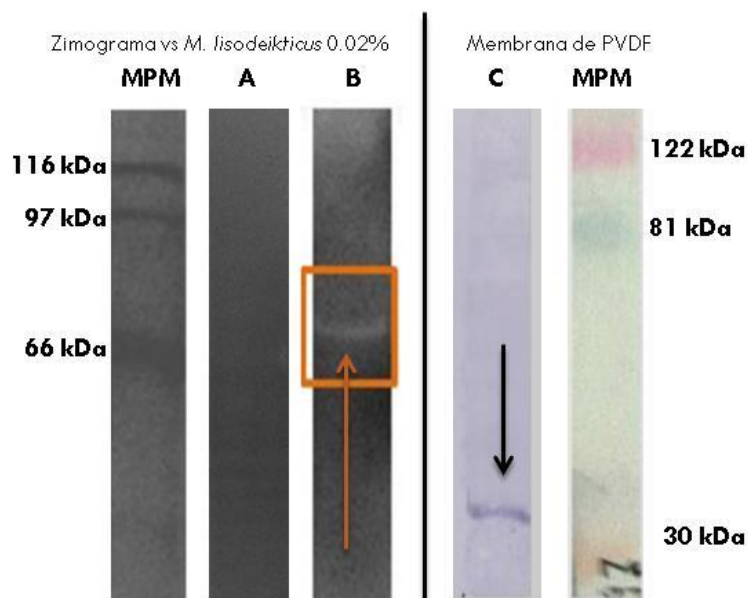
1 MFKSGKKWAF ASIATASLGL VALNTNAEKA HADSDAQANT NSASQLDQQT KTAPVNEKQV
61 TLAKPATVKA SSAAVTAQSA APAPSAAQSA AKVNADSTAK ADQHSAAAKV GTKATTSSAV
121 KPAKEAASAN AVKAAPASSA AKKVSTSVAS SAAPSSAASK TVTSAAVKDS AAKEAVSSAA
181 NVKSSSAAAK TSVNSSAVSE AAKKDAKAEK TAEKKTDNSS KDYTIDNTYR LADNEGSDQK
241 TNNKIIVAHAVGQYSSARDV AIYEKREWDS SETYVQYIVG DGGRVYAVGE EGYVAWGAGK
301 WANENAPVQV ELAQYSDSQ FKKDYQTYVN LLRDSAKKWN IPTTLDSEY TGIKSHVWVT
361 EHVWGNHMDPYGYLGTHGIT KEQFAHDLAY GFDNDAANDN QNNNQNDNHQ NDNQNNQNNN
421 HQNDSSNNHG NQNNQSYHVG DKVTIKNSAS HWATGQSIYN GVKGHTYKII QTNGHKLLLD
481 QVISWINDGD VYKAGSNSGS SNNHNNHHTT NNADIKVGTV VTINNNASHW ATGQSIYSGV
541 KGKSYKVIQT NGRLLLDKV ISWINKGDVH VPGSNSNNNN SGNQNHNGN NHHNNNGTES
601 IHVGSKVTIN NNAKRWATGQ NIYSGVKGKT YTVIQMNGSR LLDKVISWI NKGDVHLPGS
661 NGSQNNNNNN NNHANNNDGT IRVGTNVTIK PSAKRWATGQ NIYGVKGT YKVIQMNGNR
721 LLDKVISWI NKGDVVPGS SNNNNSNSNN NHHNNGSNYH FTNQNWTAQ TNFVNSIASD
781 VMNVCQNNHL YASVAMAQAV VESAYGASTL AQEAHNLFGI KADSTWHGAT YTKNTQEVIN
841 GRVVTISAAF RKYDSFKDSI ADYAKKLESR PQYANAFSNH AHNYVESVKA IKAGGYATAP
901 TYVSSIVNCI NNYGFYKLDG LNSAISL

```

**Figura 6.** Secuencia en aminoácidos de la enzima *N*-acetilmuramidasa reportada en el genoma de *P. acidilactici* 7\_4. Rojo: péptido señal. Morado: dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. Verde: domino de *N*-acetilglucosaminidasa. Amarillo: Sitios de unión a Zn<sup>2+</sup>. Los residuos de unión a carbohidrato se encuentran subrayados y los residuos catalíticos se encuentran dentro de los recuadros [RefSeq: WP\_002829921; NCBI, 2015].

En trabajos más recientes se clonó y expresó la *N*-acetilmuramidasa de 99 kDa [Campos-Gómez, 2013] utilizando como vector de clonación y expresión el plásmido pET-22b el cual cuenta con un tallo de histidinas en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) y un péptido señal que dirige la proteína recombinante al periplasma, además de presentar una secuencia dentro de este vector que codifica para la resistencia a la ampicilina. Esta proteína recombinante se expresó en *E. coli* XL-1 Blue con las siguientes condiciones de inducción: 0.1 mM de inductor (IPTG), 2 h de inducción, 37 °C y 200 rpm, encontrando en la fracción celular actividad lítica en zimogramas con *M. lysodeikticus* como sustrato a 70 kDa, por debajo del peso molecular esperado (99 kDa) y por medio de Western-Blot se observó una señal positiva por arriba de 30 kDa (Figura 7). Probablemente esta enzima sufre alguna ruptura en el extremo C-terminal, donde se encuentra el tallo de histidinas del vector utilizado. Esto se explica porque el ensayo de Western-Blot se realizó ocupando un anticuerpo que reconocía el tallo de

histidinas, lo que indica que la proteína recombinante se traduce de manera correcta, pero que por alguna razón se fragmenta y aun así, mantiene la actividad lítica. Estos resultados sugieren que el dominio que le confiere la actividad lítica a la enzima es la región ubicada en el extremo amino terminal que corresponde al dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa.



**Figura 7.** MPM. Marcador de peso molecular A. pET-22(b) en *E. coli* XL-Blue B. Proteína recombinante pET22-99. C. Western-Blot (anticuerpo: AntiHis6x-AP)

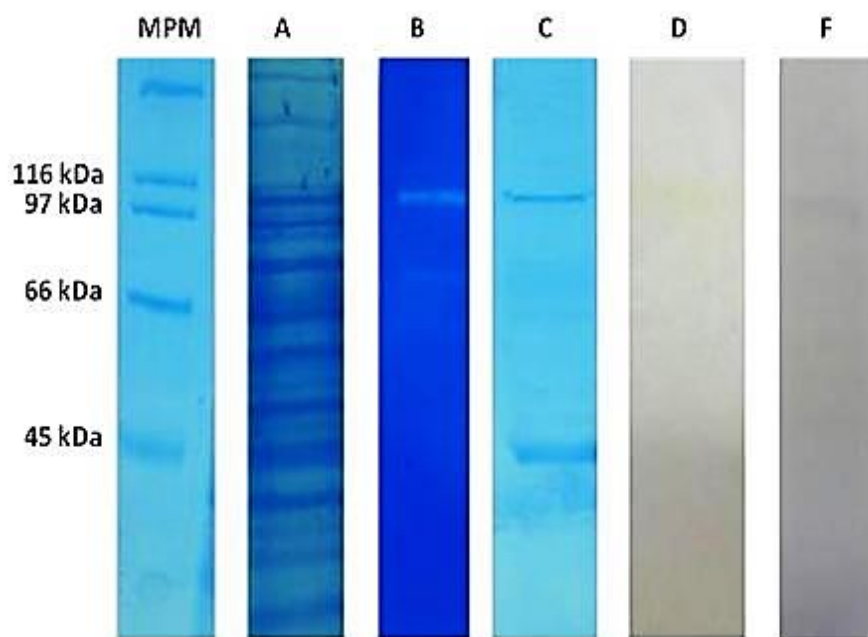
Paralelamente se clonó y expresó la proteína de 99 kDa utilizando un vector diferente (pET-19b) [García-Cano, 2013] que posee características distintas al pET-22b (Tabla 10). Entre las diferencias resalta la posición del tallo de histidinas, el cual se encuentra en el N-terminal para el caso del pET-19b, para evitar la posible ruptura en el C-terminal antes mencionada.

**Tabla 10.** Diferencias entre los vectores de clonación y expresión utilizados

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

Cuando se trabajó con el vector pET-19b se ocuparon las mismas condiciones de inducción reportadas anteriormente [Campos-Gómez, 2013]. Se encontró actividad lítica en el extracto extracelular (sobrenadante), el cual fue concentrado mediante ultrafiltración y se semi-purificó con una columna de exclusión molecular. Esta actividad lítica se encontró a 99 kDa en zimogramas con *M. lysodeikticus* como sustrato, que corresponde con la masa molecular teórico. Además se observó una señal positiva en el Western-Blot (muy tenue) y en el zimograma con 4-nitrofenil-*N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamida [Barbosa-

González, 2015] al mismo tamaño (Figura 8). Posteriormente se realizó la caracterización bioquímica de la enzima semi-pura obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 11.



**Figura 8.** MPM. Marcador de peso molecular A. Extracto extracelular. B. Zimograma contra *M. lysodeikticus* C. Proteína semi-pura D. Zimograma contra 4-Nitrophenil N-acetil- $\beta$ -D-glucosamida F. Western-Blot (anticuerpo: AntiHis6x-AP)

**Tabla 11.** Caracterización bioquímica de la proteína recombinante

pH optimo	Estabilidad a pH	Temp. optima de actividad	Temperatura de inactivación
6	5 – 7	60 °C	70 °C

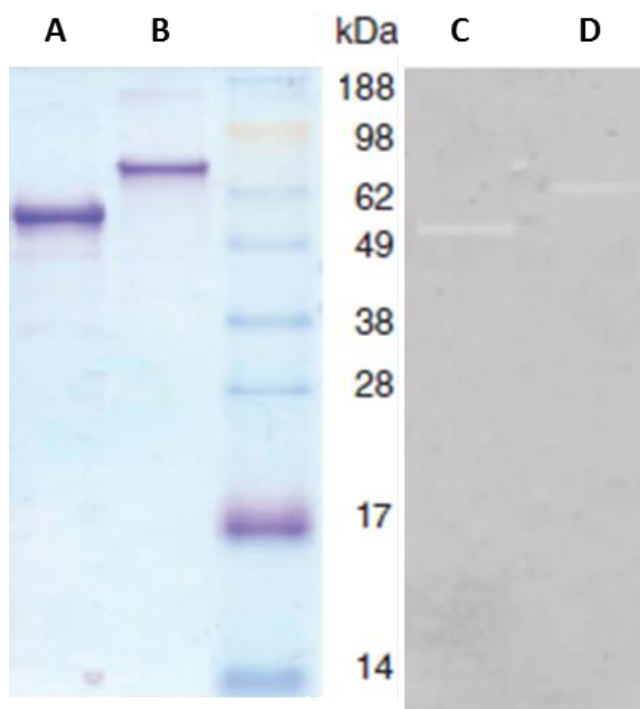
Efecto de activadores e inhibidores sobre la actividad de la enzima		
Zn <sup>2+</sup>	EGTA	EDTA / Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> / Na <sup>2+</sup>
Disminuye un 80 % [1 mM]	Disminuye un 80 % [10 mM]	No tienen efecto en la actividad

Recientemente, los resultados presentados de la clonación, expresión y caracterización de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99-kDa producida por *P. acidilactici* ATCC 8042 fueron publicados en la revista internacional *Applied Microbiology and Biotechnology* [García-Cano *et al.*, 2015]. Ya se encuentra disponible en la base de datos del NCBI el gen que codifica para esta proteína el cual se nombró *paci99* en este trabajo (GenBank accession number: KP728239). La secuencia en aminoácidos de la proteína de *P. acidilactici* ATCC 8042 ya se encuentra reportada como una peptidoglucano hidrolasa bifuncional (GenBank: AKD44141).

Se han reportado diferentes enzimas con dos dominios de actividad de PGH en su secuencia, semejantes a la proteína de 99 kDa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, es decir, dominios de N-

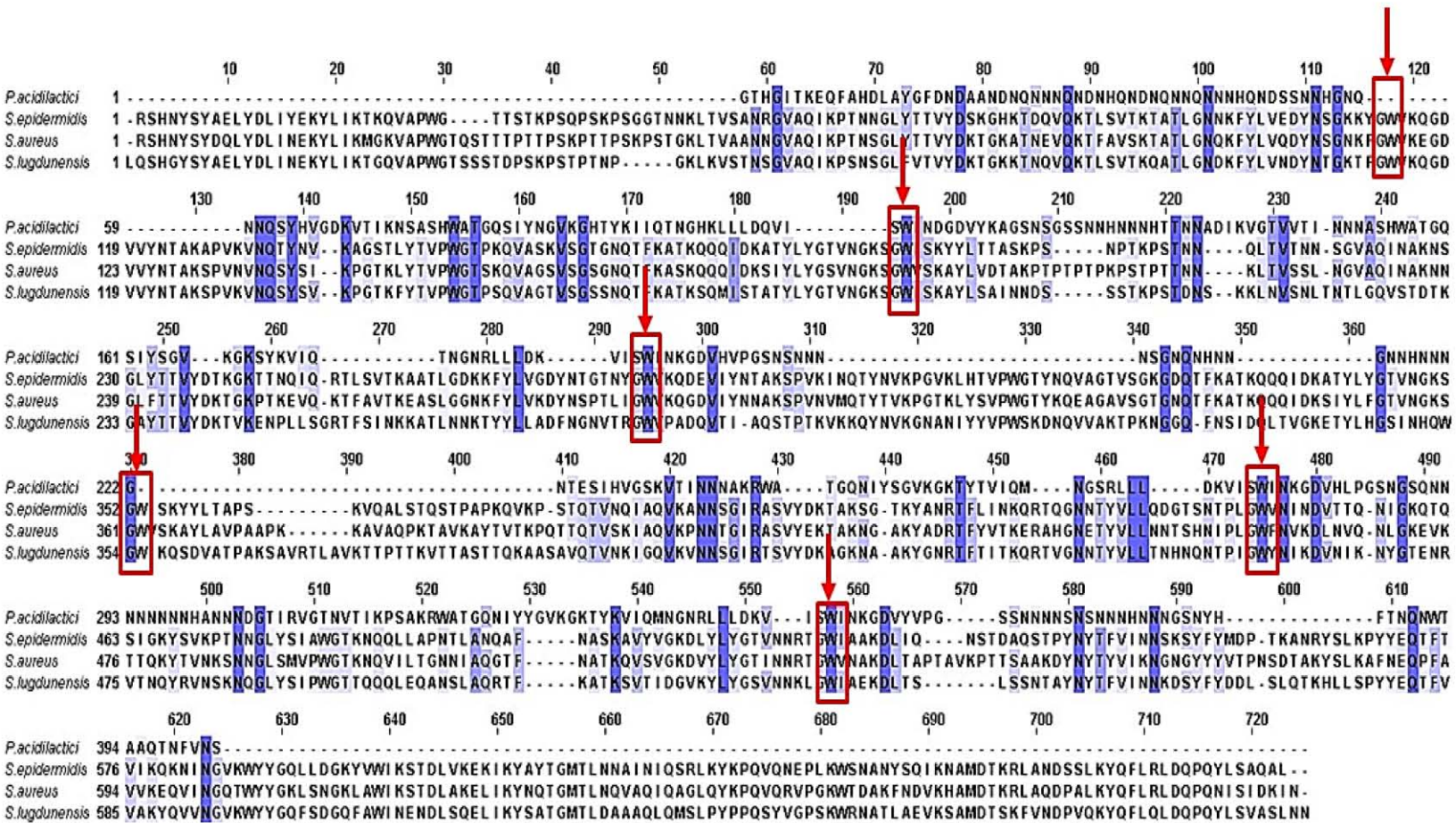
acetilmuramil-L-alanina amidasa y de *N*-acetilglucosaminidasa, sin embargo estas proteínas fueron reportadas en el género *Staphylococcus* [Oshida *et al.*, 1995; Bourgeois *et al.*, 2009; Zoll *et al.*, 2010]. Estas enzimas presentan una secuencia entre los dominios catalíticos que contiene dipéptidos de glicina y triptófano (GW), las cuales se denominan secuencias repetidas (R1, R2 y R3) y se relacionan con el anclaje a la membrana celular [Bublitz, *et al.* 2009]. Algunos autores han subclonado los genes que codifican para estas proteínas, es decir, han generado proteínas recombinantes las cuales contienen un solo dominio catalítico (Figura 9). Con esta información se buscó si la secuencia intermedia entre los dominios de la enzima de *P. acidilactici* tiene homología con las secuencias reportadas en *Staphylococcus*; para esto se realizaron alineamientos múltiples con las secuencias de aminoácidos de las proteínas disponibles en las bases de datos, las cuales ya se encontraban caracterizadas (Figura 10). No se encontraron los dipéptidos GW en la secuencia de la proteína de 99 kDa, pero se encontraron varias secuencias ricas en asparaginas (N) [García-Cano *et al.*, 2015].

Se tiene la hipótesis que esta región puede estar involucrada en la unión con la pared celular. Por lo tanto, en este trabajo se plantea diseñar cebadores para amplificar los dominios de *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa y de *N*-acetilglucosaminidasa con fragmentos de diferente longitud de la cadena intermedia rica en asparaginas, para comprobar si la cantidad de residuos que se encuentran entre los dominios catalíticos podría modificar la actividad lítica. Cabe resaltar que para el género *Staphylococcus* ambos dominios tienen actividad de manera independiente (Carriles C y D, Figura 9).



**Figura 9.** Actividad lítica detectada de los dominios independientes en *S. lugdunensis*. A y C. Dominio de *N*-acetilglucosaminidasa B y D. Dominio de *N*-acetilmuramyl-L-alanina amidasa. A/B. SDS-PAGE. C/D. Zimograma contra *M. lysodeikticus* [Modificado Bourgeois *et al.*, 2009].

**Figura 10.** Alineamiento múltiple de las secuencias en aminoácidos de la región intermedia entre el género *Staphylococcus* (*epidermidis*, *aureus* y *lugdunensis*) y la PGH bifuncional reportada en *P. acidilactici* ATCC 8042. En rojo se representan los dipéptidos GW.



Este trabajo pretende dilucidar si la actividad de peptidoglucano hidrolasa de la proteína de 99 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042 sólo esta conferida por alguno de los dos dominios presentes en la secuencia de aminoácidos, o si es necesaria la unión de ambos dominios para que se manifieste la actividad lítica.

### **3. HIPÓTESIS**

Los dominios de amidasa y glucosaminidasa presentes en la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa reportada en *P. acidilactici* ATCC 8042 (GenBank: AKD44141) tienen actividad por separado, es decir, aunque se clonen de manera independiente mantendrán la actividad lítica.

### **4. OBJETIVOS**

- Determinar si los dominios de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa muestran actividad lítica de manera independiente mediante su clonación y expresión en sistemas heterólogos para determinar el grado de participación de cada una en la actividad antimicrobiana mostrada por la misma.
- Determinar las mejores condiciones de expresión y recuperación de proteínas recombinantes con el fin de maximizar la producción.
- Determinar si la región intermedia entre los dos dominios, rica en asparaginas (N) es importante para que se manifieste la actividad lítica de los dominios catalíticos reportados para esta enzima.

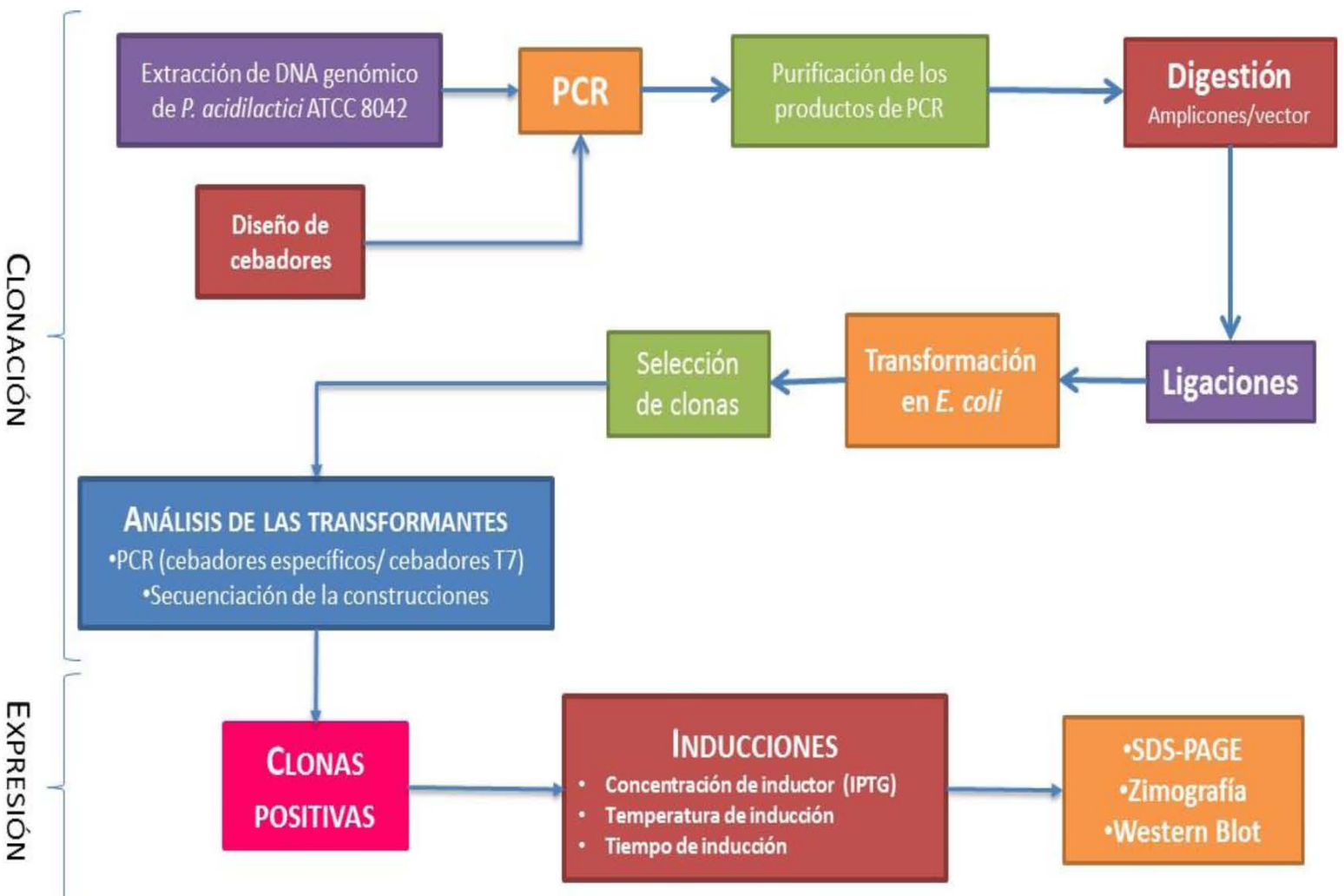


Figura 11. Diagrama general de la metodología a seguir

## 5.1. GENERACIÓN DE LAS SUBCLONAS DE AMBOS DOMINIOS CATALÍTICOS

### 5.1.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Cepas y plásmidos usados

CEPA / PLÁSMIDO	OBSERVACIONES
<i>P. acidilactici</i> ATCC 8042	Cepa de colección ATCC.
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3) pLysS	Cepa de clonación y expresión (Novagen, USA). Ampliamente reportada en la expresión de genes tóxicos.
pET-22b	Vector de expresión, resistencia a Ampicilina, promotor T7 <i>lac</i> , <i>His-Tag</i> en el amino terminal (Novagen, USA).

### 5.1.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE *P. acidilactici* ATCC 8042

Se realizó un preinóculo partiendo de la cepa conservada a -20 °C de *P. acidilactici* ATCC 8042, y se adicionaron 200 µL a un tubo con 10 mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). El preinóculo se incubó a 29 °C durante 12 h. Se realizó una resiembra adicionando 1.5 mL del preinóculo a un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo MRS, el cual se incubó bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 a una longitud de onda de 600nm (DO<sub>600nm</sub>). Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 8,500 rpm durante 20 min a 4 °C. El paquete celular se lavó dos veces con solución salina 0.85 % de NaCl pH = 7.0, se centrifugó bajo las mismas condiciones y el paquete celular se guardó a -20 °C. Después se resuspendió en 450 µL de buffer TE, con 50 µL de una solución de lisozima (10 mg/mL) y 10 µL de una solución de mutanolisina (1 U/µL). Se incubó durante 1 h a 37 °C a 300 rpm, posteriormente se adicionaron 30 µL de una solución de RNasa (0.1 µg/mL) y nuevamente se incubó a 37 °C durante 30 min. Finalizado el tiempo, se agregaron 50 µL de una solución de proteínasa K (10 mg/mL) y se incubó a 50 °C, 50 min y 65 °C 10 min. Se dejó enfriar para adicionar 10 µL de SDS al 10 % y se incubó a 37 °C por 40 min. Finalmente se adicionaron 200 µL de una solución NaCl 6M y 400 µL de la fase orgánica de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) (SIGMA), se centrifugó a 14,000 rpm, 10 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa. Esta se lavó 2 veces con 500 µL de cloroformo centrifugando a 14,000 rpm, 10 min, 4 °C. Se recuperó la fase acuosa (superior) libre de cloroformo y se añadió 1 mL de etanol 100 % y se incubó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 14,000 rpm, 10 min y se descartó la fase acuosa. La pastilla se lavó con 300 µL de etanol al 75 % centrifugando a 14,000 rpm, 2 min y 4 °C. Al ADN obtenido se le adicionaron 100 µL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular y se calentó a 65 °C, 15 min y 300 rpm para determinar la concentración de ADN obtenida.

### 5.1.3. DISEÑO DE CEBADORES

Se diseñaron cebadores específicos (Tabla 13a y 13b) para amplificar las dos dominios del gen de interés de *P. acidilactici* ATCC 8042 de manera independiente (amidasa y glucosaminidasa). En la Figura 12 se representan las regiones que se amplificaran a partir de la secuencia del gen que codifica para la



proteína de 99 kDa así como el tamaño esperado de cada amplicon. Como se observa se obtendrán distintas subclonas de la misma enzima.

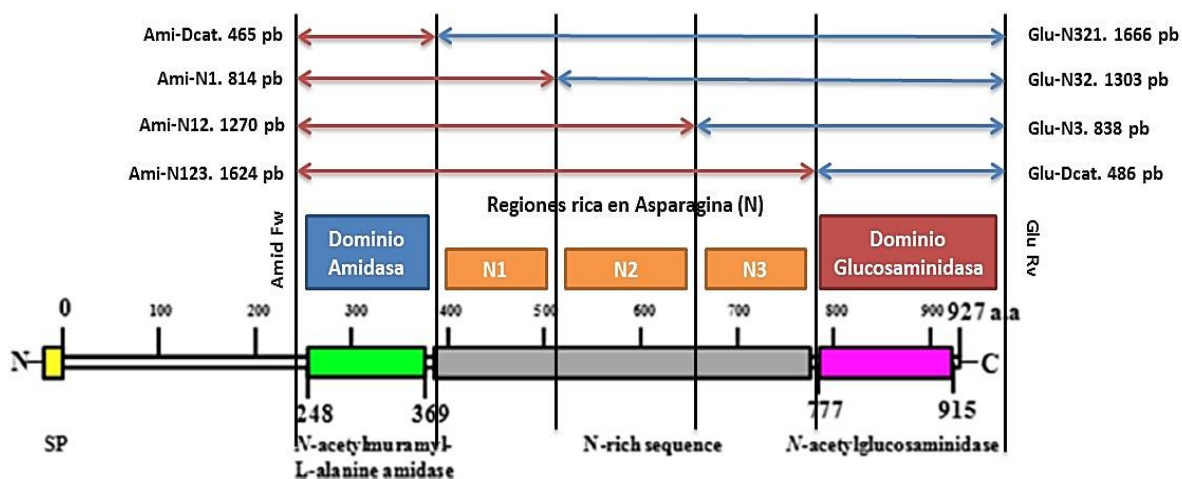


Figura 12. Cebadores utilizados para amplificar ambos dominios. Se indica el tamaño de amplicón esperado para cada región.

Tabla 13a. Cebadores diseñados para el dominio de *N*-acetilmuramyl-*L*-alanina amidasa.

Primer	Dirección	Secuencias (5´-3´)	Long.	Tm (°C)
<b>Amid Fw</b>	Forward	CTCGAGCTCAGGTAGCGATCAAAAG	25	59.3
<b>N1 Rv</b>	Reverse	CCGAAGCTTCGAACCGGAATTAGAA	25	57.7
<b>N12 Rv</b>	Reverse	CGGAAGCTTCTTGTTGATCCAGC	23	57.1
<b>N123 Rv</b>	Reverse	CAGAAGCTTTTGAGCAGCCGTCCA	24	59.1
<b>DCat Rv</b>	Reverse	CCGAAGCTTCTGTTCTTGTAATTC	26	58

Tabla 13b. Cebadores diseñados para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa.

Primer	Dirección	Secuencias (5´-3´)	Long.	Tm (°C)
<b>Dcat Fw</b>	Forward	GCGAGCTCAACTAATTGTTAACA	25	54.4
<b>N3 Fw</b>	Forward	CGGAGCTCAGGTGATGTTACCTT	24	59.1
<b>N32 Fw</b>	Forward	CTGAGCTCTCCGTTTCGTCAAACAA	26	59.5
<b>N321 Fw</b>	Forward	GCGAGCTTCATGGAATTACCAAG	24	57.4
<b>Glu Rv</b>	Reverse	CGGAAGCTTCAACGAAATTGCTGAG	25	57.7

#### 5.1.4. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES DE INTERÉS DE AMBOS DOMINIO

Para la amplificación de las diferentes secuencias del gen de interés se realizaron reacciones de PCR (Termociclador Maxigene, Axygen) con la enzima *Pfu* DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA). Se utilizó el ADN genómico de *P. acidilactici* ATCC 8042 como ADN templado (100 ng). Los cebadores se utilizaron a una concentración final de 0.1  $\mu$ M y los dNTP's (Fermentas, USA) a 0.1 mM. De la enzima se ocuparon 1 U y el buffer de la enzima (10X PCR buffer, Thermo-Scientific) se diluyó a una

concentración final de 1X. Se adicionó agua para llevar a un volumen final de 25 µL por cada reacción. Las condiciones térmicas se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Condiciones térmicas de la PCR a partir de ADN genómico

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 s	35
<b>Alineamiento</b>	58 °C – 60 °C *	30 s	
<b>Extensión</b>	72 °C	4 min	
<b>Extensión final</b>	72 °C	10 min	1

\* La temperatura de alineamiento varía de acuerdo al %GC de cada primer

Para la purificación de los productos de PCR a partir de banda se utilizó el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA) y se siguieron las especificaciones recomendadas por el proveedor.

#### 5.1.5. ELABORACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

**Digestión:** Los fragmentos amplificados y purificados de los distintos fragmentos de la secuencia se digirieron con dos enzimas de restricción, *Sac* I (5'-GAGCT<sup>^</sup>C-3') y *Hind* III (5'-A<sup>^</sup>AGCTT-3') (Thermo Scientific, USA), las cuales fueron tomadas en cuenta durante el diseño de todos los cebadores. La mezcla de reacción de la digestión de cada producto consistió en aproximadamente de 750 ng a 1 µg de ADN templado para reacción; se utilizaron 5 U de cada enzima de restricción (stock: 10 U/µL), además de buffer de reacción a una concentración final 1X (10X Buffer Tango, Fermentas). El volumen de cada reacción de digestión fue de 20 µL. Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h, y posteriormente se inactivaron las enzimas a 70 °C durante 10 min. El plásmido pET-22b también se digirió de la misma manera. Posteriormente los productos de todas las digestiones fueron purificadas a partir de banda con el GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, USA).

**Ligación:** Para generar cada construcción se utilizó una relación vector: inserto igual a 1:3 de ADN. Para cada digestión de utilizó 50 ng de vector, 1 U de T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific, USA) y el buffer de la enzima a una concentración final de 1X, cada reacción tuvo como volumen final 20 µL. Esta mezcla de reacción se incubó a 22 °C durante 1 h, posteriormente se mantuvo a 65 °C durante 10 min para inactivar a la enzima. Las 8 construcciones generadas fueron las siguientes:

- |    |            |    |            |
|----|------------|----|------------|
| 1) | p22AmiDcat | 5) | p22GluDcat |
| 2) | p22AmiN1   | 6) | p22GluN3   |
| 3) | p22AmiN12  | 7) | p22GluN32  |
| 4) | p22AmiN123 | 8) | p22GluN321 |

#### 5.1.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Los productos de las ligaciones se transformaron en la cepa *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen), la cual es ampliamente utilizada para la expresión de proteínas tóxicas debido a que cuenta con un plásmido adyacente que confiere resistencia a cloranfenicol y codifica para la síntesis de la T7 lisozima, inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa. Debido a esta inhibición la expresión basal de la proteína tóxica dentro del hospedero se verá afectada por una mayor regulación [pET System Manual,

Novagen]. La cepa utilizada estaba almacenada en glicerol al 15 % a -70 °C, de estas se realizó un preinóculo de 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) adicionado con cloranfenicol (concentración final 34 µg/mL) del cual se transfirieron 500 µL a 50 mL de medio LB, hasta llegar a una DO<sub>600nm</sub> entre 0.1-0.25, posteriormente se centrifugaron a 8,500 rpm durante 10 min. Las células obtenidas se resuspendieron en 15 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se dejaron incubar en hielo durante 30 min. Se centrifugaron para obtener las células, se resuspendieron en 2 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se dejaron incubar al menos 2.5 h a 4 °C. Se agregó glicerol a una concentración final de 20 % y se almacenaron a -70 °C.

#### **5.1.7. TRANSFORMACIÓN**

Se realizó la mezcla de transformación, que consiste en 85 µL de células competentes + 7.5 µL de cada reacción ligación, y se dejó incubar 30 min en hielo. Después se les aplicó un choque térmico, elevando la temperatura a 42 °C durante 2 min, se incubaron en hielo durante 5 min, se transfirió la mezcla de transformación a un tubo de 1.5 mL, se le agregó 1 mL de medio LB para recuperar las células (37 °C, 200 rpm, 1 h y 20 min). Se centrifugó el tubo a 8,500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en 200 µL de medio LB y se plaqueó sobre cajas de agar LB con ampicilina (concentración final 100 µg/mL) y cloranfenicol (concentración final 34 µg/mL). Se seleccionaron colonias al azar las cuales se inocularon en tubos de 5 mL de medio LB con los antibióticos necesarios y se incubaron aproximadamente 12 h a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente se extrajo el plásmido de las colonias seleccionadas, para lo que se ocupó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific), siguiendo las especificaciones señaladas por el proveedor. Este plásmido se ocupará para el posterior análisis de las transformantes.

#### **5.1.8. ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES**

Utilizando como ADN templado los plásmidos extraídos de las colonias seleccionadas para cada construcción, se realizó la PCR con los cebadores universales T7, los cuales están presentes en la secuencia del vector. Para todas las subclonas generadas se utilizaron los cebadores T7promotor (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y T7terminador (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3') cuya T<sub>m</sub> es 55 °C. Paralelamente también se realizaron las reacciones de PCR con cebadores específicos, es decir, los diseñados para cada una de las construcciones. En ambos casos, se utilizó la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Thermo Scientific). Estas reacciones de PCR se realizaron de la misma manera que anteriormente fue descrita. Como control negativo se utilizó una transformante la cual contenía el vector de clonación pET-22b sin ningún inserto.

#### **5.1.9. SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES**

Se secuenciaron las 8 construcciones generadas con el fin de verificar que realmente contengan el fragmento del gen de interés. Para esto fue necesario realizar una extracción de plásmido a cada transformante positiva y posteriormente enviarlo a los laboratorios de MacroGen Inc (Seúl, Corea). Con los resultados de la secuenciación se realizaron alineamientos en contra de los fragmentos correspondientes obtenidos *in silico* con la ayuda del software Serial Cloner v1.3.

#### **5.1.10. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS**

La conservación de las cepas que contenían la construcciones ya verificadas se realizó haciendo un preinóculo de cada una de ellas en un tubo con 5 mL de medio LB con los antibióticos correspondientes, tomando una alícuota de 200  $\mu$ L de los tubos que contenían a las colonias positivas incubando a 37 °C, 200 rpm, durante 12 h. Posteriormente se realizó una resiembra en un tubo con 5 mL de medio LB con el antibiótico adecuado, incubando a las mismas condiciones hasta llegar a una  $DO_{600nm}$  = 0.6-0.8. Después se tomaron 0.8 mL del cultivo adicionando 0.2 mL de glicerol al 80 % y se colocaron en un criovial para ser almacenados a -70 °C.

### **5.2. EXPRESIÓN**

#### **5.2.1. INDUCCIONES**

Se realizó un preinóculo partiendo de la construcción a expresar conservada a -70 °C, adicionando 100  $\mu$ L por cada 5 mL de medio LB, incubado a 37 °C, 200 rpm, durante 12 h. Este preinóculo se resembró tomando una alícuota (1 % con respecto al volumen de inducción) que fue agregado a matraces Erlenmeyer con medio LB adicionado con los antibióticos indicados para el vector (pET-22b) y la cepa de expresión (*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS): ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y cloranfenicol (34  $\mu$ g/mL). Para el dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa sólo se agregó ampicilina, ya que cuando se realizó la inducción en presencia de ambos antibióticos los niveles de expresión de la proteína recombinante fueron considerablemente menores, dificultando la detección de la actividad lítica.

Los matraces se incubaron a 37 °C y 250 rpm hasta llegar a una  $DO_{600nm}$  entre 0.5 y 0.8, después se adicionó IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (Thermo Scientific) como inductor en una concentración final de 0.4 mM y se dejó incubar 3 h en las mismas condiciones. Posteriormente los cultivos de centrifugaron a 8,500 rpm durante 15 min para separar las células. Estas células se resuspendieron en buffer Tris-HCl 10 mM pH = 8, ajustando la  $DO_{600nm}$  entre 2.0 y 2.5, posteriormente se sonicaron (Sonic Dismembrator F550 Ultrasonic Homogenizer, Fisher Scientific, USA) utilizando pulsos de 30 s con 20 s de descanso durante 7 min a 4 °C. Después se centrifugó a 17,000 rpm durante 20 min a 4 °C para separar la fracción citosólica (I) de los restos celulares (II). El extracto extracelular fue concentrado por ultrafiltración (III) utilizando una membrana Amicon® MWCO de 10 kDa (Merck Millipore, USA) hasta obtener aproximadamente el 5 % de volumen inicial. Las fracciones que se evaluaron son las siguientes: I. Fracción citosólica II. Restos celulares III. Extracto extracelular.

#### **5.2.2. DETERMINACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO Y DE ACTIVIDAD LÍTICA POR ZIMOGRAMAS**

El perfil proteico de todas las fracciones fue determinado por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) a 120 V durante 3 h. Los geles se prepararon al 10 % o al 12 % de poliacrilamida con los reactivos necesarios para la elaboración según lo indicado por el proveedor (manual de Bio-Rad Mini-PROTEAN 3). Los SDS-PAGE se tiñeron con azul de Coomassie y se destiñeron con solución desteñidora (10 % etanol/ 10 % ácido acético/ 80 % agua) en agitación suave.

Los SDS-PAGE que se tiñeron con plata se dejaron incubando toda la noche con solución fijadora (30 % etanol/ 10 % ác. acético), posteriormente se realizaron 2 lavados con etanol al 30 % durante 30 min cada uno y después 2 lavados con agua desionizada durante 10 min cada uno. Se agregó la solución de plata que consiste en 250 µL de una solución stock de nitrato de plata al 20 % en 50 mL de agua desionizada y se incubó durante 30 min con agitación. Luego se hicieron 2 lavados con agua desionizada durante 1 min y se reveló con una solución de carbonato de sodio 2.5 %/ formaldehído 37 % hasta la aparición de bandas en el gel. Al final se enjuagó con agua desionizada.

Para la elaboración de los zimogramas se prepararon geles con 0.2 % de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* como sustrato (Leclerc *et al.*, 1989). Una vez realizada la electroforesis, el gel se lavó con agua desionizada, se adicionaron 70 mL de buffer de renaturalización (Tris-HCl 10 mM pH = 8.0 con Tritón X-100 al 1 % v/v) y se incubó a 37 °C aproximadamente 12 h en agitación suave. Finalmente el gel se tiñó con 0.01 % de KOH y 0.1 % de azul de metileno durante 30 min y se destiñó con agua destilada. El peso molecular de las bandas de actividad lítica fue determinado por la comparación con marcadores de peso molecular (Bio-Rad, USA).

### **5.2.3. WESTERN-BLOT**

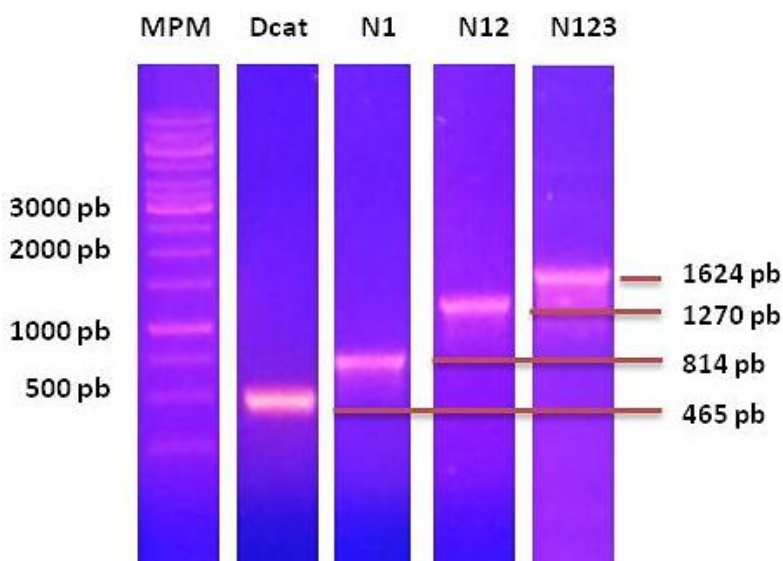
Para corroborar que la actividad estaba conferida por las enzimas recombinantes se realizaron ensayos de Western-Blot utilizando un anticuerpo (Anti-His (C-term) Mouse Monoclonal Antibody, Alkaline Phosphatase Conjugate, Life technologies, USA) que reconoce al tallo de histidinas el cual se encuentre en el C-terminal. Se corrió un SDS-PAGE y posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) PolyScreen® (Perkin-Elmer, USA) a 15 V durante 2 h en un equipo Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad), con un buffer de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM y metanol al 10 % (v/v)). La membrana fue bloqueada con leche descremada (Skim milk, Difco) al 5 % (p/v) en buffer TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 7.5) adicionado con Tween-20 al 0.05 % (v/v) dejando en agitación a temperatura ambiente durante 1.5 h. Después de este tiempo, la membrana de PVDF fue lavada con 20 mL de buffer TBS con Tween 20 por lo menos 3 veces durante 15 min y se le adicionó el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (1:7500) diluido en el mismo buffer, se incubó durante 2 h en agitación suave a temperatura ambiente. Al final de este tiempo se lavó la membrana nuevamente con 20 mL de buffer TBS 3 veces durante 15 min y se adicionó la solución reveladora de NBT/BCIP (Perkin-Elmer), que se dejó actuar hasta la aparición de bandas moradas, que indican la presencia de las proteínas con el tallo de histidinas. Todo este procedimiento se realizó a temperatura ambiente.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. DOMINIO DE *N*-ACETILMURAMIL-*L*-ALANINA AMIDASA

#### 6.1.1. SUBCLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *paci99* PARA EL DOMINIO DE *N*-ACETILMURAMIL-*L*-ALANINA AMIDASA

En la Figura 13 se observan los productos de las PCR's para cada uno de los fragmentos de interés a partir de DNA genómico (AmiDcat, AmiN1, AmiN12, AmiN123) utilizando los cebadores diseñados para este dominio (Tabla 13a). Se obtuvieron los 4 amplicones esperados los cuales correspondían con el tamaño esperado, el cual se calculó realizando un PCR *in silico* con el programa Serial Cloner 1.3.



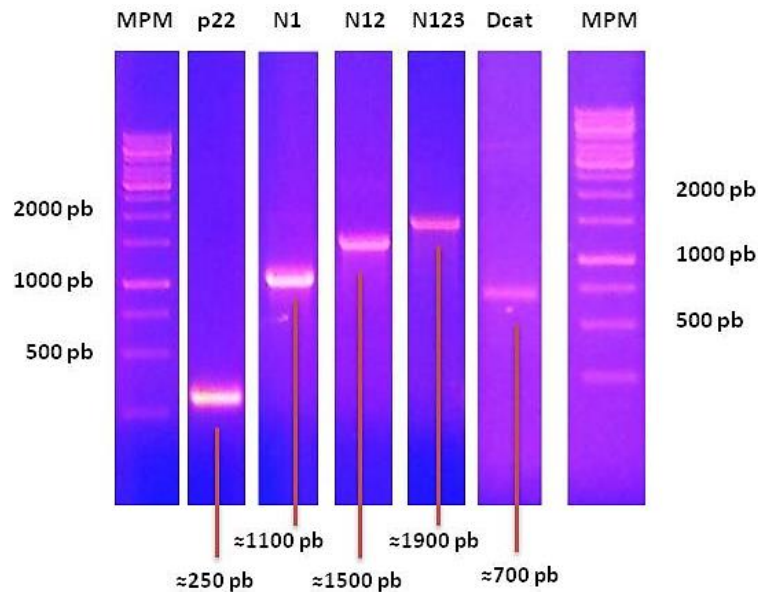
**Figura 13.** Amplificación de los fragmentos del gen *paci99*. MPM. Marcador de pb Dcat. 465 pb N1. 814 pb N12. 1270 pb N123. 1624 pb. Gel de agarosa al 1 % revelado con bromuro de etidio (0.01 %).

#### 6.1.2. ELABORACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Los amplicones obtenidos a partir de ADN genómico se purificaron y posteriormente se realizó la digestión, tanto del vector (pET-22b) como de estos amplicones (AmiDcat, AmiN1, AmiN12, AmiN123). Dichos productos digeridos y puros se utilizaron para realizar la mezcla de ligación. Los productos de las ligaciones se transformaron en la cepa *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS (Novagen), la cual es ampliamente utilizada para la expresión de proteínas tóxicas debido a que cuenta con un plásmido adyacente que confiere resistencia a cloranfenicol y codifica para la síntesis de la T7 lisozima, inhibidor natural de la T7 RNA polimerasa. Debido a esta inhibición la expresión basal de la proteína tóxica en el hospedero se verá afectada por una mayor regulación [pET System Manual, Novagen]. Después de seleccionar las colonias al azar y sembrarlas en 5 mL de medio LB adicionando los respectivos antibióticos (ampicilina y cloranfenicol) se incubaron aproximadamente 12 h a 37 °C y 200 rpm, para posteriormente extraer el plásmido de cada una de ellas y así realizar el análisis para verificar que la colonia seleccionada si contenía el gen de interés.

### 6.1.3. ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES

En la Figura 14, se observan los amplicones obtenidos utilizando como ADN templado los plásmidos extraídos de cada una de las construcciones presuntamente positivas, amplificadas con los cebadores universales T7. Estos cebadores deben amplificar un producto del tamaño de cada inserto más 250 pb de la región de T7 propia del vector utilizado. Como se observa en la imagen, cada una de las 4 construcciones evaluadas presenta los amplicones en el tamaño esperado. Además aparece el control negativo, el cual consiste en el vector pET-22b sin ningún inserto, transformado en la misma cepa que se utiliza para la expresión de las proteínas recombinantes (*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS). Posteriormente se procedió con la secuenciación.

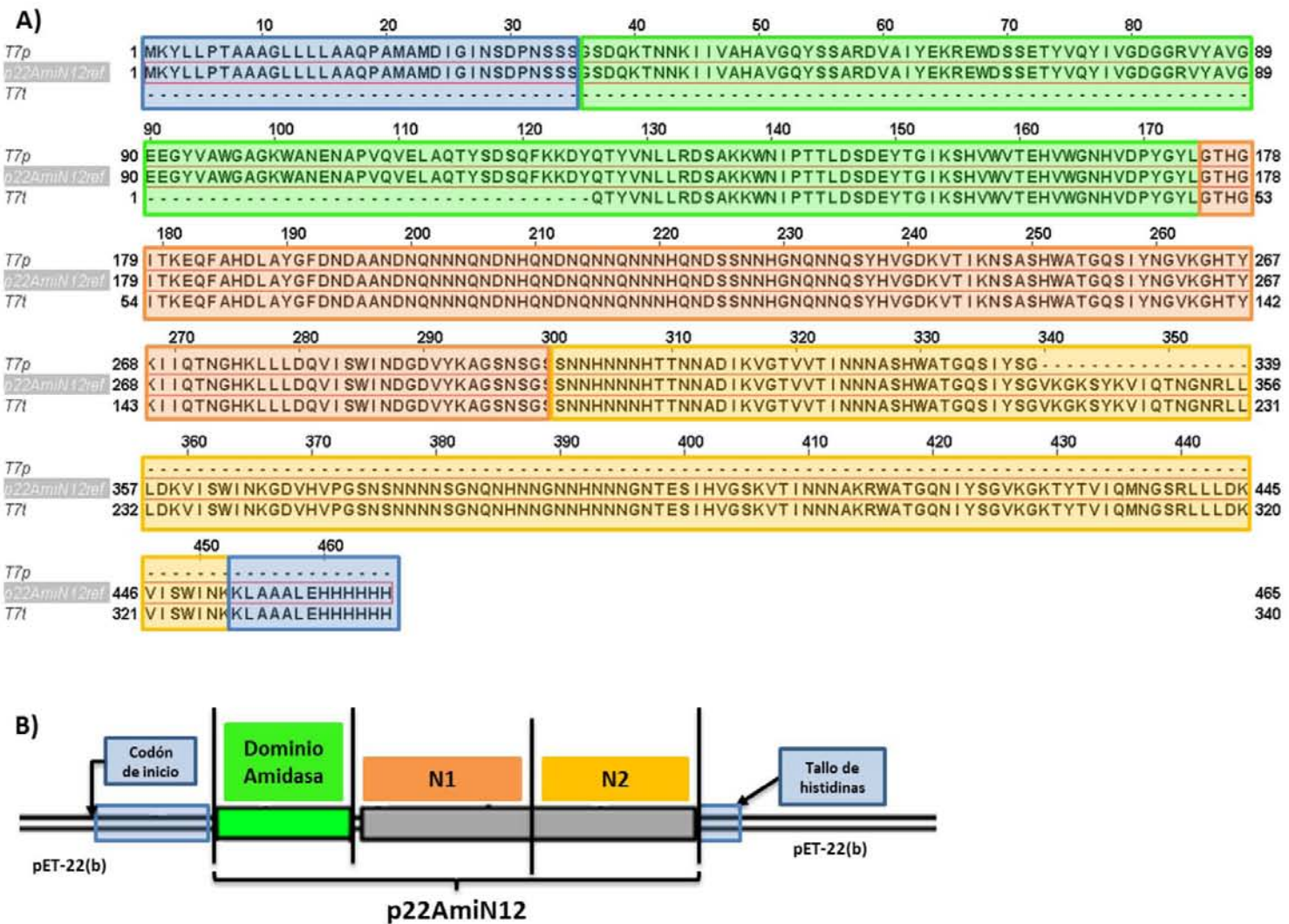


**Figura 14.** Análisis de las transformantes para el dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa MPM. Marcador de pb. Gel de agarosa al 1 % revelado con bromuro de etidio (0.01 %).

### 6.1.4. SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Las construcciones se mandaron a secuenciar a los laboratorios de MacroGen Inc (Seúl, Corea). Se analizaron los cromatogramas para determinar desde qué nucleótido era confiable la secuencia. Se obtuvieron lecturas de un poco más de 1000 pb en promedio, de las cuales el 75 % de las lecturas eran confiables, es decir, los picos en el cromatogramas se encontraban bien definidos. Posteriormente las secuencias de nucleótidos se tradujeron a aminoácidos con ayuda del servidor ExPASy Translate tool (<http://web.expasy.org/translate/>) y se alinearon contra las referencias correspondientes con el servidor MAFFT v7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Para las 4 construcciones secuenciadas se comprobó que el fragmento del gen de interés de cada una estaba presente y en marco de lectura correcto. Para el análisis de cada construcción la secuencia en pares de bases resultantes de la secuenciación con los cebadores T7 las cuales se tradujeron a aminoácidos. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple contra la construcción esperada que fue diseñada *in silico* con ayuda del software Serial Cloner v2.1. Como se puede observar en la Figura 15a, para el caso de la construcción p22AmiN12 no se presentó ningún cambio con respecto a la secuencia de referencia. En la Figura 15b se muestra la representación gráfica de la construcción utilizada en este ejemplo. En ninguna de las 4

construcciones obtenidas y analizadas (p22AmiDcat, p22AmiN1, p22AmiN12, p22AmiN123) se encontraron cambios en la secuencia.



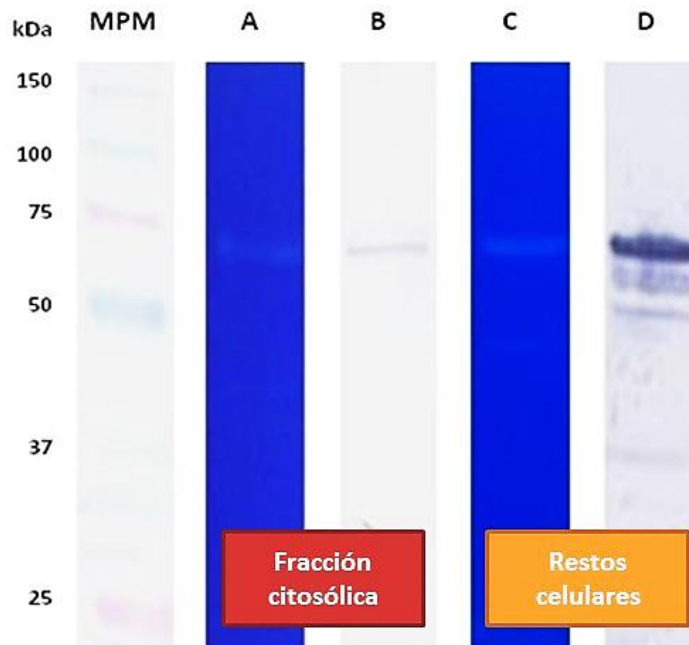
**Figura 15. A)** Alineamiento de la secuencia en aminoácidos contra la referencia **B)** Representación gráfica de la construcción p22AmiN12. Azul. Secuencia propia del vector pET-22b. Verde. Dominio de *N-acetilmuramyl-L-alanina* amidasa. Naranja. N1 Amarillo. N2. El código de colores en ambos figuras es el mismo.



### 6.1.5. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON EL DOMINIO DE *N*-ACETILMURAMIL-*L*-ALANINA AMIDASA

Se realizaron inducciones de todas las subclonas generadas para el dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. Se utilizaron distintas condiciones para cada una de ellas: concentración de IPTG (0.1, 0.4 y 1 mM) y diferentes tiempos de inducción (2, 3, 4 y 8 h). Posteriormente se intentó detectar actividad lítica con zimogramas contra *M. lysodeikticus* de las diferentes fracciones obtenidas de cada condición de inducción (sobrenadante, fracción citosólica y restos celulares) realizada con cada una de las 4 diferentes subclonas.

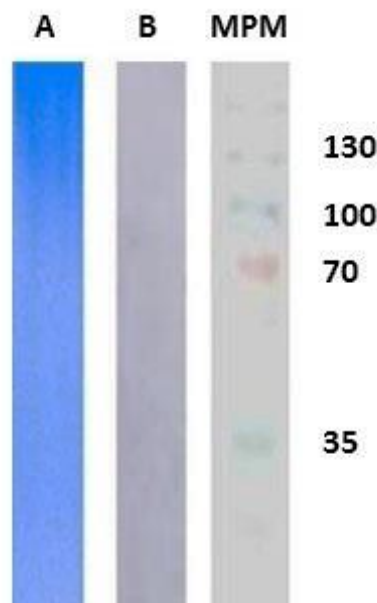
La única subclona que presentó actividad lítica en zimogramas contra *M. lysodeikticus* fue p22AmiN123 (condiciones: 37 °C, 250 rpm, 3 h) encontrada en dos fracciones: fracción citosólica y restos celulares (Figura 16). Además se corroboró que la actividad esta conferida por la proteína recombinante generada debido a que la señal positiva del Western-Blot está a la misma altura, por debajo de los 70 kDa, que corresponde con el peso molecular teórico de esta subclona, que es de 65 kDa, determinado con ayuda del software ExPasy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A pesar de que el vector pET-22b cuenta con un péptido señal (*pelB* leader) que direcciona la proteína expresada al periplasma, no se detectó actividad lítica en el extracto extracelular (datos no mostrados). Esto podría indicar que la proteína recombinante tiene cierta afinidad por la pared celular donde se encuentra el sustrato y no es secretada al exterior de la célula. En los reportes de peptidoglucano hidrolasas clonadas y expresadas utilizando el mismo vector (pET-22b) encuentran la proteína recombinante en la fracción citosólica [Yoon *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2015].



**Figura 16.** Diferentes fracciones de la subclona p22AmiN123. A y C. Zimograma contra *M. lysodeikticus* B y D. Western-Blot. MPM. Marcador de peso molecular

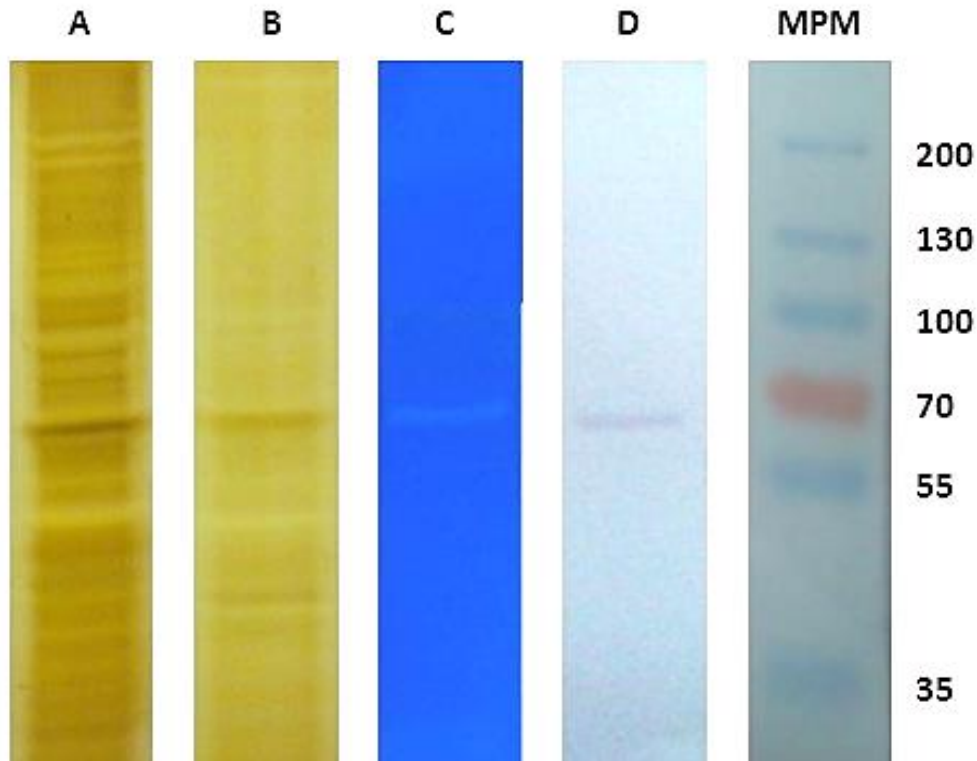
Cabe mencionar que la región de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa está contenida dentro de un dominio conservado denominado PGRP Superfamily (Peptidoglycan Recognition Proteins) el cual está

definido en la base de datos (NCBI Conserved Domain Search) como una región de aminoácidos los cuales se unen, y en algunos casos hidrolizan, al peptidoglucano de la pared celular. Esta familia incluye a las *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasas dependientes de zinc. Este dominio conservado contiene sitios de unión a sustrato los cuales podrían estar interactuando con el peptidoglucano de la pared celular [Guan *et al.*, 2004], por esta razón la proteína recombinante no es secretada al exterior de la célula, lo cual explicaría por qué encontramos una banda más intensa de actividad en zimogramas y en el ensayo de Western Blot en la fracción de restos celulares (Figura 16. Carriles C y D). Paralelamente se realizó el mismo tratamiento a control negativo, que es la cepa utilizada (*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS) transformada con el vector pET-22b sin ningún inserto, y se indujo bajo las mismas condiciones. Se evaluó la fracción de restos celulares del control negativo y, como se observa en la Figura 17, no se detectó actividad lítica en zimogramas ni señal positiva en el Western Blot.



**Figura 17.** Control negativo A. Zimograma contra *M. lysodeikticus* B. Western-Blot MPM. Marcador de peso molecular

Posteriormente se trató de purificar la fracción citosólica con ayuda de cromatografía de afinidad contra el tallo de histidinas presente en la proteína recombinante. Se ocupó una resina Protino-Ni TED (MACHEREY-NAGEL, Alemania). Se inyectó la muestra y posteriormente se lavó la columna con buffer de lavado (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl, pH = 8) para remover todas las proteínas que no interaccionaron con la resina. Se eluyó utilizando imidazol a una concentración de 25 mM adicionado al buffer de lavado. Como se observa en la Figura 18, se logró semipurificar la proteína recombinante, es decir, aunque en el perfil electroforético (Carril B) la banda más intensa corresponde a la enzima de interés, también se observan algunas bandas de distintos tamaños. Cabe mencionar que ninguna de estas bandas presentó actividad en zimogramas contra *M. lysodeikticus* ni señal positiva en el Western Blot, excepto la proteína de interés a un tamaño por debajo de los 70 kDa que corresponde con el peso molecular teórico.



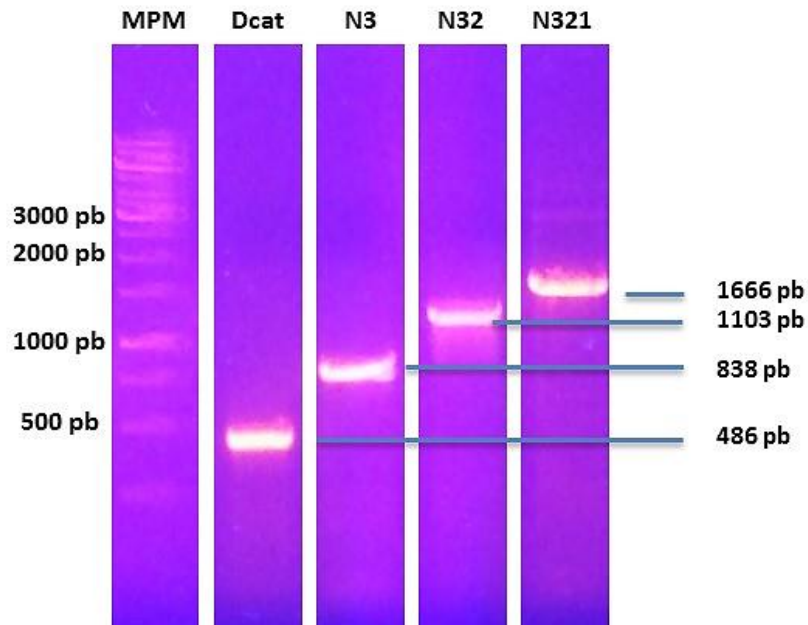
**Figura 18.** Purificación parcial de la subclona p22Amin123. MPM. Marcador de peso molecular. A. SDS-PAGE fracción citosólica (tinción de plata). B. SDS-PAGE Enzima semipura (tinción de plata). C. Zimograma contra *M. lysodeikticus* con la enzima semipura. D. Western-Blot con la enzima semipura.

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, el dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa presenta actividad lítica por sí mismo y no es necesario que se encuentre unido al dominio de *N*-acetilglucosaminidasa. Cabe mencionar que la subclona en la cual se detectó actividad lítica contiene la región rica en asparaginas (p22Amin123), lo que sugiere que ésta es necesaria para manifestar la actividad de la región de amidasa. De algún modo esta región puede estar afectando el plegamiento de la proteína o la afinidad por el sustrato y sólo cuando están presentes estos residuos la enzima es capaz de degradar el peptidoglucano. Se encuentran muy pocos reportes acerca de estas regiones ricas en asparaginas, los cuales indican que dichos residuos ayudan a las proteínas a formar agregados, además de ser regiones desordenadas estructuralmente; cabe mencionar que ninguno de estos ejemplos fue descrito en Eubacterias [Muralidharan *et al.*, 2013]. Por lo tanto la función de estas regiones en la secuencia de la peptidoglucano hidrolasa de *P. acidilactici* ATCC 8042 aun es desconocida.

## 6.2. DOMINIO DE *N*-ACETILGLUCOSAMINIDASA

### 6.2.1. SUBCLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS DEL GEN *paci99* PARA EL DOMINIO DE *N*-ACETILGLUCOSAMINIDASA

En la Figura 19 se observa los productos de las PCR's para cada uno de los fragmentos de interés a partir DNA genómico (GluDcat, GluN3, GluN32, GluN321) utilizando los cebadores diseñados para este dominio (Tabla 13b). Se obtuvieron los 4 amplicones al tamaño esperado para este dominio, lo cual fue determinado de la manera descrita anteriormente.



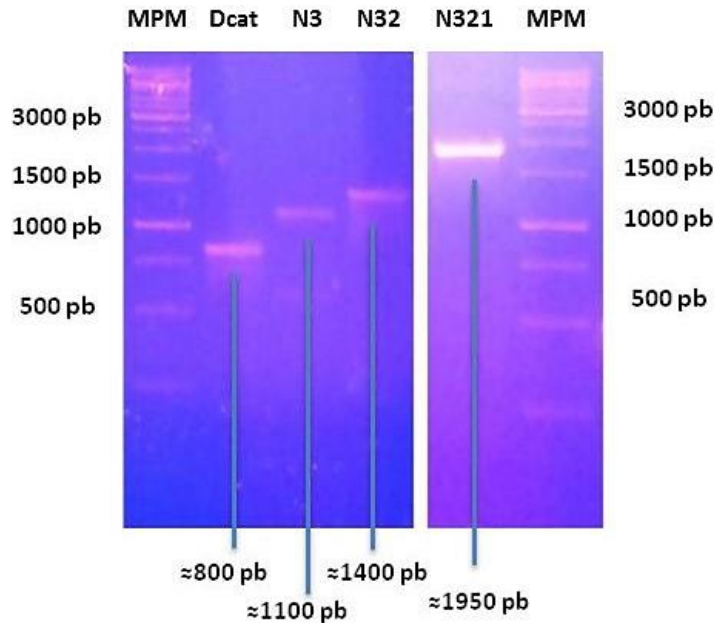
**Figura 19.** Amplificación de los fragmentos del gen *paci99*. MPM. Marcador de pb. Dcat. 486 pb N1. 838 pb. N12. 1103 pb. N123. 1666 pb. Gel de agarosa al 1 % revelado con bromuro de etidio (0.01 %).

### 6.2.2. ELABORACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Las construcciones para este dominio se realizaron siguiendo los mismos protocolos antes descritos, se ocupó el mismo vector de clonación (pET-22b) y también se transformó en la misma cepa (*E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS). Para las digestiones y las ligaciones se utilizaron las mismas concentraciones y enzimas que en el caso del dominio de amidasa. Después de seleccionar las clonas al azar, se extrajo el plásmido de colonia a partir de 5 mL de cultivo para su análisis.

### 6.2.3. ANÁLISIS DE LAS TRANSFORMANTES

En la Figura 20 se observan los amplicones obtenidos utilizando como DNA templado los plásmidos extraídos de cada una de las construcciones positivas, amplificados con los cebadores universales T7. Como se observa en la imagen, las 4 construcciones evaluadas muestran los amplicones en el tamaño esperado.



**Figura 20.** Análisis de las transformantes para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa MPM. Marcador de pb Dcat. 486 pb + 250 pb = 800 pb. N3. 838 pb + 250 pb = 1100 pb N32. 1103 pb + 250 pb = 1400 pb N321. 1666 pb + 250 pb = 1950 pb. Gel de agarosa al 1 % revelado con bromuro de etidio (0.01 %).

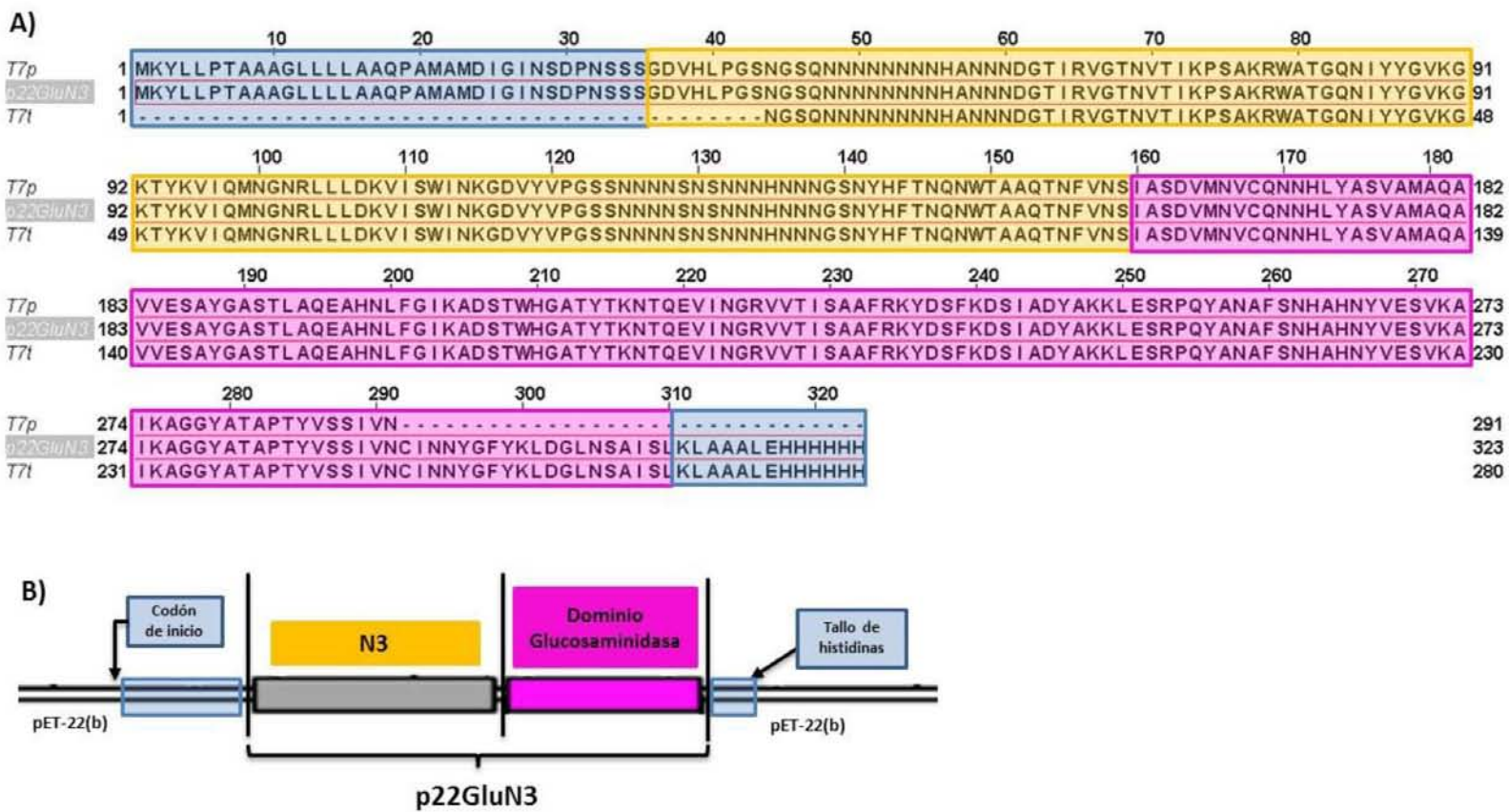
#### 6.2.4. SECUENCIACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES

Las construcciones generadas para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa se secuenciaron y se analizaron de la manera antes descrita. Para las 4 construcciones (p22GluDcat, p22GluN3, p22GluN32, p22GluN321) se comprobó que el fragmento del gen de interés estaba presente en cada una de ellas, además no presentaron ningún cambio con respecto a la secuencia de referencia. En la Figura 21 se muestra un ejemplo del alineamiento múltiple realizado para analizar en este caso la construcción p22GluN3.

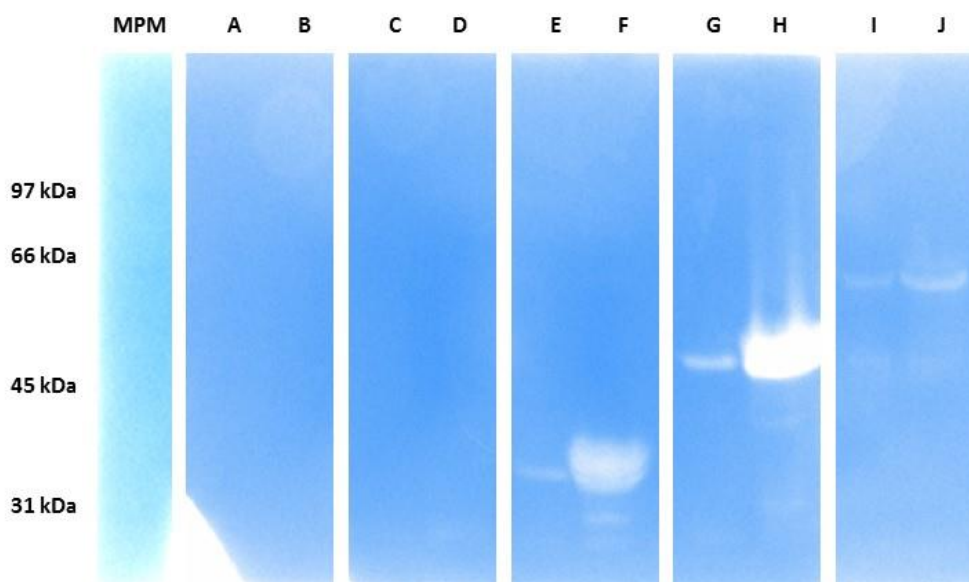
#### 6.2.5. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES CON EL DOMINIO DE *N*-ACETILGLUCOSAMINIDASA

Se expresaron todas las subclonas obtenidas que contenían el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa: p22GluDcat, p22GluN3, p22GluN32 y p22GluN321. Las condiciones que se probaron fueron las mismas que en el caso del dominio de amidasa, es decir, se probaron diferentes condiciones de inductor, temperaturas de inducción y distintos tiempo de inducción. Las condiciones óptimas a las cuales se obtuvieron mejores resultados fueron: 37 °C, 250 rpm y 3 h de inducción. Se trabajó con las 3 fracciones antes descritas: (I) Extracto extracelular, (II) Fracción citosólica y (III) Restos celulares. En la Figura 22 se observa actividad lítica de todas las subclonas, excepto la que solo contenía el dominio catalítico (p22GluDcat). Además se probó la actividad del control negativo (pET-22b en *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS), el cual no presentó ninguna banda de actividad lítica en ninguna de las dos fracciones evaluadas (carril A y B). En este zimograma contra *M. lysodeikticus* se probaron solo la fracción citosólica y los restos celulares de las muestras ya mencionadas. Todas las bandas de actividad se encuentran al tamaño esperado: p22GluDcat (22 kDa), p22GluN3 (35 kDa), p22GluN32 (51 kDa) y p22GluN321 (65 kDa).

**Figura 21. A)** Alineamiento de la secuencia en aminoácidos contra la referencia **B)** Representación gráfica de la construcción p22GluN3. Azul. Secuencia propia del vector pET-22b. Morado. Dominio de N-acetilglucosaminidasa. Naranja. N3. El código de colores en ambos figuras es el mismo.



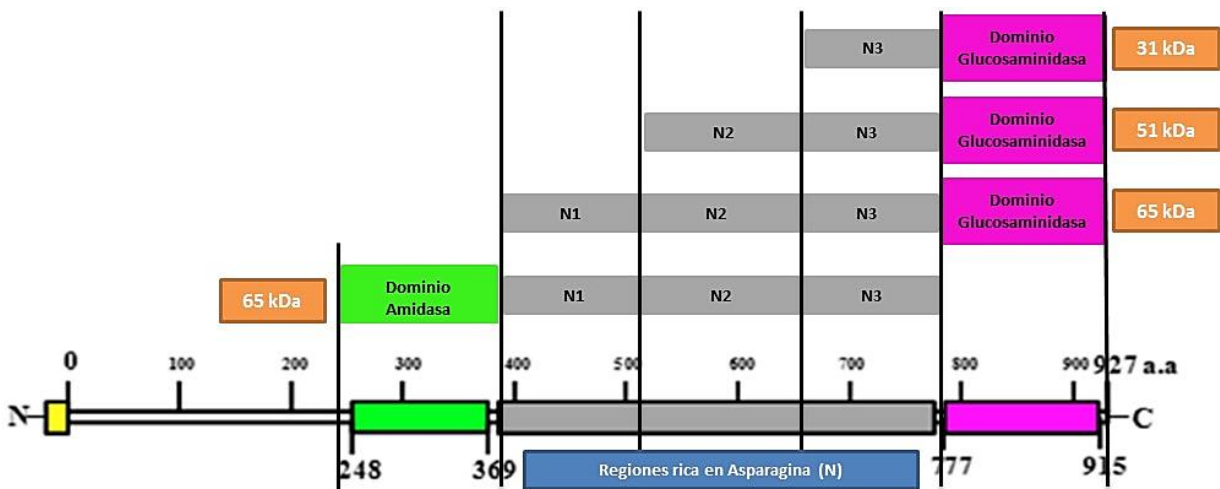
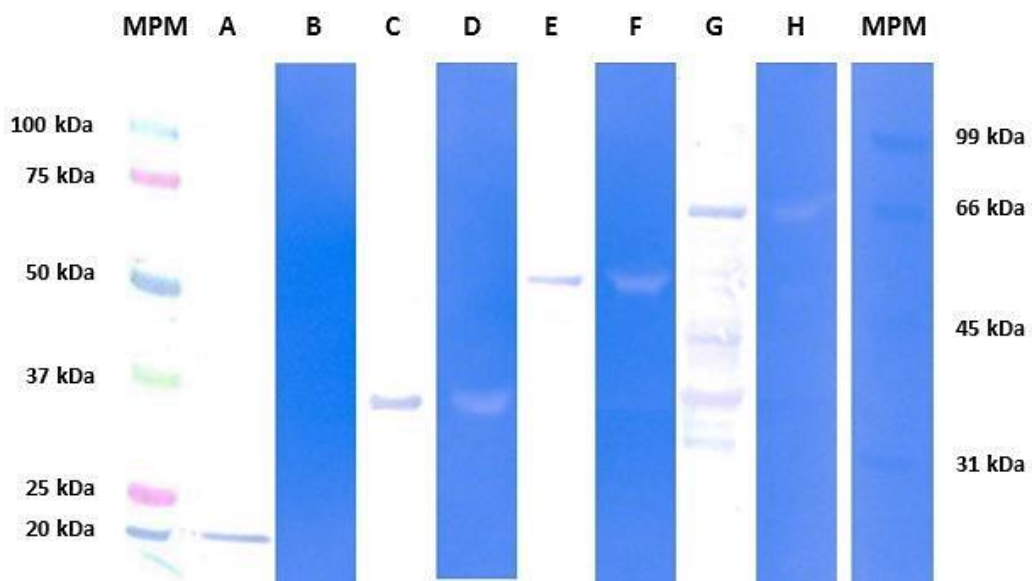
En comparación con la fracción citosólica los restos celulares tienen mayor actividad en los zimogramas, esto mismo se observó en la subclona en la cual se detectó actividad lítica del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa (p22AmiN123), lo cual indica que los dominios con alguna de las 3 regiones ricas en asparaginas tienen cierta afinidad hacia la pared celular. En este caso, para el dominio reportado de *N*-acetilglucosaminidasa no se cuenta con información acerca de qué residuos pudieran interactuar con el sustrato, como en el caso del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. Con estos resultados se puede inferir que las regiones ricas en asparaginas desempeñan un rol importante en la actividad lítica de estas subclonas, pues probablemente algunos aminoácidos de esta región son importantes para su anclaje a la pared celular, donde se encuentra el sustrato natural de este tipo de enzimas. Esto se corrobora debido a que en las dos subclonas donde se encontraban sólo los dominios catalíticos (no contenían ninguna de las 3 regiones ricas en asparaginas N1, N12 y N123): p22AmiDcat y p22GluDcat no se detectó actividad lítica en zimogramas.



**Figura 22.** Zimograma contra *M. lysodeikticus*. A y B. Citosol y restos celulares control negativo (pET22 en *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS). C y D. Citosol y restos celulares p22GluDcat. E y F. Citosol y restos celulares p22GluN3. G y H. Citosol y restos celulares p22GluN32. I y J. Citosol y restos celulares p22GluN321.

Cabe mencionar que también se analizaron las fracciones del extracto extracelular para cada una de las subclonas del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa en las cuales no se detectó actividad lítica por medio de zimogramas contra *M. lysodeikticus* (datos no mostrados), como se hizo cuando se trabajó esta misma fracción para el dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. Estos resultados muestran que, aunque el vector utilizado cuenta con un péptido señal, las proteínas recombinantes no se secretan a exterior de la célula. Posteriormente se realizó otra inducción de las 4 subclonas generadas para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa bajo las condiciones anteriormente descritas, donde únicamente se aumentó el volumen con la finalidad de aumentar la concentración de proteínas recuperadas en la fracción citosólica. Estas muestras se analizaron y, como se observa en la Figura 23, en el caso de la subclona p22GluDcat se detectó en el Western Blot (carril A) una banda que en el zimograma no presentó actividad lítica (carril B), y que se encontró en un peso molecular aproximado de 20 kDa, el cual corresponde con el peso teórico de esta subclona (22 kDa). Se logró detectar

actividad lítica de las 3 subclonas del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa, las cuales contenían al menos un fragmento de la secuencia rica en asparaginas. Tanto las bandas detectadas en el zimograma como las encontradas en el ensayo de Western Blot corresponden con el peso molecular teórico calculado para cada una de las 3 subclonas. Con los resultados presentados, se generaron 3 subclonas que presentaron actividad lítica (p22GluN3, p22GluN32 y p22GluN321) para este dominio, destacando la actividad en restos celulares de p22GluN12. Los resultados que se obtuvieron sugieren que la región rica en asparaginas es determinante para la actividad lítica de ambas regiones. En el caso del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa solo se detectó actividad lítica en la subclona p22amiAmin123 y para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa se encontró en todas las subclonas excepto en p22amiGluDcat. Como se observa en la Figura 24 todas las enzimas generadas que presentan actividad cuentan con al menos un fragmento de la región rica en asparaginas.





Cabe resaltar que la actividad observada en los zimogramas usando células de *M. lysodeikticus* como sustrato del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa fue más intensa que la del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por García-Cano y cols. (2015) quienes realizaron pruebas espectrofotométricas para medir la actividad específica para cada dominio y se observó el mismo comportamiento.

Esta región inter-dominios, de aproximadamente 400 aminoácidos, aparentemente permite que los dominios catalíticos tengan actividad lítica, lo cual se puede deber principalmente a dos razones: (1) permiten o favorecen al correcto plegamiento de la proteína y/o (2) los aminoácidos presentes en esta región confieren cierta afinidad hacia la membrana celular donde se encuentra el sustrato. La proporción de residuos de asparagina con respecto al resto de los aminoácidos es de 23 %, seguido por un 9.5 % de glicina y 8.5 % de serina, por lo que estos 3 residuos representan más del 40 % del total de la secuencia. La asparagina y la serina son aminoácidos que se clasifican como polares sin carga, mientras que la glicina como no polar, por lo que de acuerdo a sus características físico-químicas, teóricamente no se verían involucrados en alguna interacción con la pared celular, la cual en este caso estaría conferida por algunos otros residuos dentro de esta región rica en asparaginas. Se buscó en la base de datos del NCBI si existía alguna secuencia en aminoácidos parecida a la región rica en asparaginas con ayuda de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), y los resultados obtenidos arrojaron que esa secuencia de aminoácidos solo se encontraba en el género *Pediococcus* en diferentes especies: *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus lolii* y *Pediococcus pentosaceus* (Tabla 15). Todas las secuencias con las cuales alineó presentaron la misma arquitectura, es decir, cuentan con dos dominios de actividad catalítica (PGRP (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa) y *N*-acetilglucosaminidasa) excepto la muramidasa FlgJ de *P. acidilactici* D3 (No. Acceso: EOA08115.1), la cual solo contiene el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa. Los porcentajes de identidad son mayores al 70 %, lo que indica que estas proteínas con la arquitectura antes mencionada se encuentran muy conservadas en este género.

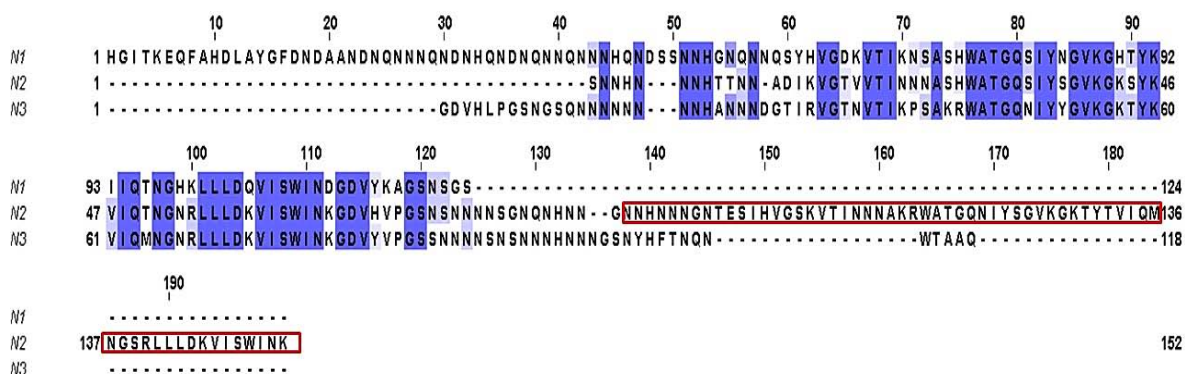
**Tabla 15.** Resultados del BLAST realizado a la secuencia rica en asparaginas [NCBI, 2015].

Descripción	Cobertura	Identidad	Valor E	No. Acceso
bifunctional peptidoglycan hydrolase [ <i>Pediococcus acidilactici</i> ]*	100 %	100 %	0	AKD44141.1
KxYKxGKxW signal domain protein [ <i>Pediococcus acidilactici</i> 7_4]	100 %	100 %	0	EFA26586.1
<i>N</i> -acetylmuramidase [ <i>Pediococcus acidilactici</i> ]	100 %	100 %	0	WP_036672225.1
<i>N</i> -acetylmuramidase [ <i>Pediococcus lolii</i> ]	100 %	98 %	0	WP_008841826.1
flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ, flgJ [ <i>Pediococcus acidilactici</i> D3]	95 %	99 %	6e-116	EOA08115.1
<i>N</i> -acetylmuramoyl- <i>L</i> -alanine amidase family protein [ <i>Pediococcus pentosaceus</i> IE-3]	99 %	55 %	9e-107	CCG90704.1
KxYKxGKxW signal peptide-containing protein, partial [ <i>Pediococcus acidilactici</i> D3]	75 %	99 %	2e-81	EOA08745.1

\*Proteína reportada semipurificada y caracterizada por García-Cano *et al.* [2015].

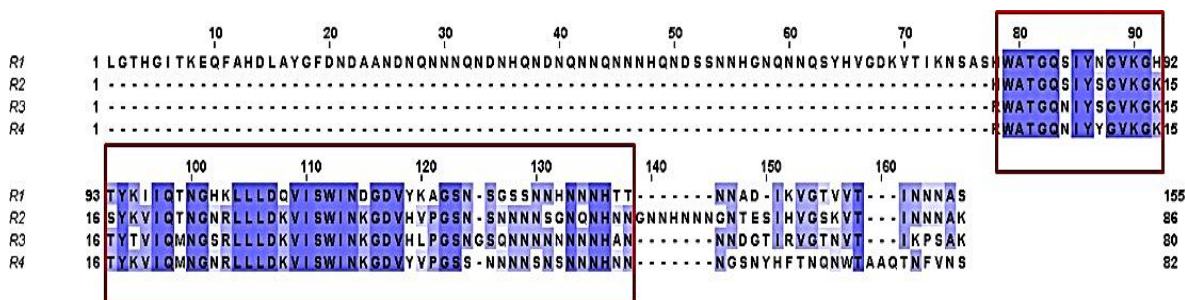
Posteriormente se tomaron los 3 fragmentos diferentes de la región intermedia (N1, N2 y N3) y se realizó un BLAST para cada uno de ellos, y curiosamente las 3 secuencias arrojaban resultados similares, después de alinear con las secuencias reportadas en las diferentes especies del género *Pediococcus* con porcentajes de identidad y de cobertura altos, todas se alineaban con proteínas reportadas como endolisinas,  $\beta$ -*N*-acetilmuramidasa o en algunos casos secuencias parciales de alguna peptidoglucano hidrolasa que se encuentran anotadas en el genoma de 3 bacterias ácido lácticas: *E. faecalis*, *E. faecium* y *L. mucosae*. Estas secuencias de aminoácidos principalmente se asocian a un dominio muy conservado denominado LysM (Pfam: PF01476) el cual se compone aproximadamente de 44 a 65 aminoácidos y está estrechamente ligado a la unión del peptidoglucano, principalmente al residuo de *N*-acetilglucosamina. Originalmente este dominio se identificó en enzimas que degradan la pared celular, pero muchas proteínas con distintas funciones biológicas también lo contienen. Una misma secuencia de aminoácidos puede tener uno o más dominios LysM repetidos en su secuencia [Buist *et al.*, 2008].

Debido a que los 3 fragmentos diferentes de la secuencia rica en asparaginas arrojaron resultados muy similares cuando se les realizó un BLAST, se hizo un alineamiento múltiple de las 3 secuencias en aminoácidos para saber cuánto se parecían entre ellas. Aunque el número de aminoácidos en cada fragmento es diferente, se puede observar en la Figura 25 que existen residuos altamente conservados en las 3 secuencias y son los aminoácidos que alinean con las secuencias reportadas en *Enterococcus* y *Lactobacillus* antes mencionadas.



**Figura 25.** Alineamiento múltiple de los 3 fragmentos de la región rica en asparaginas (N1, N2 y N3). En color azul se resaltan los aminoácidos conservados.

Cuando se realizó el alineamiento la secuencia de N2 contenía aminoácidos (Figura 25, recuadro rojo) que también se podían alinear perfectamente con la secuencia encontrada en los otros fragmentos (N1 y N3), es decir, en realidad existían 4 secuencias repetidas (R) altamente conservadas en los 400 aminoácidos (a.a.) que se reportan como una región rica en asparaginas por García-Cano *et al.* [2015]. Posteriormente se realizó otro alineamiento múltiple pero ahora, en vez de dividir en 3 fragmentos la región rica en asparaginas, se tomaron en cuenta 4 fragmentos. El tamaño de estos 4 fragmentos es el siguiente: R1= 155 a.a., R2= 86 a.a., R3= 80 a.a. y R4= 82 a.a. En la Figura 26 se puede apreciar que los residuos marcados con el recuadro rojo están altamente conservados en las 4 secuencias de aminoácidos (R1, R2, R3 y R4).



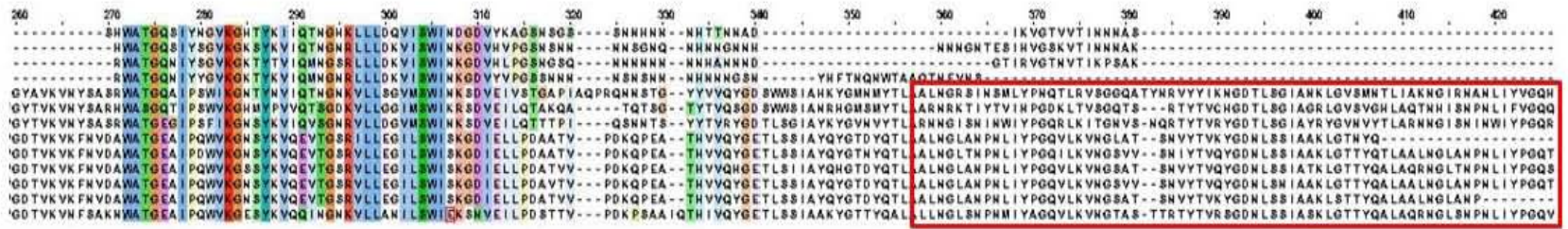
**Figura 26.** Alineamiento múltiple de los 4 fragmentos de la región rica en Asparaginas (N1, N2 y N3). En color azul dentro del recuadro rojo se resaltan los aminoácidos altamente conservados.

Se realizó un BLAST para cada una de las 4 secuencias repetidas y los resultados en todos los casos fueron prácticamente los mismos: además de alinear con las secuencias de distintas peptidoglucano hidrolasas del género *Pediococcus*, todas se relacionan principalmente con secuencias de enzimas que contienen dominios LysM y otro de algún tipo de actividad de peptidoglucano hidrolasa, las cuales se reportan en bacterias ácido lácticas (*Enterococcus* y *Lactobacillus*). Analizando estos resultados, los aminoácidos conservados de las secuencias repetidas no alinean con los residuos que conforman el dominio LysM como tal, sin embargo éstos se encontraron en la región que une al dominio catalítico (generalmente: GH25\_muramidase) con el dominio LysM (Figura 27). En la Tabla 16 se enlistan las secuencias que se utilizaron para el alineamiento múltiple.

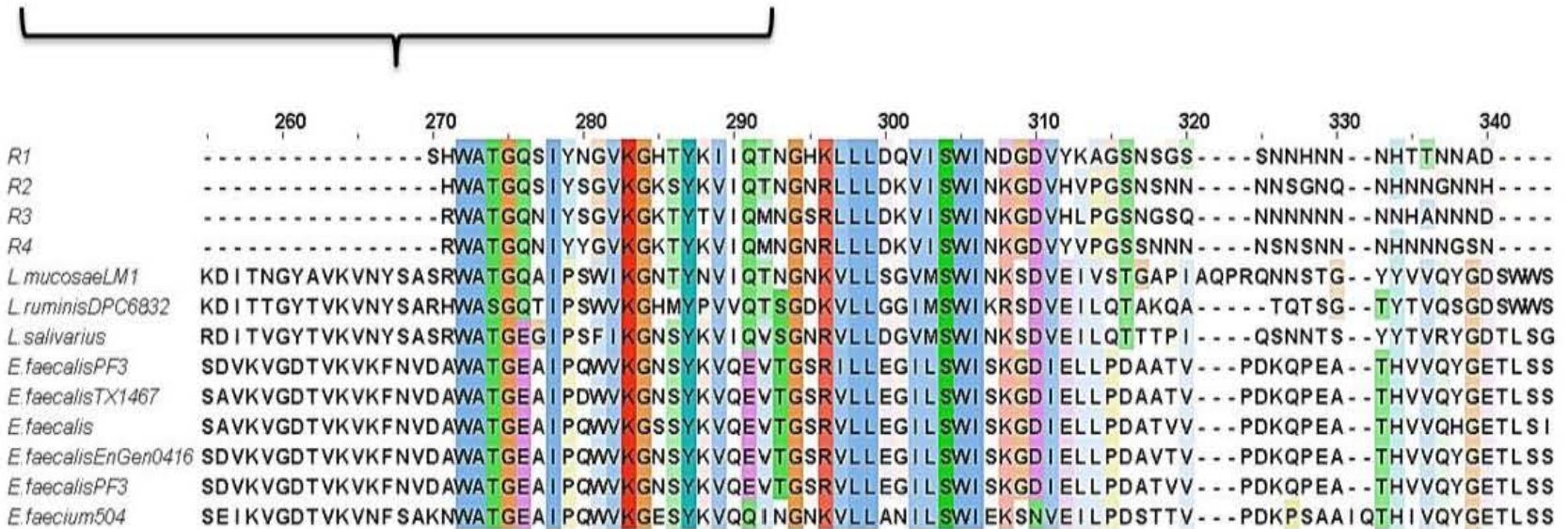
**Tabla 16.** Secuencias utilizadas para el alineamiento múltiple

No. De Acceso (GenBank)	Proteína	Microorganismo
AJT51621.1	1,4-beta-N-acetilmuramidasa	<i>Lactobacillus mucosae</i> LM1
ETC92394.1	1,4-beta-N-acetilmuramidasa, parcial	<i>Enterococcus faecalis</i> PF3
KIC04702.1	Endolisina	<i>Lactobacillus ruminis</i> DPC 6832
EJY49012.1	Proteína LysM, parcial	<i>Enterococcus faecium</i> 504
EGG50550.1	Proteína LysM	<i>Enterococcus faecalis</i> TX1467
ETU35174.1	Proteína hipotética P016_01543	<i>Enterococcus faecalis</i> EnGen0416
ETC92391.1	Proteína de unión a peptidoglucano LysM, parcial	<i>Enterococcus faecalis</i> PF3
WP_003702056.1	Proteína de unión a peptidoglucano LysM, parcial	<i>Lactobacillus salivarius</i>
WP_002417738.1	Proteína de unión a peptidoglucano LysM, parcial	<i>Enterococcus faecalis</i>

**← Dominio catalítico**



**Dominio LysM**



**Figura 27.** Alineamiento múltiple de las secuencias repetidas (R1, R2, R3 y R4) de la región rica en asparaginas contra los resultados obtenidos en el BLAST. En el recuadro rojo se indica el dominio LysM.

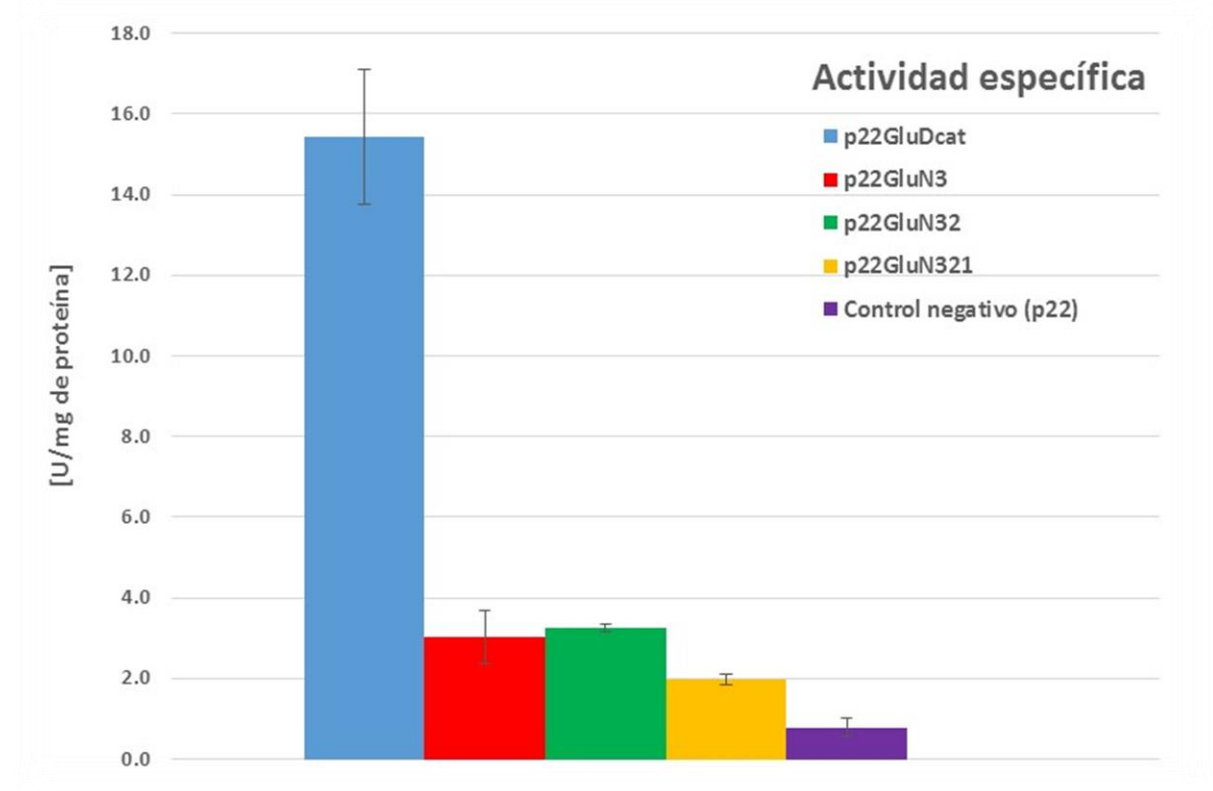
Como se observa en el alineamiento múltiple (Figura 27) los aminoácidos conservados en las 4 secuencias repetidas (R) se encontraron también en todas las secuencias de la Tabla 16. Estos residuos sólo se encontraron en BAL's y entre dos dominios, uno catalítico y otro de unión a peptidoglucano, lo cual contrasta con la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de *P. acidilactici* ATCC 8042 debido a que en esta secuencia no se encuentra ningún dominio de unión a peptidoglucano (LysM), además de tener dos dominios de actividad lítica. Debido a los resultados obtenidos en la expresión de las subclonas para los dominios de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa, se sugiere que probablemente estos aminoácidos conservados tengan cierta afinidad por el peptidoglucano debido a que las secuencias con las cuales alinearon cuando se realizó el BLAST contienen dominios de unión al peptidoglucano. Para probar esta hipótesis se tendría que construir subclonas de las peptidoglucano hidrolasas de *Enterococcus* y *Lactobacillus* en las que se esperaría que no se presentara actividad lítica cuando esta región fuera deletada.

Los resultados obtenidos en este trabajo recalcan la importancia de dominios de unión al sustrato (peptidoglucano) en este tipo de enzimas, los cuales indican que para obtener la actividad óptima no solo es necesario el dominio catalítico como tal. Existen numerosos reportes en diferentes bacterias que indican que la actividad lítica de las peptidoglucano hidrolasas, tanto en bifuncionales como en enzimas que cuentan solo con un dominio catalítico, se ve favorecida por la presencia de dominios conservados cuya función es el reconocimiento o la unión al sustrato en la pared celular (ej.: LysM y SH3) [Steen *et al.*, 2003; Carroll *et al.*, 2003; Huard *et al.*, 2004; Camiade *et al.*, 2010]. Sin embargo, existen secuencias no reportadas en las bases de datos como dominios conservados pero cuya función ha sido descrita por varios autores, quienes demuestran que estos residuos interactúan con el reconocimiento del sustrato en la pared celular [Hell *et al.*, 2003; Biswas *et al.*, 2006; Yokoi *et al.*, 2008]. Con esta información se puede decir que aunque las regiones repetidas (R1, R2, R3 y R4) encontradas en este trabajo no están reportadas como dominios conservados, los resultados obtenidos permiten plantear la hipótesis de que estos residuos intervienen en el reconocimiento y unión al peptidoglucano.

Paralelamente, se realizaron pruebas espectrofotométricas para determinar la actividad específica de glucosaminidasa para la fracción citosólica de todas las subclonas generadas para el dominio de *N*-acetilglucosaminidasa (p22GluDcat, p22GluN3, p22GluN32, p22GluN321) además de un control negativo (cepa de expresión transformada con el vector sin inserto) [Ortega-Escobar. Comunicación personal, 2015]. La actividad de glucosaminidasa fue medida utilizando el ensayo enzimático de la  $\beta$ -*N*-acetilglucosaminidasa (NAG) de Sigma-Aldrich. Este ensayo utiliza como sustrato al 4-nitrofenil *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamínido (NP-GlcNAc).

Como se observa en la gráfica (Figura 28) la subclona que presentó la mayor actividad específica con esta determinación fue p22GluDcat ( $15.43 \pm 1.68$  U/mg de proteína), lo cual difiere con los resultados obtenidos en los zimogramas contra *M. lysodeikticus* (Figura 23) en los que esta subclona no presentó actividad lítica. Este comportamiento se puede explicar ya que en esta prueba el sustrato (NP-GlcNAc) se encuentra disuelto en el buffer y probablemente se encuentra más accesible para interactuar con los residuos que llevan a cabo la catálisis. Por el contrario, en los zimogramas en donde se embeben células liofilizadas de *M. lysodeikticus* al gel de poliacrilamida, el sustrato se localiza en la pared celular y no se encuentra del todo accesible para la enzima, y para acceder al mismo, las proteínas necesitan

una manera de reconocer y unirse al peptidoglucano. Estos ensayos se realizaron por triplicado; los cálculos de actividad específica se realizaron de acuerdo con lo indicado por el proveedor de los reactivos que se ocupó para realizar estas determinaciones (Sigma-Aldrich).



**Figura 28.** Actividad específica [U/mg de proteína] de las subclonas del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa.

Con los resultados antes mencionados se pueden sentar las bases para poder definir la función de estos residuos repetidos en la secuencia rica en asparaginas de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional reportada en *P. acidilactici* ATCC 8042. Todo indica que esta región favorece la actividad lítica, debido probablemente a que estos residuos son encargados del reconocimiento y unión al sustrato natural (peptidoglucano) en esta enzima.

## 7. CONCLUSIONES

- La proteína analizada en este trabajo es la primera peptidoglucano hidrolasa bifuncional reportada en bacterias ácido lácticas y se demostró que ambos dominios catalíticos (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa) presentan actividad lítica de manera independiente.
- En el caso del dominio de *N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa (PGRP) únicamente la subclona p22AmiN1+N2+N3, que contiene la secuencia espaciadora más larga, presentó actividad lítica en zimogramas con un peso molecular aproximado de 65 kDa, correspondiente a la construcción esperada. Esto indica que esta región tiene un papel en la actividad lítica, probablemente de tipo conformacional y de unión al peptidoglucano. En el caso del dominio de *N*-acetilglucosaminidasa las 3 subclonas que contienen región espaciadora, independientemente del tamaño (Glu+N1/ Glu+N1+N2/ Glu+N1+N2+N3) presentaron actividad lítica en zimogramas contra *M. lysodeikticus*.
- Las construcciones que solo contienen el dominio catalítico (p22AmiDcat y p22GluDcat), no presentaron actividad, lo que refuerza la idea de que la región rica en asparaginas juega un rol importante en la catálisis de estas enzimas.
- Se encontró que la secuencia rica en asparaginas contiene aminoácidos conservados en otras bacterias ácido lácticas, además de que se encuentra repetida 4 veces en la secuencia de la peptidoglucano hidrolasa bifuncional de 99 kDa de *P. acidilactici* ATCC 8042.

## 8. PERSPECTIVAS

Por el momento se está trabajando en la purificación de estas enzimas para su posterior caracterización bioquímica, la cual se enfocará en las subclonas que muestren mayor actividad en zimogramas con células de *M. lysodeikticus* como sustrato. También se propone realizar el espectro antibacteriano de estas proteínas recombinantes una vez purificadas, para comparar estos datos con los resultados reportados por García-Cano *et al.* [2015] cuando la proteína de 99 kDa fue caracterizada sin ninguna modificación.

Con la información generada de estos proyectos se pretende sentar las bases para el uso potencial de estas enzimas como agentes antibacterianos, principalmente en la industria alimenticia. Además se podría realizar ingeniería de proteínas con estas enzimas para aumentar o hacer más específica la actividad lítica. Por ejemplo, fusionando de uno a varios de los diferentes dominios reportados de reconocimiento o unión al peptidoglucano, a uno de los dominios catalíticos de la proteína bifuncional de *Pediococcus* (*N*-acetilmuramil-*L*-alanina amidasa y *N*-acetilglucosaminidasa) para ver si su actividad de peptidoglucano hidrolasa podría incrementarse y/o aumentar el número de microorganismos contra los cuales se presenta. Existen numerosos reportes donde se generan proteínas de fusión, obteniendo un aumento considerable en la actividad lítica contra ciertos microorganismos, principalmente patógenos, como son: *L. monocytogenes* y *S. aureus* [Becker *et al.*, 2009; Donovan *et al.*, 2009; Inagaki *et al.*, 2009; Manoharadas *et al.*, 2009; Schmelcher *et al.*, 2011a; Nelson *et al.*, 2012].



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Anzengruber J., Courtin P., Claes I., Debreczeny M., Hofbauer S., Obinger C., Chapot-Chartier M., Vanderleyden J., Messner P., Schäffer C. (2014). Biochemical characterization of the major *N*-acetylmuramidase from *Lactobacillus buchneri*. *Microbiology*. 160(8): 1087-1819.
- Atrih A., Zollner P., Almaier G, Williamson M, Foster SJ. (1998). Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores. *Journal of Bacteriology*. 180: 4603-4612.
- Barbosa-González P. (2015). Diseño y validación de un método zimográfico para la caracterización de una enzima con actividad de *N*-acetilglucosaminidasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Becker S., Foster-Fray J., Stodola A., Anacker D., Donovan D. (2009). Differentially conserved staphylococcal SH3b\_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. *Gene*. 443: 32-41.
- Bera A., Herbert S., Jakob A., Vollmer W., Gotz F. (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. 55:778–787.
- Bera A., Biswas R., Herbert S., Götz F. (2006). The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 74: 4598-4604.
- Biswas R., Voggu L., Karsten U., Hentschel P., Günther T., Götz (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS Microbiology Letters*. 259: 260-268.
- Bourgeois I., Camiade E., Biswas R., Courtin P., Gibert L., Gotz F., Chapot-Chartier M., Pons & Pestel-Caro. (2009). Characterization of AtlL, a bifunctional autolysin of *Staphylococcus lugdunensis* with *N*-acetylglucosaminidase and *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activities. *FEMS Microbiology Letters*. 290: 105-113
- Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Górski A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Society for Experimental Biology and Medicine* 366-377.
- Briers Y., Walmagh M., Van Puyenbroeck V., Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A., Oliveira H., Azaredo J., Verween G., Pirnay J., Miller S., Volckaert G., Lavigne R. (2014). Engineered Endolysin-Based “Artilysins” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio*®. 5(4): 1379-14.
- Bublitz M., Polle L., Holland C., Heinz D., Nimtz M., Schubert W. (2009). Structural basis for autoinhibition and activation of Auto, a virulence-associated peptidoglycan hydrolase of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*. 71(6): 1509-1522.
- Buist G., Steen A., Kok J., Kuipers O. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding (peptido) glycans. *Molecular Microbiology*. 68(4): 83-847.
- Callewaert L., Walmagh M., Michels C., Lavigne R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*. 22: 164-171.

- Campos-Gómez M. (2013). Clonación y expresión de la peptidoglucano hidrolasa de 99 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- Cappa F., Bottazzi V. (1996). Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 1St261. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*. 46: 299–310.
- Camiade E., Peltier J., Bourgeois I., Couture-Tosi E., Courtin A., Chapot-Chartier M., Dpuy B., Pons J. (2010). Characterization of Acp, a peptidoglycan hydrolase of *Clostridium perfringens* with *N*-acetylglucosamine activity that is implicated in cell separation and stress-induced autolysis. *Journal of Bacteriology*. 2373-2384.
- Carroll S., Hain T., Technow U., Darji A., Pashlidis P., Joseph S., Chakraborty T. (2003). Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of Bacteriology*. 185(23): 6801-6808.
- Cavadini C., Hertel, C., Hammes, W. (1996). Stable expression of the lysostaphin gene in meat lactobacilli by introducing deletions within the prosequence. *Systematic and Applied Microbiology*. 19:21-27.
- Celia L., Nelson D., Kerr D. (2008). Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*, 130: 107-117.
- Cibik R., Chapot-Chartier M. (2004). Characterization of autolytic enzymes in *Lactobacillus pentosus*. *Letters in Applied Microbiology*. 38: 459-463.
- Donovan D., Dong S., Garrett W., Rousseau G., Moineau S., Pritchard D. (2006a). Peptidoglycan hydrolase fusions maintain their parental specificities. *Applied and Environmental Microbiology*. 4: 2988-2996.
- Donovan D., Lardeo M., Foster-Frey J. (2006b). Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiology Letters*. 265: 133-139.
- Donovan D., Becker S., Dong S., Baker J., Forster-Frey J., Pritchard D. (2009) Peptidoglycan hydrolase enzyme fusions for treating multi-drug resistant pathogens. *Biotech International*. 287: 22-33.
- Fedorov T., Surovstev V., Pletnev V., Borozdina M., Gusev V. (2003). Purification and some properties of lysostaphin, a glycylglycine endopeptidase from the culture liquid of *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*. *Biochemistry (Moscow)*. 68 (1): 61-65.
- Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A. (2010). Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioengineered Bugs*. 1(1): 9-16.
- Fischetti V. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Current Opinion in Microbiology*. 11: 393-400.
- Fischetti V. (2010). Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 300: 357-362.
- Foster SJ (1992) Analysis of the autolysins of *Bacillus subtilis* 168 during vegetative growth and differentiation by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*. 174: 464–470.

- Foster SJ (1995). Molecular characterization and functional analysis of the major autolysin of *Staphylococcus aureus* 8325/4. *Journal of Bacteriology*. 177: 5723-5725.
- Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2951-2958.
- García P., Martínez B., Obeso J., Rodríguez A. (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 479-485.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A., Martínez B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*. 21:373-382.
- García-Cano I., Velasco-Pérez L., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Mendoza-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.
- García-Cano I., Serrano-Maldonado C., Olvera-García M., Delgado E., Peña C., Mendoza G., Quirasco M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT Food Science and Technology*. 59: 26-34.
- García-Cano I., Campos-Gómez M., Contreras-Cruz M., Serrano-Maldonado E., González-Canto A., Peña-Montes C., Rodríguez-Sanoja R., Sánchez S., Farrés A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-015-6593-2.
- Guan R., Roychowdhury A., Ember B., Kumar S., Boons G., Mariuzza R. (2004). Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *PNAS*. 101(49): 17168-17173.
- Huard C., Miranda G., Redko Y., Wessner F., Foster SJ, Chapot-Chartier M. (2004). Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: Identification of a third N-acetylglucosaminidase, AcmC. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 3493-3499.
- Hell W., Reichl S., Anders A., Gattermann S. (2003). The autolytic of the recombinant amidase of *Staphylococcus saprophyticus* is inhibited by its own recombinant GW repeats. *FEMS Microbiology Letters*. 227: 47-51.
- Inagaki N., Iguchi A., Yokoyama T., Yokoi K., Ono Y., Yamakawa A., Taketo A., Kodaira K. (2009). Molecular properties of the glucosaminidase AcmA from *Lactococcus lactis* MG1363: Mutational and biochemical analyses. *Gene* 447:61–71.
- Kim W., Salm H., Geider K. (2004). Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology*. 150: 2707-2714.
- Leclerc D., Asselin A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35:749–753.

- Loessner M. (2005) Bacteriophage endolysins- current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 480-487.
- Lortal S., Valence F., Bizet C., Maubois J. (1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: application to 10 *Lactobacillus* species. *Research in Microbiology*. 148: 461-474.
- Lortal S., Chapot-Chartier M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*. 15: 857-871.
- Manoharadas S., Witte A., Bläsi U. (2009). Antimicrobial activity of a chimeric enzymatic towards *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biotechnology*. 139(1): 118-123.
- Margot P., Karamata D. (1992) Identification of the structural genes for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase and its modifier in *Bacillus subtilis* 168: inactivation of these genes by insertional mutagenesis has no effect on growth or cell separation. *Molecular Genetics and Genomics*. 232: 359-366.
- Margot P., Mauel C., Karamata D. (1994) The gene of the N-acetylglucosaminidase, a *Bacillus subtilis* 168 cell wall hydrolase not involved in vegetative cell autolysis. *Molecular Microbiology*. 12: 535-545.
- Mayer M., Payne J., Gasson M., Narbad A. (2010). Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 5415-5422.
- Mehta K., Paskaleva E., Azizi-Ghannad S., Ley D., Page M., Dordick J., Kane R. (2013). Characterization of AmiBA2446, a novel bacteriolytic enzyme active against *Bacillus* species. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 79(19): 5899-5906.
- Moellering R. (2011). Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 37:2-9.
- Mora D., Fortina M., Parini C., Daffonchio D., Manachini P. (2000). Genomic subpopulations within species *Pediococcus acidilactici* detected by multilocus typing analysis: relationships between pediocin Ach/PA-1 producing and non-producing strains. *Microbiology* 146:2027-2038.
- Mora D., Musachio F., Fortina M., Senini L., Machini P. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *Journal Applied Microbiology*. 94: 561-570.
- Muralidharan V, Goldberg DE (2013). Asparagine repeats in *Plasmodium falciparum* proteins: good for nothing? *PLoS Pathogens*. doi:10.1371/journal.ppat.1003488.
- Nelson D., Schmelcher M., Rodriguez-Rubio L., Klumpp J., Pritchard D., Dong D., Donovan D. (2012) Endolysin as antimicrobials. *Advance Virus Research*. 83: 299-365.
- Obeso J., Martínez B., Rodríguez A., García P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*. 128:211-8.
- Oshida T., Sugai M., Komatsuzawa H., Hong Y., 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*. 92: 285-289.

- Oliveira M., Viñas I., Colás P., Anguera M., Usall J., Abadias M. (2013). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology*. 38: 137-142M
- Ortega-Escobar A. (2015). Purificación, caracterización y evaluación del potencial antibacteriano de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura (En proceso). Facultad de Química. UNAM. México D.F.
- Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., Lan C. (2008). Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1-13.
- Park J., Yun J., Lim J., Kang D., Ryu S. (2012). Characterization of an endolysin, LysBPS13, from a *Bacillus cereus* bacteriophage. *FEMS Microbiology Letters*. 332: 76-83.
- Pastagia M., Schuch R., Fischetti V., Huang D. (2013). Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *Journal of Medicine Microbiology*. 62: 1506-1516.
- Perschel A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*. 10: 179-186.
- Raymond J., Mahapatra S., Crick D., Pavelka M. (2005). Identification of the *namH* gene, encoding the hydroxylase responsible for the *N*-glycolylation of the mycobacterial peptidoglycan. *Journal of Biology and Chemistry*. 280: 326-333.
- Rivera J. (2004). Evaluación del efecto de bioconservador en Salamis al adicionar *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Donovan D., Martínez B., Rodríguez A., García P. (2015). Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*. 21. 1-11.
- Scheurwater E., Pfeffer J., Clarke J. (2007). Production and purification of the bacterial autolysin *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase B from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression & Purification*. 56: 128-137.
- Schuch R., Nelson D., Fischetti V. (2002) A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*. 418: 884-889.
- Serizawa M., Yamamoto H., Yamaguchi H., Fujita Y., Kobayashi K., Ogasawara N., Sekiguchi J. (2004). Systematic analysis of SigD-regulated genes in *Bacillus subtilis* by DNA microarray and Northern blotting analyses. *Gene*. 329: 125-136.
- Schmelcher M., Tchang V., Loessner M. (2011a). Domain shuffling and module engineering of *Listeria* phage endolysins for enhances lytic activity and binding affinity. *Microbial Biotechnology*. 4(5): 651-662.
- Schmelcher M., Waldherr F., Loessner M. J. (2011b). *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93: 633-643.

- Smith T., Blackman A., Foster S. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology*. 146: 249–262.
- Steen A., Buist G., Leenhouts K., El Khattabi M., Grijpstra F., Zomer A., Venema G., Kuipers O., Kok J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *Journal of Biological Chemistry*. 278(26): 23874-23881.
- Szweda P., Kotlowski R., Kur J. (2005). New effective sources of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin. *Journal of Biotechnology*. 117: 203-213.
- Szweda P., Lacka I., Kotlowski R., Synoweicki J. (2007). Protective effect of lysostaphin from *Staphylococcus simulans* against *Staphylococcus aureus* in milk and some other food products. *Journal of Food Safety*. 27: 265-274.
- Sugahara, K., Yokoi, K., Nakamura, Y., Nishino, T., Yamakawa, A., Taketo A., Kodaira K. (2007). Mutational and biochemical analyses of the endolysin LysgaY encoded by the *Lactobacillus gasserii* JCM 1131T phage  $\phi$ gaY. *Gene*. 404:41–52.
- Supungul P., Rimphanitchayakit V., Aoki T., Hirono I., Tassanakajon A. (2010). Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 28:490-498.
- Tillman G., Simmons M., Garrish J., Seal B. (2013). Expression of a *Clostridium perfringens* genome-encoded putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase as a potential antimicrobial to control the bacterium. *Arch Microbiology*. 195: 675-681.
- Turner M., Waldherr F., Loessner M., Giffard P. (2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 30, 58–67.
- Vollmer W. (2007). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 287-306.
- Vollmer W., Joris B., Charlier P. and Foster S. (2008a). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 259–286.
- Vollmer W., Blanot D., de Pedro M. (2008b). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*. 32: 149-167.
- Vollmer W. (2015). Peptidoglycan. Capítulo 6. *Molecular Medical Microbiology* (2da edición) Vol.1: 105-124.
- Xu Y., Wang T., Kong J., Wang H. (2015). Identification and functional characterization of AclB, novel cell-separating enzyme from *Lactobacillus casei*. *International Journal of Food Microbiology*. 203: 93-100.
- 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 Atl<sub>WM</sub> encoded by *Staphylococcus warneri* M: Mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene*. 416: 66-76.
- Yoon Low L., Chen Y., Perego M., Osterman A., Liddington R. (2005). Structure and lityc activity of *Bacillus anthracis* prophage endolysin. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 35433-35439.

- Yoong P., Schuch R., Nelson D., Fischetti V. (2006). PlyPH bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology*. 188: 2711-2714
- Zhang H., Bao H., Billington C., Hudson J., Wang R. (2012). Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk. *Food Microbiology*. 31: 133-136.
- Zimmer M., Vukov N., Scherer S., Loessner M. (2002). The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5311-5317.
- Zoll S., Patzold B., Schlag M., Gotz F., Kalbacher H, Stehle T. (2010). Structural Basis of Cell Wall Cleavage by a Staphylococcal Autolysin. *PLOS Pathogens*. 6: Issue 3.
- Zoll S., Schalg M., Shkumatov A., Rautenberg M., Svergun D., Götz F., Stehle T. (2012). Ligand-Binding Properties and Conformational Dynamics of Autolysin Repeat Domains in Staphylococcal Cell Wall Recognition. *Journal of Bacteriology*. 194(15): 3789-3802.