



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



DISEÑO RACIONAL DE UNA ENDOLISINA QUIMÉRICA CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

PRESENTA

MARÍA ZULEMA JUÁREZ CORTÉS

LA PAZ, B.C.S., JULIO DE 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 11 del mes de Junio del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis titulada:

"DISEÑO RACIONAL DE UNA ENDOLISINA QUIMÉRICA CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*"

Presentada por el alumno:

JUÁREZ

Apellido paterno

CORTÉS

materno

MARÍA ZULEMA

nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	9	8	4
---	---	---	---	---	---	---


Aspirante de:


MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISION REVISORA

Directores de Tesis


DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX
Director de Tesis


DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA
2a. Directora de Tesis


DR. SERGIO FRANCISCO MARTÍNEZ DÍAZ


DR. MAURICIO MUÑOZ OCHOA


DR. VÍCTOR HUGO CRUZ ESCALONA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO



I.P.N.
CICIMAR
DIRECCIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 14 del mes de Junio del año 2018

El (la) que suscribe BM. MARÍA ZULEMA JUÁREZ CORTÉS Alumno (a) del Programa

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A160984 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. CÉSAR SALVADOR CARDONA FÉLIX Y DRA. BÁRBARA GONZÁLEZ ACOSTA

y cede los derechos del trabajo titulado:

"DISEÑO RACIONAL DE UNA ENDOLISINA QUMÉRICA CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*"

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la

siguiente dirección: marizjuarez@yahoo.com.mx - ccardona.felix@gmail.com -
baga.gonzal@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


BM. MARÍA ZULEMA JUÁREZ CORTÉS

Nombre y firma del alumno

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Microbiología y Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del Instituto Politécnico Nacional (CICIMAR-IPN) bajo la dirección del Dr. César Salvador Cardona Félix, Catedrático CONACyT comisionado al referido Centro de Investigación y de la Dra. Bárbara González Acosta, Profesora-Investigadora del CICIMAR-IPN, con la asesoría del Dr. Sergio Francisco Martínez Díaz, Dr. Víctor Cruz Escalona y Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, todos Profesores-Investigadores del CICIMAR-IPN, en el período comprendido de febrero de 2016 a junio de 2018.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi madre, mujer que siempre me enseñó que la fortaleza está en uno mismo, que la lucha es cuestión de actitud, que el compromiso y la responsabilidad siempre van de la mano, y sobre todo que el amor es el sentimiento más irracional, pero a su vez el más noble.

Siempre en mi mente María.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el financiamiento al Proyecto Número 247842 titulado: “*Ensolisinas fágicas recombinante: Nueva estrategia para el control de bacterias patógenas en cultivos de importancia acuícola en México*”, de la convocatoria de proyectos de desarrollo científico para atender problemas nacionales 2014, así como por la beca para estudios de Maestría (738218).

Al Dr. César Salvador Cardona Félix y a la Dra. Bárbara González Acosta directores de este trabajo, quienes no sólo me brindaron sus conocimientos y guía profesional para mi formación académica. Gracias por la amistad, la paciencia y la confianza que me proporcionaron. Sin lugar a dudas ahora son parte importante de mi crecimiento.

A los miembros del comité revisor Dr. Víctor Escalona Cruz, Dr. Mauricio Muñoz Ochoa, Dr. Sergio F. Martínez Díaz, quienes dieron su voto de confianza y aportaron sus conocimientos para enriquecer el trabajo.

A mis compañeros y ahora amigos Antony Landeros y César Guadarrama, por su ayuda en el trabajo de laboratorio, así como por compartir sus conocimientos y sus ratos libres para disfrutar de la amistad.

A Lina Zermeño, por que fuiste parte del logro, no sólo por tus sugerencias y apoyo profesional, sino porque gracias a ti y a tú familia pude encontrar calidez de hogar.

A mi esposo Jorge Alberto Sánchez Burgos por todo el apoyo, por brindarme calma y claridad en los momentos de oscuridad y dolor. Eres uno de los pilares más importantes de este logro.

A mi padre Benito Juárez Gutiérrez y a mis hermanas Rosario y Viviana I. Juárez Cortés, por levantarme el ánimo para seguir afrontando el reto.

A mis amigas Hisol L-Arellanes y Dora Liney por su valioso apoyo y motivación brindados en el día a día.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Péptidos catiónicos</i>	3
1.1.1 <i>Mecanismo de acción de los péptidos catiónicos</i>	4
1.2. <i>Endolisinas</i>	6
1.2.1 <i>Actividad enzimática</i>	9
1.2.2 <i>Estructura</i>	10
1.2.3 <i>Mecanismos de lisis</i>	11
2. CEPA BLANCO	14
3.1. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14
3. ANTECEDENTES	16
3.1 <i>Desestabilizadores de membrana y endolisinas</i>	16
3.2 <i>Uso de la predicción estructural y modelaje de proteínas</i>	18
3.3 <i>Endolisinas quiméricas</i>	19
3.4 <i>Endolisinas en la industria acuícola</i>	21
4. PLANTEAMIENTO	22
5. HIPÓTESIS	23
6. OBJETIVOS	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1 <i>Predicción de estructuras y diseño de la proteína quimérica</i>	24
7.2 <i>Producción recombinante de la proteína quimérica</i>	25
7.2.1 <i>Amplificación del gen</i>	27
7.2.2 <i>Clonación del gen en el vector pGEM-T Easy</i>	27
7.2.3 <i>Subclonación del gen LysVPMS1 en vector de expresión pColdI</i>	28
7.2.3.1 <i>Reamplificación del gen LysVPMS1-PCNP</i>	28
7.2.3.2 <i>Purificación del inserto</i>	29
7.2.4 <i>Obtención del vector de expresión</i>	29
7.2.5 <i>Ligación del inserto LysVPMS1-PCNP en el vector de expresión pColdI</i>	30
7.2.6 <i>Prueba de verificación por doble restricción</i>	33

7.2.7	<i>Expresión de la proteína LysVPMS1-PCNP</i>	33
7.2.8	<i>Purificación por afinidad a níquel de la proteína LysVPMS1-PCNP</i>	34
7.2.9	<i>Cuantificación de proteína</i>	35
7.2.10	<i>Prueba de actividad muralítica relativa de LysVPMS1-PCNP</i>	35
8.	RESULTADOS	37
8.1	<i>Predicción de la estructura de la endolisina LysVPMS1 y análisis de acoplamiento molecular con monómero de pared</i>	37
8.2	<i>Análisis de acoplamiento molecular con fragmento de pared celular Gram-negativo de la endolisina LysVPMS1</i>	39
8.3	<i>Predicción de la estructura de LysVPMS1-PCNP y análisis de acoplamiento molecular con monómero de pared</i>	41
8.4	<i>Análisis de acoplamiento molecular con fragmento de pared celular Gram-negativo de la endolisina LysVPMS1-PCNP</i>	43
8.5	<i>Diseño de la proteína LysVPMS1-PCNP</i>	44
8.6	<i>Clonación en el vector pGEM-T Easy</i>	45
8.7	<i>Preparación del inserto para subclonación en vector de expresión</i>	46
8.8	<i>Restricción y purificación de vector de expresión pColdI</i>	47
8.9.	<i>Ligación del inserto LysVPMS1-PCNP con el vector de expresión pColdI</i>	48
8.10	<i>Inducción de la expresión y purificación de LysVPMS1-PCNP</i>	49
8.11	<i>Cuantificación de proteína por densitometría</i>	50
8.12	<i>Pruebas de actividad muralítica relativa de LysVPMS1-PCNP</i>	48
9.	DISCUSIÓN	54
10.	CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de péptidos catiónicos.....	5
Figura 2. Ciclo de vida lítico de un bacteriófago	7
Figura 3. Composición de la membrana celular de bacterias Gram-negativas. LP (Lipopolisacárido), PG (Peptidoglicano).	8
Figura 4. Estructura del peptidoglicano en bacterias Gram-negativas y sitios de corte de las endolisinas	9
Figura 5. Estructura general de endolisinas. DCE (Dominio catalítico de la enzima), DUC (Dominio de unión a la pared celular), E (Enlazador)	11
Figura 6. Mecanismos de lisis inducidos por endolisinas. a) Sistema holina-endolisina; b) Translocación y c) Anclamiento y liberación por pinholinas	12
Figura 7. Descripción gráfica de la metodología seguida para la producción recombinante de la proteína LysVPMS1-PCNP	26
Figura 8. Modelos de la estructura terciaria de la endolisina LysVPMS1 obtenidos mediante el software Quark.....	37
Figura 9. a) Acoplamiento molecular del modelo 1 <i>ab initio</i> y b) Estructura terciaria de la endolisina LysVPMS1	38
Figura 10. Superficie y sitios catalíticos de la endolisina LysVPMS1. a) Modelo 3, b) Modelo 8 y c) Modelo 9	39
Figura 11. Estructura general (a) y construcción (b) de un fragmento de la pared celular de una bacteria Gram-negativa	40
Figura 12. Mejores acoplamientos del modelo 1 de la endolisina LysVPMS1	41
Figura 13. Segundo (a) y tercer (b) acoplamiento molecular de la endolisina LysVPMS1	41
Figura 14. Modelos obtenidos mediante el software Quark de la proteína LysVPMS1-PCNP	42
Figura 15. a) Modelo 1 <i>ab initio</i> de LysVPMS1-PCNP y b) Estructura terciaria; c) Modelo 2 <i>ab initio</i> de LysVPMS1-PCNP y d) Estructura terciaria.....	43
Figura 16. Análisis de acoplamiento molecular de la proteína LysVPMS1-PCNP con fragmento de peptidoglicano	44

Figura 17. Esquema y secuencia del diseño de la proteína quimérica LysVPMS1-PCNP	45
Figura 18. a) Amplificación del gen; b) Crecimiento de colonias de la transformación en células DH5α con pGEM-Teasy e inserto (LysVPMS1-PCNP); c) Confirmación de clonas positivas	46
Figura 19. a) Extracción de plásmido de las colonias 1, 3, 4 y 5; b) Amplificación del inserto; c) Purificación del inserto.....	47
Figura 20. a) Visualización de la restricción de la construcción pCold+LysVPMS1; b) Visualización de la purificación del vector de expresión.	48
Figura 21. a) Visualización de la amplificación con la polimerasa CloneAmp™ DNA; b) Purificación del inserto; c) Confirmación de clona positiva	49
Figura 22. Prueba de inducción y monitoreo de la purificación	50
Figura 23. Gel para realizar cuantificación de proteína mediante densitometría a partir de diluciones de albúmina.....	51
Figura 24. Cinética de actividad enzimática y porcentaje de actividad muralítica relativa de la endolisina LysVPMS1 y LysVPMS1-PCNP.....	52
Figura 25. Porcentaje de actividad muralítica relativa de las endolisinas silvestre (LysVPMS1) y quimera (LysVPMS1-PCNP)	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de PCR y programa para la amplificación del gen LysVPMS1-PCNP	27
Tabla 2. Mezcla de reacción para la ligación del gen LysVPMS1-PCNP con pGEM-T Easy	28
Tabla 3. Mezcla de reacción y programa para amplificación del gen mediante mezcla de PCR Phusion Flash.....	29
Tabla 4. Reacción de restricción para obtención de pColdI	30
Tabla 5. Componentes del Master Mix y protocolo de amplificación de 3 pasos para CloneAmp™ DNA HIFI PCR	31
Tabla 6. Mezcla de reacción para clonación recomendada con In-Fusion	32
Tabla 7. Componentes de reacción para doble restricción con NdeI y BamHI	33

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHPNS	Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (Síndrome de Necrosis Hepatopáncreatica Aguda)
DCA	Dominio Catalítico Activo
DCE	Dominio Catalítico de la Enzima
DUC	Dominio de Unión a la Pared Celular
E	Enlazador
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMS	Early Mortality Syndrome (Síndrome de Mortalidad Temprana)
IDT	Integrated DNA Technologies
IPTG	Isopropil- β -D-1 tiogalactopiranosido
LB	Luria Bertani
mDAP	Mesodiaminopimélico
NAG	N-acetilglucosamina
NAM	N-acetilmurámico
PCNP	Nanopéptidopolicatiónico
PG	Peptidoglicano
SAR	Signal Arrest Release (Liberación de detección de señal)
tdh	Hemolisina Directa Termoestable
trh	Hemolisina Relacionada a tdh
T0	Tiempo inicial
TF	Tiempo final
PB	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonio

GLOSARIO

Antimicrobiano. Agentes que actúan sobre estructuras o funciones bacterianas, ya sea inhibiendo su membrana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o funciones de ácidos nucleicos (Molina-López, 2015).

Endolisina. Enzima producida por fagos para hidrolizar el peptidoglicano desde el interior de la célula y liberar la progenie (Borysowski, *et al*, 2006).

Enlazador. Secuencia no estructurada que conecta dominios catalíticos con módulos de unión.

Enzima. Proteínas que catalizan reacciones químicas (Segovia & Soberón, 2007).

Fago. Virus que infecta y se replica dentro de células bacterianas.

Péptido catiónico. Moléculas de bajo peso molecular constituidos por menos de 50 aminoácidos, con carga positiva por su contenido de arginina y lisina (Pushpanathan, Gunasekaran, & Rajendhran, 2013).

Proteína. Polímeros lineales constituidos por más de 50 aminoácidos distintos, unidos por enlaces covalentes (Mckee & Mckee, 2003).

Resistencia bacteriana. Mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Fernández-Riverón, *et al*, 2003).

In silico. Uso de softwares informáticos para realizar simulaciones biológicas empleando modelos matemáticos (Fina, Lombarte, & Rigalli, 2013).

RESUMEN

La resistencia bacteriana es una problemática particularmente crítica para bacterias patógenas Gram-negativas por la membrana externa que poseen. Por ello actualmente se ha propuesto como una alternativa el diseño racional de proteínas quiméricas para generar antimicrobianos con actividad potencializada y menor probabilidad de generar dicha resistencia. Y bajo esta premisa en este trabajo realizamos el diseño racional de una nueva endolisina quimérica (denominada LysVPMS1-PCNP), a partir del análisis estructural de la endolisina silvestre (LysVPMS1) proveniente del fago VPMS1. La cual se sabe ejerce actividad lítica sobre células sensibilizadas del género *Vibrio*. Esto con el objetivo de potencializar su actividad bacteriolítica contra *Vibrio parahaemolyticus*, dado las serias pérdidas económicas que provoca esta bacteria en la industria acuícola. Para ello modificamos el dominio N-terminal de LysVPMS1 fusionando un péptido policatiónico (PCNP). Corroboramos el diseño realizando análisis *in silico* mediante acoplamiento molecular (Autodock v1.1.1.2) y observamos la presencia del aminoácido Glutámico 135 en los sitios catalíticos de LysVPMS1, el cual también se encontró presente en LysVPMS1-PCNP como Glutámico 144. Los modelos demostraron además que la nueva proteína es termodinámicamente estable y que el péptido se encuentra expuesto. Para probar la actividad primero se obtuvo la proteína recombinante y posteriormente se realizó un ensayo para medir la actividad muralítica relativa contra células sensibilizadas de *V. parahaemolyticus*, en donde la endolisina quimérica mostró 5.8 veces más actividad que la silvestre. Los resultados comprobaron que a partir del análisis *in silico* se puede realizar el diseño racional de una proteína quimérica, en donde además la modificación es estable ya que pudo ser producida vía recombinante. Obteniendo además una mayor actividad muralítica dado que esta nueva endolisina presenta mayor capacidad lítica sobre células sensibilizadas en un menor tiempo.

Palabras clave: Endolisina, Ingeniería de proteínas, *in silico*, fago, modelos *ab initio*.

ABSTRACT

Bacterial resistance is a particularly critical problem for pathogenic Gram-negative bacteria due to its outer membrane. Therefore, the rational design of chimeric proteins to generate antimicrobials with potentiated activity and a lower probability of generating said resistance has been proposed as an alternative. In this work we carried out the rational design of a new chimeric endolysin (called LysVPMS1-PCNP), from the structural analysis of the wild-type endolysin (LysVPMS1) from the phage VPMS1, which we know exerts lytic activity on sensitized cells of the genus *Vibrio*. To potentiate the bacteriolytic activity against *Vibrio parahemolyticus*, due to the serious economic losses caused by this bacterium in the aquaculture industry, we modified the N-terminal domain of LysVPMS1 by fusing a polycationic peptide (PCNP). We corroborated the design by performing *in silico* analysis by molecular coupling (Chimera 1.11.2) and observed the presence of the amino acid Glutamic 135 in the catalytic site of LysVPMS1, which was also found in LysVPMS1-PCNP as Glutamic 144. The models also showed that the new protein is thermodynamically stable and the peptide is exposed. The recombinant protein was obtained and the muralytic activity was tested against permeabilized cells of *V. parahaemolyticus*, where the chimeric endolysin showed 5.8 times more activity than the wild type. Our results proved that starting from *in silico* analysis, the rational design of a chimeric protein can be carried out, where the modification is also stable since it could be produced as a recombinant protein. Also enhancing muralytic activity since this new endolysin obtains greater lytic capacity on permeabilized cells in less time.

Key words: Endolysin, Protein engineering, chimeric protein, *in silico*, *ab initio*.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la búsqueda de nuevas alternativas de control bacteriano es un objetivo primordial debido a la aparición de resistencia bacteriana (Cabrera *et al.*, 2007).

Esta resistencia es considerada un problema de salud pública por el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro utilizados para combatir una extensa gama de enfermedades causadas principalmente por bacterias Gram-negativas (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014). Aunado a esto se encuentra la transmisión de resistencia a antibióticos a través de la cadena alimenticia debido a su presencia en el tejido de organismos de consumo humano, que son tratados con antibióticos de uso veterinario; por otro lado, estos organismos a su vez pueden adquirirlos debido al impacto antropogénico mediante los afluentes de aguas residuales, los cuales dispersan estos compuestos (Teale, 2002).

Las bacterias producen o adquieren nuevos genes de resistencia mediante transferencia horizontal (Paredes & Roca, 2004 & Defoirdt *et al.*, 2007), consecuencia de su rápida duplicación y plasticidad genética (Molina-López, 2015). Dicha resistencia presente tanto en cepas patógenas como comensales se debe a la presión selectiva que ejercen los antibióticos (Hawkey, 1998), lo cual ha llevado a desarrollar mecanismos bacterianos de resistencia como la degradación por proteasas, la liberación de proteínas inhibidoras o los cambios en la conformación de la membrana externa (Hancock, 1997).

Esta problemática es particularmente crítica para bacterias patógenas Gram-negativas debido a que son resistentes a diferentes clases de antibióticos por la membrana externa que poseen (Briers & Lavigne, 2015). Por ello se ha dirigido el interés y esfuerzo hacia el desarrollo de compuestos que tengan menor probabilidad de generar dicha resistencia (Yeaman & Yount, 2003).

En este contexto se ha propuesto el uso de péptidos catiónicos y endolisinas (enzimas) para combatir bacterias Gram-negativas (Schmelcher *et al.*, 2012). Lo anterior mediante el diseño racional de proteínas quiméricas, las cuales son proteínas que no existen en la naturaleza y se crean mediante la combinación de genes que

originalmente codifican proteínas separadas, una de ellas generalmente con función de reconocimiento molecular y otras que transfieren ciertas funcionalidades como mejoras en la estabilidad, vida media, entre otras; de esta fusión resulta una nueva molécula que posee las propiedades funcionales de ambas proteínas parentales (Schmidt, 2009).

Es importante establecer que para poder realizar el diseño racional de una nueva proteína se requiere del conocimiento profundo de la estructura de las moléculas originales y de su sitio activo para proponer cambios que logren alguna función preconcebida (Martínez & García, 2014). El conocimiento de la estructura se basa en la determinación de las estructuras cristalográficas o la generación de modelos tridimensionales de proteínas a través de programas bioinformáticos, los cuales permiten visualizar los aminoácidos de los sitios activos además de otros residuos componentes de estos sitios (Walsh, 2007). La comprensión de la estructura permite proponer cambios que resulten en una actividad diferente de la original y dicho cambio puede estar dado por la sustitución de aminoácidos específicos, así como la adición o delección de pequeñas regiones de una proteína para promover o restringir los cambios conformacionales que ocurren durante la catálisis (Brannigan & Wilkinson, 2002).

Además, los programas bioinformáticos permiten obtener la estructura terciaria a partir de su secuencia de aminoácidos cuando no se cuenta con la estructura tridimensional de una proteína por análisis de cristales mediante rayos X o por resonancia magnética nuclear, además de predecir y poder manipular parámetros como especificidad, afinidad de unión y estabilidad (Blundell, 1994). Una vez establecidas las modificaciones se debe realizar la validación en laboratorio, esto obteniendo la construcción y la expresión de la quimera mediante técnicas de ADN recombinante, para posteriormente purificarla y evaluar las funciones con el fin de comprobar las nuevas propiedades de la proteína modificada (Yu *et al.*, 2014).

Las modificaciones exitosas en proteínas han sido: para permitir su purificación en un solo paso añadiendo etiquetas de péptidos pequeños (*v. g.* polihistidina) para brindarles cierta afinidad de acuerdo a la técnica cromatográfica a utilizar (Bell *et al.*, 2013), como biosensores para monitorear moléculas de señalización (*v. g.* proteína

verde fluorescente) (Pedelacq, *et al.*, 2006) y como agentes terapéuticos (v. g. anticuerpos modificados) (Schmidt, 2013).

La aplicación como agentes terapéuticos es en el que nos enfocaremos en este estudio por lo que primero se establecerán las características principales de los péptidos catiónicos y de las endolisinas, moléculas objetivo en este trabajo.

1.1 Péptidos catiónicos

Los péptidos catiónicos deben su diversidad (>600) a los procesos de duplicación, divergencia y presión selectiva de sus genes codificantes debido a la interacción de las especies de origen con el ambiente y sus patógenos específicos (Dassanayake *et al.*, 2007).

Éstos se caracterizan por su gran contenido de arginina y lisina, definiendo así su carga positiva (de +2 a +9), conformados a su vez por aproximadamente 50% de aminoácidos hidrófobos (Hancock & Rozek, 2002). Varían en tamaño de 12-50 aminoácidos con masas moleculares menores a 1000 (Hancock, 2001), además, poseen un amplio intervalo de actividad, menor toxicidad y menor capacidad de desarrollo de resistencia (Pushpanathan *et al.*, 2013; Téllez & Castaño, 2010). Y son considerados adecuados para interactuar con membranas bacterianas que posean grupos de cabeza hidrófilos con carga negativa (Hancock, 2001)

La toxicidad de los péptidos catiónicos depende de las características de la membrana celular objetivo como son el potencial transmembranal y la polarización, así como por sus características estructurales (Yeaman, 2003).

La actividad antimicrobiana que poseen los péptidos es atribuida a la interacción de la carga positiva de la arginina y lisina con la carga negativa de la superficie externa de la bacteria, debido a la presencia de grupos fosfatos de lipopolisacáridos (en bacterias Gram-negativas) o ácido teicoico (en bacterias Gram-positivas) (Jackson, 1997; Mavri & Vogel, 1996; Téllez & Castaño, 2010).

1.1.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción es determinado por la asociación de los péptidos catiónicos con la superficie de la membrana externa la cual está cargada negativamente por la presencia de lipopolisacáridos aniónicos, los péptidos neutralizan la carga sobre una parte de la membrana externa creando grietas por los cuales atraviesan y se unen con los cationes divalentes presentes en los lipopolisacáridos desestabilizando la membrana (**Fig. 1 a**), o bien, una vez que el péptido ha atravesado la membrana, interactuará con la superficie de la membrana citoplasmática cargada negativamente (**Fig. 1 b**) (Oren & Shai, 1998).

En la membrana citoplasmática (**Fig. 1 c**) los péptidos interactúan electrostáticamente con la superficie aniónica induciendo a la inserción paralela en la membrana entre la interfaz de las cabezas de los grupos hidrofílicos y cadenas hidrófobas de los fosfolípidos presentes en ésta (Huang, 2000), posteriormente se pliegan y en seguida pueden resultar cuatro escenarios: la lisis celular; formación de canales debido a una alta concentración de péptidos en la superficie externa de la membrana citoplasmática provocando la reorientación perpendicular comprometiendo la integridad de la membrana (Huang, 2000); el modelo de alfombra en donde se causa la descomposición de la membrana por asociación permanente de los péptidos (Oren & Shai, 1998); y finalmente la eliminación directa de la célula bacteriana por péptidos que actúan sobre ácidos nucleicos (Hancock, 2001).

Otra característica de algunos de estos péptidos es que no provocan la disolución completa de las células bacterianas, si no que provocan cambios en la morfología de la membrana externa, además de tener la capacidad de translocarse a través de las bicapas lipídicas sin afectar la función de barrera de membrana. La diversidad en sus mecanismos de acción, establece la importancia de estos compuestos, además, los péptidos han adquirido importancia como agentes terapéuticos debido a que llegan a tener especificidad con el objetivo; por otro lado, su toxicidad generalmente es baja y pueden ser metabolizados fácilmente (Pinto *et al.*, 2015).

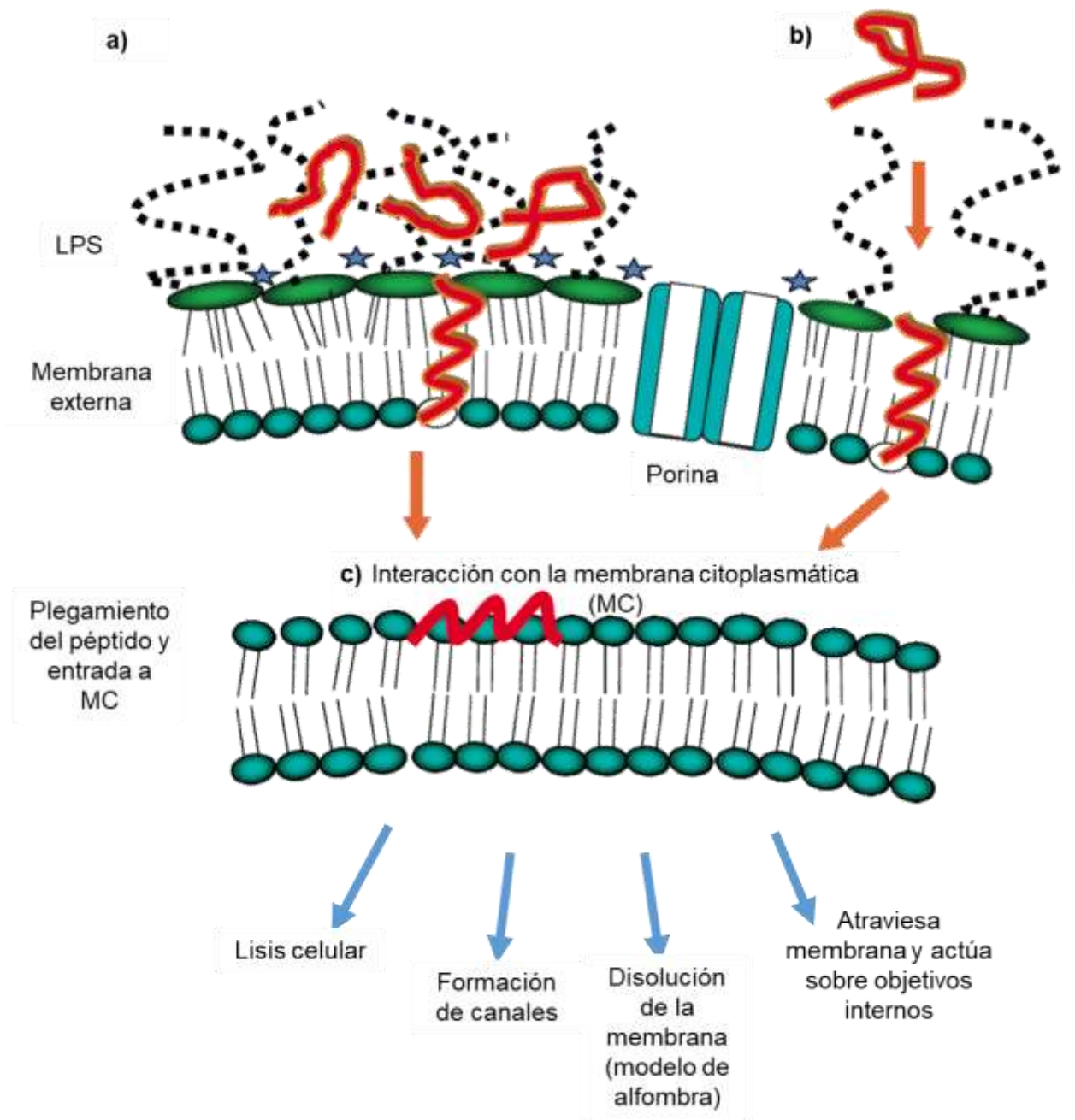


Figura 1. Mecanismos de acción de péptidos catiónicos. Imagen tomada y modificada de Hancock, 2001. LPS (Lipopolisacáridos).

1.2 Endolisinas

Las endolisinas son consideradas agentes antimicrobianos con potencial biotecnológico, dado que el desarrollo de resistencia hacia éstas es poco probable debido a la coevolución del bacteriófago (virus que infectan bacterias) y su huésped (García *et al.*, 2012), por su alta capacidad bactericida, rápida acción (Briers *et al.*, 2014b), y por no producir efectos secundarios (Haq *et al.*, 2012).

Estas enzimas son producidas por bacteriófagos cerca del final de su ciclo lítico, las cuales hidrolizan el peptidoglucano desde el interior de la célula para interferir o inhibir su síntesis (Borysowski *et al.*, 2006). A través de este mecanismo, ayudan al fago naciente a emerger, provocando a su vez la muerte de la bacteria a la que infectan (Zhang *et al.*, 2014) (**Fig. 2**). La especificidad de estas enzimas está dada por el reconocimiento del dominio de unión de la enzima a la pared celular limitando el efecto antibacteriano a un cierto género, especie, serotipo o cepa (Nelson *et al.*, 2012).

Los estudios realizados en los últimos años han demostrado que las endolisinas pueden expresarse de forma recombinante y añadirse exógenamente a bacterias sensibles causando una rápida lisis celular (Lood *et al.*, 2015). Sin embargo, únicamente son ideales para lisar únicamente bacterias Gram-positivas cuando se añaden de manera exógena (Briers *et al.*, 2014b).

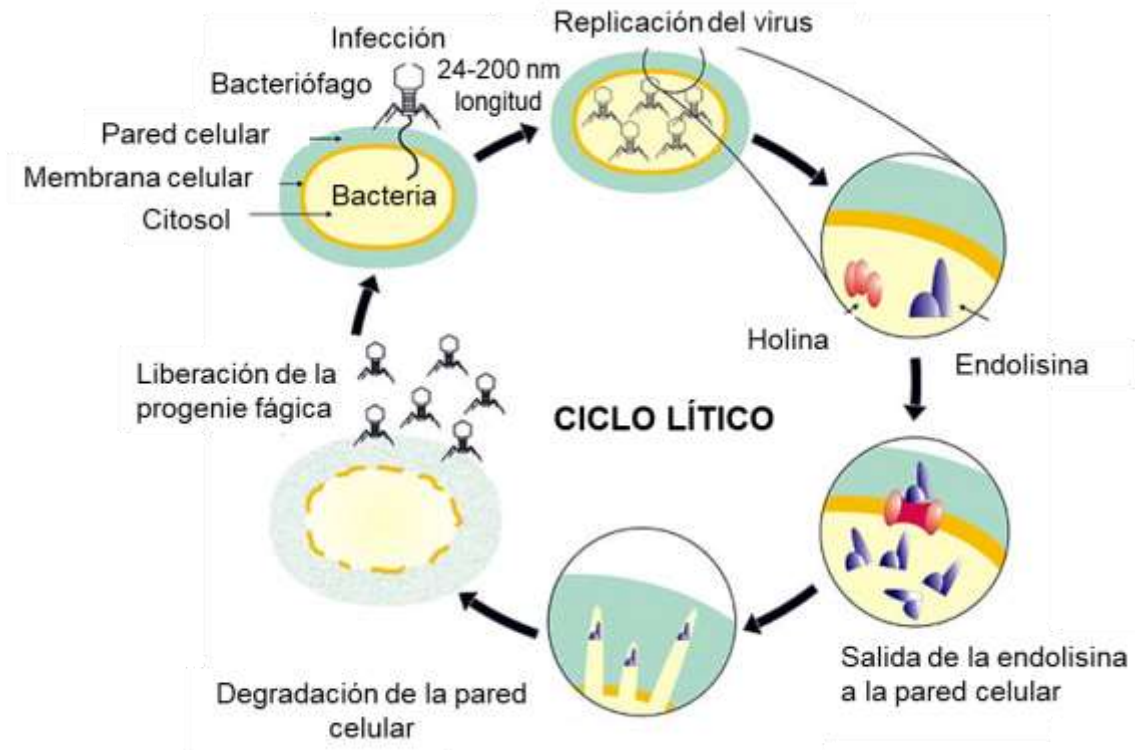


Figura 2. Ciclo de vida lítico de un bacteriófago (Saiz-Velarde, 2014).

Las limitaciones de su aplicación en bacterias Gram-negativas se deben a que éstas presentan una membrana celular externa conformada por una bicapa lipídica, la cual, está constituida en su parte externa por lípidos A, polisacáridos y cadenas de antígeno O, mientras que la parte interna contiene lipopolisacáridos; además la membrana posee proteínas como las porinas las cuales pueden ser triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos, que permiten el acceso a la capa de peptidoglucano (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). En su conjunto esta membrana evita el paso de diferentes compuestos (**Fig. 3**).

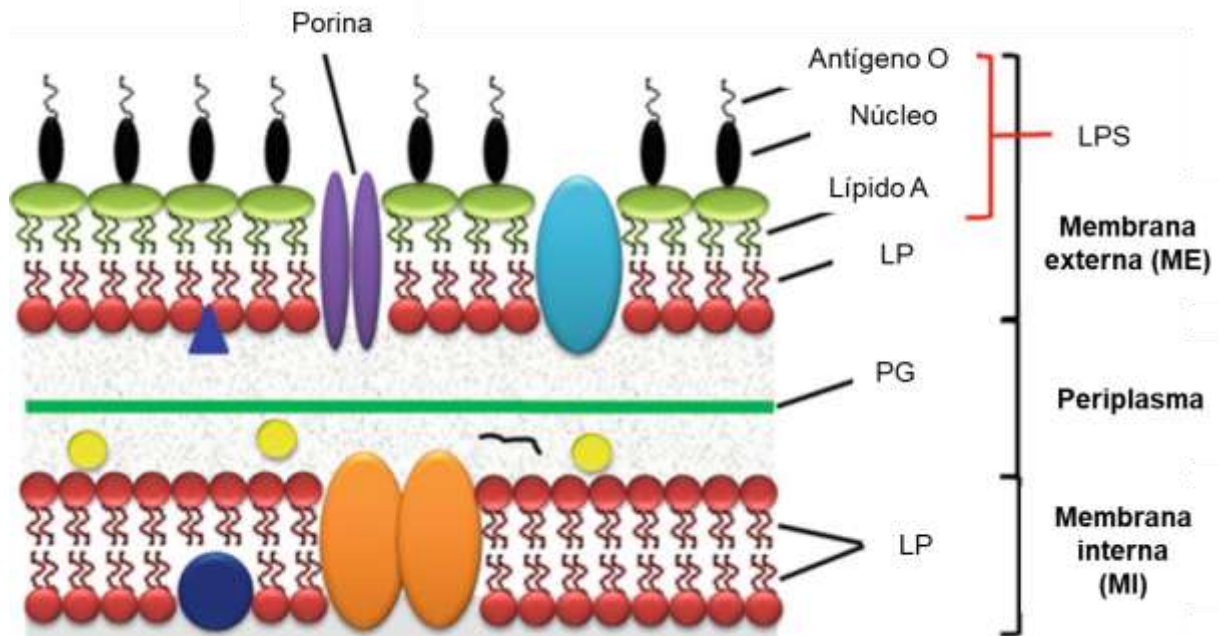


Figura 3. Composición de la membrana celular de bacterias Gram-negativas. LP (Lipopolisacárido), PG (Peptidoglucano). Imagen editada de Chatterjee y Chaudhuri, 2012.

La capa de peptidoglucano, es un heteropolímero conformado de cadenas de glucano lineales de N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM) unidas por enlaces β -1,4 (**Fig. 4**). Estas cadenas a su vez forman una red por los entrecruzamientos covalentes con péptidos cortos (Vollmer & Bertsche, 2008) a través de un enlace amida entre el NAM y una L-alanina. El resto de la cadena de péptidos puede estar conformada por aminoácidos D-alanina, D-glutámico, L-lisina y L-glicina, bien conservados en bacterias Gram-negativas, en las cuales a su vez la cadena de péptidos presenta un residuo de ácido mesodiaminopimélico (mDAP) en la tercera posición, unido directamente a la D-alanina terminal del siguiente esqueleto (Nelson et al., 2012). En conjunto, esta capa confiere rigidez bidireccional a la pared celular y su disrupción causa lisis osmótica (Rivas *et al.*, 2015).

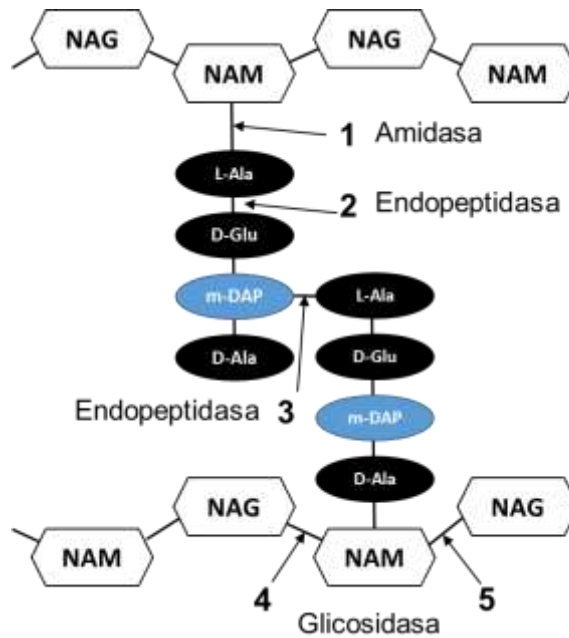


Figura 4. Estructura del peptidoglucano en bacterias Gram-negativas y sitios de corte de las endolisinas. Imagen tomada de Zermeño-Cervantes, 2012.

1.2.1 Actividad enzimática

Los sitios catalíticos de las endolisinas reconocen superficies de unión que poseen secuencias específicas (epítomos) sobre la capa de peptidoglucano, variando de acuerdo a su tipo y a los sitios en los cuales rompen los enlaces (**Fig. 4**). Se clasifican en tres tipos: 1) actividad glicosidasa, rompe la fracción glucosídica del peptidoglucano (N-acetilglucosaminidasa, N-acetilmuramidasa ó lisozima); 2) actividad amidasa, rompe el enlace amida entre fracción glucosídica y peptídica (N-acetilmuroamil-L-alanina-amidasa), esta actividad es asociada con endolisinas de bacteriófagos, esto debido a que la hidrólisis que provoca separa al polímero glucano del esqueleto peptídico, permitiendo la desestabilización del peptidoglucano y causando una rápida lisis de células hospedadoras, esto otorga una ventaja evolutiva a los bacteriófago ya que permite la diseminación de la progenie viral (Nelson *et al.*, 2012); 3) actividad endopeptidasa (proteasa), corta enlaces peptídicos entre dos aminoácidos y puede ocurrir en el esqueleto peptídico del peptidoglucano (D-alanil-glicil y L-alanoil-D-glutamato) (Walmagh *et al.*, 2013; Zermeño-Cervantes, 2012); 4) actividad transglicolasa lítica, estas no son hidrolasas verdaderas por que no requieren de agua

para catalizar el corte del peptidoglucano, son similares a las muramidasa por que rompen los enlaces β (1-4) entre los residuos de N-acetilmuroamidasa y N-acetilglucosaminidasa pero estos forman un residuo de N-acetil-1,6-anhidro durante el corte glucosídico dándole un mecanismo diferente al de las lisozimas (Holtje & Tomasz, 1975).

1.2.2 Estructura

Las endolisinas poseen diferentes dominios o módulos funcionales individuales, los cuales pueden adoptar una estructura globular o modular (**Fig. 5**). La mayoría de las enzimas globulares; es decir, con un solo dominio, son provenientes de fagos que infectan a bacterias Gram-negativas (Callewaert *et al.*, 2011; Fischetti, 2010).

Mientras que las modulares, denominadas así por poseer uno o más dominios catalíticos y un dominio de unión a la pared celular, son más comunes en bacterias Gram-positivas (Díaz *et al.*, 1990). El arreglo que se encuentra con más frecuencia es el que presenta un dominio catalítico en el extremo N-terminal y un dominio de unión a la pared celular en el C-terminal. Mientras que otras pueden tener un dominio catalítico en el extremo N-terminal, un dominio catalítico central de especificidad y un módulo de unión a sustrato en el C-terminal (Loessner, 2005). Por otro lado, es frecuente encontrar una secuencia no estructurada conectando los dominios catalíticos con el módulo de unión a sustrato (Korndörfer *et al.*, 2006).

Las endolisinas de fagos que infectan Gram-negativas generalmente no poseen un dominio de reconocimiento. Sin embargo, cuando éste se encuentra presente, está dispuesto en el extremo N-terminal mientras que el dominio catalítico se ubica en el C-terminal (Briers *et al.*, 2007).

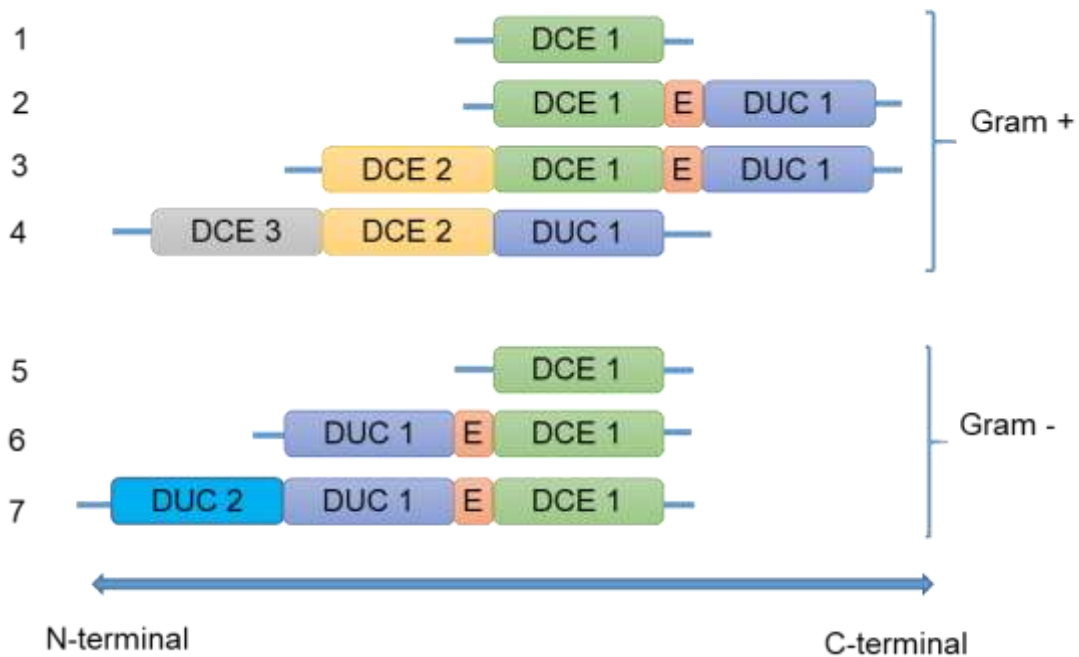


Figura 5. Estructura general de endolisinas. DCE (Dominio catalítico de la enzima), DUC (Dominio de unión a la pared celular), E (Enlazador). Imagen tomada y modificada de Rivas *et al.*, 2015.

1.2.3 Mecanismos de lisis

La lisis celular inducida por las endolisinas puede darse a través de tres mecanismos (Walmagh *et al.*, 2013) (**Fig. 6**):

A) Sistema holina-endolisina: Las holinas forman poros y permiten el paso de las endolisinas a través de la membrana citoplasmática de la bacteria huésped, llegando al periplasma y degradando el peptidoglucano.

B) Translocación: Las endolisinas que poseen en el extremo N-terminal, una región hidrófoba (H) y una región catalítica (C), las cuales son trasladadas a través de la membrana citoplasmática mediante la ayuda del sistema de translocación Sec-dependiente de la bacteria. Este traslado es debido a que, en la región catalítica, la endolisina lleva un sitio de reconocimiento con actividad peptidasa, el cual es detectado por el sistema de translocación utilizado por la propia bacteria para el transporte de proteínas.

C) Anclaje y liberación por pinholinas: Las endolisinas con una secuencia de liberación de señal (SAR por sus siglas en inglés Signal-Arrest-Release) en el extremo N-terminal que carecen de la región catalítica en el extremo C-terminal, se acumulan y se ligan a la membrana citoplasmática estando inactivas, por no poseer la señal de liberación. Por efecto de una peptidasa SAR, la endolisina adopta su configuración activa y es transportada al periplasma celular. Posteriormente la liberación de las endolisinas SAR se da lentamente y en bajas proporciones ya sea espontánea o rápidamente en masa, como respuesta al cambio de potencial de la membrana, generado por las pinholinas, para formar poros nanométricos (Yang *et al*, 2012).

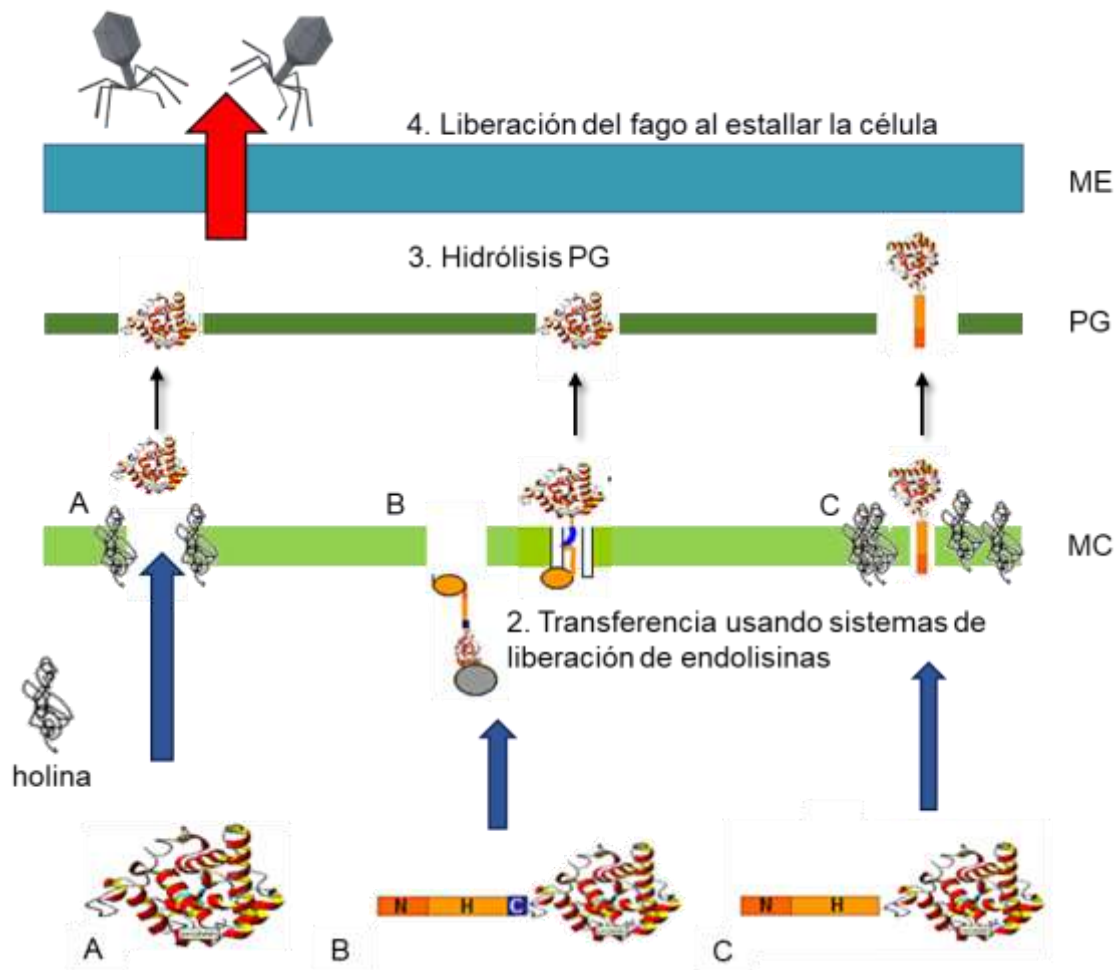


Figura 6. Mecanismos de lisis inducidos por endolisinas. a) Sistema holina-endolisina; b) Translocación y c) Anclamiento y liberación por pinholinas. Imagen tomada y modificada de Walmagh *et al.*, 2013. ME (Membrana externa), PG (Peptidoglucano) y MC (Membrana citoplasmática).

Finalmente, de estos mecanismos, resulta la despolarización de la membrana, permitiendo la liberación de la progenie viral una vez que ha terminado su ciclo de multiplicación.

Actualmente se ha visto que las endolisinas tienen mayor actividad cuando se añaden externamente en bacterias Gram-positivas, ya que poseen el peptidoglucano expuesto, esto se ha observado cuando se adiciona la enzima a la suspensión de células (Loessner *et al.*, 2002).

2. CEPA BLANCO

2.1. *Vibrio parahaemolyticus*

Es una bacteria Gram-negativa halofílica, que mide entre 0.5-0.8 µm de diámetro y entre 1.4-2.6 µm de largo. Forma parte de la flora natural de ecosistemas acuáticos salobres y marinos (Morris & Black, 1985; Daniels *et al.*, 2000; Eslava *et al.*, 2007). Al igual que otras especies del género *Vibrio*, ésta se puede encontrar en la columna de agua y en el sedimento (Eslava *et al.*, 2007). Por otro lado, puede ser una bacteria de vida libre, comensal, saprobia o parásita. Debido a lo anterior, pueden ser aislados de sedimento, plancton y otros organismos marinos donde alcanzan concentraciones elevadas ($3 \times 10^3 - 3 \times 10^6$ UFC/g) (Lear, 1963; Kaneko & Colwell, 1973).

Las temperaturas cálidas (37° C óptimo), son ideales para el crecimiento de esta bacteria, aunado a esto, su tiempo de generación es corto (entre 8 a 9 minutos), permitiéndole alcanzar elevadas concentraciones en un período corto de tiempo (Park *et al.*, 2004). Así mismo, influyen en su crecimiento, la luminosidad, cantidad de nutrientes y corrientes marinas (Oliver & Kaper, 1997).

El estudio de *V. parahaemolyticus* ha adquirido mayor relevancia, durante los últimos años, debido a que ha sido relacionada con la intoxicación humana, por ingestión de organismos marinos contaminados (moluscos bivalvos, crustáceos y peces) (González-Escalona *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2005); causando gastroenteritis de forma recurrente (Levine & Griffin, 1993), además de provocar infecciones de heridas y septicemia (Daniels *et al.*, 2000).

La patogenicidad hacia humanos de las variedades de esta especie de *Vibrio*, está determinada por los productos de los genes hemolisina directa termoestable (*tdh* por sus siglas en inglés). Los cuales codifican una proteína con capacidad hemolítica. Ésta puede aumentar la permeabilidad vascular y favorecer la acumulación de líquidos, así como la alteración del flujo iónico de las células intestinales, desencadenando así diarrea secretora; asociada al fenómeno de Kanagawa (Takeda, 1982; Nishibuchi & Kaper, 1990; González-Escalona *et al.*, 2005). En cepas de *V. parahaemolyticus* en donde no se presenta el gen *tdh*, el factor de virulencia está dado por el gen hemolisina

relacionada a *tdh* (*trh* por sus siglas en inglés) el cual también codifica una hemolisina, la cual posee características biológicas, inmunológicas y fisicoquímicas similares a *tdh* (Honda *et al.*, 1988; Oliver & Kaper, 1997).

Por otro lado, también se ha visto que *V. parahaemolyticus* puede actuar como patógeno de organismos de importancia comercial en condiciones de cultivo (Bartley & Slanetz, 1971; Daniels *et al.*, 2000), dado que puede afectar tanto a larvas, como a organismos adultos (Borges Magaña *et al.*, 2012; Roque *et al.*, 2001). Llegando a causar serias pérdidas económicas, debido a que se pueden presentar mortalidades del 100% en los sistemas de cultivo (Aguirre-Guzmán, 2004; Campa-Córdova *et al.*, 2005).

Esto último, algunos autores lo han atribuido a la carencia de control de la microbiota en los sistemas tempranos de cultivo (Sorgeloos, 1995) y a la aparición y persistencia de enfermedades que no pueden ser tratadas de forma eficiente (McPhearson *et al.*, 1991). Además del uso indiscriminado de antibacterianos en el tratamiento de las mismas (Bermudez *et al.*, 2009),

En la industria acuícola, el organismo al que mayormente afecta esta bacteria es el camarón, ya que forma parte de su flora natural, encontrándose en el tracto digestivo, branquias y cutículas (Morales-Covarrubias, 2004). Es considerado patógeno oportunista, debido a que afecta a su hospedero cuando el sistema inmune se deprime principalmente por estrés (Cuéllar-Anjel, 2013). Actualmente se ha puesto mayor esfuerzo en el estudio del control de esta bacteria, debido a que, en años recientes, surgió el denominado Síndrome de Mortalidad Temprana o Síndrome de la Necrosis Hepatopancreática Aguda (EMS o AHPND, por sus siglas en inglés) (Peña-Navarro & Varela-Mejías, 2015). Se considerada una cepa altamente infecciosa, debido a que impacta de forma importante la producción de los organismos. Por otro lado, se ha dispersado rápidamente por diversos países, siendo China en donde se reportó por primera vez en el 2009, posteriormente en Vietnam, Malasia y México (FAO, 2015).

3. ANTECEDENTES

El uso exógeno de endolisinas contra bacterias Gram-negativas se ha visto limitado, debido a la composición de su membrana externa, la cual no permite el acceso de las enzimas a la capa de peptidoglucano (Fischetti, 2011; Morita *et al.*, 2001). Por ello, aunque se ha puesto especial interés en endolisinas con efecto antibacteriano contra bacterias Gram-negativas, los estudios aún siguen siendo insuficientes (Walmagh *et al.*, 2013). No obstante, se ha demostrado que mediante el uso de diferentes estrategias se puede aprovechar el mecanismo de acción de estas enzimas.

3.1 Desestabilizadores de membrana y endolisinas

De las endolisinas estudiadas, sólo una pequeña fracción muestra actividad frente a bacterias Gram-negativas (Lai *et al.*, 2011). Esta actividad se mejora en presencia de factores desestabilizadores de membrana como lo son el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácidos orgánicos débiles (ácido cítrico y málico) (Briers & Lavigne, 2015; Oliveira *et al.*, 2014).

Ejemplo del uso de EDTA como desestabilizador de membrana, es el trabajo de Walmagh *et al.*, (2013) quienes además de caracterizar cinco endolisinas globulares obtenidas de bacteriófagos que atacan a bacterias Gram-negativas: BcepC6gp22 (fago BceC6B de *Burkholderia cepacia*), P2gp09 (fago P2 de *Escherichia coli*), PsP3gp10 (fago PsP3 de *Salmonella enterica*), K11gp3.5 y KP32gp15 (fagos K11 y KP32 de *Klebsiella pneumoniae*, respectivamente); predijeron a través de análisis *in silico*, que tres de las endolisinas poseen actividad transglicosilasa (BcepC6gp22, P2gp09 y PsP3gp10). Mientras que las restantes presentan actividad amidasa (K11gp3.5 y KP32gp15). Posteriormente observaron que células de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) con membranas permeabilizadas con EDTA, fueron sensibles a la acción antibacteriana de las cinco endolisinas, logrando una reducción del número de células viables de entre 1.89 y 3.08 unidades logarítmicas. Finalmente, compararon la acción antibacteriana de las endolisinas globulares con la de una endolisina modular (OBPgp279) y de ello concluyen que la composición estructural (globular-modular) de la endolisina es un determinante principal de la actividad muralítica y de la capacidad

contra bacterias Gram-negativas de una endolisina, siendo las modulares las que presentan una mayor actividad enzimática y antibacteriana.

El trabajo más reciente en donde utilizan endolisinas en conjunto con EDTA es el de Guo *et al.* (2017), quienes además del permeabilizador, evaluaron el efecto de la endolisina LysPA26 en células de *P. aeruginosa*. En este trabajo los autores concluyen que la enzima estudiada posee un dominio tipo lisozima que mantiene su actividad en un 90% en presencia de EDTA. Así mismo lograron reducir hasta en 4 órdenes de magnitud el número de células de un cultivo de *P. aeruginosa* en un período de 30 minutos, además de tener estabilidad a diferentes pH y temperaturas. Sin embargo, observaron que esta endolisina puede lisar otras bacterias Gram-negativas, pero no bacterias Gram-positivas.

En cuanto al uso de endolisinas en conjunto con ácidos orgánicos para sensibilizar la membrana externa, se encuentran los trabajos de Oliveira y colaboradores (2014) y Oliveira *et al.* (2016) quienes realizaron combinaciones de la endolisina Lys68 con ácido cítrico y málico como permeabilizadores de la membrana externa de *Salmonella typhimurium*, obteniendo de estas combinaciones una reducción bacteriana logarítmica aproximada de 3 a 5 después de un tiempo de dos horas. Posteriormente probaron la endolisina ABgp46 proveniente del fago que ataca a *Acinetobacter* (vb_AbaP_CEB1) en combinación con los mismos ácidos orgánicos sobre células multi-resistentes de *A. baumannii*. Logrando reducir el número de células viables hasta en 2 órdenes de magnitud en un tiempo de 2 horas. Además, establecieron que dicha endolisina es una N-acetilmuramidasa, la cual es activa en un amplio intervalo de pH (4.0-10.0), así como a temperaturas de hasta 50° C.

3.2 Uso de la predicción estructural y modelaje de proteínas

La simulación molecular de proteínas, ha sido utilizada como herramienta de aproximación en el estudio de las endolisinas para ayudar a su clasificación ya que se pueden realizar comparaciones con otras proteínas para determinar similitudes y establecer el tipo de actividad de acuerdo a su estructura (Oliveira *et al.*, 2013), además de poder estudiar su dinámica a detalle. (Kukol, 2009).

Recientemente Maciejewska *et al.* (2017), realizaron un estudio de caracterización exhaustivo de la endolisina AP3gp15 codificada por el fago AP3 (infecta a *B. cenocepacia*), fue clasificada en la familia DUF3380 por búsqueda de homologías mediante el programa bioinformático BLAST. El análisis la ubicó como una endolisina modular, con 73 homólogos significativos conocidos. Compuesta por un dominio de unión a la pared celular (DUC) en el extremo N-terminal y un dominio catalíticamente activo (DCA) en el extremo C-terminal. Dominios que, al ser comparados por separado, tienen cada uno 2428 y 233 homólogos respectivamente.

Los mismos autores realizaron la predicción del mecanismo catalítico basándola en la búsqueda de los aminoácidos Glutámico y Aspártico; dos residuos que están presentes en los sitios catalíticos de la mayoría de las lisozimas. Para AP3gp15 identificaron al aminoácido Glutámico 101 en el centro catalítico, sin embargo, no identificaron ningún equivalente de Aspártico como segundo residuo catalítico. El reconocimiento del sustrato está dado por residuos localizados en hélices $\alpha 5$, $\alpha 10$, $\alpha 12$, $\alpha 14$ y una región de loop o de unión (Ser102- Val114).

Además, mediante mutagénesis dirigida sustituyeron al aminoácido Glu101 por Alanina (Glu101Ala), para confirmar que efectivamente se trata de un residuo fundamental en la catálisis de AP3gp15. Posteriormente, probaron la actividad de la enzima mutante sobre células permeabilizadas de *P. aeruginosa* PAO1 y esta disminuyó de 14710 U/mg para la versión silvestre a 90 U/mg para la proteína mutante, reduciéndose la actividad lítica en un 99.4%.

Finalmente, reportaron que la actividad muralítica de esta enzima fue dos veces más activa que la lisozima comercial, esto contra cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* y *S. enterica* serovar *Typhimurium*.

Trabajos anteriores como el de Walmagh & Boczkowska (2013), determinaron que las endolisinas OBPgp279 proveniente del fago OBP de *P. fluorescens*, la endolisina PVPSE1gp146 del fago PVP-SE1 de *S. entérica* serovar Enteritiditis y la endolisina 201Q2-1gp229 del fago 201Q2-1 de *P. chlororaphis*, poseen estructuras modulares con dominios de unión a la pared celular en el extremo N-terminal y un dominio catalítico en el C-terminal. Estas endolisinas, presentaron alta actividad muralítica contra el peptidoglucano de diferentes bacterias Gram-negativas. Por otro lado, la endolisina PVP-SE1gp146 fue termorresistente hasta temperaturas de 90° C, por lo que se consideró como candidato potencial antibacteriano para la conservación de alimentos. Mientras que la endolisina OBPgp279 ejerció una actividad antibacteriana de una unidad de reducción logarítmica únicamente hasta que se permeabilizó la membrana externa de las especies de *Pseudomonas*.

Briers *et al.* (2007) por otro lado, predijeron la estructura y los residuos catalíticos de las endolisinas KZ144 del bacteriófago fKZ de *P. aeruginosa* y EL188 de fago EL, las cuales son activas contra diferentes especies de bacterias Gram-negativas con membranas permeabilizadas. Determinaron que ambas poseen una estructura modular con un dominio de unión al sustrato en el extremo N-terminal y un módulo catalítico en el C-terminal. A través del análisis de mutagénesis sitio dirigida, se estableció que los aminoácidos E115 y E155 son los residuos catalíticos en las endolisinas KZ144 y EL188 respectivamente.

3.3 Endolisinas quiméricas.

Recientemente, se ha aplicado el conocimiento del mecanismo de acción de las endolisinas para diseñar nuevas proteínas con actividad mejorada contra bacterias Gram-negativas.

Briers *et al.* (2014a y 2014b) son pioneros en esta tecnología, al combinar un péptido catiónico antimicrobiano de 29 aminoácidos (SMAP-29) con la endolisina

KZ144. De esta forma, obtuvieron un potente y mejorado antibacteriano que mata aproximadamente 4 órdenes de magnitud a *P. aeruginosa* en minutos y sin desarrollo de resistencia.

Este mismo grupo, posteriormente desarrolló y optimizó un método para diseñar endolisinas con actividad bacteriolítica potencializada contra bacterias Gram-negativas a las que denominaron “Artilisinas”, término atribuido a la modificación de endolisinas con péptidos desestabilizadores de lipopolisacáridos. Los autores seleccionaron siete péptidos con propiedades fisicoquímicas variables (policatiónicos, hidrófobos y anfipáticos) que interfirieran las fuerzas estabilizadoras de los lipopolisacáridos. Los policatiónicos por competir con los iones divalentes estabilizadores de la capa de lipopolisacáridos, mientras que los hidrófobos por el aumento en la hidrofobicidad superficial y la posible interferencia en el empaquetamiento hidrófobo del resto del lípido A, y finalmente los anfipáticos por combinar sus propiedades policatiónicas e hidrófobas para adoptar una conformación helicoidal con carga positiva de un lado y aminoácidos hidrofóbicos en el sentido opuesto.

Las construcciones las realizaron combinando con los péptidos anteriores siete diferentes endolisinas con actividad antimicrobiana demostrada. Evaluaron la actividad al modificar la ubicación del péptido y la adición de enlazadores tanto en el dominio N-terminal como en el C-terminal de las endolisinas (Briers *et al.*, 2014).

La construcción que obtuvo la mayor actividad fue la combinación en el dominio N-terminal de un nanopéptido policatiónico (PCNP, por sus siglas en inglés) con la endolisina modular OBPgp279. Ésta logró una reducción logarítmica en una orden de magnitud de 4 a 5 en 30 minutos contra las cepas: *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Además, demostraron que la presencia del enlazador que aumenta la separación entre el PCNP y la endolisina, brinda flexibilidad a la proteína y mejora la actividad de las endolisinas.

3.4 Endolisinas en la industria acuícola

La industria acuícola en el presente, busca ser sostenible y por ello las alternativas para el control de bacterias como *V. parahaemolyticus* deben ser más dirigidas hacia el patógeno. Esto ha dado pauta a que en la industria se evalúe el uso de otros compuestos como lo son las endolisinas, debido a sus características particulares. Por ello se han aislado fagos, para obtener las secuencias completas de sus genomas con la finalidad de encontrar marcos de lectura abiertos que codifiquen proteínas tipo endolisinas. Ejemplo de lo anterior, es el trabajo de Ramírez-Orozco (2013) quien estudió el genoma del fago VPMS1 (42.3 Kb) encontrando que tiene un tamaño de 42.3 Kb constituido por 53 genes codificantes, entre los cuales se encontraba el gen MS50 perteneciente a una proteína tipo lisozima, la cual posteriormente fue nombrada como LysVPMS1. Por otro lado, (Hu *et al.*, 2016), estudiaron el genoma (134.742 Kb) del fago qdvp001 que lisa a *V. parahaemolyticus*. En este se encontraron varias proteínas funcionales putativas con un gen de endolisina putativo (ORF 60).

Estudios realizados a partir del fago VPMS1, muestran el efecto bactericida de sus lisados crudos, en conjunto con aceite esencial de orégano como permeabilizador de membrana orgánico, contra diferentes cepas de *Vibrio*, logrando reducir más del 50% la cuenta de células viables de estas bacterias (Zermeño-Cervantes, 2012).

Actualmente se conoce el efecto lítico de la endolisina LysVPMS1 sobre células sensibilizadas con EDTA de diferentes cepas de *V. parahaemolyticus* como son ATCC-17802, AHPND (M8, M9, CVP2, M22, M30, M37, G1b, G2, G3, G8, V2, V4, V5, V8, V9, V16, V18) y otras especies del género *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. harveyi* y *V. campbelli*). El efecto lítico para la mayoría de las cepas de este estudio fue >40% con respecto a la cepa control (VP_{ATCC-17802}). La importancia de este reporte radica en que es el primero enfocado a cepas asociadas a AHPND, proponiendo además el uso de esta endolisina como estrategia de control bacteriana en la industria acuícola (Zermeño-Cervantes, 2012).

4. PLANTEAMIENTO

La resistencia de los patógenos hacia los antibióticos, es consecuencia del uso indiscriminado de los mismos, convirtiéndose en una amenaza tanto para la salud pública (Mao *et al.*, 2013), la industria de alimentos y el ambiente (Paredes & Roca, 2004). Lo anterior, debido a que pueden permanecer en el ambiente y acumularse en los tejidos de los organismos que se cultivan, afectando a los productores y consumidores. En los últimos años se ha demostrado que las endolisinas son una alternativa a esta problemática, y aunque su actividad mediante aplicación exógena es limitada en bacterias Gram-negativas, se ha demostrado que la membrana de estas bacterias puede desestabilizarse mediante el uso de permeabilizadores orgánicos que permiten el acceso de estas enzimas a la capa de peptidoglucano. Por otro lado, se ha comprobado que el diseño de proteínas quiméricas a partir de endolisinas en conjunto con la actividad de péptidos catiónicos mejora la actividad exógena de esta enzima sobre bacterias Gram-negativas. Por lo anterior se propone realizar el diseño racional de una endolisina quimérica a partir de la endolisina LysVPMS1 del bacteriófago VPMS1, para mejorar su actividad contra la bacteria Gram-negativa *V. parahaemolyticus*.

5. HIPÓTESIS

A través de la predicción estructural y el modelaje de proteínas es posible realizar el diseño racional de una endolisina quimérica, a partir de la endolisina LysVPMS1 que posea actividad contra *Vibrio parahaemolyticus*.

6. OBJETIVOS

General

- Obtener una endolisina quimérica con actividad contra *Vibrio parahaemolyticus*.

Específicos

- Modelado *in silico* de la estructura tridimensional de la endolisina LysVPMS1.
- Diseñar una endolisina quimérica a partir de la endolisina LysVPMS1 y modelar su estructura tridimensional *in silico*. Obtener la enzima recombinante.
- Comprobar la actividad lítica de la endolisina quimérica contra *V. parahaemolyticus*.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Predicción de estructuras y diseño de la proteína quimérica

Para este estudio se eligió la endolisina LysVPMS1, a partir de su secuencia, se realizó una búsqueda de homologías usando la herramienta básica de búsqueda de alineamiento local (Basic Local Alignment Search Tool por sus siglas en inglés) BLAST_n, BLAST_p y PDB. La predicción de la estructura se realizó *in silico* mediante el análisis de los modelos 3D *ab initio*, los cuales fueron realizados utilizando el algoritmo informático para plegamiento de proteínas Quark y analizados mediante acoplamiento molecular con el software Chimera 1.11.2. Se realizaron dos análisis de acoplamiento:

El primero, modelando un monómero de pared bacteriana compuesto por N-acetil-glucosamina y N-acetil-galactosamina. Se aceptaron las opciones estándar del programa y consideraron los mínimos de energía. Los criterios de análisis establecidos se basaron en los característicos de la lisozima del bacteriófago T4. Siendo éstos la presencia de los aminoácidos glutámico y aspártico, así como la distancia interatómica de los oxígenos (2-4 Å), los puentes de hidrógeno y posibles sitios catalíticos expuestos sobre la superficie de la proteína.

El segundo análisis se hizo modelando un fragmento de la pared celular de una bacteria Gram-negativa utilizando el editor y visualizador de moléculas Avogadro. La estructura generada se utilizó para el análisis de acoplamiento molecular. El cual fue realizado mediante el programa AutoDock The Scripps Research Institute y visualizado en el Chimera 1.12. Se utilizaron los mismos criterios de análisis que en el primer modelado.

Para el diseño de la proteína quimérica se seleccionó mediante revisión bibliográfica al péptido PCNP (nanopéptido policatiónico), del cual se obtuvo su secuencia de nucleótidos mediante traducción reversa usando la utilería bioinformática en: http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html. Posteriormente a través de análisis *in silico*, se realizó el diseño de la construcción de la proteína quimérica, tomando como base la secuencia de aminoácidos de la endolisina LysVPMS1 y fusionando en el dominio N-terminal la secuencia de nucleótidos del PCNP. Así mismo,

en los extremos se insertaron los correspondientes sitios de restricción de BamHI y NdeI. A esta construcción se le denominó LysVPMS1-PCNP. Con el diseño de la proteína quimérica se realizó el análisis de acoplamiento molecular *in silico*.

7.2 Producción recombinante de la proteína LysVPMS1-PCNP

En la **Fig. 7** se resume la obtención vía recombinante de la proteína quimérica. En donde primero se realizó una serie de amplificaciones para obtener múltiples copias del gen de acuerdo a las necesidades de cada paso en la metodología. Se realizaron ligaciones tanto en un vector de clonación y posteriormente en uno de expresión, con las construcciones obtenidas se transformaron células competentes, se realizaron las confirmaciones de clonas positivas de ambas ligaciones, siendo para ello necesaria la extracción de ADN plasmídico, para a partir de éste realizar PCR de colonias y doble restricción para verificar la liberación del inserto. Finalmente, la proteína fue expresada y cuantificada para probar su actividad.

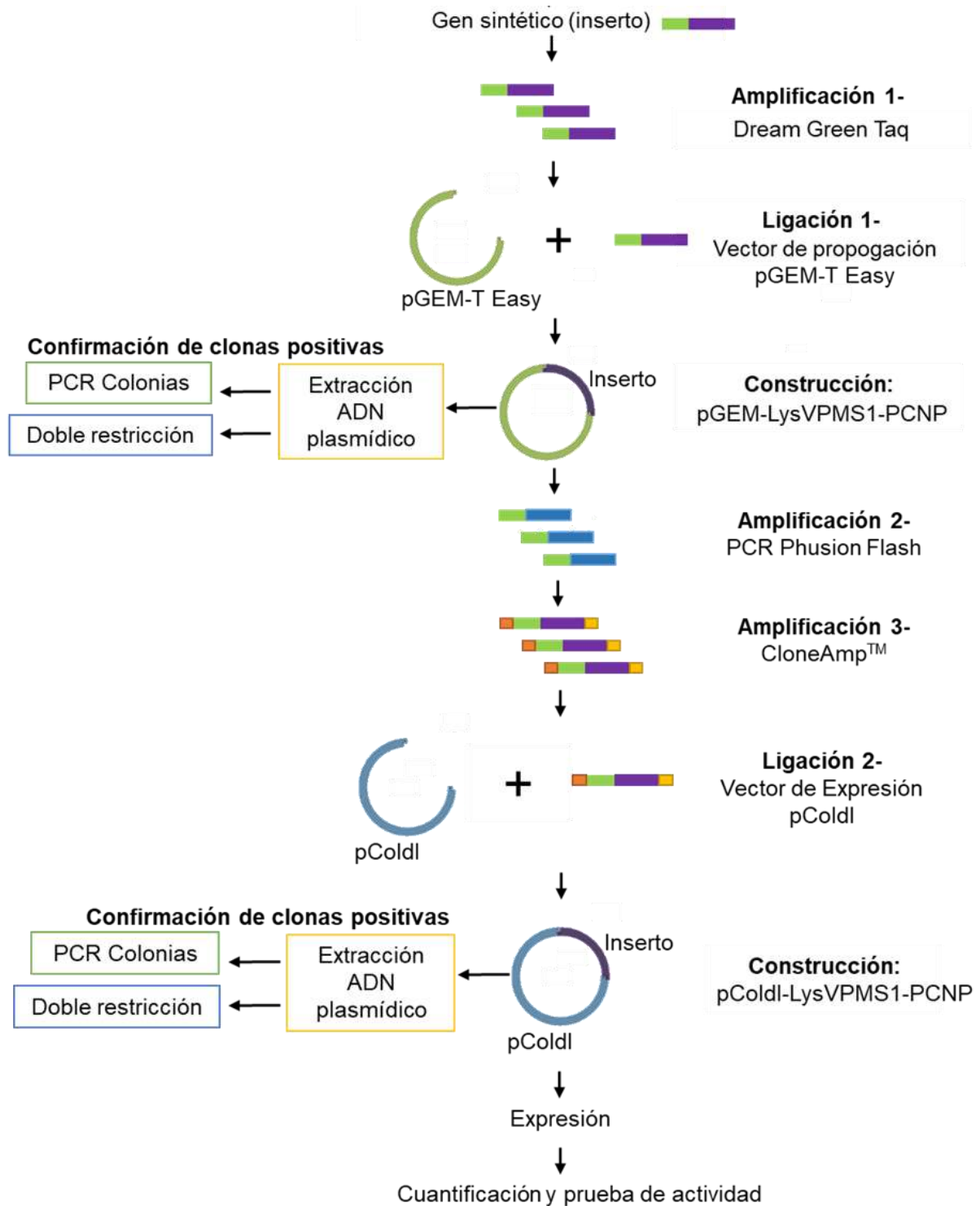


Figura 7. Descripción gráfica de la metodología seguida para la producción recombinante de la proteína LysVPMS1-PCNP

7.2.1 Amplificación del gen

El gen codificante (inserto) de la proteína quimérica LysVPMS1-PCNP, fue sintetizado mediante servicio externo por la empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Se realizó el diseño del oligonucleótido con sentido, el cual fue denominado MS50_PCNP_Fw.

5'-GGTCGGAATTCCATATGAAACGCAAGAAACG-3'

Mientras que el oligonucleótido anti-sentido (denominado MS50_Rv), corresponde a la siguiente secuencia:

3'-GGTTGGGGATCCCTAGCTTTCATTACCAATAAACTC-5'

La amplificación del gen (**Fig.7 Amplificación 1**) se realizó utilizando Dream Taq Green PCR Master Mix (Thermo Scientific), el cual además añade una secuencia de poli A, necesarios para la posterior clonación. Se usó la mezcla de reacción y el programa de PCR que se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Mezcla de reacción y programa para la amplificación del gen LysVPMS1-PCNP

Componente de reacción	Concentración Final	Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
DreamTaq Green PCR Master Mix	1X	Desnaturalización inicial	95° C	2 min	1
Oligo Sentido	1 µM	Desnaturalización	95° C	30 s	
Oligo Anti-sentido	1 µM	Alineamiento y Extensión	72° C	1 min	29
Templado	100 ng				
Agua libre de nucleasas	Llevar a 25 µL	Extensión final	72° C	7 min	1

7.2.2 Clonación del gen en el vector PGEM-Teasy

Para asegurar la propagación del gen se insertó en el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) mediante una reacción de ligación (**Fig. 7 Ligación 1**) como se describe en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Mezcla de reacción para la ligación del gen LysVPMS1-PCNP con pGEM-TEasy

Componente de reacción	Reacción para LysVPMS1-PCNP
Regulador de ligación rápida	1X
pGEM®-T Easy Vector	50 ng
Producto de PCR	6.14 ng
T4 DNA Ligasa	1 µL
Agua libre de nucleasas	1 µL

La reacción se colocó en incubación durante 16 horas a 4° C y se inactivó a 65° C durante 10 minutos.

Posteriormente, con el producto de ligación se transformaron células competentes DH5α las cuales fueron inoculadas en placas de medio Luria Bertani (LB) suplementadas con ampicilina (100 µg/mL). Se realizó una PCR de colonias para confirmar que las clonas tuvieran el inserto de interés, amplificando el gen con Green PCR Master Mix (**Tabla 1**). Esperando obtener un fragmento de 617 pb.

La amplificación fue visualizada en un gel de agarosa al 1% en TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) y teñido con el fluorocromo GelRed. Finalmente, las clonas positivas fueron sembradas en placas de LB con ampicilina (100 µg/mL). Se cosechó la biomasa y se realizó la extracción del ADN plasmídico por el método de CTAB.

7.2.3 Subclonación del gen LysVPMS1-PCNP en vector de expresión pColdI

7.2.3.1 Reamplificación del gen LysVPMS1-PCNP

A partir de la construcción pGEM-Teasy+LysVPMS1-PCNP se realizó una nueva amplificación del gen (**Fig. 7 Amplificación 2**) para recuperar el inserto utilizando la mezcla y el programa de la PCR Phusion Flash (**Tabla 3**).

Tabla 3. Mezcla de reacción y programa para amplificación del gen mediante mezcla de la PCR Phusion Flash

Componente de reacción	Concentración Final	Paso	Temp.	Tiempo	Ciclos
Agua libre de nucleasas	7 μ L	Desnaturalización inicial	98° C	10 s	1
Phusion Flash	2X	Desnaturalización	98° C	1 s	35
Oligonucleótido sentido	1 μ M	Gradiente	55.5° C	5 s	
Oligonucleótido anti-sentido	1 μ M	Extensión	72° C	10 s	
Templado	100 ng	Extensión final	72° C	1 min	1

7.2.3.2 Purificación del inserto

Se realizó un gel preparativo de agarosa al 1% con TBE y se extrajo el ADN del gel usando el kit de Zymoclean Gel DNA Recovery (ZymoResearch) siguiendo el protocolo del fabricante en:

https://www.zymoresearch.com/media/amasty/amfile/attach/_D4001T_D4001_D4002_D4007_D4008_Zymoclean_Gel_DNA_Recovery_Kit_ver_1_2_1_LKN-SW_.pdf

7.2.4 Obtención del vector de expresión

Se usó como vector de expresión el vector pColdI (Takara), para lo cual se sembró la cepa DH5 α pCold-MS50 en placas de LB con ampicilina (100 μ g/mL). Se cosecharon después de 12 horas de incubación a 37° C y se extrajo el ADN plasmídico por el método de CTAB.

Para linearizar el vector de expresión se realizó la digestión utilizando las enzimas de restricción NdeI y BamHI (**Tabla 4**):

Tabla 4. Reacción de restricción para obtención de pColdI

Componente de reacción	
ADN (pCold)	37.1 ng/μL (2 μL)
Enzima NdeI	1 μL
Enzima BamHI	1 μL
Buffer 3.1	1X

La reacción se colocó en incubación a 37° C toda la noche y se inactivó a 65° C por 20 minutos. El resultado fue visualizado en un gel de agarosa al 1%.

Se realizó la purificación mediante extracción de ADN de gel como se especificó en la sección **7.2.3.2**

7.2.5 Ligación del inserto LysVPMS1-PCNP en el vector de expresión pColdI

La ligación del inserto LysVPMS1-PCNP con el vector de expresión pColdI fue realizada usando el Kit de clonación In-Fusion® HD Ecodry™.

1. Se obtuvo el vector de expresión pColdI tal como se describe en la Sección **7.2.4**
2. Se diseñaron los oligonucleótidos sobrelapantes con 15 pb del gen de interés y 15 pb complementarios a los extremos del vector pCold linearizado. A continuación, se muestran las secuencias específicas:

InF_pC+PCNFw (extremo NdeI):

5'-CTAGAAGGTAGGCATATGAAACGCAAGAAA-3'

InF_pC+PCNRv (extremo BamHI):

5'-CTTGAATTCGGATCCCTAGCTTTCATTACC-3'

3. A partir del inserto LysVPMS1-PCNP purificado en la sección **7.2.3.2**, se realizó una amplificación con la polimerasa CloneAmp™ DNA para añadir los extremos del vector de expresión pCold (**Fig.7 Amplificación 3**).

La mezcla de reacción (Clone Amp™ HIFI PCR Premix) fue preparada a temperatura ambiente adicionando los componentes y usando el protocolo de amplificación de reacciones de 3 pasos como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Componentes del Master Mix y protocolo de amplificación de 3 pasos para CloneAmp™ DNA HIFI PCR

Componente de reacción	Concentración	Paso	Temp	Tiempo	Ciclos
CloneAmp HIFI PCR Premix	1X	Desnaturalización inicial	98° C	10 s	1
Oligo sentido	1 µM	Desnaturalización	98° C	5 s	
Oligo Anti-sentido	1 µM	Alineamiento	68° C	5 s	35
Templado	43.2 ng/µL	Extensión	72° C	10 s	
Agua libre de nucleasas	Llevar a 25 µL	Extensión final	72° C	5 min	1

Se verificó la integridad del producto de PCR mediante un gel de agarosa al 1%.

4. Se purificó el producto de PCR con el kit de purificación GeneJET PCR (Thermo Scientific) utilizando el protocolo del fabricante en: http://2017.igem.org/wiki/images/8/81/T--Chalmers-Gothenburg--Thermo_Scientific_GeneJET_PCR_Purification_Kit.pdf
5. La clonación (**Fig. 7 Ligación 2**) se realizó usando la proporción 2:1 Inserto-Vector, los componentes se mezclaron y en seguida se agregaron a las perlas In-Fusion HD Eco Dry hasta mezclar homogéneamente por pipeteo (**Tabla 6**).

Tabla 6. Mezcla de reacción para clonación recomendada con In-Fusion

Componente de Reacción	Concentración	Volumen (2:1)
Fragmento de PCR purificado	56.5 ng/ μ L	3 μ L
Vector linearizado	37.1 ng/ μ L	2 μ L
Agua libre de nucleasas	Llevar a 10 μ L	5 μ L

6. La reacción se incubó por 15 minutos a 37° C, posteriormente a 50° C por 15 minutos para su inactivación.
7. Se transformaron células competentes DH5 α con 2.5 μ L de la reacción del paso 6 y como control positivo se utilizaron 50 ng (1 μ L) del vector pUC19.
 - a) Las células competentes se mantuvieron en hielo durante todo el proceso., Se colocaron 50 μ L de células en tubos Falcon de 15 mL y se agregaron 2.5 μ L de la ligación y del vector control.
 - b) La mezcla de células y la ligación se mantuvo en hielo por 30 minutos.
 - c) Se realizó shock térmico a 42° C por 45 segundos.
 - d) Los tubos se colocaron nuevamente en hielo por 2 minutos.
 - e) Se agregaron 200 μ L de medio LB a temperatura ambiente.
 - f) Las células se incubaron durante 1 hora en agitación a 150 rpm y 37° C.
 - g) Cada reacción de transformación se colocó en microtubos de 1.5 mL. Se centrifugaron a 6,000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregaron 100 μ L de medio fresco respectivamente. Cada muestra fue sembrada en placas de LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C durante 14 horas.
 - h) La verificación de las clonas positivas se realizó por PCR de colonias. Para dicha confirmación se usó una PCR estándar con el Master Mix Dream Taq Green (**Tabla 1**).

7.2.6 Prueba de verificación por doble restricción

Para verificar la correcta ligación del inserto con el vector de ligación, se realizaron cortes con enzimas de restricción correspondientes a los sitios de restricción del inserto (NdeI y BamHI). Una ligación positiva es confirmada cuando el inserto es liberado por la acción de las enzimas. Para ello se realizó el inóculo de tubos con medio LB (5 mL) y ampicilina (100 µg/mL) con las clonas que resulten positivas de la verificación por PCR de colonias.

Obtenido el cultivo se realizó la extracción del ADN plasmídico por el método de CTAB, se cuantificó la concentración obtenida y se hizo la mezcla de reacción, utilizando para la reacción 1 (Rx 1) las enzimas NdeI y BamHI, mientras que para las reacciones 2 y 3 (Rx 2 y Rx 3) sólo BamHI y NdeI respectivamente (**Tabla 7**). Todo bajo las condiciones de incubación e inactivación de la sección **7.2.4**.

Tabla 7. Componentes de reacción para doble restricción con NdeI y BamHI.

Componente de reacción	Rx 1	Rx 2	Rx 3
ADN (pCold-LysVPMS1+PCNP)	1000 ng/µL	1000 ng/µL	1000 ng/µL
Enzima NdeI	1 µL	1 µL	-
Enzima BamHI	1 µL	-	1 µL
Buffer 3.1	1X	1X	1X
Agua libre de nucleasas	a 10 µL	a 10 µL	a 10 µL

7.2.7 Expresión de la proteína LysVPMS1-PCNP

Células competentes Rosetta 2 fueron transformadas usando 1000 ng del producto de la ligación del vector de expresión pCold con el inserto LysVPMS1-PCNP, las células transformadas fueron sembradas en placas de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL). Las colonias que crecieron fueron inoculadas en 5 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) y se incubaron con agitación a 37° C.

Prueba de inducción:

Del cultivo anterior se tomaron 100 μL y se inocularon 5 mL de LB con ampicilina y cloranfenicol. Se incubó en agitación a 37° C hasta tener una densidad óptica (DO) de 0.8. El inóculo se dividió en 2 (tubo 1- inducido y tubo 2- no inducido) colocando 2.5 mL del cultivo en cada tubo. Se añadieron 0.25 mM del inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a uno de los tubos (tubo 1-) para inducir la expresión de la proteína y se incubó en agitación a 16° C por 16 horas. El tubo 2 (no inducido), fue puesto bajo las mismas condiciones. Se tomaron 500 μL de cada tubo (1 y 2) y se centrifugaron. Se desechó el sobrenadante y se agregó 200 μL de buffer de carga 2X. Las muestras se calentaron a 95° C durante 5 min. Finalmente, la inducción fue visualizada en un gel de SDS-PAGE al 10%.

7.2.8 Purificación por afinidad a níquel de la proteína LysVPMS1-PCNP

Se preparó un preinóculo sembrando 100 μL de células transformadas en 50 mL de medio LB suplementado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y 34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloranfenicol e incubado con agitación a 37° C. Posteriormente el preinóculo fue agregado a 450 mL de caldo LB con los mismos antibióticos y se incubó durante 8 horas con agitación y aireación a 37° C. Se añadieron 0.25 mM de inductor IPTG y se incubó en agitación con aireación a 16° C durante 16 horas.

Se cosecharon las células por centrifugación a 3,200 rpm hasta observar un botón compacto. Se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 10 mL de solución amortiguadora PB (20 mM NaH_2PO_4 , 0.1 M NaCl a pH 7.4). Las células fueron lisadas por ultracongelación a -78°C durante 30 minutos y posteriormente descongelado (*bis*). Se añadieron 0.6 g (concentración final de 10 mM) de NaCl, 15 mL de NaH_2PO_4 20 mM a pH 7.4 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1mM (PMSF).

Las células fueron sonicadas y el sobrenadante fue centrifugado a 3,200 rpm por 20 minutos. Posteriormente fue pasado por filtros de 0.45 μm e inyectado a través de una columna de afinidad a níquel (His Trap™ HP; 1 mL; GE Healthcare, LittleChalfont, UK). En seguida se realizó un lavado con PB 20 mM e Imidazol a 20 mM y 40 mM. Finalmente, la muestra fue eluida con 500 mM de Imidazol y dializada contra el regulador de almacenamiento PB (20 mM NaH_2PO_4 , 0.1 M NaCl a pH 7.4). Se tomaron muestras de 50 μL en cada paso del proceso de purificación: botón (no soluble), lisado

crudo filtrado, lisado crudo que pasó a través de la columna, primer lavado con PB, segundo lavado con imidazol 20 mM, tercer lavado con 40 mM y elución con 500 mM de imidazol. Finalmente, las eluciones fueron visualizadas en un gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomasie R-250.

7.2.9 Cuantificación de proteína

La cuantificación de la proteína quimérica obtenida de la purificación fue realizada a partir de una curva de calibración usando diluciones de albúmina que fueron de 1 a 5 µg/mL. Las diluciones fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12% y se dejó correr la electroforesis. Finalmente, el gel fue analizado para determinar las concentraciones mediante densitometría usando el programa computacional Image Lab™ 6.0.

7.2.10 Prueba de actividad muralítica relativa de LysVPMS1-PCNP

La proteína LysVPMS1 para hacer las comparaciones de la actividad con la de la quimera fue obtenida vía recombinante, purificada por cromatografía con afinidad a Níquel y cuantificada por densitometría (Sección 7.2.9) por Zermeño-Cervantes.

La actividad muralítica relativa se midió y cuantificó por triplicado usando para el tratamiento 1: 40 µg/mL de la proteína LysVPMS1, el tratamiento 2: 40 µg/mL de la proteína quimérica LysVPMS1-PCNP, y como control negativo 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.4 cada uno en 30 µL de solución amortiguadora PB. A estas se le añadieron 3 µL de 1 mM de CaCl₂ y 270 µL de células permeabilizadas ajustadas a una DO₆₀₀ de 1.0 en regulador universal pH 6.0. La disminución de la densidad óptica se monitoreó en un lector de microplacas Infinite M1000 PRO (Tecan, Männedorf) durante 30 minutos con lecturas cada 30 s y 10 s de agitación previa. La actividad muralítica se cuantificó en células permeabilizadas previamente tratadas con EDTA para exponer el sustrato de la pared celular y se calculó con relación a la actividad en la cepa de *Vibrio parahaemolyticus* VP_{ATCC-17802} (100%).

La actividad de cada una de las proteínas fue calculada de acuerdo a las pendientes de cada cinética por tratamiento, mediante el método de maximización de R² propuesto por Briers *et al.*, (2006). En el cual se calculan las R² y el conjunto de datos con el valor

máximo de R^2 es el que corresponde al conjunto de datos más confiable para determinar la actividad de la muestra, y a partir de la pendiente correspondiente a la regresión lineal se calcula la actividad de la muestra expresándose como una caída en la densidad óptica (DO) a 600 nm/min. A los datos de cada cinética se le restó la caída de los controles para obtener la actividad neta de cada una de las proteínas. Y finalmente el porcentaje de actividad fue calculado a partir del máximo valor de actividad obtenido (100%).

8. RESULTADOS

8.1 Predicción de la estructura de la endolisina LysVPMS1 y análisis de acoplamiento molecular con monómero de pared.

La predicción estructural de la endolisina, a través de homología con estructuras depositadas en bases de datos, no fue exitosa. Por ello, se realizó el modelado *ab initio* de la endolisina LysVPMS1 utilizando el software Quark el cual arrojó 10 modelos de la posible estructura terciaria de la proteína (**Fig. 8**).

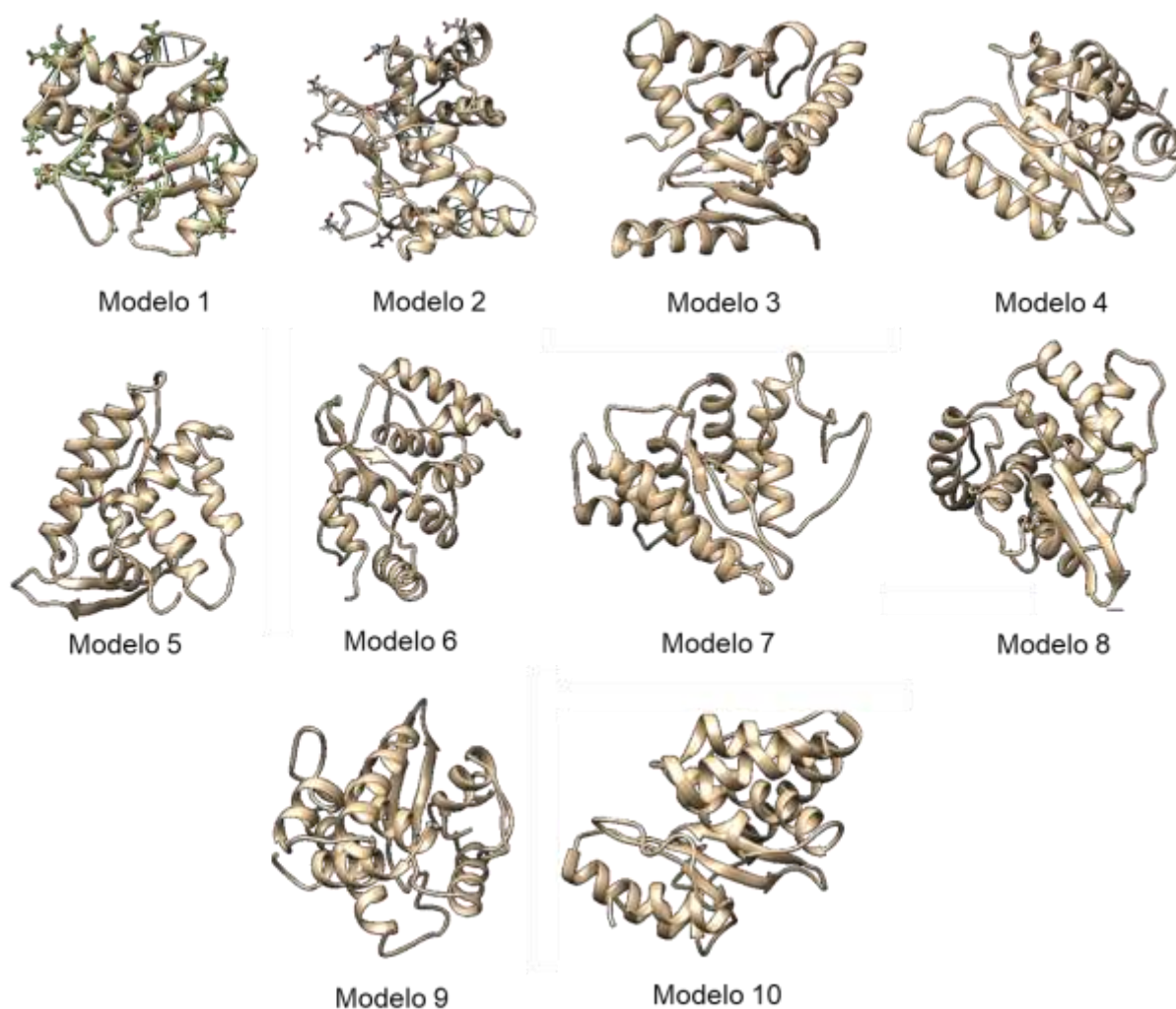


Figura 8. Modelos de la estructura terciaria de la endolisina LysVPMS1 obtenidos mediante el software Quark.

Al ser analizados los modelos *in silico* de acuerdo a los criterios establecidos en la metodología, el modelo 1 (**Fig. 9a**) presentó un sitio catalítico de relevancia el cual establece la reacción de acoplamiento con el monómero de pared, con un mínimo de energía de -5.3 kcal/mol. Éste se encuentra expuesto sobre la superficie de la proteína y ubicado entre los aminoácidos Glutámico 135 y Glutámico 83. En la conformación de la estructura terciaria (**Fig. 9b**), se marcó la Metionina inicial del dominio N-terminal y se determinó que en este modelo el dominio en donde se fusionó el péptido, se encuentra también expuesto.

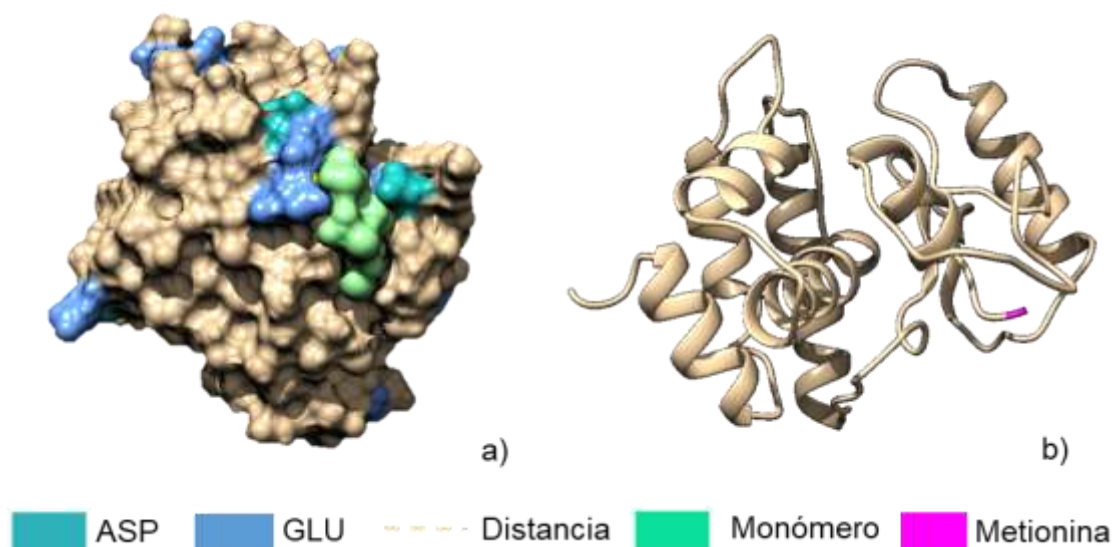
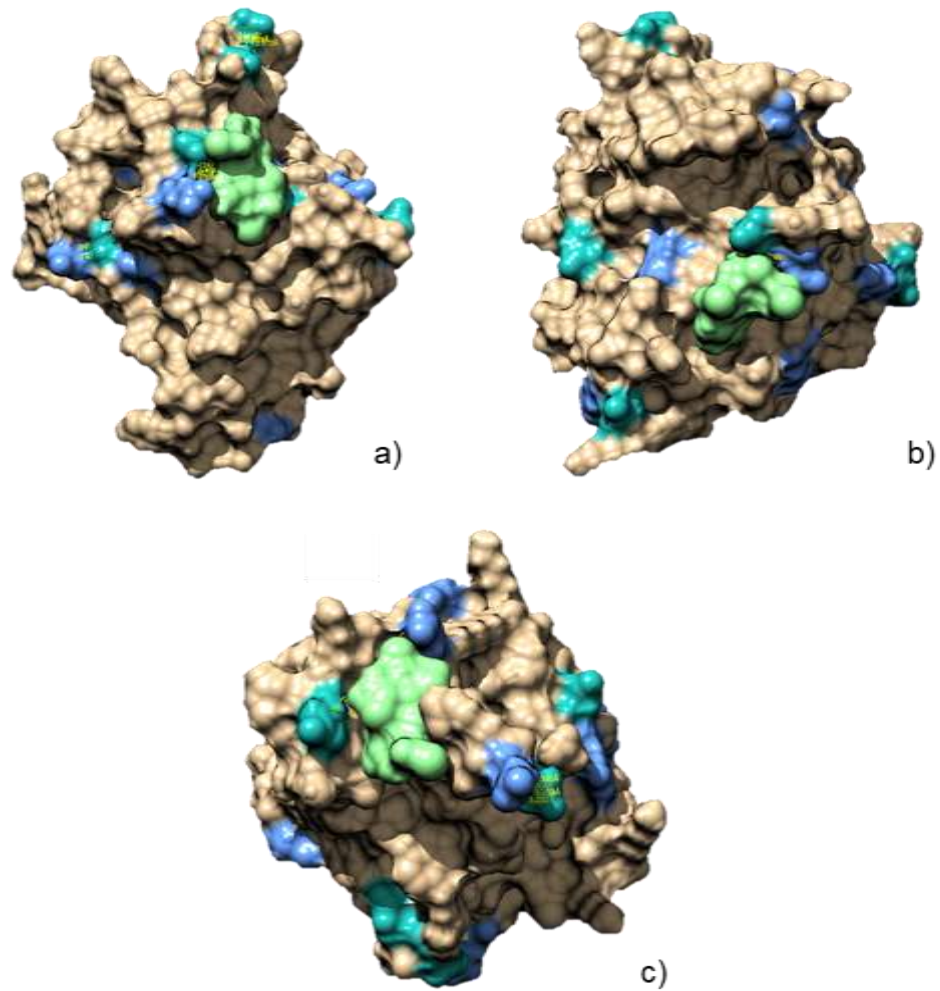


Figura 9. a) Acoplamiento molecular del modelo 1 *ab initio* y b) Estructura terciaria de la endolisina LysVPMS1.

Los modelos de acoplamiento 3, 8 y 9 de la endolisina (**Fig. 10**) presentaron alguno de los criterios establecidos. Específicamente se observó que en el modelo 3, se encuentra un sitio catalítico con un mínimo de energía de -5.6 kcal/mol, entre los aminoácidos Aspártico 95 y Glutámico 91. Mientras que en el modelo 8 el sitio se encuentra entre los aminoácidos Glutámicos 135 y Aspártico 134 con -5.7 kcal/mol de mínimo de energía. El modelo 9 presentó el mismo mínimo de energía en su reacción de acoplamiento, el cual se encontró entre los aminoácidos Aspártico 33 y Glutámico 68.



■ ASP
 ■ GLU
 - - - Distancia
 ■ Monómero

Figura 10. Superficie y sitios catalíticos de la endolisina LysVPMS1. a) Modelo 3, b) Modelo 8 y c) Modelo 9.

8.2 Análisis de acoplamiento molecular con fragmento de pared celular Gram-negativo de la endolisina LysVPMS1.

Debido a que no se encontró ninguna estructura química disponible de un fragmento de la pared celular de bacterias Gram-negativas, se construyó una a partir de la conformación general de la pared celular de algunas bacterias Gram-negativas (Fig. 11).

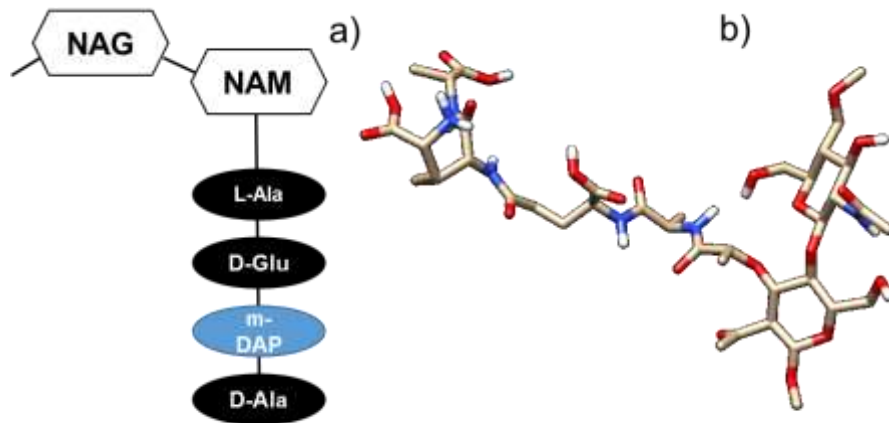


Figura 11. Estructura general (a) y construcción (b) de un fragmento de la pared celular de una bacteria Gram-negativa.

La estructura generada fue utilizada para el análisis de acoplamiento molecular con la endolisina LysVPMS1. Se examinaron los mejores modelos obtenidos en el análisis de acoplamiento de acuerdo a los criterios de análisis, siendo el modelo 1 el que mejor se acopla.

Del análisis de acoplamiento el modelo 1 de la endolisina LysVPMS1, muestra de forma estándar los 9 mejores acoplamientos. En donde 3 de estos acoplamientos (**Figs. 12 a, b y c**) se encuentran en el mismo sitio catalítico, el cual se encuentra formando un “complejo” debido a que presentan los mismos aminoácidos en el sitio GLU91, GLU121 y GLU142. El mejor acoplamiento es el que se muestra en la figura 11 a) el cual arroja un mínimo de energía de -4.7 kcal/mol, observándose además que una mayor superficie del fragmento de pared interacciona con el sitio catalítico.

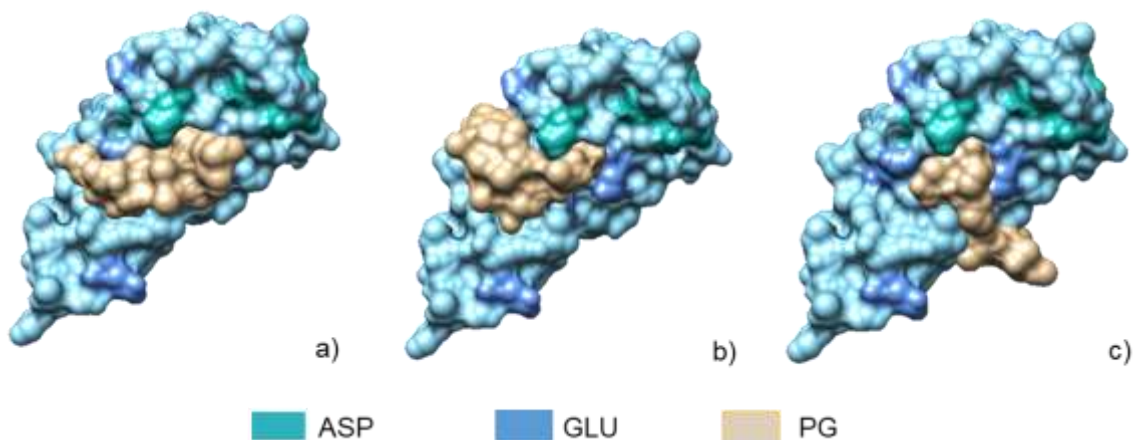


Figura 12. Mejores acoplamientos del modelo 1 de la endolisina silvestre LysVPMS1

Los siguientes dos acoplamientos de importancia se dieron en donde se encontraban los aminoácidos Glutámico 135 y Aspártico 108 (**Figs. 13 a y b**) con mínimos de energía iguales en las dos interacciones (-4.3 kcal/mol).

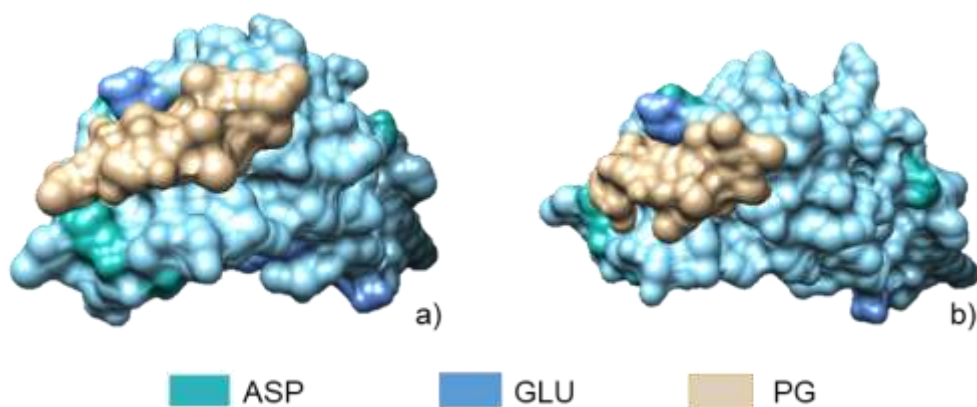


Figura 13. Segundo (a) y tercer (b) acoplamiento molecular de la endolisina LysVPMS1.

8.3 Predicción de la estructura de LysVPMS1-PCNP y análisis de acoplamiento molecular con monómero de pared.

Al igual que en la predicción estructural de la endolisina silvestre, se obtuvieron 10 modelos *ab initio* para la proteína quimérica LysVPMS1-PCNP (**Fig. 14**). En el modelo 1 (**Fig. 15a**), la reacción de acoplamiento arrojó un mínimo de energía -5.7 kcal/mol y el sitio catalítico se encontró entre los aminoácidos Glutámico 144 y Glutámico 190. Al igual que en el anterior, el modelo 2 (**Fig. 14c**) presentó en su sitio

catalítico el aminoácido Glutámico 144. Sin embargo, se encontró con el aminoácido Aspártico 143 y un acoplamiento con un mínimo de energía de -6.0 kcal/mol.

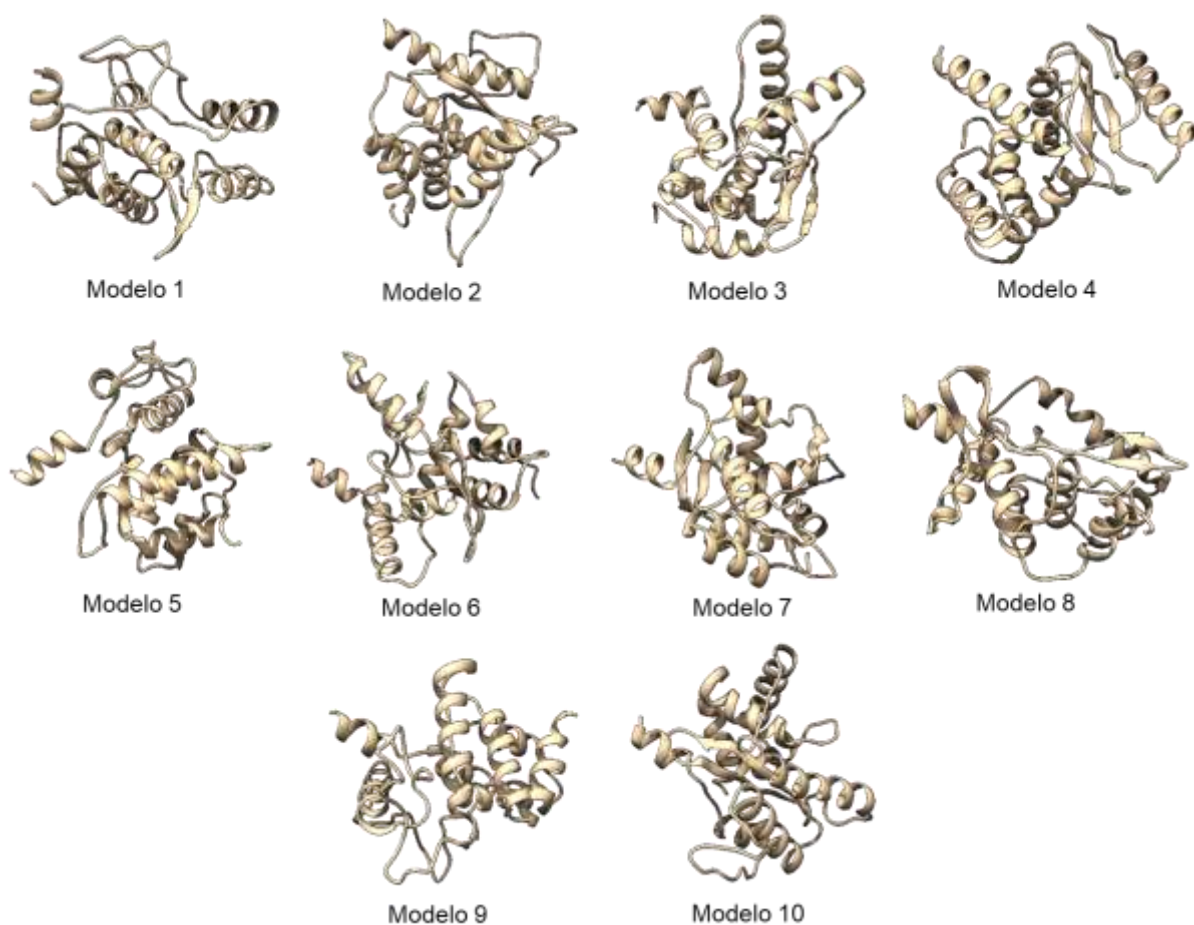


Figura 14. Modelos obtenidos mediante el software Quark de la proteína LysVPMS1-PCNP.

En estos dos modelos el sitio catalítico se encontró expuesto sobre la superficie de la proteína. Cabe destacar que el aminoácido Glutámico 144 presente en ambos sitios, es el mismo al que se hace referencia en el modelado de la endolisina LysVPMS1 (Glutámico 135) y para el caso de la proteína quimérica el aminoácido catalítico se encuentra desfasado 9 aminoácidos respecto a la numeración de la versión silvestre, esto por la fusión del PCNP.

En ambos modelos se visualizaron las predicciones de la estructura terciaria (**Figs. 15b y 15d**), encontrando que para ambos casos el lugar en donde se realizó la modificación con la fusión del péptido se observaron totalmente expuestos al solvente.

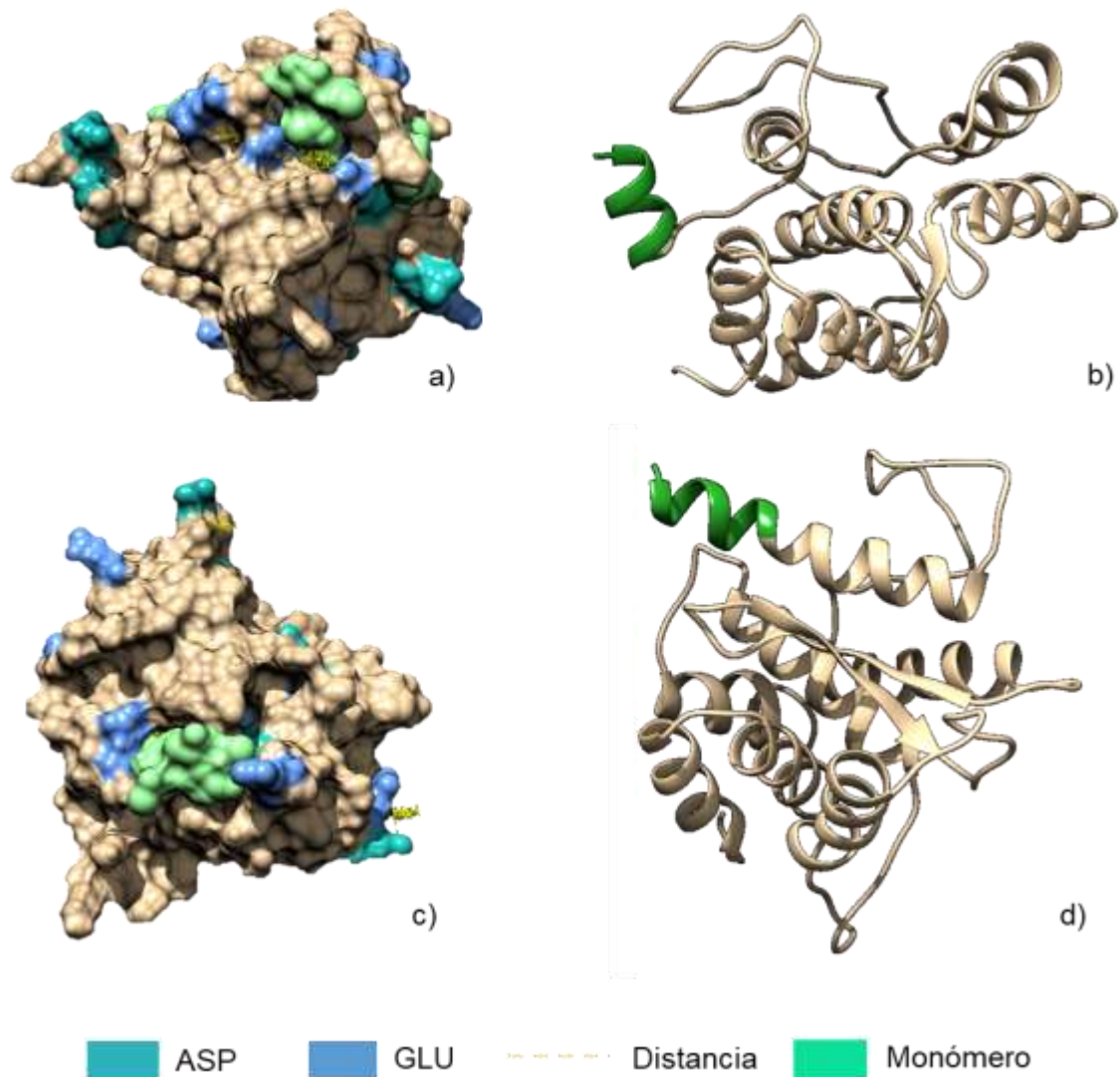


Figura 15. a) Modelo 1 *ab initio* de LysVPMS1-PCNP y b) Estructura terciaria; c) Modelo 2 *ab initio* de LysVPMS1-PCNP y d) Estructura terciaria

8.4 Análisis de acoplamiento molecular con fragmento de pared celular Gram-negativa de la endolisina LysVPMS1-PCNP.

El aminoácido Glutámico 135 presente tanto en el análisis de acoplamiento con el monómero de pared como con el fragmento de pared celular de la endolisina LysVPMS1, se presenta en el sitio catalítico de la proteína quimérica, siendo en esta última el aminoácido Glutámico 144 (**Fig. 16a**). Encontrándose a su vez con el Aspártico 16 el cual forma parte de los aminoácidos del polipéptido catiónico.

Otro sitio catalítico expuesto fue encontrado cerca del extremo N-terminal, en éste la interacción se dio entre los Glutámicos 136 y 190 (**Fig. 16b**). Con esto se pueden tener pistas de la función que desempeña el péptido para dar lugar a la interacción de la proteína con la membrana externa de una bacteria Gram-negativa.

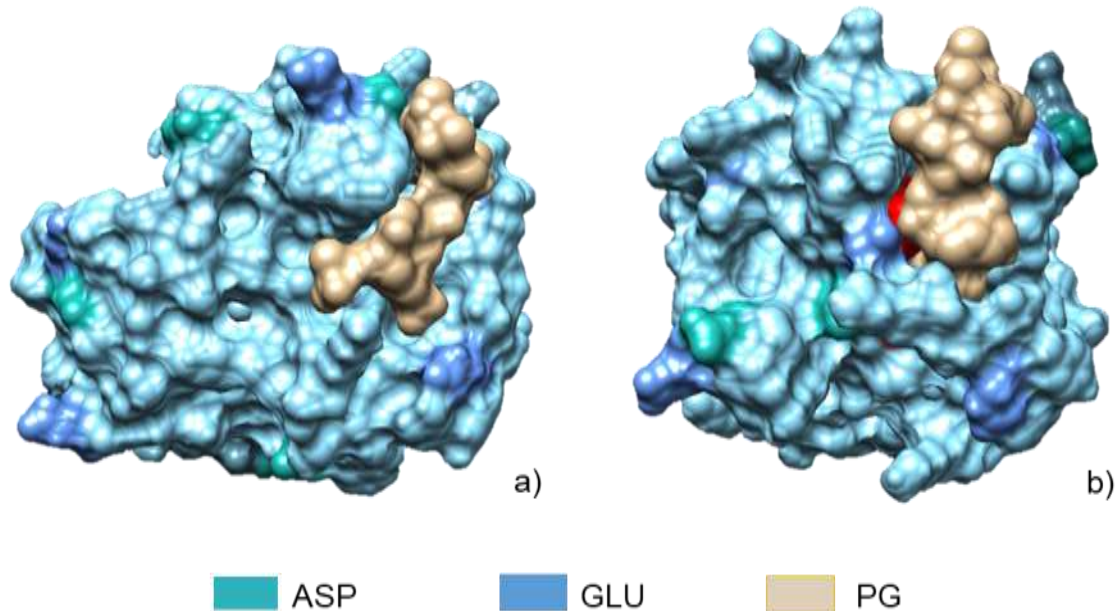


Figura 16. Análisis de acoplamiento molecular de la proteína LysVPMS1-PCNP con fragmento de peptidoglucano.

8.5 Diseño de la proteína LysVPMS1-PCNP

Se obtuvo la construcción de una nueva proteína quimérica denominada LysVMPS1-PCNP con una secuencia de 206 aminoácidos (**Fig. 17**). Se encuentra conformada por la endolisina LysVPMS1 y la fusión en el dominio N-terminal de un nanopéptido policationico (PCNP), seguido del sitio de restricción correspondiente a NdeI. Mientras que en el dominio C-terminal se encuentra el sitio de restricción de la enzima BamHI.



GGTCGGAATTCATATGAAACGCAAGAAACGTAAGAAACGCAAACATTACTTATACATCGACGCTGCTCG
 CAAGCAGTTCAAGATTGAAGACAAAGCACCTTCATCAACATCAGCTGAAGGTATCCACACTCAGGCTGA
 CCTATCCACTTCACGTGGTACTGCACTTATGCAACGAGCTACTGACGAGCTAATTGCTCAAGGCTACCAC
 TCAGTGCAGACTTACCTCTTTGTGAATGCTCGTGAGGATACCTTCCGCACATCTTACACTTACAACCCAAT
 CAAGGGTGAAGGCTGTCGCGGCTCATTCAATGAAGCACACACTGACCAATACTACTCGCTGACTAAAGC
 TATCAGTGACCTGGACCAGGATGGTTACACTCGCACAGTCTATCAGTGTGATGAGCTAATGTCACCTTGAC
 GAAGCATTCTAGCATTATGGATGAACCTAACACTCCCACTTACGAGACGTTCCGAGCACTCTACATCA
 CCACCAAAGGCAAACCAGCTTGGGATGCTGCCGTACAGTTTATTAGTTACACTGTAAAGATGCAAGCAC
 TCGCGCTTACACTACTTACTTGAGTTTATTGGTAATGAAAGCTAGGGATCCCCAACC

Figura 17. Esquema y secuencia del diseño de la proteína quimérica LysVPMS1-PCNP.

8.6 Clonación en el vector *PGEM-Teasy*

La amplificación del gen se corroboró mediante una electroforesis en un gel de agarosa, en donde se observa una banda a una altura aproximada de 617 pb (**Fig. 18a**). En cuanto a la confirmación de la inserción del gen en el vector de clonación pGEM-T Easy, se obtuvo el crecimiento de 8 colonias (**Fig. 18b**) después de transcurrir 6 días. Posteriormente se realizó la PCR de colonia como confirmación, encontrando 5 clonas positivas, las cuales se verificaron en un gel de agarosa (**Fig. 18c**).

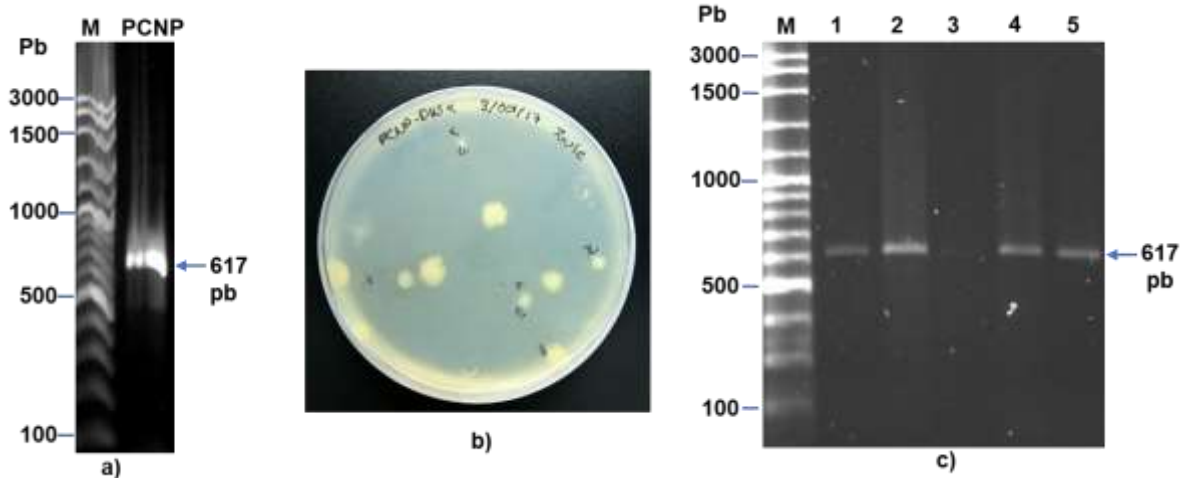


Figura 18. a) Amplificación del gen; b) Crecimiento de colonias de la transformación en células DH5 α con pGEM-T Easy e inserto (LysVPMS1-PCNP); c) Confirmación de clonas positivas. M, marcador

8.7 Preparación del inserto para subclonación en vector de expresión

A las colonias positivas se les realizó una extracción de ADN plasmídico, el cual fue visualizado en un gel de agarosa. En éste se observaron bandas con peso molecular variables. De las cuatro extracciones realizadas, la clona 1 es la que se encontró con menos impurezas ya que la banda se observa sin barrido y con mayor intensidad (**Fig. 19a**). Se confirmó la amplificación al presentarse una banda a la altura de 617 pb, peso correspondiente al gen (**Fig. 19b**); así como su purificación (**Fig. 19c**) por visualización en gel de agarosa.

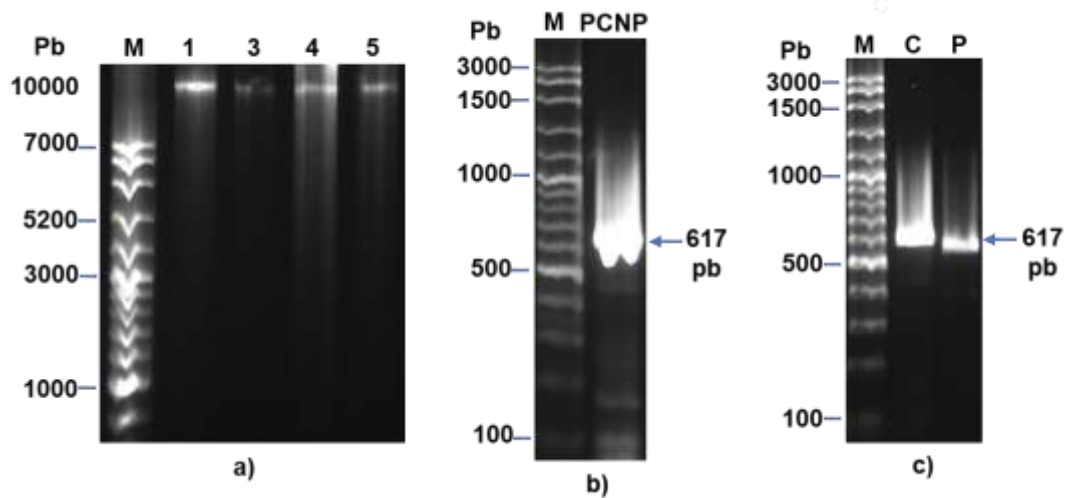


Figura 19. a) Extracción de plásmido de las colonias 1, 3, 4 y 5; b) Amplificación del inserto; c) Purificación del inserto. M, Marcador; C, Control y P, Purificación

8.8 Restricción y purificación del vector de expresión *pColdI*

En la visualización de la restricción del vector de expresión, se confirmó que las enzimas realizan los cortes adecuadamente. Sin embargo, se observó la banda del vector superior a su peso (4,407 pb). Esto probablemente se deba a un efecto de migración anómala del marcador de peso molecular, lo cual dificulta la ubicación de la banda. Por otro lado, la banda que corresponde a la liberación del inserto de la endolisina LysVPMS1, se encuentra a de la altura esperada (587 pb) (**Fig. 20a**). Y finalmente se verificó la purificación del vector al observar una banda en el gel (**Fig. 20 b**).

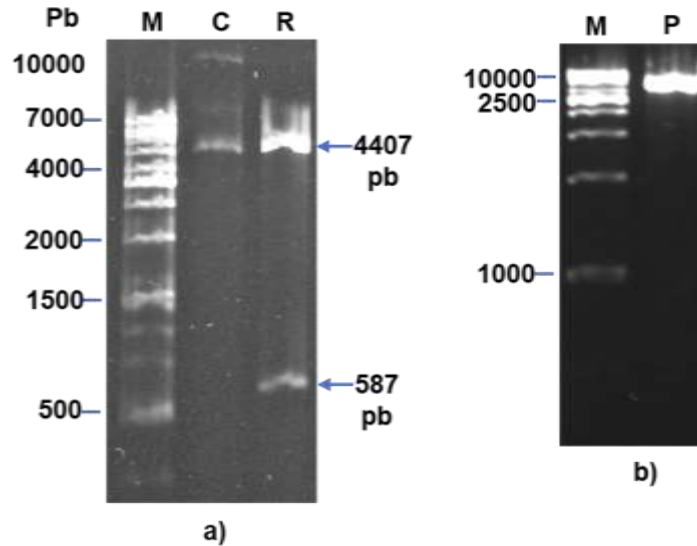


Figura 209. a) Visualización de la restricción de la construcción pCold+LysVPMS1; b) Visualización de la purificación del vector de expresión. M, Marcador, C, Control (plásmido sin cortar). R, Restricción de la construcción pCold-LysVPMS1; P, Purificación pCold.

8.9 Ligación del inserto *LysVPMS1-PCNP* con el vector de expresión *pColdI*

Resultado de la amplificación con la polimerasa CloneAmp™ DNA, se observó una única banda de alta intensidad y grosor a una altura de 647 pb (**Fig. 21 a**). El incremento en el peso aproximado del inserto, es debido a los extremos añadidos para la posterior ligación con el vector de expresión.

En la purificación del inserto, se logró obtener una banda correspondiente a su peso (**Fig. 21b**).

En cuanto al resultado de la transformación de células DH5α con el producto de ligación, se confirmó con la PCR de colonias la presencia de clonas positivas que contenían el inserto de interés. El amplicón obtenido se encontró a la altura esperada en 617 pb dado que la amplificación se realizó con Green Dream Taq y los oligos específicos del gen y no con los utilizados para la amplificación con la polimerasa CloneAmp™ DNA, los cuales añaden los extremos sobrelapantes al inserto (**Fig. 21 c**).

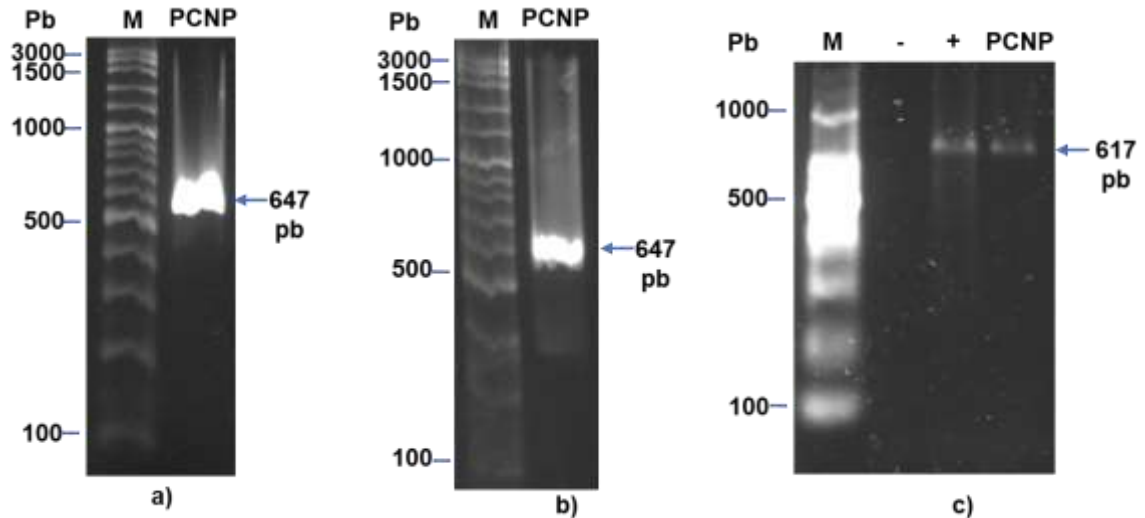


Figura 21. a) Visualización de la amplificación con la polimerasa CloneAmp™ DNA; b) Purificación del inserto; c) Confirmación de clona positiva. M, marcador; -, control negativo; +, control positivo (*LysVPMS1-PCNP*).

8.10 Inducción de la expresión y purificación de *LysVPMS1-PCNP*

La inducción de la expresión de la proteína fue exitosa utilizando una concentración de 0.25 mM de IPTG. Lo anterior se confirmó al observar en el gel de acrilamida al 10% una nueva banda a una altura equivalente de 23 kDa, el cual corresponde al peso de la proteína de interés. Por otro lado, en el cultivo no inducido (NI), esta banda no fue visible (**Fig. 22a**).

Verificada la expresión de la proteína, se realizó la inducción de la expresión con un mayor volumen de cultivo para obtener mayor cantidad de proteína y purificarla posteriormente. En las muestras separadas durante el proceso de purificación (**Fig. 22b**), se pudo observar que en el pellet y por consiguiente en los lisados (carriles marcados como P, LF y LC) se encontró presente la proteína de interés en 23 kDa aproximadamente. Por otro lado, en los lavados se denota que al usar el PB la proteína pasó a través de la columna, mientras que en los lavados con imidazol la presencia de ésta disminuyó. Y en la elución con 500 mM de Imidazol, se visualizó la proteína de interés con menor intensidad comparada con las del pellet y los lisados. Como control de la purificación se usó la purificación de la endolisina silvestre *LysVPMS1* (carril Lys). La banda de ésta se observó incluso por debajo de la proteína quimérica, siendo esto un indicador positivo de la diferencia en cuanto al tamaño debido a la fusión del péptido.

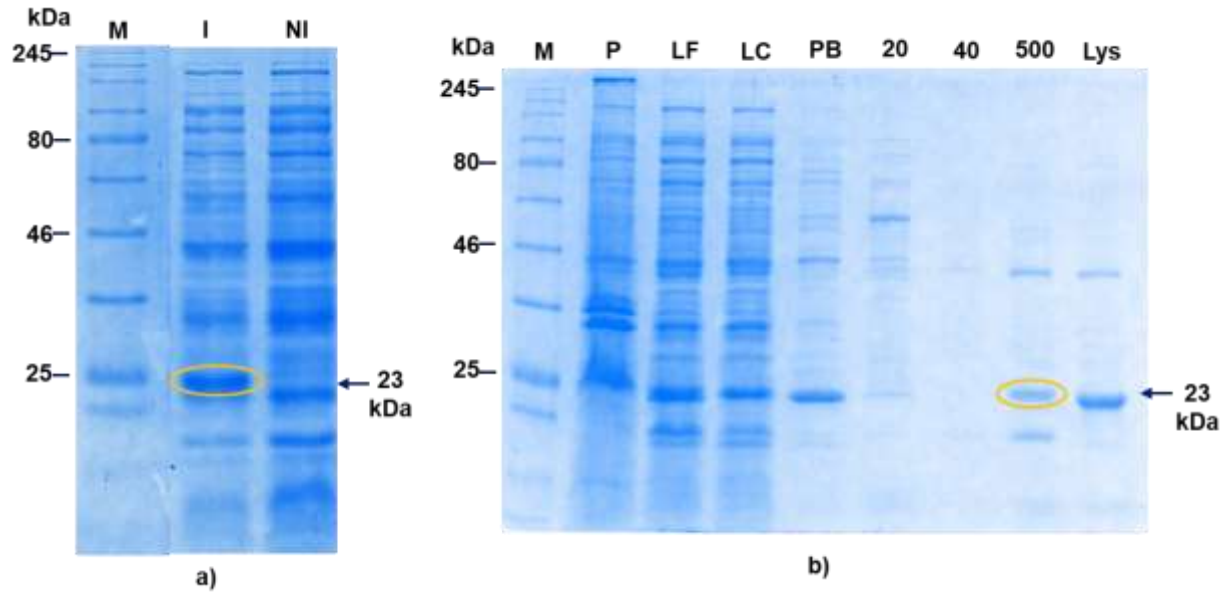


Figura 22. a) Prueba de inducción y b) Monitoreo de purificación. I, Inducido, NI, No inducido, M, Marcador, P, Pellet, LF, Lisado crudo filtrado, LC, Lisado crudo por columna, PB, Solución amortiguadora, 20, 40 y 500 mM de Imidazol.

8.11 Cuantificación de proteína por densitometría.

El software calculó una concentración de 432 $\mu\text{g/mL}$ considerando las intensidades de las bandas de cada una de las diluciones de albúmina, las cuales se observan en el gel en orden ascendente de concentración de izquierda a derecha en los carriles 1-5 (**Fig. 23**). La concentración fue obtenida usando este método debido a que la proteína no se encontraba pura, por lo que únicamente con el software se seleccionó la banda a cuantificar correspondiente al peso de la proteína quimérica (carril 8, **Fig. 23**).

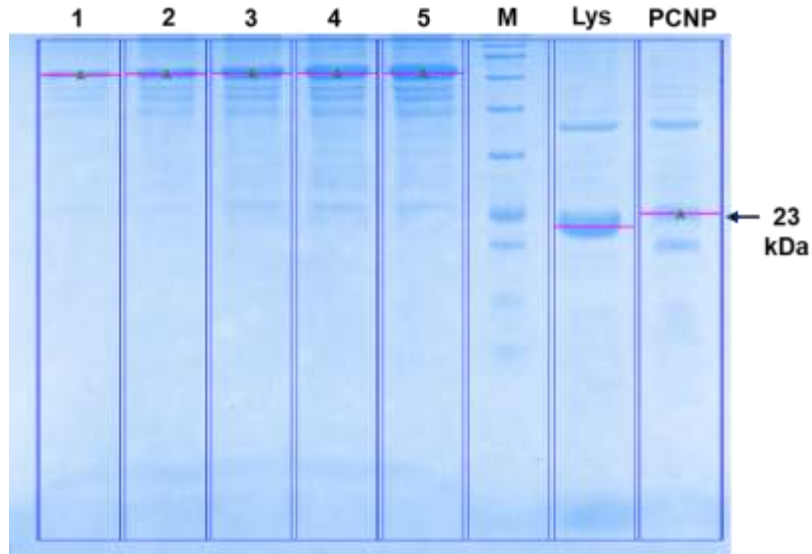


Figura 23. Gel para realizar cuantificación de proteína mediante densitometría a partir de diferentes diluciones de albúmina.

8.12 Pruebas de actividad muralítica relativa de LysVPMS1-PCNP

La prueba de actividad muralítica mostró que LysVPMS1-PCNP reduce la densidad óptica ($D.O_{600nm}$) de 0.54 (tiempo inicial) a 0.30 en un tiempo menor a los 3 minutos, mientras que la silvestre muestra esa disminución en la $D.O_{600}$ después de 20 minutos aproximadamente (**Fig. 24** izquierda). La proteína quimérica disminuye en mayor medida la densidad óptica comparada con la enzima silvestre. Indicando así que la enzima modificada requiere de menor tiempo para disminuir la densidad óptica de la suspensión de bacterias utilizadas. El control se comportó con una tendencia típica dado que permanece constante.

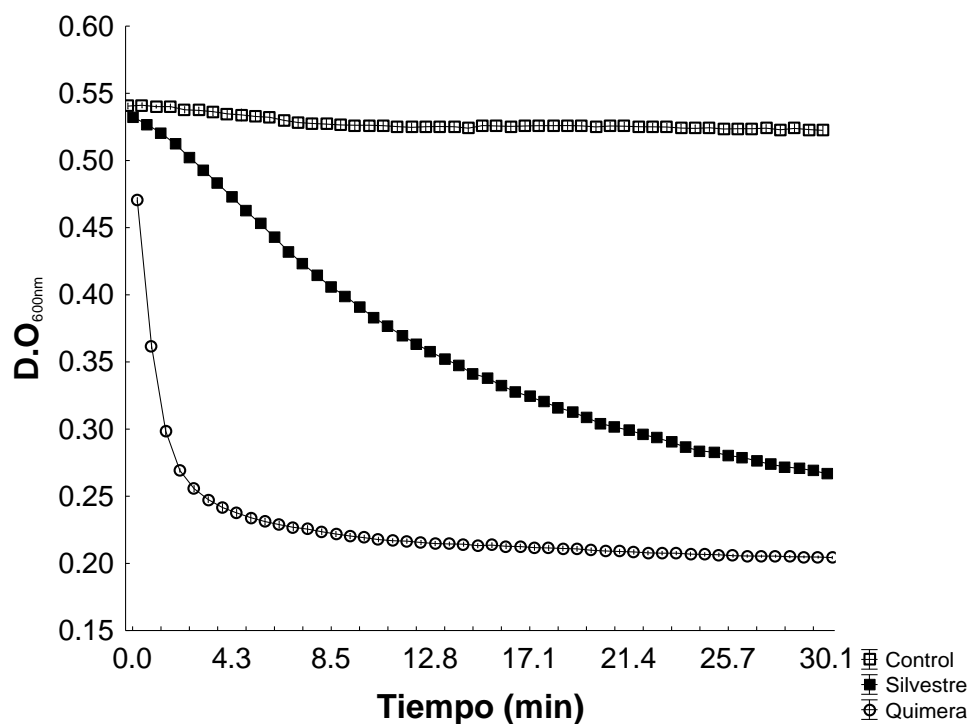


Figura 24. Cinética de actividad muralítica relativa(derecha) de la endolisina LysVPMS1 y LysVPMS1-PCNP (Quimera).

Por otro lado, para comparar la actividad muralítica tanto de la endolisina LysVPMS1 como de la proteína quimérica, se obtuvieron las pendientes de cada réplica a partir de las 60 lecturas obtenidas en cada una. El valor de actividad más alto calculado de la endolisina LysVPMS1 en este ensayo fue considerado como el 100% y relativo a este porcentaje se obtuvo la proporción de la actividad de la quimera. Teniendo como resultado que la endolisina quimérica presentó 5.8 mayor actividad con respecto a la actividad de la silvestre mayor (**Fig. 25**).

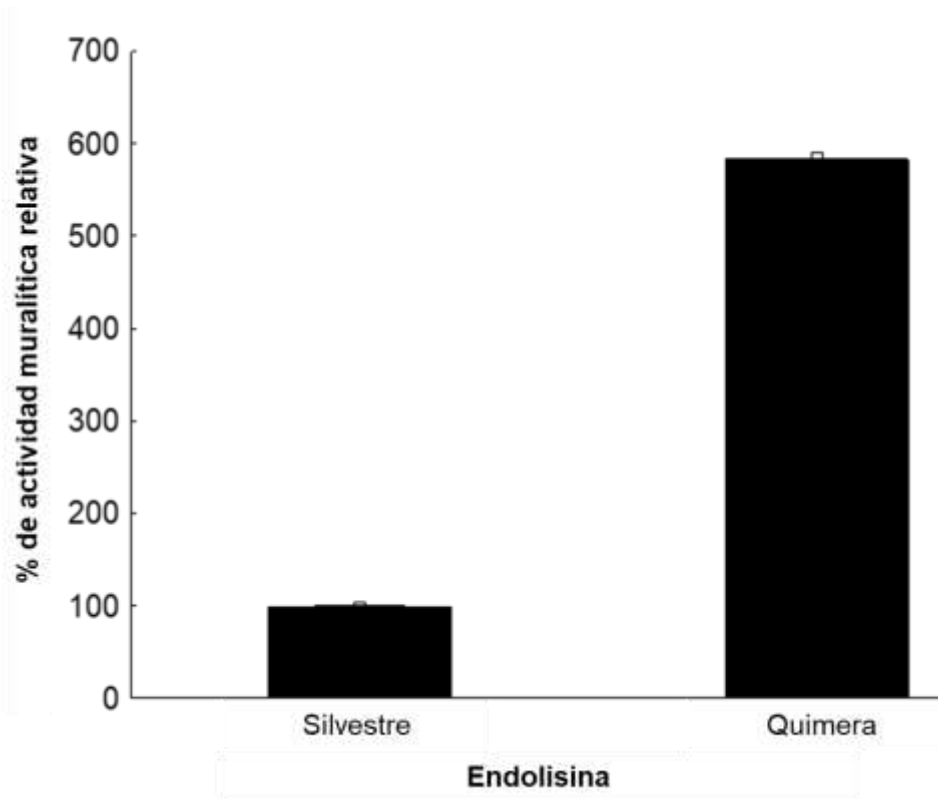


Figura 25. Porcentaje de actividad muralítica relativa de las endolisinas silvestre (LysVPMS1) y la quimera (LysVPMS1-PCNP).

9. DISCUSIÓN

La selección de la endolisina LysVPMS1 (silvestre) fue basada en el conocimiento previo del efecto lítico que ésta tiene sobre células Gram-negativas sensibilizadas. No obstante, no se tenía información sobre la conformación de su estructura terciaria, la cual a su vez es importante ya que permite clasificarla mediante búsqueda de homologías con otras endolisinas a partir de su estructura primaria, como comúnmente lo hacen diferentes autores antes de evaluar la actividad de una nueva endolisina (Oliveira *et al.*, 2016; Lood *et al.*, 2015 & Lim *et al.*, 2014).

Por ello la búsqueda de homologías se realizó en las bases de datos de proteínas, sin embargo, la endolisina LyVPMS1 no pudo ser clasificada, debido a que no se encontró ninguna homología con otra proteína en el análisis bioinformático. Esto tiene que ver con el hecho de que existe una gran deficiencia en la caracterización estructural y bioquímica de las endolisinas en general (Maciejewska *et al.*, 2017). Y esta deficiencia es atribuida a que las proteínas pueden tener n configuraciones posibles de su estructura terciaria, dificultando su estudio, por ello, aunque se han podido determinar la secuencia de más de 250, 000 proteínas a través de difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear, de estas apenas se conocen 20,000 estructuras terciarias (Olivares-Quiroz & García-Colin, 2004).

Por lo anterior se realizó el modelado *ab initio* de la endolisina LysVPMS1 y de la endolisina quimérica LysVPMS1-PCNP. Sin embargo, este tipo de modelado precisamente tiene como desventaja que la predicción de su estructura se basa sólo en la energía termodinámica, y dinámica molecular de cada aminoácido para proponer una conformación tridimensional con mínima entropía y máxima estabilidad (Patiño, 2015). Mientras que el modelado por homología o comparativo construye la estructura desconocida de la proteína diana comparando y utilizando la información disponible de su secuencia proteica homóloga $\geq 50\%$ (Gupta *et al.*, 2014).

Sin embargo, realizar una aproximación de la estructura terciaria a través del modelado *in silico* permitió realizar el diseño racional de la proteína quimérica, ya que como lo mencionan algunos autores para ello se debe tener idea de la estructura para ubicar los sitios activos o regiones en donde se pueden ensamblar otras proteínas con el fin de realizar una función bioquímica particular (Thireou *et al.*, 2009 & Olivares-Quiroz & García-Colín, 2004). Y además considerar que la ubicación de un dominio puede afectar la localización y la funcionalidad de la molécula a fusionar (Sachdev & Chirgwin, 1998). Aunado a esto se tomó en cuenta para la modificación de la endolisina el conocimiento general de endolisinas que actúan contra Gram-negativas, en el cual se hace mención de manera particular que el dominio N-terminal es el sitio activo de la enzima (Yang *et al.*, 2014), siendo así el lugar ideal para fusionar péptidos u otras proteínas para mejorar la actividad lítica (Schmelcher *et al.*, 2011).

A su vez, poder generar las estructuras secundarias de las proteínas permitió conocer sus conformaciones y comprobar teóricamente su estabilidad, lo cual, es el resultado del equilibrio entre interacciones electrostáticas, fuerzas de Van Der Waal y puentes de hidrógeno (Patiño, 2015). La presencia de estas interacciones está dada por la composición química de la cadena peptídica principal de la proteína, en donde el grupo peptídico es el que determina la tendencia en el plegamiento, en donde la secuencia de aminoácidos va modificando su configuración espacial hasta alcanzar un estado termodinámicamente estable con una estructura tridimensional particular (Viguera, 2003). La estabilidad se pone de manifiesto cuando al encontrarse en un disolvente polar las proteínas forman puentes de hidrógeno dando lugar a elementos de estructura terciaria como las láminas beta y alfa hélices dextrógiras, que están conectados por lazos o loops y en ocasiones por regiones desordenadas, dando lugar a la estructura nativa en donde se definen los sitios activos de la macromolécula, y sólo en este estado la proteína realiza la función bioquímica para la cual fue diseñada (Olivares-Quiroz & García-Colín, 2004). En caso de encontrarse desordenadas, no es recomendable continuar y realizar el modelado 3D dado que son conformaciones no estables (Contreras-Moreira, 2010).

Los modelos obtenidos fueron soportados con criterios de análisis preestablecidos, como son las distancias interatómicas, así como con la presencia de aminoácidos específicos en los sitios catalíticos y los mínimos de energía. Esto debido a que son evaluaciones empíricas de interacciones dadas entre ligando y receptores. Por ejemplo, las distancias interatómicas en un rango de 2-4 Å se establecen debido a que las constantes de unión más altas de los ligandos surgen de fuerzas de atracción de corto alcance entre ambas moléculas (Novotny & Sharp, 1992). Además se consideró la selección de los aminoácidos Glutámico y Aspártico para determinar el sitio catalítico, ya que en la mayoría de las lisozimas estos dos residuos se encuentran en sus sitios catalíticos (Oliveira *et al.*, 2013).

En los modelos de acoplamiento de la endolisina silvestre realizados tanto con el monómero de pared como con la fracción de peptidoglucano, los aminoácidos que se encontraron con mayor incidencia en los sitios catalíticos fueron el Glutámico 91, Aspártico 95 y Glutámico 135. Sin embargo, el aminoácido que prevalece al realizar los modelos de la proteína quimérica es el Glutámico 135. Esto probablemente se deba a que el programa considera la asignación de plegamientos (Yang *et al.*, 2012), cambiando así los sitios en donde se da la actividad. Es quizá debido a esta razón, que no se encuentren el Glutámico 91 y Aspártico 95 en los sitios catalíticos de la proteína quimérica. Además en el acoplamiento el ligando es tratado como una molécula flexible mientras que la conformación de la proteína es rígida, permitiendo así que el ligando se acople en otros lugares para maximizar la energía libre total durante la asociación (Verkhivker *et al.*, 2002).

La presencia del aminoácido Glutámico 135 en los modelos con el monómero de pared y el fragmento de peptidoglucano de LysVPMS1 y LysVPMS1-PCNP, es un indicador determinante de su rol dentro del sitio activo. No obstante, esto debe ser comprobado mediante mutagénesis dirigida, ya que al evaluar la actividad de las enzimas mutantes éstas muestran pérdida o disminución de su actividad enzimática (Kataoka *et al.*, 2005).

De igual forma en los modelos fue importante encontrar que el péptido fusionado estuviera expuesto en las estructuras terciarias realizadas. Ya que éste inicialmente interactuará con la superficie de la membrana insertándose en la bicapa lipídica (Fjell *et al.*, 2012). Lo cual podría dar lugar a confirmar el diseño *in silico* de la proteína. No obstante, esta interacción no pudo ser observada en los modelos debido a que los ligandos usados fueron pequeños. Pero si se observó en los modelos con el fragmento de PG que los sitios con actividad se encontraban cercanos al péptido.

Con respecto a la construcción de la proteína quimérica, esta se hizo mediante la forma más simple de combinación, denominada fusión genética de extremo a extremo, en donde los genes codificantes se unen entre sí para que al ser expresados lo hagan como una única cadena polipeptídica en un organismo hospedador (Schmidt, 2009). Esta construcción fue necesaria realizarla para poder llevar a cabo la producción recombinante de la quimera y comprobar experimentalmente la viabilidad del diseño mediante pruebas de actividad, esto porque aunque los modelos son aproximaciones teóricas para diseñar hipótesis valiosas comprobables (Yang *et al.*, 2012), deben evaluarse experimentalmente para verificar las características estructurales y especificidad enzimática (Contreras-Moreira, 2010).

Dentro del contexto experimental, se re-estandarizaron condiciones de PCR para la amplificación del gen de interés, esto porque se observaron bandas inespecíficas. Siendo necesario para eliminarlas realizar PCR con gradientes de temperatura, así mismo se comprobó la integridad del ADN de las extracciones realizadas, dado que si éste se encuentra fragmentado dificulta la amplificación de productos de la PCR, afectando además la reproducibilidad de las técnicas posteriores (Alejos-Velázquez *et al.*, 2014).

La estrategia de clonar el inserto en el vector de clonación pGEM-T Easy, suponía ventajas como evitar su degradación por acción de nucleasas, no obstante, al transformar las células competentes DH5 α éstas presentaron crecimiento tardío (cinco días). Esto inicialmente fue un problema, debido a que sólo se esperaban las 16 horas

de incubación y no se observó crecimiento de colonias de las diferentes transformaciones realizadas. Por lo cual fue necesario dejar la placa por mayor tiempo a temperatura ambiente (30° C) hasta comprobar si se presentaba el crecimiento de las células. Este comportamiento en el crecimiento podría ser efecto del mismo vector de clonación porque pGEM-T Easy tiene la capacidad de formar un alto número de copias dentro de la célula, creando una carga metabólica alta para la célula, reflejándose en la reducción de la velocidad de crecimiento (Lara, 2011; Dong *et al.*, 1995). Sin embargo, sí se logró la obtención de clonas positivas.

La ligación del inserto con el vector de expresión fue uno de los retos más importantes, debido a que se realizaron numerosas pruebas. Se cambiaron las proporciones de inserto (3:1 y 6:1), así como del vector, incluso realizando nuevas purificaciones de este, o usando otro vector de expresión (pET32b) sin éxito. Al respecto, la literatura menciona que las ligaciones pueden ser afectadas por la temperatura, concentración iónica en la solución y por la naturaleza de los extremos ya sea cohesivos o romos. Se utilizaron proporciones 3:1 (inserto-vector), 5:1 ó 10:1 con 10 a 30 veces más ligasa respectivamente (López, 2018). El protocolo de ligación se siguió conforme a lo especificado, sin embargo, la temperatura de la reacción no fue monitoreada, por lo que probablemente esta haya sido la causa del fracaso de las ligaciones con el vector de expresión usando T4 ADN ligasas. La ligación exitosa se obtuvo con el kit de clonación In-Fusion® HD Eco Dry™, este método asegura el proceso por la adición al inserto de extremos sobrelapantes (15 pb) que corresponden a los extremos complementarios del vector linearizado usado (pColdI), los cuales posteriormente en la mezcla de reacción se hibridaron en los sitios complementarios. Además, se consideraron todas las especificaciones sugeridas por el fabricante.

Obtenida la ligación en el vector de expresión, nuevamente se presentaron problemas con el proceso de transformación ya que no se obtenía el crecimiento de colonias. Por ello se realizaron ajustes en el protocolo de transformación de células competentes. Se probaron dos cepas competentes, Stellar y DH5α con la finalidad de descartar una baja competencia de la cepa Stellar. Para esto diferentes

concentraciones de células transformantes se usaron, utilizando dos volúmenes de la reacción de ligación 2.5 y 5 μL fueron probadas, siendo la primera con la que se logró la transformación de células, el segundo volumen probablemente la inhibía debido a que las células pueden ser sensibles a la enzima In-Fusion. Finalmente, al transformar células con el control positivo pUC19, se demostró que estas se encontraban competentes y en buen estado.

La actividad muralítica se refiere a la capacidad que tienen las endolisinas de degradar la capa de peptidoglucano que conforma la pared celular bacteriana (Briers, 2006). Y en este trabajo se consideró como relativa debido a que la actividad residual de la quimera es expresada en porcentaje comparándola con la silvestre la cual es ponderada como el 100% de actividad relativa (Oliveira *et al.*, 2016). Un resultado en condiciones óptimas y un exceso de sustrato, presenta una caída lineal inicial de la densidad óptica tras la adición de la enzima, seguida de una disminución gradual de la pendiente causada por el agotamiento de la enzima y / o la concentración de sustrato inferior (Briers *et al.*, 2006). En este estudio la prueba de actividad de la proteína quimérica fue realizada utilizando el método turbidimétrico en microplacas, usando células con la pared celular expuesta mediante el uso de agentes permeabilizadores evaluando la disminución de la densidad óptica de la suspensión de bacterias sensibilizadas (Zermeño-Cervantes, 2012). Los resultados mostraron que la enzima modificada disminuye drásticamente la densidad óptica ($D.O_{600\text{nm}}$) en pocos minutos de 0.54 a 0.22, mientras que la silvestre cayó de 0.54 hasta 0.28 en un tiempo más prolongado, esto es indicador de que la velocidad de reacción es mayor en la quimera que en la silvestre, lo cual se puede relacionar con la afinidad otorgada, por la modificación mediante la fusión del péptido, ya que el diseño se basó en la idea de que el péptido permitiría el ingreso de la endolisina a través de perforaciones locales en la membrana externa Gram-negativa, por interferencia de las fuerzas estabilizadores iónicas e hidrofóbicas, que permiten la unión del péptido con los cationes divalentes presentes en los lipopolisacáridos aniónicos, para que posteriormente la quimera actúe de forma similar a la endolisina silvestre y degrade enzimáticamente la capa de peptidoglucano (Gerstman *et al.*, 2016 & Briers *et al.*, 2014).

No obstante, al ser probada la actividad sobre células sensibilizadas en donde la pared celular ya se encuentra expuesta, quedaría el hecho de que la disminución en la densidad óptica y por ende el aumento en la actividad muralítica relativa de 5.8 veces con respecto a la de la silvestre, estaría dada según Briers & Lavigne (2015) al aumento de la concentración de la proteína en el sitio de acción por efecto de las fuertes interacciones de las cargas positivas de las argininas y lisinas que comprenden al péptido PCNP con la superficie polianiónica de la célula, que permite un mayor contacto de los dominios de la endolisina con el peptidoglucano degradándolo de esta forma y reflejándose en la disminución de la DO así como en el aumento de actividad.

En este trabajo se demostró que la modificación de la enzima silvestre provoca un aumento en la actividad muralítica sobre células sensibilizadas, consecuencia de la fusión del nanopéptido policationico. El cual ha sido utilizado con éxito cuando se fusiona con otras endolisinas, ya sea mejorando sus propiedades muralíticas y antibacterianas así como el incremento de la actividad enzimática en amplios intervalos de salinidad y pH cuando es unido al dominio C-terminal de endolisinas provenientes de fagos que infectan a bacterias Gram-positivas (Schmelcher & Loessner, 2016). Mientras que en las endolisinas que van dirigidas a Gram-negativas el péptido funciona como un permeabilizador de membrana externa, este promueve la transferencia de la endolisina a través de esta estructura cuando es fusionado al dominio N-terminal (Briers *et al.*, 2014a). Sin embargo, este último mecanismo de acción aún necesita ser comprobado en la actividad de la quimera LysVPMS1-PCNP.

Por otro lado, el diseño de una nueva proteína por ende trae consigo diferentes retos a solucionar, el más importante en este trabajo fue poder expresarla de forma recombinante. El siguiente paso fue probar si era activa, y aunque se pudo corroborar que hubo un aumento en la actividad con la modificación realizada, aún son necesarios diferentes estudios para poder caracterizar las propiedades de la endolisina quimérica. Como son pruebas de actividad sobre células viables con sus respectivas repeticiones para descartar cualquier error y no sobre o sub estimar la actividad. Pruebas de

estabilidad a diferente salinidad, pH, temperatura (Schmelcher, 2016); así como la evaluación de especificidad, es decir si ésta tiene actividad sobre otras cepas de *Vibrio* e incluso probar con cepas patógenas de origen dulceacuícola. Así mismo podría comprobarse el mecanismo de acción de la endolisina quimérica (Briers, 2014). Aún se puede realizar un cálculo más exacto de la actividad muralítica relativa, probando diferentes concentraciones para correlacionar la actividad y la cantidad. Otra prueba interesante sería observar la diferencia en la actividad cuando además del péptido se fusiona un enlazador el cual brinda mayor flexibilidad a la molécula y mantiene separadas las estructuras y funciones de cada una (Schmidt, 2009).

Finalmente, los péptidos catiónicos son de los compuestos que han tenido auge en los últimos años debido a sus propiedades, y de acuerdo a lo observado en este trabajo definitivamente favorecen en un aumento en la actividad cuando son fusionados con proteínas, por lo que es importante seguir explorando el uso de estos compuestos dentro de la ingeniería de proteínas.

10. CONCLUSIONES

El diseño racional fue una estrategia útil que permitió proponer la modificación de la endolisina LysVPMS1, ya que no se tenían datos sobre la conformación estructural terciaria. No obstante, es necesario seguir estudiando la estructura de esta proteína para poder conocer a fondo su mecanismo de acción.

Gracias al modelado *ab initio* y análisis de acoplamiento molecular mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se determinó el posible arreglo estructural tridimensional e interacción de acoplamiento más estable energéticamente hablando.

El modelo 1 del análisis de acoplamiento *in silico* de la endolisina LysVPMS1 fue el que cumplió con la mayoría de los criterios de análisis presentando un sitio catalítico de relevancia, determinado por la presencia de los aminoácidos Glutámico y Aspártico.

En el modelo 1 el dominio N-terminal de LysVPMS1 se encontró expuesto, esto corroboró la aseveración de algunos autores de que esta región era la ideal para fusionar péptidos u otras proteínas para mejoras en la actividad y proponer el diseño *in silico* de la quimera.

Se corroboró *in silico* el diseño de la proteína quimérica al analizar la estructura terciaria de la proteína LysVPMS1-PCNP y encontrar expuesto al nanopéptido PCNP, ya que de esta forma podría interactuar con la membrana externa bacteriana.

La importancia del aminoácido glutámico #135 quedó demostrada al presentarse en los sitios catalíticos de los mejores modelos tanto de la endolisina silvestre como de la quimérica. Sin embargo, aún se requieren estudios de mutagénesis dirigida para comprobarlo.

El diseño de la quimera se comprobó experimentalmente mediante la expresión recombinante, ya que al ser expresada por la célula y mostrar actividad es indicador de

la estabilidad de la misma, dado que las proteínas únicamente presentan actividad cuando su conformación estructural es la adecuada.

La actividad muralítica relativa de la enzima quimérica fue 5.8 veces mayor con respecto a la actividad de la silvestre, y el aumento es atribuido a la acción del péptido fusionado ya que este provoca un aumento de la concentración de la proteína en el sustrato por efecto de las interacciones de las cargas positivas de sus componentes con la superficie polianiónicas de la membrana externa celular

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Guzmán, G. 2004. ¿Los *Vibrio* sp., son agente patógeno importante para el cultivo de camarón? *Boletín Informativo Del Programa Nacional de Sanidad Acuicola*, 1, 1–3.
- Alejos-Velázquez, L. P., M. C. Aragón-Martínez, & A. Cornejo-Romero. 2014. Extracción y purificación de ADN. In *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos teóricos y prácticos*.
- Bahar, A. A., & D. Ren. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543–1575.
- Bartley, C. H., & L. W. Slanetz. 1971. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in estuarine waters and oysters of New Hampshire. *Applied Microbiology*, 21(5), 965–6.
- Bell, M. R., M. J. Engleka, A. Malik, J. E. Strickler. 2013. To fuse or not to fuse: what is your purpose? 651 *Protein Science*, 22:1466–77
- Bermudez, M. C., A. Espinoza, & M. L. Santiago. 2009. Uso de antibióticos en la Industria camaronícola. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(3).
- Borges Magaña, R. O., Y. J. Mendoza Falcón, & N. M. C. Castro. 2012. Necrosis en postlarvas de camarón. *Revista Electronica de Veterinaria*, 13(2), 1–4.
- Borysowski, J., & A. Górski. 2010. Fusion to cell-penetrating peptides will enable lytic enzymes to kill intracellular bacteria. *Medical Hypotheses*, 74(1), 164–6.
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska & A. Gorski. 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 231(4), 366–377.
- Brannigan J. A., J. M. Wilkinson (2002) Protein engineering 20 years on. *Nature Review Molecular Cell Biology*, 3, 964–970.
- Briers, Y., & R. Lavigne. 2015. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*,

10(3), 377–90.

Briers, Y., G. Volckaert, A. Cornelissen, S. Lagaert, C. W. Michiels, K. Hertveldt, & R. Lavigne. 2007. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages ?KZ and EL. *Molecular Microbiology*, 65(5), 1334–1344.

Briers, Y., M. Walmagh, B. Grymonprez, M. Biebl, J. P. Pirnay, V. Defraigne, J. Michiels, W. Cenens, A. Aertsen, S. Miller & R. Lavigne. 2014. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3774–3784.

Briers, Y., M. Walmagh, V. V. Puyenbroeck, A. Cornelissen, W. Cenens, A. Aertsen, G. Verween, J.P. Pirnay, S. Miller, G. Volckaert, R. Lavigne. 2014a. Engineered Endolysin-Based “ Artilyns ” To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio*, 5(4), 1–10.

Briers, Y., M. Walmagh, V. V. Puyenbroeck, A. Cornelissen, W. Cenens, A. Aertsen, & H. Oliveira. 2014b. Engineered Endolysin Based “ Artilyns ” To Combat Multidrug Resistant GramNegative pathogens. *mBio*, 5(4), 1–10.

Bulet, P., R. Stocklin & L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 169–184.

Cabrera, C. E., R. F. Gómez & A. E. Zúñiga. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*. 38 (2).

Callewaert, L., M. Walmagh, C. W. Michiels & R. Lavigne. 2011. Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 164–171.

Calvo, J., & L. Martínez-Martínez. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 27(1), 44–52.

- Campa-córdova, A. I., A. Luna-gonzález, M. C. Flores-Miranda, M. R. Pacheco-Marges & F. Ascencio-Valle. Respuesta Inmune en Camarón Blanco, *Litopenaeus vannamei*, Expuesto a Infecciones Bacterianas y Virales.. *Avances en Nutrición Acuícola XI-Memorias de congreso*. 317–344. ISBN 978-607-433-775-4.
- Contreras-Moreira, B. 2010. 3D-footprint: a database for the structural analysis of protein–DNA complexes. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D91–D97.
- Cuéllar-Anjel, J. 2013. Enfermedad de las manchas blancas. CFSPH ficha de las enfermedades. 50. Iowa State University.
- Daniels, N. A., M. C. Evans & P. M. Griffin. 2000. Noncholera Vibrios. In *Emerging Infections 4* (pp. 137–147). American Society of Microbiology.
- Daniels, N. A., L. MacKinnon, R. Bishop, S. Altekruise, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. H. Bean, P. M. Griffin & Slutsker, L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(5), 1661–6. <https://doi.org/10.1086/315459>
- Dassanayake, R. S., Y. I. N. Silva Gunawardene & S. S. Tobe. 2007. Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized α/β motifs. *Peptides*, 28(1), 62–75. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2006.09.022>
- Defoirdt, T., N. Boon, P. Sorgeloos, W. Verstraete & P. Bossier. 2007. Alternatives to antibiotics to control bacterial infections: luminescent vibriosis in aquaculture as an example. *Trends in Biotechnology*, 25(10), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.08.001>
- Díaz, E., R. López & J. L. García. 1990. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(20), 8125–9. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.20.8125>
- Doherty, A. J., B. A. Connolly & A. F. Worrall. 1993. Overproduction of the toxic

protein, bovine pancreatic DNaseI, in *Escherichia coli* using a tightly controlled T7-promoter-based vector. *Gene*, 136(1–2), 337–40. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90491-K](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90491-K)

Dong, H., L. Nilsson & C. G. Kurland. 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology*, 177(6), 1497–504. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7883706>

Eslava, C. A., I. Rosas, M. Solano, G. Delgado, M. Ramírez, J. M. Villaseca, A. C. 2007. *Vibrio cholerae*: bacteria ambiental con diferentes tipos de vida. In *Instituto Nacional de Ecología*. Retrieved from <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap2.html>

Felipe, D., & C. Patiño. 2015. Un método híbrido para la predicción de la estructura terciaria de las proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos.

Fischetti, V. A. 2011. Exploiting what phage have evolved to control gram-positive pathogens. *Bacteriophage*, 1(4), 188–194. <https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17747>

Fischetti, V. A. 2010. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.002>

Fjell, C. D., J. A. Hiss, R. E. W. Hancock & G. Schneider. 2012. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (n.d.). *Report of the FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp (under TCP/VIE/3304): Hanoi, Viet Nam, 25-27 June 2013*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/018/i3422e/i3422e00.htm>

García, P., L. Rodríguez, A. Rodríguez, & B. Martínez. 2010. Food biopreservation:

- promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 373–382.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2010.04.010>
- Gerstman, H., L. Rodríguez-Rubio, R. Lavigne & Y. Briers. 2016. From endolysins to Artylisins: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochemical Society Transactions*, 44(1): 123-128.
<https://doi.org/10.1042/BST20150192>
- González-Escalona, N. V., C. Cachicas, M. L. Acevedo, J. A. Rioseco, F. Vergara, F. Cabello, R. T. Espejo & J. Romero. 2005. *Vibrio parahaemolyticus* Diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 129–131.
<https://doi.org/10.3201/eid1101.040762>
- Guo, M., C. Feng, J. Ren, X. Zhuang, Y. Zhang, Y. Zhu, K. Dong, P. He, X. Guo & J. Qin. 2017. A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 293.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00293>
- Gupta, C. L., S. Akhtar & P. Bajpai. 2014. In silico protein modeling: possibilities and limitations. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 13, 513-515
- Hancock, R. E. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet*, 349(9049), 418–422.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)80051-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80051-7)
- Hancock, R. E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 156-64
- Hancock, R. E. W., & A. Rozek. 2002. Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiology Letters*, 206(2), 143–149.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11000.x>
- Haq, I. U., W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb & I. Qadri. 2012. Bacteriophages and their Implications on Future Biotechnology: A Review. *Virology Journal*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-9>
- Hernández, G. C., P. J. Ulloa, O. J. A. Vergara., T. R. Espejo & C. F. Cabello. 2005.

Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: Problemas emergentes de salud pública en Chile. *Revista Medica de Chile*, 133(9), 1081–1088. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872005000900013>

Honda, T., Y. X. Ni & T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56(4), 961–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3126151>

Holtje, J. V., & A. Tomasz. 1975. Lipoteichoic acid: A specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 72:1690–1694.

Hu, Y., H. Yang, J. Wang, Y. Zhang, J. Yu & H. Wei. 2016. Comparison between a chimeric lysin ClyH and other enzymes for extracting DNA to detect methicillin resistant *Staphylococcus aureus* by quantitative PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1971-6>

Huang, H. W. 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, 239: 8347–52.

Jackson, S. K. 1997. Role of lipid metabolites in the signalling and activation of macrophage cells by lipopolysaccharide. *Progress in Lipid Research*, 36(4), 227–244. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(97\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(97)00010-6)

Kaneko, T. & R. R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *Journal of Bacteriology*, 113(1), 24–32.

Kataoka, Y., K. Takada, H. Oyama, M. Tsunemi, M. N. G. James, & K. Oda. 2005. Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases. *FEBS Letters*, 579(14), 2991–2994. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.050>

Korndörfer, I. P., J. Danzer, M. Schmelcher, M. Zimmer, A. Skerra & M. J. Loessner.

2006. The Crystal Structure of the Bacteriophage PSA Endolysin Reveals a Unique Fold Responsible for Specific Recognition of *Listeria* Cell Walls. *Journal of Molecular Biology*, 364(4), 678–689. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.069>
- Kukol, A. 2009. Lipid Models for United-Atom Molecular Dynamics Simulations of Proteins. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 5(3), 615–626. <https://doi.org/10.1021/ct8003468>
- Lai, M., N. Lin & A. Hu. 2011. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage 6 AB2 endolysin (LysAB2) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, 529–539. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3104-y>
- Lara, A. 2011. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209–223.
- Lear, D. W. 1963. Occurrence and significance of chitinoclastic bacteria in pelagic waters and zooplankton. In C. C. T. Publisher (Ed.). Symposium on Marine Microbiology.
- Levine, W. C., & P. M. Griffin. 1993. *Vibrio* Infections on the Gulf Coast: Results of First Year of Regional Surveillance. *Journal of Infectious Diseases*, 167(2), 479–483. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.2.479>
- Lim, J. A., H. Shin, S. Heu & S. Ryu. 2014. Exogenous Lytic Activity of SPN9CC Endolysin Against Gram-Negative Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 803-811. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1403.03035>
- Loessner, M.J., K. Kramer, F. Ebel & S. Scherer. 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*, 44, 335–349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>
- Loessner, M. J. 2005. Bacteriophage endolysins - Current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 480–487.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.002>

Lood, R., B. Y. Winer, A. J. Pelzek, R. Diez-Martinez, M. Thandar, C. W. Euler, R. Schuch & V. A. Fischetti. 2015. Novel phage Lysin capable of killing the multidrug-resistant gram-negative bacterium *Acinetobacter Baumannii* in a mouse bacteremia model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 1983–1991. <https://doi.org/10.1128/AAC.04641-14>

López, R. R. (n.d.). Genética de Bacterias. *Universidad de Mayahuec*, 1, 1–32.

Love, M. J., D. Bhandari, R. C. J. Dobson & C. Billington. 2018. Potential for Bacteriophage Endolysins to Supplement or Replace Antibiotics in Food Production and Clinical Care. *Antibiotics*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7010017>

Maciejewska, B., K. Żrubek, A. Espaillet, M. Wiśniewska, K. P. Rembacz, F. Cava, G. Dubi & Z. Drulis-Kawa. 2017. Modular endolysin of Burkholderia AP3 phage has the largest lysozyme-like catalytic subunit discovered to date and no catalytic aspartate residue. *Scientific Reports*, 7(1), 14501. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14797-9>

Mao, J., M. Schmelcher, W. J. Harty, J. Foster-Frey & D. M. Donovan. 2013. Chimeric Ply187 endolysin kills *Staphylococcus aureus* more effectively than the parental enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 342(1), 30–36. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12104>

Martínez, C. & J. F. Guevara. 2014. Ingeniería de proteínas para el mejoramiento de enzimas. *Revista digital universitaria* 15(12), 93.

Mavri, J., & H. J. Vogel. 1996. Ion pair formation of phosphorylated amino acids and lysine and arginine side chains: A theoretical study. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24(4), 495–501. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199604\)24:4<495::AID-PROT8>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199604)24:4<495::AID-PROT8>3.0.CO;2-D)

Mayer, M. J., M. J. Gasson & A. Narbad. 2012. Genomic sequence of bacteriophage ATCC 8074-B1 and activity of its endolysin and engineered variants against

- Clostridium sporogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3685–3692. <https://doi.org/10.1128/AEM.07884-11>
- McPhearson, R. M., A. DePaola, S. R. Zywno, M. L. Motes & A. M. Guarino. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. *Aquaculture*, 99(3–4), 203–211. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90241-X](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90241-X)
- Molina-López, J. 2015. Drogas antibacterianas. Retrieved from <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/terapeutica.html>
- Morales-Covarrubias, M. S. 2004. *Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología*. Editorial Trillas.
- Morita, M., Y. Tanji, Y. Orito, K. Mizoguchi, A. Soejima & H. Unno. 2001. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 500(1–2), 56–59. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02587-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02587-X)
- Morris, J. G., & R. E. Black. 1985. Cholera and Other Vibrioses in the United States. *New England Journal of Medicine*, 312(6), 343–350. <https://doi.org/10.1056/NEJM198502073120604>
- Nelson, D. C., M. Schmelcher, L. Rodriguez-Rubio, J. Klumpp, D. G. Pritchard, S. Dong & D. M. Donovan. 2012. *Endolysins as Antimicrobials*. *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 83). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4>
- Nishibuchi, M., & J. B. Kaper. 1990. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (tdh) gene in *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 4(1), 87–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb02017.x>
- Novotny, J. & K. Sharp. 1992. Electrostatic fields in antibodies and antibody/antigen complexes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 58(3), 203–224. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(92\)90006-R](https://doi.org/10.1016/0079-6107(92)90006-R)

- Olivares-Quiroz, L., L. García, & C. Scherer-Colín. 2004. Plegamiento de las proteínas: Un problema interdisciplinario. *Rev. Soc. Quím. Méx*, 48, 95–105.
- Oliveira, H., D. V. Boas, S. Mesnage, L. D. Kluskens, R. Lavigne, S. Sillankorva, F. Secundo & J. Azeredo. 2016. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-gram-negative bacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 7(FEB), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00208>
- Oliveira, H., L. D. R Melo, S. B. Santos, F. L. Nobrega, E. C. Ferreira, N. Cerca, ... L. D. Kluskens. 2013. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage Endolysins. *Journal of Virology*, 87(8), 4558–4570. <https://doi.org/10.1128/JVI.03277-12>
- Oliveira, H., V. Thiagarajan, M. Walmagh, S. Sillankorva, R. Lavigne, M. T. Neves-Petersen, ... J. Azeredo. 2014. A Thermostable Salmonella Phage Endolysin, Lys68, with Broad Bactericidal Properties against Gram-Negative Pathogens in Presence of Weak Acids. *PLoS ONE*, 9(10), e108376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108376>
- Oliver, J. D., & J.B., K. 1997. *Vibrio* species. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*.
- Oren, Z., & Y. Shai. 1998. Mode of action of linear amphipathic α -helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 47(6), 451–463. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(1998\)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F)
- Paredes, F. & J. J. Roca. 2004. Acción de los antibióticos. *Ámbito Farmacéutico Farmacología*, 23(3), 116–124. Retrieved from pps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13059414&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=144&accion=L&origen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n03a13059414pdf001.pdf
- Park, K.S., T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, T. Lida & T. Honda. 2004. Cytotoxicity and enterotoxicity of the thermostable direct hemolysin-deletion mutants of *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiology and Immunology*, 48(4), 313–8.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107542>

- Pedelacq, J. D., S. Cabantous, T. Tran, T. C. Terwilliger & G. S. Waldo. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 24:79–88.
- Peña-Navarro, N., & A. Varela-Mejías. 2015. Análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1), 43–53. <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16892>
- Pinto, J.C., M. Cova, R. Ferreira & R. Vitorino. 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 2023-2040. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6375-x>
- Pushpanathan, M., P. Gunasekaran & J. Rajendhran. 2013. Antimicrobial peptides: Versatile biological properties. *International Journal of Peptides*, 2013(Table 1). <https://doi.org/10.1155/2013/675391>
- Ramírez Orozco, J. M. 2013. Caracterización del Genoma del Fago VPMS1 y Evaluación de sus péptidos como una alternativa para inhibir el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*, 126. Retrieved from <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/16744>
- Rivas, C. I. B., M. C. Juárez, J. Oviedo-Boyso, R. E. Nunez-Anita, L. K. Kawabe & J. J. V. Alarcon. 2015. Advances in the use of endolysins : general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives. *Formatex*, 259–268.
- Roque, A., A. Molina-Aja, C. Bolán-Mejía & B. Gomez-Gil. 2001. In vitro susceptibility to 15 antibiotics of vibrios isolated from penaeid shrimps in Northwestern Mexico. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(5), 383–7. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00308-9](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00308-9)
- Rodríguez-Noriega , E., G. León-Garnica, S. Petersen-Morfín, H. R. Pérez-Gómez, E. González-Díaz & R. Morfín-Otero. 2014. La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34, 181-190. doi:

<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>

Sachdev, D. , J. M. Chirgwin. 1998. Order of fusions between bacterial and mammalian proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 244: 825-933–7.

Saiz-Velarde, A. 2014. BIOLOGIA 2º - Alfredo Saiz Velarde: mayo 2014. Retrieved April 7, 2018, from <http://bioalfredosaiz.blogspot.mx/2014/05/>

Schmelcher, M., D. M. Donovan, & M. J. Loessner. 2012. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiology*, 7(10), 1147–1171. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.97>

Schmelcher, M. & M. J. Loessner. 2016. Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37(iii), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>

Schmelcher, M., V. S. Tchang & M. J. Loessner. 2011. Domain shuffling and module engineering of Listeria phage endolysins for enhanced lytic activity and binding affinity. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 651–662. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00263.x>

Schmidt, S. R. 2009. Fusion proteins as biopharmaceutical - Applications and challenges. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 12(2), 284-295.

Schmidt, S. R. 2013. Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges. 1st ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Sorgeloos, P. 1995. Bioengineering of hatcheries for marine fish and shellfish. *Journal of Marine Biotechnology*, 3, 42–45. Retrieved from https://www.researchgate.net/profile/Patrick_Sorgeloos/publication/36454681_Bioengineering_of_hatcheries_for_marine_fish_and_shellfish/links/09e4150fd7859c11f8000000/Bioengineering-of-hatcheries-for-marine-fish-and-shellfish.pdf

Teale, C.J. 2002. Antimicrobial resistance and the food chain. *Journal of Applied*

Microbiology Symposium Supplement, 92, 85-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.20.x>

Takeda, Y. 1982. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacology & Therapeutics*, 19(1), 123–146. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(82\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0163-7258(82)90044-4)

Téllez, G. A., & J. C. Castaño. 2010. Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55–67. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(10\)70093-X](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(10)70093-X)

Thireou, T., V. Atlamazoglou, N. Papandreou, M. Lonquety, J. Chomilier & E. Eliopoulos. 2009. Quantitative Prediction of Critical Amino Acid Positions for Protein Folding. *Protein & Peptide Letters*, 16(11), 1342–1349. <https://doi.org/10.2174/092986609789353673>

Trujillo, T., G. Aguirre, J. Sánchez & J. Rábago. 2005. Patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio sp.* en juveniles de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). *Ciencia Y Mar*, IX(27), 11–18. Retrieved from <http://www.umar.mx/revistas/27/vibrio.pdf>

Verkhivker, G. M., D. Bouzida, D. K. Gehlhaar, P. A. Rejto, S. T. Freer & P. W. Rose. 2002. Complexity and simplicity of ligand-macromolecule interactions: The energy landscape perspective. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(2), 197–203. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(02\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00310-X)

Viguera, A. R. 2003. Estructura y estabilidad de proteínas. *Investigación y ciencia*, 70-77.

Vollmer, W. & U. Bertsche. 2008. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1778(9), 1714–1734. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2007.06.007>

Walmagh, M. & B. Boczkowska. 2013. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages, 4369–4375. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4294-7>

- Walmagh, M., B. Boczkowska, B. Grymonprez, Y. Briers, Z. Drulis-Kawa & R. Lavigne. 2013. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4369–4375. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4294-7>
- Walsh, G. 2007. Protein engineering. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35(1), 2-8.
- Yang, D. C., K. Tan, A. Joachimiak, & T. G. Bernhardt. 2012. A conformational switch controls cell wall-remodelling enzymes required for bacterial cell division. *Molecular Microbiology*, 85(4), 768–781. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08138.x>
- Yang, H., J. Yu, & H. Wei. 2014. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(OCT), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00542>
- Yang, Z., K. Lasker, D. Schneidman-Duhovny, B. Webb, C. C. Huang, E. F. Pettersen, T. D. Goddard, E. C. Meng, A. Sali & T. E. Ferrin. 2012. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: An integrated modeling system. *Journal of Structural Biology*, 179(3), 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.006>
- Yeaman, M. R. & N.Y. Yount. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), 27–55. <https://doi.org/10.1124/pr.55.1.2>
- Yu, K., L. Chengcheng, K. Byung-Gee & L. Dong-Yup. 2014. Synthetic fusion protein design and applications. *Biotechnology Advances*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.005>
- Zermeño-Cervantes, L. 2012. Inducción de susceptibilidad a endolisinas mediante la permeabilización de la membrana externa de bacterias Gram-negativas. Tesis de maestría. *Instituto Politécnico Nacional*.
- Zhang, M., S. Karra, & W. Gorski. 2014. Electrochemical Coupled-Enzyme Assays at Carbon Nanotubes. *Analytical Chemistry*. 86(18), 9330-9334.

Zorriehzahra, J. & R. Banaederakhshan. 2015. Early Mortality Syndrome (EMS) as new Emerging Threat in Shrimp Industry. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 3, 64–72.