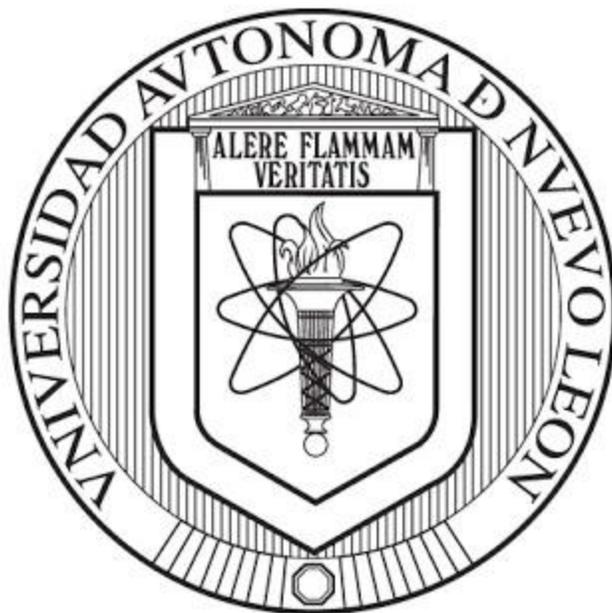


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN AISLADOS  
CLÍNICOS DE *Serratia marcescens***

**POR**

**BIOL. KARLA LIZETH DE ANDA MORA**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**JUNIO, 2021**

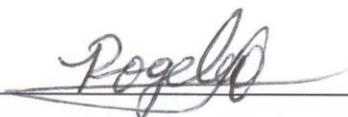
**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN AISLADOS  
CLÍNICOS DE *Serratia marcescens***

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. Angel Andrade Torres**  
Director de Tesis



---

**Dr. Rogelio de Jesús Treviño Rangel**  
Co-director de Tesis



---

**Dr. Miguel Angel Becerril García**  
Miembro de la comisión



---

**Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

# **ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Serratia marcescens***

Presentado por:

Biol. Karla Lizeth De Anda Mora

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Angel Andrade Torres. Y contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT SA1435-20



---

Dr. C. Angel Andrade Torres  
Director de Tesis

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN AISLADOS  
CLÍNICOS DE *Serratia marcescens***

**BIOL. KARLA LIZETH DE ANDA MORA FUE BECARIO DEL  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT)  
CON EL NÚMERO DE REGISTRO 1004858**

## **DEDICATORIA**

**A MI AMADA FAMILIA.  
CELIA MORA IZAGUIRE, JOSÉ ANTONIO DE ANDA MENDOZA Y ANGIE DE  
ANDA MORA.  
POR SER MI PILAR E INSPIRACIÓN PARA SEGUIR PREPARÁNDOME.  
GRACIAS.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Angel Andrade Torres, por su infinita paciencia en el desarrollo y revisión de este proyecto y por siempre tener la disposición de compartir sus conocimientos.

A la Dra. Gloria González por su siempre distinguida amabilidad y disposición para lo necesario, por habernos recibido en el departamento y por su gran apertura a seguir apoyando cada paso de nosotros como alumnos.

A los miembros de mi comisión de tesis, el Dr. Rogelio Treviño y el Dr. Miguel Angel Becerril por su disponibilidad siempre y su amabilidad constante.

A CONACYT y PAICYT por proveer los fondos que hicieron de mis estudios y este proyecto una realidad.

A todos los doctores del departamento por compartir con nosotros sus conocimientos y experiencias y en especial al Dr. Alejandro Sánchez por ofrecer siempre su oído y ser un gran apoyo desde el día cero de mi ingreso a maestría, le estoy eternamente agradecida.

A los Fer's de Micro Sanitaria. Sin su ayuda habría estado perdida. Muchísimas gracias por compartir su experiencia, Fer Flores por tu enorme paciencia en las primeras etapas de proyecto y Fer Espinosa por siempre hacer el ambiente ameno.

Para mis compañeros de posgrado: Anita (que la lloradera en WhatsApp no termine), Orlando, Gera, Martín (¡de verdad, gracias! Me has ayudado muchísimo), Luis, Caro, Wilson (corazoncito coreano), Liz, Joan y por supuesto Juan ("la vida se arregla sola, tú sólo rockanrolea" lema de vida), que han sido grande, ENORME

apoyo durante el trayecto de maestría, he aprendido mucho de cada uno de ustedes y los admiro mucho, no me caben los agradecimientos, los love you.

A mi hermana Angie, mi mejor amiga, mi otra mitad. Te amo infinitamente y agradezco cada día por tenerte a mi lado. Muchas gracias por siempre estar disponible, por siempre tener la paciencia para atenderme y sólo por existir.

A mi mami, Celia, porque siempre estás dispuesta a escucharme y porque veo en tus ojos el brillo del orgullo de madre. Gracias, mamita, por todo, todo te lo debo, pero siempre en el camino busco la manera de recompensar tus sacrificios. Te amo.

A mis amigos incondicionales Raúl, Celene, Karen, Vane, Gaby, Chuy Medina, Laura González y mi prima/amiga/gemeli Laura Mora. Siempre son mi escape del estrés y siempre están ahí para mí, los love you mucho.

A mi familia en el día a día Rem y Vainilla, mis gatitas, que son también una base fundamental.

Y a Mauricio Olvera, porque estuviste conmigo estos dos años llenos de sacrificio y apoyo incondicional, gracias, por tanto.

## ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 <i>Serratia marcescens</i> .....	1
1.2 Epidemiología de <i>S. marcescens</i> .....	2
1.3 Resistencia antibiótica .....	4
1.4 Patogénesis y factores de virulencia de <i>S. marcescens</i> .....	5
1.5 Capacidad proteolítica de <i>S. marcescens</i> .....	7
1.6 Serralisina de <i>S. marcescens</i> .....	9
1.7 Proteasas tipo Serralisina en <i>S. marcescens</i> .....	12
1.8 Regulación de genes codificantes de proteasas en <i>S. marcescens</i> .....	13
1.9 Modelos de estudio .....	15
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. HIPÓTESIS .....	18
4. OBJETIVOS .....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	20
5.1 Cepas bacterianas .....	20
5.2 Actividad proteolítica en agar .....	21
5.3 Precipitación de proteínas secretadas por <i>S. marcescens</i> .....	21
5.4 Análisis de proteínas secretadas .....	22
5.5 Actividad proteolítica en zimogramas.....	22
5.6 Purificación de ADN cromosómico.....	23
5.7. Purificación de ADN plasmídico .....	24
5.8. Preparación de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ electrocompetentes.....	25
5.9. Electroporación de células <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ electrocompetentes .....	26
5.10. Amplificación de <i>prtS</i> , <i>slpB</i> , <i>slpD</i> y <i>slpE</i> .....	26
5.11. Clonación de <i>slpB</i> .....	27
5.12 Extracción y purificación de ARN .....	27
5.13 Síntesis de cDNA .....	28
5.14 PCR en tiempo real.....	29

5.15 Identificación de proteínas por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1 Actividad proteolítica .....	31
6.1.1 Actividad Proteolítica en placa .....	31
6.1.2 Perfil de proteínas secretadas .....	32
6.1.3 Actividad proteolítica en zimogramas .....	33
6.1.4 Identificación de proteínas por Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) .....	37
6.2 Purificación de ácidos nucleicos .....	38
6.2.1 Amplificación y secuenciación de genes de proteasas .....	39
6.2.2. PCR tiempo real.....	44
8. CONCLUSIONES.....	55
9. BIBLIOGRAFÍA .....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
1: Sitio activo de la metaloproteasa PrtS .....	11
2: Resultados de actividad proteolítica.....	32
3: Perfil de proteínas secretadas.....	33
4: Actividad proteolítica en zimogramas de las cepas 30°C y 37°C.....	34
5: Actividad proteolítica en zimogramas en diferente pH .....	35
6: Efecto de inhibidores de proteasas sobre la actividad proteolítica.....	36
7: Identificación de proteasas por LC-MS/MS.....	38
8: ADN cromosómico de las cepas evaluadas .....	39
9: Fragmentos de proteasas para reacciones de qRT-PCR.....	40
10: Reacciones de PCR para los genes de proteasas.....	41
11: Modelos tridimensionales de las proteasas.....	43
12: Expresión relativa de los genes de proteasas.....	45
13: Expresión relativa de los genes de los reguladores de proteasas. ....	45

## LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Cepas y plásmidos .....	20
2. Oligonucleótidos.....	30
3. Cambios en la secuencia aminoacídica de proteasas.....	42

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Serratia marcescens*

*Serratia marcescens* es una bacteria Gram negativa, anaerobio facultativo, móvil, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Puede crecer en un amplio rango de temperaturas (5-40°C) y de pH (5-9), además se caracteriza por la producción de un pigmento rojo llamado prodigiosina. Esta especie fue descrita originalmente en 1819 por el farmacólogo italiano Bizio, reconociéndola como el microorganismo causal del pigmento generado en papilla de maíz [51, 56]. El género *Serratia* consta de 18 especies las cuales pueden ser aisladas de una gran diversidad de nichos, incluyendo suelo, agua, o como agentes patógenos de plantas y artrópodos. *S. marcescens* destaca por su presencia en soluciones y superficies inertes en el ambiente hospitalario, así como por el desarrollo de infecciones nosocomiales oportunistas en pacientes debilitados. [44, 95]. En este contexto, los brotes más importantes asociados a *S. marcescens* ocurren en unidades de cuidados neonatales o de cuidados intensivos, adicionalmente la prevalencia de este patógeno en el ambiente hospitalario favorece la aparición de cepas multidrogo-resistentes [65, 94]. En seres humanos, los sitios anatómicos más comúnmente colonizados por *S. marcescens* son el tracto digestivo, tracto respiratorio y el tracto urinario. Además, la presencia de *S. marcescens* en las uñas del personal dedicado a la salud representa un riesgo de transmisión hacia sujetos vulnerables [21]. En años recientes se ha reportado un notable incremento

en infecciones por especies del género *Serratia* particularmente de las especies *S. liquefaciens*, *S. odorifera* y *S. marcescens*, siendo esta última la más frecuentemente aislada [1]. Actualmente, *S. marcescens* se considera una causa importante de bacteriemia, neumonía, queratitis, endocarditis, meningitis e infecciones de heridas y de vías urinarias [43, 51], afectando principalmente pacientes en cuidados intensivos y neonatos [28, 30].

Se han estudiado diferentes aspectos de *S. marcescens* respecto a su patogenia y virulencia, lo que incluye su capacidad para adherirse a superficies, su hidrofobicidad, su lipopolisacárido (LPS) y los productos secretados al medio. Estos últimos cumplen un papel crucial como factores de virulencia durante el desarrollo de las infecciones por *S. marcescens*, a la fecha se han descrito diversas quitinasas, lipasas, cloroperoxidasa, ADNasa, hemolisina y diferentes proteasas [42, 67]

## 1.2 Epidemiología de *S. marcescens*

Hasta la primera mitad del siglo XX *S. marcescens* era considerado un microorganismo saprófito no dañino, si bien en 1913 se describieron los primeros casos de infecciones por esta bacteria en humanos, es hasta la década de los 50's cuando adquiere un carácter de patógeno oportunista asociado a importantes brotes en el ambiente nosocomial [2, 88]. Las infecciones causadas por *S. marcescens* pueden presentar un amplio rango de manifestaciones clínicas desde colonización asintomática hasta queratitis, conjuntivitis, infecciones en el tracto

urinario, neumonía, infección de herida postquirúrgica, septicemia y meningitis, sin embargo los sitios donde más frecuentemente es aislado este microorganismo es, en orden decreciente, el sistema circulatorio, aparato respiratorio y tracto gastrointestinal [35, 51]. Actualmente, *S. marcescens* representa el tercer patógeno más frecuentemente aislado relacionado a brotes epidémicos en áreas de cuidado neonatal [35].

El programa internacional de vigilancia epidemiológica SENTRY, reportó durante el periodo 1997-2008, a *S. marcescens* como el séptimo patógeno bacteriano asociado a cuadros de neumonía, con una incidencia de 4.1, 3.2 y 2.4% en EUA, Europa y Latinoamérica, respectivamente [43]. Mientras que para el periodo 2009-2011, el programa SENTRY evidenció que el 6.5% de las infecciones ocasionadas por Gram negativos en pacientes de unidades de cuidados intensivos de EUA y Europa, se encuentran relacionadas con *S. marcescens* [75]. Además, reportes recientes muestran un incremento en la incidencia de infecciones por *S. marcescens* en diferentes regiones de Latinoamérica, incluido México [33, 34], se sugiere que dicho incremento se relaciona con la resistencia intrínseca de *S. marcescens* a diferentes antimicrobianos, entre los que figuran  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas, aminoglucósidos, ciprofloxacina, cloranfenicol, polimixinas y tetraciclinas [87]. De acuerdo con lo anterior, la Organización Mundial de la Salud considera a *S. marcescens* como un objetivo prioritario de investigación para el desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas [18]

### 1.3 Resistencia antibiótica

Las cepas de *S. marcescens* relacionadas a brotes epidémicos han sido evaluadas con respecto a su resistencia antibiótica, evidenciando una alta resistencia a distintos antibióticos de uso común incluidos  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos y péptidos antimicrobianos [61, 77]. La resistencia intrínseca de *S. marcescens* está asociada a genes de resistencia antibiótica (ARGs, por sus siglas en inglés), incluidos múltiples genes de bombas de flujo conservados entre distintas cepas de *S. marcescens*, algunos de estos genes se encuentran incluso conservados en todos los miembros del género *Serratia* [12].

De acuerdo con estudios filogenéticos y genómica comparativa entre cepas aisladas de diferentes nichos se ha descrito que las cepas clínicas de *S. marcescens* codifican un mayor número de genes de resistencia adquirida en comparación con las cepas ambientales. La frecuencia general de ARGs entre 32 genomas analizados corresponden a 0.13% genes relacionados a resistencia a macrólidos, 0.54% para sulfonamidas, 3.69% para cloranfenicol, 3.96% para quinolonas, 7.11% para aminoglucósidos, 20.38% para  $\beta$ -lactámicos y 56.22% para péptidos antimicrobianos [77]. Adicionalmente, en Polonia y Taiwán se ha documentado un 19 y 12%, respectivamente, de aislados codificantes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBL) [62] [25]. En México existen pocos estudios formales que aborden la resistencia antimicrobiana de las cepas de *S. marcescens* circulantes, sin embargo, un estudio reciente por González y

colaboradores que involucró 193 aislados clínicos provenientes de ocho centros médicos localizados en el centro y noreste del país reportó un 100% de resistencia a ampicilina, además de una baja susceptibilidad a ciprofloxacina (78.7%) y amikacina (75.6%) [38].

#### 1.4 Patogénesis y factores de virulencia de *S. marcescens*

A la fecha se han descrito diferentes factores que contribuyen a la patogenicidad en *S. marcescens*, entre los que destacan pilis, una hemolisina, LPS y enzimas degradativas extracelulares. La expresión de pilis en *S. marcescens* y bacterias relacionadas juega un importante papel durante la adherencia e invasión del hospedero [70], contribuyendo al establecimiento de un proceso infeccioso [27, 52]. Se ha sugerido la existencia de dos clases de adhesinas asociadas al pili de *S. marcescens*, denominadas resistente y sensible a manosa, respectivamente. Debido a que exhiben un comportamiento diferente en presencia de D-manosa en sangre. En algunas infecciones el daño al tejido es debido al fenómeno inflamatorio localizado, incluida la acción de los leucocitos polimorfonucleares (PMNLs) [10]. En este sentido, Mizunoe y colaboradores tras evaluar cepas de *S. marcescens* causantes de infección en tracto urinario, asociaron la presencia del pili sensible a manosa con la activación de PMNLs, la producción de especies reactivas de oxígeno y la consecuente afectación del tejido urinario [58].

Por otra parte, la hidrofobicidad de *S. marcescens* ha sido vinculada con la capacidad de adherirse a superficies como catéteres y otros plásticos. De acuerdo

con esto, se considera que el pigmento prodigiosina podría funcionar como hidrofobina, en contraparte el aminolípido serratamolida operaría como hidrofílica [6]. No obstante, por ser la hidrofobicidad una característica termodependiente (con el mejor desempeño a 30°C), se sugiere que ésta se pierde durante la invasión de un hospedero humano [4, 73].

El LPS es el mayor componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, cumple con un rol estructural contribuyendo a la rigidez celular y mediando el contacto con el espacio extracelular. Debido a su baja permeabilidad protege a la bacteria de estresores externos como los compuestos antimicrobianos y debido a su papel en la activación del sistema inmune del hospedero es considerado uno de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) [29]. El LPS se compone de tres regiones: el lípido A, la región núcleo y el antígeno O. El antígeno O (somático) es una cadena variable de azúcares, la cual determina el serotipo del microorganismo. En *Serratia* se han descrito 24 antígenos somáticos [36]. La detección del lípido A por parte del hospedero desencadena la liberación de citocinas proinflamatorias al torrente sanguíneo [22, 26]. La respuesta celular del hospedero al LPS es dosis-dependiente, bajas concentraciones de LPS activan el sistema inmune favoreciendo la eliminación del patógeno, mientras que altas dosis de LPS pueden causar fiebre, taquicardia, incluso provocar choque séptico y la muerte [20, 68].

La hemolisina ShIA o serratamolida es un factor ampliamente distribuido y conservado entre las diferentes cepas de *S. marcescens*, su actividad se asocia con la liberación de mediadores inflamatorios por parte de los PMNLs. El gen *shIA*

codifica la hemolisina (165 kDa), mientras que su translocación y activación depende del producto de *shlB*. *In vitro*, la mayor actividad de ShIA se reporta en la etapa tardía de la fase logarítmica [13, 64]. En un modelo murino experimental se evidenció que la cepa de *Escherichia coli* 536/21 recombinante, expresando la hemolisina de *S. marcescens*, fue capaz de colonizar el riñón de ratones 5 veces más rápido que la cepa silvestre [53]. ShIA purificada también es capaz de producir hemólisis en células rojas murinas y de oveja, además resulta citotóxica en líneas celulares de vías aéreas y células epiteliales del limbo corneal [81]. Fenotipos hiper-hemolíticos han sido descritos en cepas de *S. marcescens* mutantes en los genes reguladores *crp* (proteína receptora de AMPc) y *hexS* [81].

*S. marcescens* produce una gran galería de enzimas extracelulares y debido a su naturaleza es un excelente degradador de quitina [60]. La importancia de su actividad de quitinasa radica en que siendo la quitina uno de los componentes principales de los hongos esta puede utilizarse para degradar su pared y ayudar a exterminarlos [19].

### 1.5 Capacidad proteolítica de *S. marcescens*

Las proteasas bacterianas juegan un importante papel en la patogénesis, diversos estudios demuestran que la actividad proteolítica contribuye a la patogenicidad al inactivar los inhibidores de proteasas en plasma, activar la cascada de generación de la bradiquinina favoreciendo la inflamación, activar la cascada de la coagulación sanguínea, escindir inmunoglobulinas (principalmente IgA), degradar

proteínas quelantes de iones; además de inducir una respuesta inflamatoria por la activación del receptor-activado-por-proteasas 2 (PAR2) [45, 49].

En metaloproteasas de zinc (es decir, aquellas que requieren un átomo de zinc para llevar a cabo la catálisis) se ha identificado una secuencia consenso (HEXXHXXGXXH) en la que se ha destacado el rol de las histidinas como el primer y segundo ligando del zinc. Además, se piensa que el dominio HEXXH actúa como base general durante la catálisis, transfiriendo un protón de la molécula del agua a la amida del enlace peptídico escindible [93]. Por otro lado, el tercer ligando del zinc ayuda a clasificar la familia a la que pertenecen estas enzimas como termolisinas, neurotoxinas y serralisinas.

Los miembros de la familia de las serralisinas (metaloproteasas secretadas por *Serratia* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y *Erwinia chrysanthemi*) se caracterizan por no poseer un pro-peptido convencional y su transporte es respaldado por proteínas secretadas adicionales. Estas enzimas se pueden dividir en dos dominios de aproximadamente 240 residuos cada uno; un dominio catalítico N-terminal, conteniendo la región de unión de zinc y un dominio estructural C-terminal, compuesto de múltiples repetidos tipo RTX (*Repeats in Toxin*) caracterizados por regiones ricas en glicina y aspartato que unen iones  $Ca^{2+}$  [41]. Las serralisinas poseen propiedades amidolíticas hacia sustratos péptido-4-metil-cumaril-7-amida, los cuales han sido ampliamente utilizados para evaluar la actividad enzimática de serin- y cisteín-proteasas [57, 97].

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae* la secreción de proteasas al medio no es un fenómeno muy común, dichas proteínas normalmente permanecen en el

espacio periplásmico o se integran a la membrana externa. No obstante, *S. marcescens* se distingue por la secreción de proteasas a través de un sistema de secreción tipo I, mecanismo común empleado por las enzimas de tipo RTX [47, 79].

En 1984 Doerr y Traub reportaron dos proteasas de aproximadamente 54 kDa como las principales enzimas secretadas por las cepas clínicas de *S. marcescens* SF178 y SH186, capaces de hidrolizar caseína a pH 6-10 y 30°C [31]. No obstante, diferentes condiciones de actividad proteolítica óptima se han reportado entre las cepas de *S. marcescens* para la hidrólisis del mismo sustrato, por ejemplo pH 10 y 37°C, además dicha actividad se describe como dependiente de CaCl<sub>2</sub> [74]. También se ha reportado que *in vitro*, la mayor relación proteasas secretadas-número de células viables de *S. marcescens* se presenta en la fase estacionaria [14].

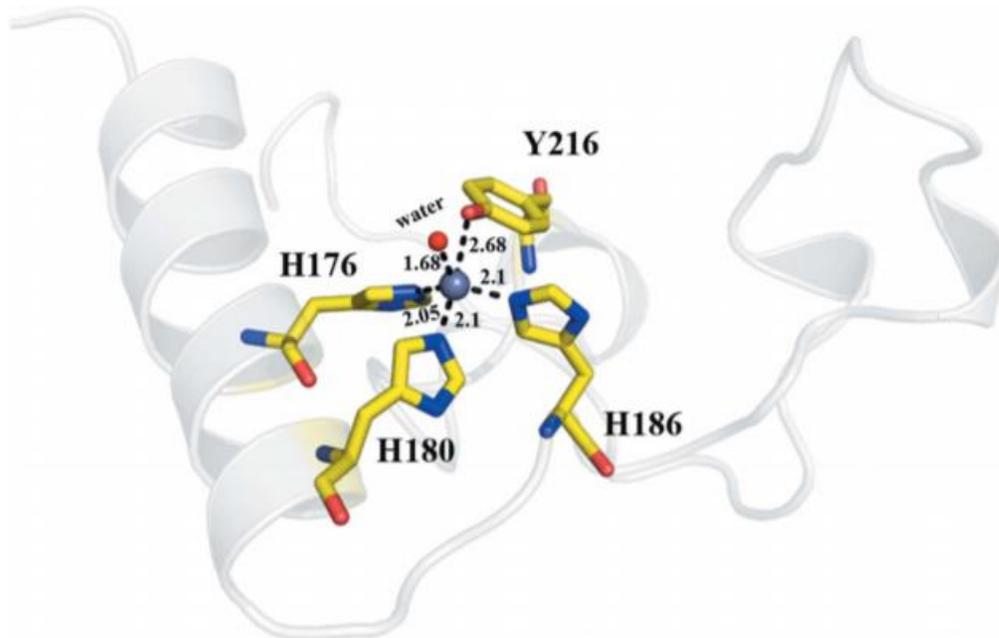
La actividad y presencia de algunas proteasas está sujeta a cambios en las condiciones del medio de crecimiento, en *S. marcescens* ATCC 25419 variaciones en pH y temperatura revelaron sólo dos tipos de proteasas, una metaloproteasa que se expresa en grandes cantidades y una proteasa de serina expresada en poca proporción [72].

#### 1.6 Serralisina de *S. marcescens*

Como se ha mencionado, diversos reportes muestran una enzima de ~50 kDa como la proteasa mayormente secretada por *S. marcescens*, esta enzima ha sido

denomina serralisina o PrtS y cuenta con una amplia investigación sobre su potencial aplicación terapéutica [3]. De acuerdo con la cepa de *S. marcescens* en cuestión, la masa de PrtS varía entre 50-56 kDa [3, 8, 67]. En la literatura, hasta tres bandas con actividad proteolítica diferentes han sido atribuidas a PrtS en geles de sustrato o zimogramas [5, 23]. Sin embargo, dicho patrón proteolítico se encuentra poco caracterizado y pocas metaloproteasas producidas por *S. marcescens* han sido evaluadas por medio de esta técnica.

PrtS presenta mayor afinidad por aminoácidos hidrofóbicos pequeños-medianos en la posición P1' (especialmente Gly y Ala), además de residuos hidrofóbicos en las posiciones P2 y P2'. Semejante a otros miembros de la familia RTX, las serralisinas poseen un motivo repetido de GGXGXDXLX y carecen de cisteínas [7]. El sitio activo de la enzima consiste en cinco tiras  $\beta$ -plegadas y dos  $\alpha$ -hélices seguido por un dominio desorganizado y una  $\alpha$ -hélice justo antes de que la cadena peptídica se estructure en el dominio  $\beta$ -sándwich. Como se mencionó anteriormente, es importante destacar la importancia de las histidinas en el sitio ligando de zinc. En PrtS los ligandos se disponen de manera trigonal bipyramidal (Figura 1), donde la molécula de agua junto con las histidinas 176 y 186 operan como ligandos ecuatoriales mientras que la tirosina 216 como un ligando axial [8, 40]. Un mecanismo de acción de la serralisina ha sido propuesto confiriéndole la base general de la actividad catalítica a la tirosina 216 como ligando del zinc; sin embargo, el rol específico de esta tirosina en el sitio catalítico de la enzima aún no ha sido clarificado [8, 93].



**Figura 1:** Sitio activo de la metaloproteasa PrtS. Los residuos catalíticos Histidina (H)176, H180, H186 y Tirosina (Y)216 se muestran en amarillo, en gris se muestran las tiras β-plegada y α-hélices. Tomado de Dongxia Wu *et al.*, 2016 [92]

Durante la escisión de la cadena β de la insulina, la serralisina se une específicamente sobre los puentes peptídicos Asn-Gln, CysSO<sub>3</sub>H-Gly, Arg-Gly y Tyr-Thr 27 [50]. Mientras que la fibronectina de puerco cuenta con cuatro sitios comunes de escisión: en 2 de 9 puentes Arg-Thr, 1 de 11 Leu-Ser y en 1 de 7 Gln-Glu [59]. Por otra parte, la afinidad de escisión de inmunoglobulinas en *S. marscecens* se describe en el siguiente orden descendente: IgG<sub>3</sub> > IgA<sub>1</sub> > IgG<sub>1</sub> > IgG<sub>2</sub> > IgG<sub>4</sub> > IgA<sub>2</sub> [49].

## 1.7 Proteasas tipo Serralisina en *S. marcescens*

Se han identificado otras proteasas que se proponen como factores adicionales en la patogenicidad de *S. marcescens*, por su similitud con PrtS estas enzimas se han denominado proteasas tipo serralisina o Slp (por sus siglas en inglés). Un análisis bioinformático del genoma de la cepa DB11 evidenció tres genes homólogos a *prtS*, los cuales fueron denominados *slpB*, *slpC* y *slpD* [80]. En *S. marcescens* PIC3611 (cepa con baja producción de proteasas), la sobreexpresión de *prtS* y *slpB* indujo citotoxicidad sobre una línea celular de carcinoma pulmonar, mientras que la eliminación de estos genes provocó un fenotipo proteolítico y citotóxico deficiente en líneas celulares humanas [80].

La actividad de SlpB sobre la línea celular A549 (células epiteliales basales alveolares humanas de adenocarcinoma) se ha reportado comparable a la actividad de PrtS [80]. En cepas de *S. marcescens* carentes de PrtS o SlpB se reporta una única banda proteolítica alrededor de los 50 kDa, lo que sugiere que ambas proteasas migran de manera muy semejante en geles de poliacrilamida [80].

Por otra parte, las proteasas SlpC y SlpD se encuentran poco estudiadas, se ha descrito que presentan una capacidad proteolítica menor en comparación con PrtS y SlpB [80]. Adicionalmente, un estudio reciente caracterizó una proteasa adicional tipo serralisina, SlpE. En 42 aislados de *S. marcescens* se encontró un 60% de positividad para el amplicón *slpE*, debido a que el 67% de los aislados *slpE* positivos tenían un origen clínico, se atribuye una mayor distribución de este gen

entre cepas clínicas. La inducción de la expresión de *slpE* en *S. marcescens* PIC3611 elevó su actividad proteolítica, mientras que la mutación del gen *slpE* en *S. marcescens* K904 redujo significativamente su capacidad proteolítica. Asimismo, la actividad de SlpE demostró niveles citotóxicos similares a los de PrtS sobre la línea celular A549 [85]. El estudio de estas proteasas resulta relevante ya que pueden contribuir de manera significativa al daño celular en el hospedero en condiciones *in vivo* [85].

### 1.8 Regulación de genes codificantes de proteasas en *S. marcescens*

En *S. marcescens* la regulación de la expresión de *prtS* y genes relacionados se encuentra poco estudiada, sin embargo, se han descrito a los sistemas de dos componentes CpxAR y EepRS como reguladores directos de dichos genes. El sistema CpxAR se ha implicado en la regulación negativa de diferentes factores de virulencia de *S. marcescens*, debido a que su distribución no está sujeta al nicho de aislamiento se sugiere que la regulación mediada por CpxAR se encuentra conservada en *Serratia* y otros géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae* [18, 24]. En *E. coli* por ejemplo, el sistema CpxAR participa en la regulación de la expresión de más de 100 genes [69]. El sistema CpxAR se compone de la histidinkinasa CpxA y el regulador de respuesta CpxR. La autofosforilación de CpxR deriva en la transferencia del grupo fosfato a CpxR y en la inhibición transcripcional de *prtS* y otros genes. La auto-fosforilación de CpxA responde a una gran variedad de estímulos como pH y sobre-expresión de algunas proteínas

de membrana [18]. Además, en *S. marcescens* el sistema CpxAR se encuentra más activo a 37°C [18].

En contraparte, el sistema EepRS en *S. marcescens* regula positivamente diferentes factores de virulencia como la hemólisis, motilidad tipo *swarming*, producción de pigmento y producción de exoenzimas [86]. Este sistema se compone por la histidin-cinasa EepS y el regulador de respuesta EepR. Se ha demostrado que EepR activa la transcripción de *prtS* y *slpB*. La eliminación de *eepR* en las cepas de *S. marcescens* CM2097 y CM2904 resulta en una reducción del 50% en la expresión de *slpB* [17]. Asimismo, en un modelo deficiente del transposón *eepR* y *eepS* se caracterizó un fenotipo carente de secreción de proteasas [17].

Por otra parte, en la cepa de *S. marcescens* 274 la eliminación de *hexS*, un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR, derivó en la disminución de prodigiosina, serrawetina y de la actividad de quitinasas, ADNsas y proteasas [89]. Además, se ha demostrado la unión directa de HexS a la región río arriba del operón *pig*, el cual codifica los elementos productores del pigmento prodigiosina [39]. Por otra parte, la expresión de *eepR* y *prtS* se incrementa 2.4 y 37 veces, respectivamente, en una cepa mutante en *hexS*, lo que sugiere una regulación negativa por parte de HexS sobre estos genes. Asimismo, se sugiere que EepR regula negativamente de manera indirecta la expresión de *hexS* [82].

## 1.9 Modelos de estudio

Un estudio epidemiológico reciente que involucró 193 aislados clínicos de *S. marcescens* a partir de 8 centros médicos distintos localizados en el centro y en el noreste de México evidenció una alta resistencia a ciprofloxacina y aminoglucósidos, así como una amplia prevalencia de la  $\beta$ -lactamasa TEM-1 [38]. Adicionalmente, el análisis comparativo de los factores de virulencia de 185 de estos aislados reveló que aquellos aislados provenientes de tracto respiratorio y heridas presentan la mayor actividad proteolítica, así como una alta producción de biopelícula [37]. Dentro de estas cepas destaca la denominada hiperproteolítica, *S. marcescens* HU1848, además de la cepa EB042 que proviene de una herida de pelvis y la cepa SM002 proveniente de líquido cefalorraquídeo.

La cepa SmUNAM836, un aislado clínico proveniente del Centro Médico Nacional Siglo XXI de Ciudad de México, es una cepa no pigmentada y resistente a múltiples antibióticos incluidas las penicilinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y polimixina B, pero susceptible a cefalosporinas y carbapenémicos. Este aislado proviene de un aspirado bronquial de un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y se distingue por ser la primera cepa de *S. marcescens* aislada en México en contar con la secuencia completa de su genoma [78].

Debido al importante papel de las proteasas de *S. marcescens* durante el establecimiento de un proceso infeccioso, en este trabajo de investigación se llevó a cabo la caracterización de la actividad proteolítica de las cepas HU1848, EB042 y SM002 (descritas por nuestro grupo de investigación como altamente productoras

de proteasas), así como de la cepa de origen mexicano que cuenta con su genoma secuenciado, SmUNAM836, con el objetivo de entender los mecanismos moleculares asociados con dicho fenotipo. Los resultados obtenidos muestran un patrón de tres proteínas secretadas con actividad proteolítica en todas las cepas y sugieren una desregulación del regulador de respuesta *eepR* y del gen *slpE* en las cepas de *S. marcescens* SM002, HU1848 y SmUNAM836.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones ocasionadas por *S. marcescens* ponen en riesgo la vida de recién nacidos y personas inmunosuprimidas cada año. Pocos estudios abordan la prevalencia y los factores de virulencia asociados a este patógeno que ha sido declarado un microorganismo prioritario para el desarrollo de nuevos antibióticos dada su importancia como patógeno emergente y su multi-farmacoresistencia.

Distintos factores de virulencia han sido descritos para *S. marcescens* entre estos, las lipasas, ADNasas, hemolisinas y fimbrias le permiten establecer infecciones en el hospedero. Sin embargo, también se han descrito a las proteasas secretadas por *S. marcescens* como elementos cruciales para su virulencia, no obstante, existen pocos estudios que aborden la prevalencia y regulación de las mismas.

Evaluar la actividad proteolítica de diferentes aislados clínicos de *S. marcescens* y la regulación transcripcional de los genes codificantes de proteasas puede ayudar a comprender el papel de estas enzimas durante el proceso de colonización de un hospedero y el desarrollo de una infección.

### 3. HIPÓTESIS

- a) Existen diferencias en los perfiles de proteínas con actividad proteolítica en las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848 y SM002 en comparación con cepas con baja actividad proteolítica.
  
- b) La elevada actividad proteolítica de las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848, SM002 es consecuencia de una mayor transcripción de los genes *prtS*, *slpB*, *slpD* y/o *slpE*, o alteraciones en la transcripción de los reguladores *eepR*, *cpxR* y/o *hexS*.

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Comparar los perfiles proteolíticos y los niveles de expresión de los genes *19rtS*, *slpB*, *slpE*, *eepR*, *cpxR* y *hexS* de las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848, SM002 y SmUNAM836.

### Objetivos específicos

- Comparar los perfiles de actividad proteolítica de las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848, SM002 y SmUNAM836 mediante zimogramas incubados a diferentes temperaturas, pH y en presencia de inhibidores.
- Determinar los niveles de expresión de los genes *19rtS*, *slpB*, *slpD*, *slpE*, *eepR*, *cpxR* y *hexS* en las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848, SM002 y SmUNAM836 mediante qRT-PCR.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se enlistan en la tabla 1. Las bacterias fueron cultivadas a 30°C o 37°C según correspondiera en medio Luria Bertani (LB, 10 g peptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl). Cuando se requirió, el medio fue suplementado con ampicilina [200 µg ml<sup>-1</sup>] o tetraciclina [25 µg ml<sup>-1</sup>]. Todas las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se conservaron en medio LB con 15% de glicerol a -70°C.

Tabla 1. Cepas y plásmidos

Cepa	Descripción	Fuente/ Referencia
<b>Cepas de <i>Escherichia coli</i></b>		
<b>DH5α</b>	F-φ 80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17(rK_ mK+) supE44 thi-1 ΔgyrA96 relA1	Stock de laboratorio
<b>Cepas de <i>S. marcescens</i></b>		
<b>SM018</b>	Aislado clínico de hemocultivo, Hospital San José-Tec de Monterrey	[38]
<b>EB042</b>	Aislado clínico de herida pelvis, Instituto Nacional de Rehabilitación	[38]
<b>SM002</b>	Aislado clínico de líquido cefalorraquídeo, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	[38]
<b>HU1848</b>	Aislado clínico de tracto respiratorio, Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”	[38]
<b>SMUNAM836</b>	Aislado clínico de expectoración bronquial, Centro Médico Nacional Siglo XXI	[78]
<b>Plásmidos</b>		
<b>pET19b</b>	Vector de clonación que incorpora 10x histidinas en el amino terminal. Ampicilina resistente.	Novagen

## 5.2 Actividad proteolítica en agar

Cinco gramos de medio de cultivo Infusión Cerebro Corazón (BHI) se resuspendieron en 10 mL de H<sub>2</sub>O, la suspensión se dializó con 100 ml de H<sub>2</sub>O durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, se agregó agar al 3% al producto de la diálisis y se esterilizó a 15 lb por 15 min 121°C. El medio BHI dializado estéril se mantuvo a 60°C y se añadió leche descremada estéril al 3% en proporción 1:1 v/v. La solución fue mezclada hasta su homogenización y distribuida en cajas Petri. Cada caja se incubó con 2 µL de un cultivo joven en caldo LB OD<sub>595</sub> 1.0. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h, las zonas claras correspondientes al halo de actividad proteolítica se registraron.

## 5.3 Precipitación de proteínas secretadas por *S. marcescens*

En 100 mL de caldo LB se inocularon 100 µL de un cultivo de toda la noche en LB con ampicilina de la cepa de interés. El cultivo se incubó a 30°C en agitación a 300 rpm durante 16 h. Posteriormente, las células se separaron mediante centrifugación, 1 100 x g a 4°C durante 40 min. El sobrenadante se filtró con una membrana de 0.22 µm y se transfirió a un vaso de precipitado. Manteniendo agitación constante se añadieron 38 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de forma gradual. La mezcla se incubó en agitación por 30 min a 4°C. Finalmente, se centrifugó a 1 100 x g a 4°C por 40 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 200 µL de amortiguador salino de fosfatos (PBS). Se agregó glicerol a una concentración final de 10% y se cuantificó la concentración de proteínas por el

método colorimétrico de Bradford (Bradford ULTRA Reagent®) en placas de 96 pozos en lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader). La solución fue almacenada a -20°C hasta su posterior uso.

#### 5.4 Análisis de proteínas secretadas

Las mezclas de proteínas secretadas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) a 120 V por 120 min. Se utilizaron 4 µg totales de la solución de proteínas secretadas de cada una de las cepas de interés. Las proteínas fueron visualizadas mediante tinción con azul de Coomasie (0.25 g azul de Coomasie, 450mL etanol, 450 mL H<sub>2</sub>O, 100 mL ácido acético [CH<sub>3</sub>COOH]).

#### 5.5 Actividad proteolítica en zimogramas

Para la preparación de geles de zimograma se utilizaron como base geles de poliacrilamida al 12% co-polimerizados con 0.15% gelatina. Las mezclas de proteínas secretadas se separaron en una cámara de electroforesis Mini Prep (Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell) a 120 V por 120 min a 4°C. Los geles se lavaron por 15 min en solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 1.25% Tritón X-100). Posteriormente, se incubaron por 1 h a 30 o 37°C en amortiguador de incubación (50mM Tris-HCl, 5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 10 µM ZnCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij-35). Cuando fue necesario se adicionó al amortiguador de incubación 50 o 100 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o 2mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF),

y se ajustó el pH [6.5-8.8]. Los geles fueron revelados mediante tinción con azul de Coomasie (2.5 g azul de Coomassie, 450 mL etanol, 450 mL H<sub>2</sub>O, 100mL ácido acético [CH<sub>3</sub>COOH]) por 10 min.

### 5.6 Purificación de ADN cromosómico

La extracción y purificación del ADN cromosómico de cada una de las cepas de interés se llevó a cabo mediante el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Brevemente, a partir de un cultivo joven de la cepa de interés en medio LB suplementado con ampicilina las células se colectaron mediante centrifugación a 20 800 x g por 1 min. La pastilla se resuspendió en 600 µL de buffer de lisis y se incubó a 80°C por 5 min, posteriormente se añadieron 3 µL de ARNasa y se mezcló por inversión. La solución se incubó a 37°C por 60 min y se agregaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas, la solución se mezcló mediante vórtex de manera vigorosa y posteriormente se dejó reposar en hielo por 5 min. La mezcla se centrifugó a 20 800 x g por 2 min a temperatura ambiente y la fase acuosa se separó cuidadosamente en un tubo nuevo. Se añadieron 600 µL de isopropanol y se centrifugó a 20 800 x g por 2 min. El sobrenadante se descartó y se añadieron 600 µL de 70 % etanol. La mezcla se centrifugó a 20 800 x g por 2 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se calentó hasta secarse por completo y posteriormente se resuspendió en 50 µL de H<sub>2</sub>O y se almacenó a -20°C. La concentración y pureza del ADN se cuantificó usando NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™)

## 5.7. Purificación de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el estuche comercial Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Jena Bioscience®) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. A partir de un cultivo de la cepa portadora del plásmido de interés de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes se colectaron las células mediante centrifugación (20 800 × g). La pastilla se resuspendió en 300 µl del buffer de lisis. Posteriormente se añadieron 300 µl de amortiguador de neutralización mezclando por inversión inmediatamente. La mezcla se centrifugó 10 min a 20 800 × g. El sobrenadante se transfirió a la columna previamente activada y se centrifugó a 20 800 × g durante 1 min. El lavado de la columna se realizó en dos ocasiones con una solución etílica proporcionada por el fabricante. Para finalizar, el ADN se eluyó con 35 µl de H<sub>2</sub>O estéril precalentada a 50°C.

En algunos casos la purificación de ADN plasmídico se realizó mediante extracción por lisis alcalina siguiendo la metodología reportada por Birnboim y Doly [11]. A partir de un cultivo de la cepa portadora del plásmido de interés en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, se colectaron las células mediante centrifugación a 20 800 × g. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µl de solución de lisis alcalina I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) en frío, agitando vigorosamente. Posteriormente se añadieron 200 µl de solución de lisis alcalina II (0.2 N NaOH, 1% SDS) en frío, mezclando por inversión inmediatamente. A continuación, se añadieron 150 µl de solución de lisis alcalina III (5 M acetato de potasio, 5 M ácido

acético) en frío, mezclando por inversión y dejando reposar el tubo en hielo por 5 min. El lisado bacteriano se centrifugó a 20 800 × g por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de una solución fenol/cloroformo (1:1), mezclando por inversión y la emulsión se centrifugó a 20 800 × g por 2 min a 4°C. La fase acuosa se separó y se añadió un 1 volumen de isopropanol frío dejando reposar la mezcla por 2 min. La mezcla se centrifugó a 20 800 × g 5 min a 4°C eliminando el sobrenadante. Se realizó un lavado de la pastilla con 1 ml de etanol al 70% y la pastilla resultante se secó a 60°C durante 1 min. Para finalizar, la pastilla se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O estéril y el ADN purificado se conservó a -20 °C.

En todos los casos la integridad del material genético se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio [10 mg ml<sup>-1</sup>] y se visualizaron en el fotodocumentador (MultiDoc-It™ Imaging Systems UVP)

#### 5.8. Preparación de células *E. coli* DH5α electrocompetentes

Se realizó la siembra de la cepa *E. coli* DH5α en agar LB, mediante estría cruzada, y se incubó a 37°C durante 12 h. Posteriormente se tomaron colonias aisladas de los últimos dos cuadrantes y se resuspendieron en 1 ml de caldo LB. Esta suspensión se agregó a un matraz con 150 ml de caldo LB y se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.4. A continuación, la suspensión bacteriana se centrifugó a 1 100 × g a 4°C por 30 min. El sobrenadante se eliminó en condiciones de esterilidad y la pastilla se resuspendió

con 100 ml de H<sub>2</sub>O estéril fría. La suspensión se centrifugó nuevamente y se resuspendió con 50 ml de H<sub>2</sub>O estéril fría. Este último paso se repitió una vez más y posteriormente las células se resuspendieron con 10 ml de 20% glicerol frío. La suspensión se centrifugó en las mismas condiciones y la pastilla se resuspendió con 1.5 ml de 20% glicerol frío. Las células se alicuotaron y se congelaron inmediatamente a -70°C.

#### 5.9. Electroporación de células *E. coli* DH5α electrocompetentes

La electroporación de las células *E. coli* DH5α se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito por Dower *et al.* con ligeras modificaciones [32] Las células electrocompetentes *E. coli* DH5α se descongelaron en hielo, se añadieron 2-3 μl de plásmido o de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 1 min. La mezcla se transfirió a celdas de electroporación frías y estériles. Posteriormente se aplicó un pulso eléctrico de 1800 V (Eppendorf® Electroporator 2510). Inmediatamente posterior al pulso eléctrico, se adicionaron 800 μl de medio LB estéril y la suspensión se incubó por 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Finalmente, las células se sembraron en placas de agar LB suplementadas con el antibiótico correspondiente.

#### 5.10. Amplificación de *prtS*, *slpB*, *slpD* y *slpE*

A partir de ADN cromosómico se llevaron a cabo las reacciones de PCR punto final de los genes *prtS*, *slpB*, *slpD* y *slpE* con los oligos correspondientes (Tabla 2) en el equipo T100 Thermal Cycler (Bio Rad™) siguiendo las siguientes

condiciones: 95°C, 5 min; 30 ciclos (95°C, 30 seg; 65°C, 40 seg; 72°C, 90 seg); 72°C, 5 min y 20°C, 5 min. Los productos fueron purificados con el estuche comercial (E.Z.N.A.® Cycle Pure Kit, Omega Bio-tek) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuenciación de los genes amplificados se realizó mediante secuenciación tipo Sanger de ADN en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, IPICYT.

#### 5.11. Clonación de *slpB*

Partiendo de ADN cromosómico de la cepa *S. marcescens* EB042 y utilizando los oligonucleótidos 234 y 235 se amplificó y limpió el producto deseado como se describió anteriormente. El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas *NdeI* y *XhoI* durante 2 h y posteriormente se ligó al vector pET19b similarmente digerido durante 16 h a 4°C utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific™).

#### 5.12 Extracción y purificación de ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante el estuche comercial Total RNA Purification Kit – Column Kit (Jena Bioscience®) según las recomendaciones del fabricante. A partir de un cultivo joven de la cepa de interés en medio LB suplementado con ampicilina se inoculó un nuevo tubo hasta alcanzar una  $DO_{595}$  de 0.1, estos nuevos cultivos se incubaron a 30°C y en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{595}$  de 1.0, posteriormente las células se colectaron mediante centrifugación a 20800 x g por 1 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se

resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis y se mezcló mediante vórtex vigorosamente. La columna fue activada con 80  $\mu\text{L}$  del buffer de activación y posteriormente se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol a la preparación celular, la parte acuosa fue trasladada a la columna pre-activada y se centrifugó a  $20\ 800 \times g$  por 30 seg. Posteriormente se hicieron dos lavados con las soluciones etílicas proporcionadas por el fabricante, por último, el ARN se eluyó con 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril. Para prevenir la contaminación del ARN purificado con ADN, las preparaciones se trataron con el estuche comercial gDNA Removal Kit (Jena Bioscience®). A partir de 44  $\mu\text{L}$  de ARN purificado se agregaron 5  $\mu\text{L}$  del buffer de reacción y 1  $\mu\text{L}$  de la enzima gDNA remover. La mezcla se incubó por 15 min a  $37^\circ\text{C}$  y posteriormente 5 min a  $58^\circ\text{C}$  para la inactivación de la ADNsa. El ARN puro resultante fue almacenado a  $-70^\circ\text{C}$  para su posterior uso. La pureza del ARN resultante se confirmó usándolo como templado en reacciones de qRT-PCR.

### 5.13 Síntesis de cDNA

Para cada reacción se tomaron 500 ng de ARN purificado, se adicionó 200 ng de Random Hexamers (Invitrogen™) y 200  $\mu\text{M}$  de dNTP Mix (Thermo Scientific™). Esta solución se incubó por 5 min a  $65^\circ\text{C}$  e inmediatamente se transfirió a hielo. Se añadieron 4  $\mu\text{L}$  del buffer y 2  $\mu\text{L}$  de DTT 100mM, esta mezcla se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente para finalmente agregar 1  $\mu\text{L}$  de SuperScript III RT y se mezcló por agitación. Posteriormente en termociclador T100 Thermal Cycler (Bio Rad™) se llevó a cabo un protocolo de 4 pasos en el siguiente orden:  $25^\circ\text{C}$  por 10 min,  $42^\circ\text{C}$  por 50 min,  $70^\circ\text{C}$  por 15 min y  $4^\circ\text{C}$  por 2 min. El cADN fue almacenado a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior uso.

#### 5.14 PCR en tiempo real

Todos los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR tiempo real se enlistan en la Tabla 2. Cada mezcla de reacción conteniendo 200 ng de cADN, 10mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5µM 0.15µM del oligonucleótido correspondiente, 25µL Master Mix, siguiendo las siguientes condiciones: 95°C 5 min, 40 ciclos (95°C 10 seg, 60°C 30seg y 72°C 20 seg) en el equipo Rotor-Gene® Q (QIAGEN®). Para la normalización de los datos se utilizó como control un fragmento del gen 16S ribosomal.

#### 5.15 Identificación de proteínas por cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

La separación de las muestras se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, como se describió previamente. Se cargaron 5 µg totales de la solución de proteínas secretadas de la cepa SM002. El gel fue teñido con azul de Coomassie durante 30 min. Las bandas correspondientes al peso molecular de 57 y 65 kDa se cortaron y almacenaron por separado en tubo cónico de 1.5mL con 300 µL de ácido acético al 5% a -20°C. Las muestras se identificaron por LC-MS/MS en el Laboratorio Universitario de Proteómica (IBt-UNAM).

#### 5.16 Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron repetidos al menos en tres ocasiones independientes. Las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5, utilizando la distribución t de Student y posteriormente se realizó un análisis de varianza de ANOVA con prueba de Bonferroni aplicando una  $p < 0.05$ .

Tabla 2. Oligonucleótidos

ID	Secuencia 5'-3'	Propósito
183	AACCCGATGAAGACGACAC	Evaluación de <i>slpB</i> mediante
184	GCAGCGACAGTTTAGCCTG	PCR tiempo real
185	CGTATGCCTTGAAACCGTTC	Evaluación de <i>slpE</i> mediante
186	TAAACTGCCGGGTATCTTCG	PCR tiempo real
187	TTACCCGTGAGAACCAAACC	Evaluación de <i>prtS</i> mediante
188	TGTAGTTGCCGAAGGTGATG	PCR tiempo real
191	TGGAAGCCATGCATAAACTG	Evaluación de <i>cpxR</i> mediante
192	TACGCTGCTGATGTTTCTGG	PCR tiempo real
195	GAGCAAGCGGACCTCATAAAG	Evaluación de <i>r16S</i> mediante
196	TGCGGTTGGATTACCTCCT	PCR tiempo real
253	CGGCAAACCGGTCAACTTC	Evaluación de <i>slpD</i> mediante
254	GTCCTGATCGTTGCCGATG	PCR tiempo real
234	GGGCATATGICATCAAGCAATGC	Par para amplificar <i>slpB</i>
235	TTTCTCGAGTTTTGTTGCCTGCATTAC	
255	TTCATATGMGCAGTCGCCACAACG	Par para amplificar <i>slpD</i>
256	GGAICTGAGTCAGGCAAACAGAATATCG	
257	TGGCATATGGGTAATACCATGAATGG	Par para amplificar <i>slpE</i>
258	AAACTCGAGTTACACGATAAAGTCAACAG	
259	GGATTGGAAAACGTCAGCATG	Par para amplificar <i>eepR</i>
260	GCCACGAAAAGATGGCATC	

En 234 y 235 se subraya la secuencia de corte para *NcoI* y *XhoI*, respectivamente.

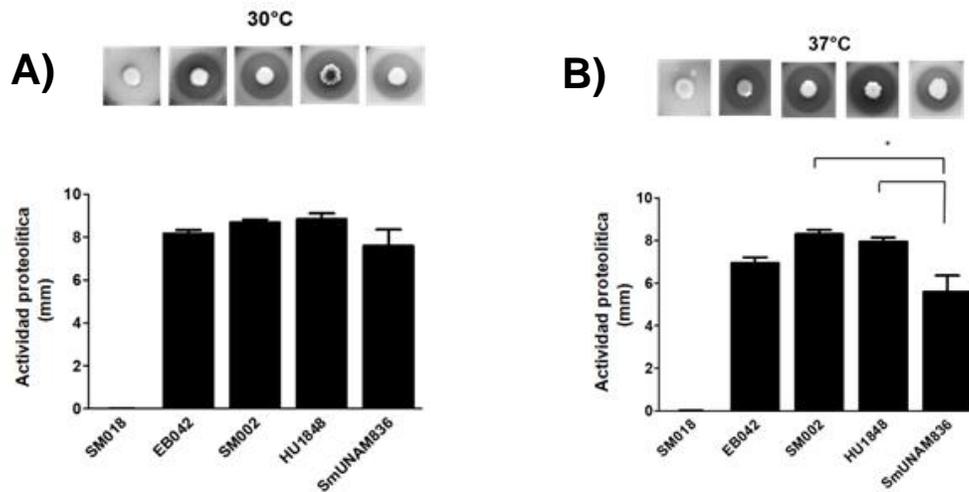
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Actividad proteolítica

#### 6.1.1 Actividad Proteolítica en placa

La evaluación y confirmación de la actividad proteolítica en placa de las cepas de *S. marcescens* EB042, HU1848 y SM002 se llevó a cabo de manera simultánea con la cepa *S. marcescens* SmUNAM836. Como control negativo se incluyó a la cepa *S. marcescens* SM018. Se estableció la forma de medición a partir de la periferia de la colonia y hasta la periferia del halo. Este valor fue determinado como el radio de la actividad proteolítica. Los ensayos de actividad proteolítica en placa se realizaron por triplicado. Los resultados se muestran en la Figura 2 para la actividad proteolítica a 30°C y 37°C.

Se evidencia la alta actividad proteolítica entre los aislados con una diferencia significativa entre las cepas SM002, HU1848 con respecto a la cepa SmUNAM836 a 37°C (Figura 2B), mientras que no se observaron diferencias significativas cuando el ensayo se realizó a 30°C (Figura 2A). Adicionalmente, se confirmó la carencia de actividad proteolítica por parte de la cepa SM018.



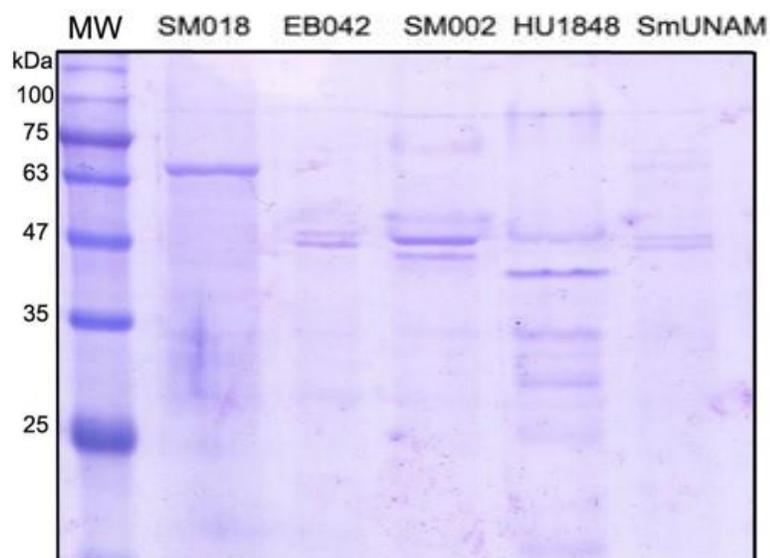
**Figura 2:** Resultados de actividad proteolítica. A) 30°C. B) 37°C. Ensayos en placa con agar BHI adicionado con leche descremada. Los datos representan la media  $\pm$ DS de al menos tres experimentos independientes, evaluados mediante análisis de varianza ANOVA, \*  $p < 0.05$ .

### 6.1.2 Perfil de proteínas secretadas

Para analizar el perfil de proteínas de cada una de las cepas en estudio se llevó a cabo la precipitación de las proteínas secretadas al medio de cultivo mediante sulfato de amonio 70%. La concentración promedio de proteínas precipitadas fue de 1 mg por cada 100 ml de medio de cultivo.

Las proteínas precipitadas fueron separadas mediante geles de acrilamida y visualizadas mediante azul de Coomassie (Figura 3). El perfil de proteínas secretadas de la cepa SM018 evidencia diferencias con respecto a las cepas con actividad proteolítica (Figura 3). Adicionalmente, la cepa HU1848 presenta una

proteína de aproximadamente 40 kDa ausente en las demás cepas evaluadas, así como mayor intensidad de las proteínas correspondientes al rango de 30-35 kDa, respecto a las cepas EB042, SM002 y SmUNAM836. Por otra parte, las cepas EB042, SM002 y SmUNAM836 presentan una banda de alrededor de 47 kDa que no aparece en las cepas HU1848 y SM018. Sin otros hallazgos, el perfil de proteínas secretadas entre las cepas proteolíticas resulta semejante.

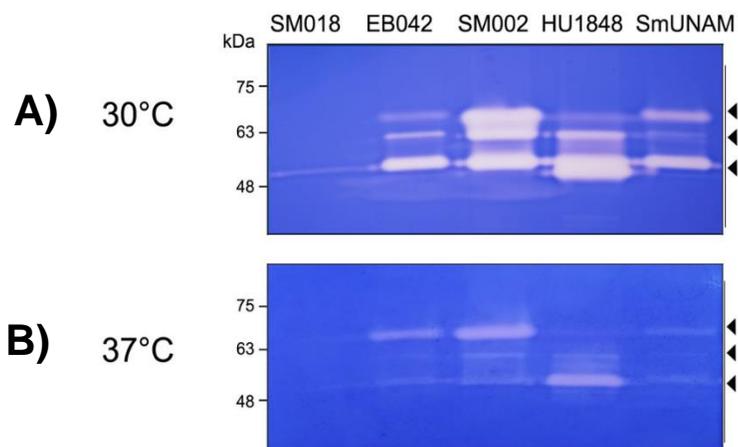


**Figura 3:** SDS-PAGE al 10% teñido con azul de Coomasie. La cepa de *S. marcescens* a la que corresponden las proteínas separadas se indica en la parte superior. Las masas moleculares usadas como referencia se indican a la izquierda de la figura.

### 6.1.3 Actividad proteolítica en zimogramas

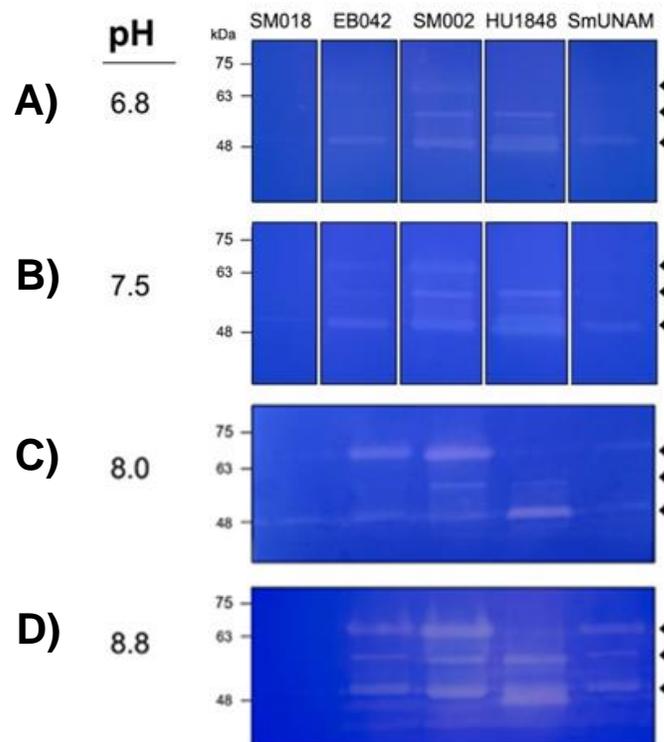
Para visualizar el patrón de proteínas secretadas con actividad proteolítica, 1  $\mu$ g de proteínas precipitadas y dializadas fueron separados en geles de acrilamida copolimerizados con gelatina. El patrón de actividad proteolítica evidenció que las

cepas de *S. marcescens* SM002, EB042, HU1848 y SmUNAM836 presentaron tres bandas con actividad hidrolítica en los pesos aproximados de ~50, 60 y 65 kDa (Figura 4). En todas las cepas la proteína de menor peso (~50 kDa) presentó la mayor actividad, particularmente en la cepa HU1848 (Figura 4). En contraste, la proteasa de ~60 kDa tuvo la menor capacidad hidrolítica. Además, la banda correspondiente a la proteasa de mayor tamaño (~65 kDa) presentó una mayor zona hidrolítica en la cepa SM002 en comparación con las demás cepas evaluadas (Figura 4). De acuerdo con los resultados de actividad en placa, se observó una mayor actividad proteolítica cuando los geles fueron incubados a 30°C en comparación de 37°C (Figura 4). Por último, se confirmó la carencia de actividad proteolítica de la cepa *S. marcescens* SM018 (Figura 2 y 4).



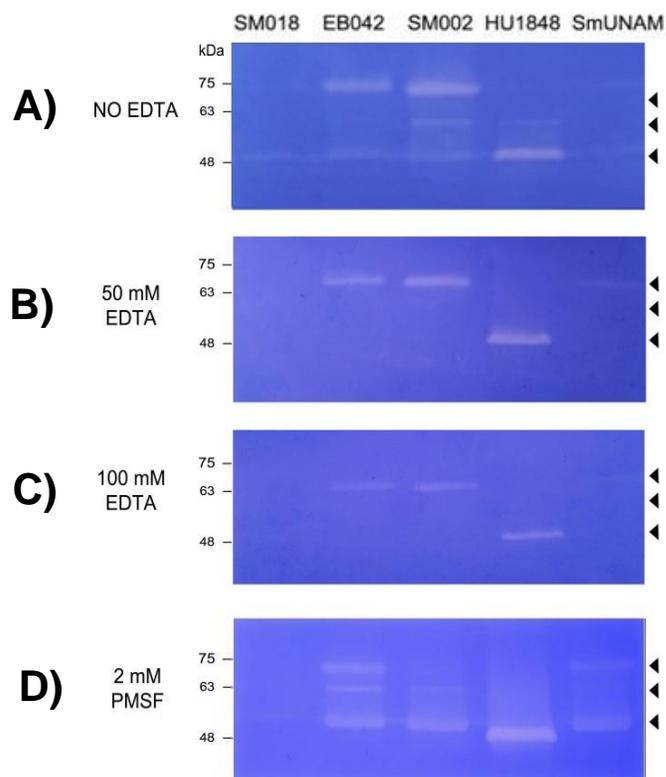
**Figura 4:** Resultados de la actividad proteolítica en zimogramas de las cepas SM018, EB042, SM002, HU1848 y SmUNAM836 A) 30°C y B) 37°C. Geles de acrilamida 10% copolimerizada con 0.15% de gelatina. Las masas moleculares utilizadas como referencia se indican a la izquierda de las figuras. Tinción con azul de Coomassie.

Para evidenciar proteasas activas en diferentes pH, los ensayos de zimogramas se realizaron en incubación bajo pH 6.8, 7.5, 8.0 y 8.8 (Figura 5). Los resultados demuestran un patrón constante compuesto por tres bandas con actividad proteolítica (~50, 60 y 65 kDa) en los diferentes pH analizados. No obstante, los resultados revelan un incremento de la actividad de las tres proteasas dependiente del pH (Figura 5). Asimismo, se destaca la actividad proteolítica de la banda en los 65 kDa de la cepa SM002 y la banda de 50 kDa en la cepa HU1848, esta última desde pH 6.8.



**Figura 5:** Actividad proteolítica en zimogramas en A) pH 6.8, B) pH 7.5, C) pH 8 y D) pH 8.8 de las cepas SM018, EB042, SM002, HU1848 y SmUNAM836. Geles de acrilamida 10% co-pimerizada con 0.15% de gelatina. Las masas moleculares se indican a la izquierda de las figuras. Tinción con azul de Coomassie.

Debido a que el EDTA es un conocido inhibidor de metaloproteasas, se evaluó la actividad proteolítica de las proteínas secretadas por *S. marcescens* en presencia de EDTA (50 o 100 mM) en el amortiguador de incubación (Figura 6). Los resultados indican que a partir de 50 mM de EDTA se inhibe la actividad de las proteasas de ~50 y 60 kDa (Figura 6), con excepción de la cepa HU1848 en la que se observa únicamente una ligera reducción en la actividad de la banda de ~50 kDa (Figura 6).

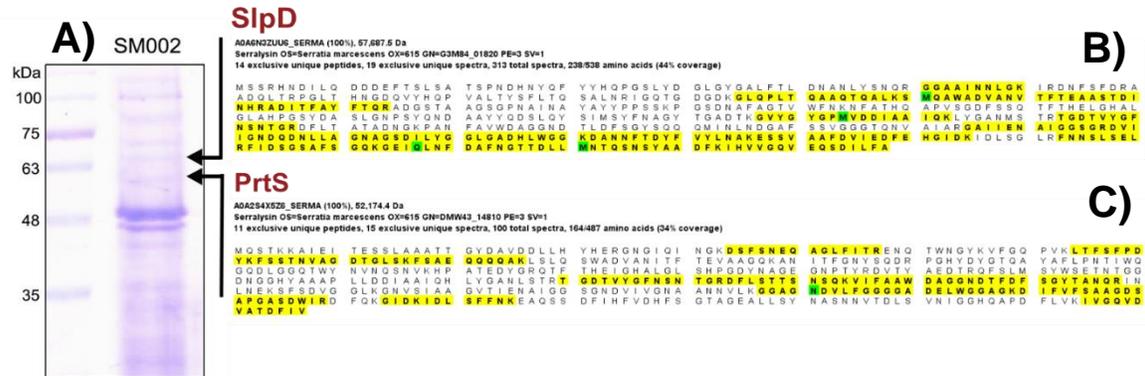


**Figura 6:** Inhibición de la actividad proteolítica en zimogramas con EDTA o PMSF. A) Gel de zimograma pH 8, 1 h de incubación, 30°C; Inhibición de la actividad proteolítica por B) 50mM de EDTA, C) 100mM de EDTA y D) 2mM de PMSF. Las masas moleculares utilizadas como referencia se indican a la izquierda de las figuras.

Por otra parte, la proteasa de ~65 kDa conserva actividad residual aún en presencia de 100 mM EDTA (Figura 6), lo que es más evidente en las cepas SM002 y EB042. Por último, no se observó un efecto sobre el patrón proteolítico cuando el gel se incubó con el inhibidor de serín-proteasas, PMSF (Figura 6D).

#### 6.1.4 Identificación de proteínas por Cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

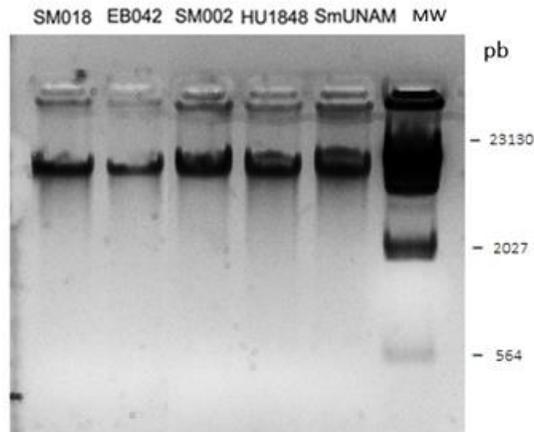
A partir de un gel de poliacrilamida se separaron 4 µg de proteínas secretadas de la cepa SM002, el gel se tiñó con azul de Coomassie y las dos bandas correspondientes a la zona de migración de las proteasas de ~65 y 60 kDa fueron removidas y transferidas a un tubo limpio para su posterior identificación. Los resultados del ensayo fueron comparados con una base de datos y analizados por el programa Scaffold (Proteome Software). La proteína en el peso de ~65kDa fue identificada como SlpD con un 44% de cobertura, mientras que la proteína en el peso de ~60 kDa se identificó como PrtS con un 34% de cobertura (Figura 7).



**Figura 7:** Resultados de la identificación por LC-MS/MS. A) SDS-PAGE con 5 µg de las proteínas secretadas al sobrenadante por la cepa SM002, tinción con azul de Coomassie. B) Cobertura de los péptidos identificados (amarillo) para la banda de ~65 kDa sobre la secuencia de SlpD. C) Cobertura de los péptidos identificados (amarillo) para la banda de ~60 kDa sobre la secuencia de PrtS.

## 6.2 Purificación de ácidos nucleicos

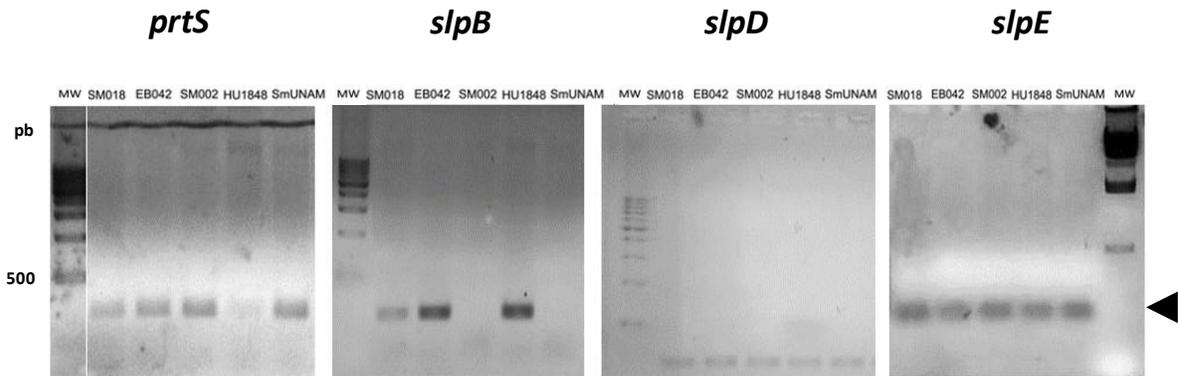
Se realizó la extracción de ADN cromosómico como se describe en la sección de Material y Métodos. La integridad del ADN cromosómico se corroboró mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, observándose libres de contaminación (Figura 8). Se obtuvo una concentración estimada de ADN cromosómico de alrededor de 200 ng/µl en cada una de las muestras.



**Figura 8:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de ADN cromosómico purificado de *S. marcescens*, el nombre de la cepa se indica en la parte superior del gel.  $\lambda$ HindIII como marcador de peso molecular (MW), el tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

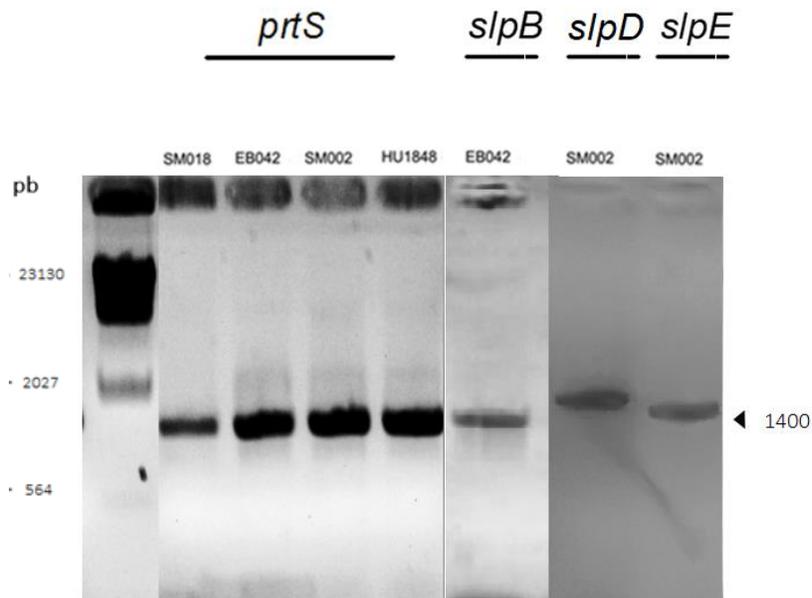
### 6.2.1 Amplificación y secuenciación de genes de proteasas

Para verificar la presencia de los genes *prtS*, *slpB*, *slpD* y *slpE* en las cepas *S. marcescens* SM002, EB042 y HU1848 se amplificaron fragmentos internos de dichos genes mediante PCR, como se describe en Material y Métodos. Los resultados de PCR indican que los genes *prtS*, *slpD* y *slpE* están presentes en todas las cepas analizadas (Figura 9.). Mientras que las cepas *S. marcescens* SM002 y SmUNAM836 carecen del gen *slpB* (Figura 9).



**Figura 9:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos internos de los genes de proteasas de *S. marcescens* amplificados mediante PCR. Los nombres de las cepas se indican en la parte superior de cada gel. Se utilizó la escalera de 500 pb como marcador de peso molecular (MW), el tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb).

Posteriormente, se amplificaron los genes completos de *prtS*, *slpB*, *slpD* y *slpE* para definir su secuencia nucleotídica e inferir posibles cambios en la secuencia de las proteínas resultantes. Debido a que la proteasa PrtS se considera la principal enzima asociada con la actividad proteolítica de *S. marcescens*, se llevó a cabo la amplificación de *prtS* a partir de las cepas SM018, EB042, SM002, HU1848 y SmUNAM836. Además, los genes *slpB*, *slpD* y *slpE* también se analizaron en las cepas EB042 y SM002 (Figura 10). Los productos correspondientes fueron purificados como se describe en Material y Métodos y enviados al IPICYT para la determinación de la secuencia nucleotídica mediante secuenciación tipo Sanger.



**Figura 10:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de PCR de los genes de proteasas indicados en la parte superior. El ADN cromosómico utilizado como templado se indica arriba de cada carril.  $\lambda$ *Hind*III como marcador de peso molecular (MW), el tamaño de las diferentes bandas se indica en pares de bases (pb) y el tamaño aproximado del amplicón se muestra al lado derecho junto a la cabeza de flecha.

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación de los productos de amplificación de los genes *prtS*, *slpB*, *slpD* y *slpE* se analizaron con Sequencher 5.1 para identificar mutaciones puntuales que modificaran la secuencia traducida. Posteriormente, las secuencias nucleotídicas se ensamblaron con EMBOSS Merger y se tradujeron por medio de ExpASy. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas con secuencias previamente reportadas de las proteínas PrtS, SlpB, SlpD y SlpE mediante Clustal Omega. Los cambios aminoacídicos encontrados en las cepas de *S. marcescens* HU1848, EB042 y SM002 se

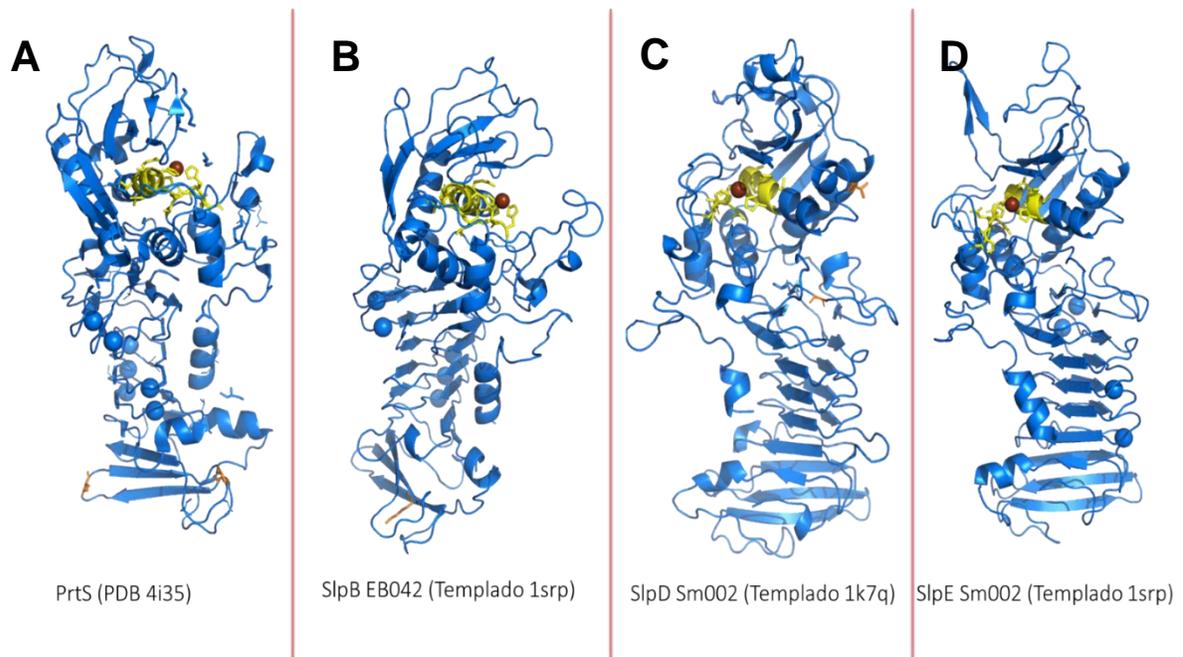
resumen en la Tabla 3. En PrtS de la cepa SM002 se identificaron tres cambios S338G, S454N, G464V. En SlpB de la cepa EB042 se identificó el cambio T430K. En SlpD de la cepa SM002 se encontraron los cambios A135T y V339A. En SlpE de la cepa SM002 no se encontró ningún cambio en su secuencia de acuerdo con el consenso de cepas analizadas. Adicionalmente, con estos resultados se corroboró que el sitio activo de las enzimas de las cepas evaluadas se encuentra libre de mutaciones.

Con el objetivo de conocer la disposición espacial de los cambios aminoacídicos identificados se construyeron modelos tridimensionales de las proteasas utilizando Swiss Model (ExpASy). Los modelos generados, así como las estructuras utilizadas como templado se muestran en la Figura 11.

Tabla 3. Cambios en la secuencia aminoacídica de proteasas

Cepa	Posición	Consenso	Cambio por
<b>PrtS</b>			
<b>SM002</b>	338	Serina	Glicina
	454	Serina	Asparagina
	464	Glicina	Valina
<b>SlpB</b>			
<b>EB042</b>	430	Treonina	Lisina
<b>SlpD</b>			
<b>SM002</b>	135	Alanina	Treonina
	339	Valina	Alanina
<b>SlpE</b>			
<b>Sm002</b>		Sin cambios	

Los modelos tridimensionales evidenciaron que ninguno de los cambios descritos se encuentra cercano al sitio activo de la enzima o en regiones presuntamente implicadas con la actividad proteolítica (Figura 11). Los templados utilizados para los modelos tridimensionales comparten una identidad aminoacídica de 58.82 % con respecto a SlpB, 49.45 % en relación con SlpD y 65.08 % en proporción con SlpE. La estructura molecular de PrtS y de cada uno de los modelos se analizó y manipuló con el programa PyMol.

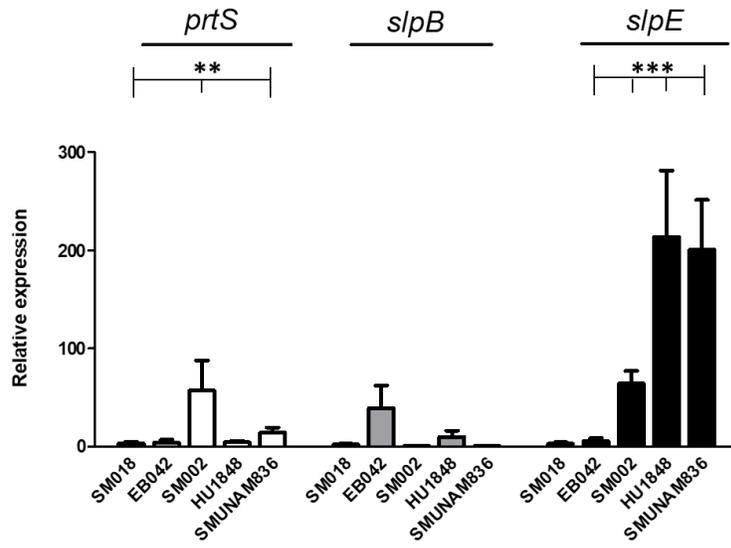


**Figura 11:** Estructura de PrtS y modelos tridimensionales de proteasas tipo serralisina. A) PrtS (PDB: 4i35), modelos tridimensionales realizados mediante Swiss Model B) SlpB de la cepa EB042 (Templado PDB: 1srp), C) SlpD de la cepa SM002 (Templado PDB: 1k7q); y D) SlpE de la cepa SM002 (Templado PDB: 1srp). Los cambios aminoacídicos se muestran en naranja, el sitio activo se encuentra marcado en color amarillo.

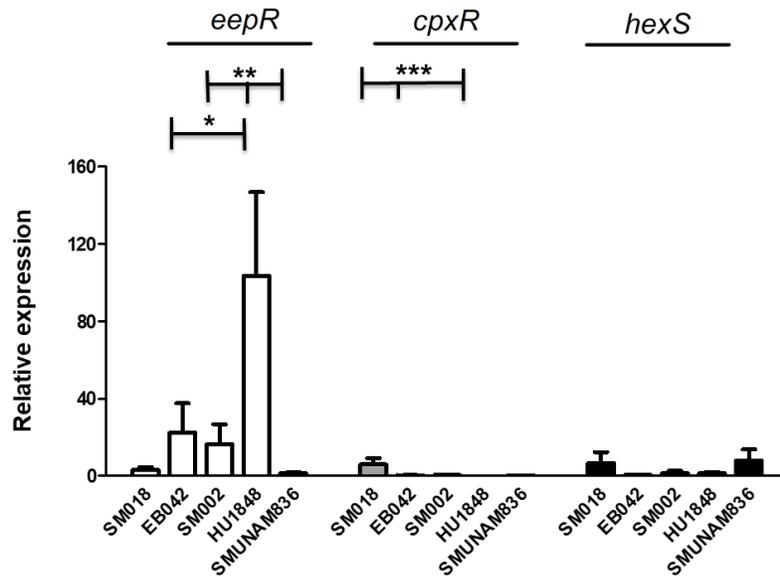
### 6.2.2. PCR tiempo real

El ARN de las diferentes cepas de *S. marcescens* se purificó como se describe en Material y Métodos, la cuantificación de este ácido nucleico reveló una concentración semejante entre las 5 cepas evaluadas (~300 ng/μl). Posteriormente, se realizó la síntesis de ADNc obteniendo una concentración promedio de ~1.0 μg/μl de ADNc. Para las reacciones de PCR en tiempo real se ajustó la cantidad de ADNc a 200 ng/μl. La evaluación de la expresión relativa de los genes de proteasas evidenció diferencias significativas en *prtS* entre las cepas de *S. marcescens* SM018 y SmUNAM836 respecto a SM002 (Figura 12), siendo la cepa SM002 la que presenta la mayor expresión de este gen entre las cepas analizadas (Figura 12). Para *s/pE* se obtuvieron diferencias significativas con altos niveles de expresión en las cepas HU1848 y SmUNAM836 en comparación con las cepas SM018 y EB042.

Por otra parte, para evaluar y comparar los transcritos de genes reguladores con actividad sobre genes de proteasas, también se evaluó la expresión relativa de los transcritos de *eepR*, *cpxR* y *hexS* en las cepas EB042, SM002, HU1848 y SmUNAM836 (Figura 13). El regulador positivo *eepR* se encontró expresado en altos niveles en las cepas *S. marcescens* EB042, SM002 y HU1848 (Figura 13). Ésta última, presentando diferencias significativas con el resto de las cepas. En contraste, se determinaron bajos niveles de expresión para los genes *cpxR* y *hexS*. Adicionalmente, se evidencian diferencias significativas del regulador negativo *cpxR* entre la cepa SM018 respecto a las cepas EB042 y HU1848.



**Figura 12:** Evaluación de la expresión relativa de los genes de proteasas. Los datos representan la media  $\pm$ DS de al menos tres experimentos independientes, comparados mediante análisis de varianza ANOVA, \*  $p < 0.05$ .



**Figura 13:** Evaluación de la expresión relativa de los reguladores asociados a proteasas. Los datos representan la media  $\pm$ DS de al menos tres experimentos independientes, comparados mediante análisis de varianza ANOVA, \*  $p < 0.05$ .

## 7. DISCUSIÓN

*S. marcescens* es una enterobacteria causante de numerosas infecciones en humanos que se caracteriza por altos niveles de resistencia a diversos antibióticos. Como microorganismo patógeno, *S. marcescens* se distingue también por la expresión y secreción de diferentes factores de virulencia como lipasas, hemolisinas, fimbrias y proteasas [66]. A la fecha, pocos estudios se han enfocado en definir la participación de las proteasas en la patogenicidad de *S. marcescens*, así como en su regulación genética.

En diferentes cepas de *S. marcescens* se han descrito al menos cinco metaloproteasas que comparten una masa proteica de alrededor de 50 kDa, una identidad aminoacídica de hasta el 61% y un motivo de unión a zinc altamente conservado [80, 85]. Debido al reciente aislamiento de cepas de *S. marcescens* con elevada actividad proteolítica [37], en este trabajo de investigación se realizó una caracterización de dicha actividad proteolítica y se determinaron los niveles de expresión relativa de los genes de *S. marcescens* asociados a proteasas.

Nuestros resultados de actividad en gel evidenciaron tres zonas diferentes (entre 50-65 kDa) con actividad proteolítica (Figura 4A), este triplete se ha reportado con anterioridad, y se atribuye de manera general a la enzima PrtS [5], sin embargo, debido a la falta de estudios equivalentes para las proteasas tipo serralisina (Slp's) y de acuerdo a los resultados obtenidos, consideramos que alguna(s) de las tres bandas corresponden a enzimas Slp's. De manera semejante, en la cepa de *S.*

*marcescens* BG también se describe un patrón de tres proteínas con actividad proteolítica entre 44-52.5 kDa con una mayor actividad para las bandas de menor tamaño [48].

Adicionalmente, se observa una disminución en la actividad proteolítica al cambiar la temperatura de incubación de 30°C a 37°C (Figura 4B), debido a la falta de estudios, este contraste no ha sido observado en zimogramas con anterioridad, sin embargo, sí se encuentra reportada que la actividad proteolítica de PrtS disminuye a 37°C por la influencia del represor CpxR, que es más activo a ésta [18].

A la espera de evidenciar un diferente patrón proteolítico en las cepas analizadas se realizaron ensayos de zimogramas incubados a diferente pH (Figura 5), a pesar de que algunas proteasas, principalmente las de mayor tamaño de las cepas de *S. marcescens* EB042 y SmUNAM836 presentan sólo una actividad residual a pH neutro y ligeramente ácido (Figura 5 A-B), el patrón de tres zonas de actividad proteolítica no varió en los diferentes pH analizados. La pérdida de la actividad de algunas de estas proteínas en pH bajos puede explicarse debido a que las proteasas de la familia serralisina presentan un 80% de actividad en pH 6.5 en comparación con pH 8.5 [96]. De manera semejante, la mirabilisina de *Proteus mirabilis*, una metaloproteasa homóloga a PrtS, presenta actividad proteolítica desde pH 6 hasta pH 10, con un pH óptimo de 8 [7], por lo que es de esperarse que PrtS y posiblemente el resto de Slp's compartan esta característica. Sin embargo, estos resultados difieren ligeramente de los reportado por Lakshmi y colaboradores, quienes describen pH 9 y 37°C como condiciones óptimas para la serralisina purificada de *Serratia* sp. RSPB11 [9].

Al ser el EDTA un potente quelante de metales afín a diferentes iones como el zinc, puede actuar como un inhibidor de la actividad enzimática de metaloproteasas [23], dicha inhibición se reporta en un rango de 20  $\mu$ M a 1mM de EDTA, dependiendo de la metaloproteasa y el organismo a partir del que se aísla [84, 91]. No obstante, los resultados obtenidos indican una alta resistencia de las proteasas de *S. marcescens* a EDTA en las proteasas de ~65kDa de las cepas EB042, SM002 y SmUNAM836, conservando actividad observable incluso en zimogramas incubados con 100 mM de EDTA. La resistencia a EDTA por parte de las serralisinas ha sido documentada con anterioridad y se sugiere está ligada a un cambio de asparagina en la posición 191 por un ácido aspártico (N191D) en la proteasa SMP6.1 de *Serratia* sp. (utilizada como insecticida) y en metaloproteasas del género *Xenorhabdus* [55]. En este sentido, la secuenciación del gen *s/pD* (correspondiente a la proteasa de ~65 kDa) reveló la presencia del cambio N191D, lo que explicaría su alta resistencia a EDTA (Figura 6 B-C). Sin embargo, no se encontró este cambio en las proteasas de las masas ~60 y 50 kDa. Por otra parte, en diferentes cepas de *S. marcescens* se ha descrito una disminución del 70% de la actividad de la serralisina a partir de EDTA 2 mM [23, 76, 90], de acuerdo con lo anterior, nuestros resultados indican que la proteasa correspondiente a PrtS (~55 kDa) mostró sensibilidad a partir de 50 mM de EDTA (Figura 6 B-C). Cabe destacar que la zona de hidrolisis correspondiente a ~50 kDa de la cepa de *S. marcescens* HU1848 presentó un doblete que no fue observado en ninguna de las demás cepas analizadas. Este patrón, sin embargo, se veía afectado por los inhibidores PMSF y EDTA (Figura 6B, C y D) inhibiendo la actividad de las bandas de mayor y menor tamaño respectivamente en el doblete. Un patrón semejante,

sensible al inhibidor PMSF, ha sido reportado en *Serratia* sp. ZF03 [63, 76], por lo que es probable que la cepa HU1848 presente en este peso molecular una serín-proteasa que no presentan las demás cepas analizadas.

Para conocer la identidad de las proteasas observadas en los zimogramas y tomando en cuenta que la migración de PrtS en geles de poliacrilamida se describe entre 50-56 kDa [54, 80, 85], se decidió evaluar las proteínas correspondientes a las zonas de actividad proteolítica de ~60 y 65 kDa mediante espectrometría de masas (LC-MS/MS). Los resultados indican que la proteasa de ~60 kDa corresponde a PrtS, mientras que la proteína de mayor tamaño (~65 kDa) corresponde a SlpD. En la literatura existe un único antecedente que describe la citotoxicidad y capacidad proteolítica de SlpD, éste sugiere que la actividad proteolítica de SlpD es baja o nula puesto que al inducir su expresión en la cepa PIC3611 no se evidenció un aumento en la actividad proteolítica [80], esto difiere de los resultados presentados en este proyecto, sin embargo una posible razón de dichas discrepancias radique en los substratos utilizados, caseína y gelatina, respectivamente, posiblemente reflejando una baja afinidad de SlpD por caseína.

Con el objetivo de determinar si cambios en la secuencia aminoacídica del sitio activo de la enzima podrían estar relacionados con la alta actividad proteolítica de las cepas HU1848, SM002 y EB042, los genes codificantes de las proteasas PrtS, SlpB, SlpD y SlpE se secuenciaron y compararon con secuencias reportadas en la literatura (Tabla 3). La secuenciación evidenció los siguientes cambios en PrtS: S398G, S454N y G464V. Un único cambio (T430K) fue identificado en SlpB. En SlpD se identificaron dos cambios, A135T, y V339A. Por último, de acuerdo con el

consenso de las secuencias reportadas en GenBank, no se observó ningún cambio en SlpE. De las seis sustituciones mencionadas, ninguna se encuentra cercana al sitio activo de la enzima ni a los sitios de unión a calcio (Figura 11). La importancia del sitio de unión a zinc radica en la dependencia de éste para la actividad de la enzima y particularmente los sitios H176, H180, H186 y Y216 que son los residuos catalíticos [92]. Mutaciones en este sitio podrían ocasionar alteraciones en la actividad enzimática de la proteasa. Los cambios aminoacídicos que presentaron las cepas analizadas no han sido documentados como causantes de alteraciones en la actividad de la proteasa, sin embargo, sí se ha visto que cambios aminoacídicos pueden provocar alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína al formar puentes de hidrógeno si se encuentran a la distancia adecuada, como lo observado en N200 que forma un puente de hidrógeno con K27 y este a su vez con V202 [92] o lo observado por Zhang y colaboradores que reportaron interacciones entre la hélice N-terminal y el dominio RTX, esto confería estabilidad química y térmica a la proteasa [96]. Adicionalmente, se ha observado que la cavidad del sitio activo puede ser afectada por el bucle formado entre los residuos 189-198, en proteasas como la FS14 este bucle sobresale más que en la proteasa SMP y esto deriva en un sitio activo más cerrado, lo que podría afectar en la especificidad de sustrato [92].

De acuerdo con nuestra segunda hipótesis, la sobreexpresión de genes de proteasas podría explicar el fenotipo altamente proteolítico de las cepas de *S. marcescens* HU1848, SM002 y EB042. Los resultados revelaron que, de los genes de proteasas analizados, *slpE* es el gen que se encuentra expresado en mayor

proporción, principalmente en las cepas HU1848 y SmUNAM836 (Figura 12). SlpE ha sido documentada como una proteasa que se distribuye principalmente en aislados clínicos y ocasionalmente entre cepas ambientales [85], en concordancia con nuestros resultados, todas las cepas analizadas codifican el gen *slpE* (Figura 9). Se ha sugerido que SlpE forma parte de un operón que cuenta con varios marcos de lectura abiertos, entre estos un posible inhibidor del gen de la proteasa [15, 85]. Además, cepas de *S. marcescens* mutantes en *slpE* resultan significativamente menos citotóxicas [54].

También para los genes *prtS* y *slpB* se determinó una sobreexpresión, esto en las cepas SM002 y EB042, respectivamente, ambas proteasas son capaces de causar alta citotoxicidad en células de carcinoma pulmonar, células de vías respiratorias A549 y células HCLE (línea celular ocular humana). Además, la cepa PIC3611, una cepa con baja actividad proteolítica y baja expresión de estas proteasas, es incapaz de producir actividad proteolítica en las mismas condiciones, por lo que se consideran cruciales para la citotoxicidad de *S. marcescens* [80].

Por otra parte, los reguladores transcripcionales también juegan un papel muy importante en la expresión de los genes de proteasas, como parte de nuestro análisis transcripcional también se evaluó la expresión de los reguladores *eepR*, *cpxR* y *hexS*. Se determinaron elevados niveles de expresión de *eepR* en las cepas SM002, EB042 y HU1848 (Figura 13). EepR es un conocido regulador positivo de factores de virulencia como proteasas, quitinasas, hemolisina y motilidad tipo *swarming*, a través del control transcripcional del gen *swrW*; así

como de la de producción del pigmento prodigiosina a través del operón *pigA-pigN* [17], por lo que su acción sobre la regulación de estos factores de virulencia podría tener gran relevancia en relación con la capacidad patogénica de las cepas SM002, EB042 y HU1848. Diferentes reportes indican que la expresión de *prtS*, *slpB* y *slpE* se ve significativamente reducida en cepas mutantes de *eepR* [17, 85]. Particularmente, la expresión de *slpE* disminuye 14 veces en una cepa  $\Delta eepR$  [85], lo que indica una estrecha relación entre EepR y SlpE, como se observó en la cepa HU1848, la cual presenta altos niveles de expresión tanto del regulador *eepR* como de la proteasa *slpE*.

Se ha reportado un papel negativo del regulador transcripcional CRP (proteína receptora de AMP cíclico) sobre la expresión de *eepR* [86]. Una vez que CRP une AMPc reconoce de manera dosis-dependiente la región promotora de *eepR* (secuencia TGAGACGATGATCACA), reprimiendo su transcripción. Cepas mutantes en *crp* muestran un incremento de 9.5 veces en los niveles de *eepR* [86]. Por otra parte, cepas de *S. marcescens* dobles mutantes en *crp* y *hexS* presentan una mayor pigmentación a 37°C en comparación con cepas silvestres [71], denotando el papel de estos reguladores negativos en la expresión de *eepR* y sus fenotipos asociados. Se ha descrito que ambos reguladores negativos (*crp* y *hexS*) reconocen la región promotora de *eepR*, de acuerdo con nuestros resultados, es posible que las cepas SM002, EB042 y HU1848 presenten mutaciones en la región promotora de *eepR*, lo que podría explicar los altos niveles de transcrito de dicho mensajero.

Por otra parte, nuestros resultados también indican una baja expresión de *hexS* (Figura 13). HexS es un regulador de la familia LysR que opera como un tetrámero, los reguladores de la familia LysR se caracterizan por unirse a regiones ricas en AT y su función puede verse afectada por el dominio de unión a ADN que se encuentra en el C-terminal [16]. En *E. coli* el regulador transcripcional LrhA, homólogo a HexS, se encuentra regulado directamente por el regulador global Lrp, el cual regula positivamente la transcripción de LrhA e indirectamente los fenotipos asociados a éste [46]. En *S. marcescens* no se ha identificado un regulador que opere de manera análoga sobre *hexS*. Sin embargo, Lrp es un regulador global conservado entre bacterias y arqueas, por lo que es posible que Lrp en *S. marcescens* también active la transcripción de *hexS*.

Adicionalmente, en *E. coli* enterohemorrágica se ha descrito que el sistema Cpx también regula *lrhA* a través del motivo de unión del regulador CpxR [GTAAA-(N)8-ATAAA], localizado río arriba del promotor de *lrhA* [83]. CpxR actúa como un regulador positivo de *lrhA* en respuesta a la sobre-expresión de la lipoproteína de membrana externa, NlpE [83]. En *S. marcescens*, NlpE también afecta la expresión de CpxR, por lo que se sugiere que *hexS* también se encuentra regulado por CpxR [18, 83]. Nuestros datos indican una baja expresión de *cpxR* y *hexS*, de acuerdo con los antecedentes, los bajos niveles de *hexS* pueden asociarse a una baja expresión de *cpxR*. Además, como se mencionó anteriormente, ya que en *S. marcescens* una alta concentración de NlpE deriva en la activación de la vía Cpx y en consecuencia una baja actividad proteolítica [18], es posible considerar para las cepas de *S. marcescens* analizadas bajos niveles

de NlpE. No obstante, se requieren estudios adicionales para esclarecer esta compleja red regulatoria que deriva en la sobreexpresión de *eepR* y en el fenotipo proteolítico de las cepas de *S. marcescens* SM002, EB042, HU1848 y SMUNAM836.

## 8. CONCLUSIONES

1. La secuencia aminoacídica de los genes de las proteasas PrtS, SlpB, SlpD y SlpE se encuentran altamente conservados entre los diferentes aislados de *S. marcescens*.
2. El patrón de bandas con actividad proteolítica es semejante entre las cepas de *S. marcescens* EB042, SM002 y SmUNAM836; sin embargo, ligeramente diferente del patrón de la cepa HU1848.
3. La zona con actividad proteolítica en ~50 kDa de la cepa *S. marcescens* HU1848 y los resultados con los inhibidores EDTA y PMSF sugieren la presencia conjunta de una metaloproteasa y una serín-proteasa en esta cepa.
4. La proteasa SlpE podría estar asociada a la alta actividad proteolítica de las cepas SM002, HU1848 y SmUNAM836, al ser la proteasa con los mayores niveles de expresión entre los genes evaluados.
5. El regulador positivo EepR se encuentra altamente expresado en las cepas con alta actividad proteolítica, lo que sugiere una desregulación de éste, posiblemente ligada a mutaciones en su región promotora.
6. La baja expresión de *hexS* puede ser consecuencia de una baja expresión de *cpxR*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Acar, J.F., *Serratia marcescens* infections. Infect Control, 1986. **7**(5): p. 273-8.
2. Al Jarousha, A.M., et al., *An outbreak of Serratia marcescens septicemia in neonatal intensive care unit in Gaza City, Palestine*. J Hosp Infect, 2008. **70**(2): p. 119-26.
3. Araghi, A., et al., *Purification and study of anti-cancer effects of Serratia marcescens serralyisin*. Iran J Microbiol, 2019. **11**(4): p. 320-327.
4. Ashkenazi, S., E. Weiss, and M.M. Drucker, *Bacterial adherence to intravenous catheters and needles and its influence by cannula type and bacterial surface hydrophobicity*. J Lab Clin Med, 1986. **107**(2): p. 136-40.
5. Balitaan, J., H. Steinbrenner, and M.J.P.S.L. Ramos, *Zymography-based assay for screening potential anti-gelatinase agents using Serratia marcescens serralyisin*. 2010. **3**: p. 100-8.
6. Bar-Ness, R., et al., *Increased cell surface hydrophobicity of a Serratia marcescens NS 38 mutant lacking wetting activity*. J Bacteriol, 1988. **170**(9): p. 4361-4.
7. Barrett, A.J., J.F. Woessner, and N.D. Rawlings, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2014.
8. Baumann, U., *Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from Serratia marcescens*. J Mol Biol, 1994. **242**(3): p. 244-51.
9. Bhargavi, P.L. and R.J.I.j.o.b.m. Prakasham, *A fibrinolytic, alkaline and thermostable metalloprotease from the newly isolated Serratia sp RSPB11*. 2013. **61**: p. 479-486.
10. Bille, J. and M.P. Glauser, *Protection against chronic pyelonephritis in rats by suppression of acute suppuration: effect of colchicine and neutropenia*. J Infect Dis, 1982. **146**(2): p. 220-6.
11. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.

12. Blair, J.M., et al., *Molecular mechanisms of antibiotic resistance*. Nat Rev Microbiol, 2015. **13**(1): p. 42-51.
13. Braun, V., et al., *Hemolytic activity of Serratia marcescens*. Arch Microbiol, 1985. **141**(4): p. 371-6.
14. Braun, V. and G. Schmitz, *Excretion of a protease by Serratia marcescens*. Arch Microbiol, 1980. **124**(1): p. 55-61.
15. Braunagel, S.C. and M.J. Benedik, *The metalloprotease gene of Serratia marcescens strain SM6*. Mol Gen Genet, 1990. **222**(2-3): p. 446-51.
16. Breddermann, H. and K. Schnetz, *Activation of leuO by LrhA in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2017. **104**(4): p. 664-676.
17. Brothers, K.M., et al., *EepR Mediates Secreted-Protein Production, Desiccation Survival, and Proliferation in a Corneal Infection Model*. Infect Immun, 2015. **83**(11): p. 4373-82.
18. Bruna, R.E., et al., *CpxR-Dependent Thermoregulation of Serratia marcescens PrtA Metalloprotease Expression and Its Contribution to Bacterial Biofilm Formation*. J Bacteriol, 2018. **200**(8).
19. Brurberg, M.B., V.G. Eijsink, and I.F. Nes, *Characterization of a chitinase gene (chiA) from Serratia marcescens BJL200 and one-step purification of the gene product*. FEMS Microbiol Lett, 1994. **124**(3): p. 399-404.
20. Caroff, M. and D. Karibian, *Structure of bacterial lipopolysaccharides*. Carbohydr Res, 2003. **338**(23): p. 2431-47.
21. Casolari, C., et al., *A simultaneous outbreak of Serratia marcescens and Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit*. J Hosp Infect, 2005. **61**(4): p. 312-20.
22. Cavaillon, J.M., *Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines*. Toxicon, 2018. **149**: p. 45-53.
23. Chander, D., et al., *Purification and characterization of thermoactive serratiopeptidase from Serratia marcescens AD-W2*. AMB Express, 2021. **11**(1): p. 53.
24. Chen, H.H., et al., *A CpxR-Regulated zapD Gene Involved in Biofilm Formation of Uropathogenic Proteus mirabilis*. Infect Immun, 2020. **88**(7).

25. Cheng, K.C., et al., *Clinical experiences of the infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Serratia marcescens at a medical center in Taiwan*. Jpn J Infect Dis, 2006. **59**(3): p. 147-52.
26. Costamagna, D., et al., *Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 805172.
27. Cox, C.E., *Aztreonam therapy for complicated urinary tract infections caused by multidrug-resistant bacteria*. Rev Infect Dis, 1985. **7 Suppl 4**: p. S767-71.
28. Crivaro, V., et al., *Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing Serratia marcescens and Klebsiella pneumoniae acquisition in a neonatal intensive care unit*. J Hosp Infect, 2007. **67**(2): p. 135-41.
29. De Castro, C., et al., *Microbe-associated molecular patterns in innate immunity: Extraction and chemical analysis of gram-negative bacterial lipopolysaccharides*. Methods Enzymol, 2010. **480**: p. 89-115.
30. Dessi, A., et al., *Serratia marcescens infections and outbreaks in neonatal intensive care units*. J Chemother, 2009. **21**(5): p. 493-9.
31. Doerr, M. and W.H. Traub, *Purification and characterization of two Serratia marcescens proteases*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 1984. **257**(1): p. 6-19.
32. Dower, W.J., J.F. Miller, and C.W. Ragsdale, *High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(13): p. 6127-45.
33. Espinosa de los Monteros, L.E., et al., *Outbreak of infection by extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing Serratia marcescens in a Mexican hospital*. J Chemother, 2008. **20**(5): p. 586-92.
34. Gales, A.C., et al., *Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **73**(4): p. 354-60.
35. Gastmeier, P., et al., *Outbreaks in neonatal intensive care units - they are not like others*. Am J Infect Control, 2007. **35**(3): p. 172-6.

36. Gaston, M.A. and T.L. Pitt, *O-antigen specificities of the serotype strains of Serratia marcescens*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(12): p. 2697-701.
37. Gonzalez, G.M., et al., *Comparative Analysis of Virulence Profiles of Serratia marcescens Isolated from Diverse Clinical Origins in Mexican Patients*. Surg Infect (Larchmt), 2020. **21**(7): p. 608-612.
38. Gonzalez, G.M., et al., *Surveillance of antimicrobial resistance in Serratia marcescens in Mexico*. New Microbiol, 2020. **43**(1): p. 34-37.
39. Gristwood, T., et al., *PigS and PigP regulate prodigiosin biosynthesis in Serratia via differential control of divergent operons, which include predicted transporters of sulfur-containing molecules*. J Bacteriol, 2011. **193**(5): p. 1076-85.
40. Hamada, K., et al., *Crystal structure of Serratia protease, a zinc-dependent proteinase from Serratia sp. E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2.0 Å resolution*. J Biochem, 1996. **119**(5): p. 844-51.
41. Hege, T., et al., *Crystal structure of a complex between Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and its cognate inhibitor: inhibition by a zinc-NH<sub>2</sub> coordinative bond*. J Biol Chem, 2001. **276**(37): p. 35087-92.
42. Iguchi, A., et al., *Genome evolution and plasticity of Serratia marcescens, an important multidrug-resistant nosocomial pathogen*. Genome Biol Evol, 2014. **6**(8): p. 2096-110.
43. Jones, R.N., *Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia*. Clin Infect Dis, 2010. **51** **Suppl 1**: p. S81-7.
44. Khanna, A., M. Khanna, and A. Aggarwal, *Serratia marcescens- a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients*. J Clin Diagn Res, 2013. **7**(2): p. 243-6.
45. Kida, Y., et al., *Serratia marcescens serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2*. Infect Immun, 2007. **75**(1): p. 164-74.

46. Kroner, G.M., M.B. Wolfe, and P.L. Freddolino, *Escherichia coli* Lrp Regulates One-Third of the Genome via Direct, Cooperative, and Indirect Routes. *J Bacteriol*, 2019. **201**(3).
47. Linhartova, I., et al., *RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism*. *FEMS Microbiol Rev*, 2010. **34**(6): p. 1076-112.
48. Lyerly, D., A.J.I. Kreger, and Immunity, *Purification and characterization of a Serratia marcescens metalloprotease*. 1979. **24**(2): p. 411-421.
49. Maeda, H., *Role of microbial proteases in pathogenesis*. *Microbiol Immunol*, 1996. **40**(10): p. 685-99.
50. Maeda, H. and K. Morihara, *Serralyisin and related bacterial proteinases*. *Methods Enzymol*, 1995. **248**: p. 395-413.
51. Mahlen, S.D., *Serratia infections: from military experiments to current practice*. *Clin Microbiol Rev*, 2011. **24**(4): p. 755-91.
52. Mantadakis, E., et al., *Susceptibility patterns of uropathogens identified in hospitalised children with community-acquired urinary tract infections in Thrace, Greece*. *J Glob Antimicrob Resist*, 2015. **3**(2): p. 85-90.
53. Marre, R., J. Hacker, and V. Braun, *The cell-bound hemolysin of Serratia marcescens contributes to uropathogenicity*. *Microb Pathog*, 1989. **7**(2): p. 153-6.
54. Marty, K.B., et al., *Characterization of a cytotoxic factor in culture filtrates of Serratia marcescens*. *Infect Immun*, 2002. **70**(3): p. 1121-8.
55. Massaoud, M.K., J. Marokhazi, and I. Venekei, *Enzymatic characterization of a serralyisin-like metalloprotease from the entomopathogen bacterium, Xenorhabdus*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1814**(10): p. 1333-9.
56. Merlino, C.P., *Bartolomeo Bizio's Letter to the most Eminent Priest, Angelo Bellani, Concerning the Phenomenon of the Red Colored Polenta*. *J Bacteriol*, 1924. **9**(6): p. 527-43.
57. Miyoshi, S., et al., *Functional domains of a zinc metalloprotease from Vibrio vulnificus*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(23): p. 7606-9.

58. Mizunoe, Y., et al., *Effect of pili of Serratia marcescens on superoxide production and phagocytosis of human polymorphonuclear leukocytes*. J Urol, 1995. **154**(3): p. 1227-30.
59. Molla, A., et al., *Interdomain cleavage of plasma fibronectin by zinc-metalloproteinase from Serratia marcescens*. Biochim Biophys Acta, 1988. **955**(1): p. 77-85.
60. Monreal, J. and E.T. Reese, *The chitinase of Serratia marcescens*. Can J Microbiol, 1969. **15**(7): p. 689-96.
61. Moradigaravand, D., et al., *Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant Serratia marcescens clones within the United Kingdom and Ireland*. Genome Res, 2016. **26**(8): p. 1101-9.
62. Naumiuk, L., et al., *Molecular epidemiology of Serratia marcescens in two hospitals in Gdansk, Poland, over a 5-year period*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3108-16.
63. Nemoto, W., et al., *Phenylmethanesulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, suppresses naloxone-precipitated withdrawal jumping in morphine-dependent mice*. Neuropeptides, 2013. **47**(3): p. 187-91.
64. Ondraczek, R., S. Hobbie, and V. Braun, *In vitro activation of the Serratia marcescens hemolysin through modification and complementation*. J Bacteriol, 1992. **174**(15): p. 5086-94.
65. Ottria, G., et al., *Environmental monitoring programme in the cell therapy facility of a research centre: preliminary investigation*. J Prev Med Hyg, 2010. **51**(4): p. 133-8.
66. Petersen, L.M. and L.S. Tisa, *Friend or foe? A review of the mechanisms that drive Serratia towards diverse lifestyles*. Can J Microbiol, 2013. **59**(9): p. 627-40.
67. Petersen, L.M. and L.S. Tisa, *Molecular characterization of protease activity in Serratia sp. strain SCBI and its importance in cytotoxicity and virulence*. J Bacteriol, 2014. **196**(22): p. 3923-36.

68. Petzl, W., et al., *Lipopolysaccharide pretreatment of the udder protects against experimental Escherichia coli mastitis*. *Innate Immun*, 2012. **18**(3): p. 467-77.
69. Price, N.L. and T.L. Raivio, *Characterization of the Cpx regulon in Escherichia coli strain MC4100*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(6): p. 1798-815.
70. Reid, G. and J.D. Sobel, *Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review*. *Rev Infect Dis*, 1987. **9**(3): p. 470-87.
71. Romanowski, E.G., et al., *Thermoregulation of Prodigiosin Biosynthesis by Serratia marcescens is Controlled at the Transcriptional Level and Requires HexS*. *Pol J Microbiol*, 2019. **68**(1): p. 43-50.
72. Romero, F.J., et al., *Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from Serratia marcescens grown in whey*. 2001. **36**(6): p. 507-515.
73. Rosenberg, M., et al., *Cell surface hydrophobicity of pigmented and nonpigmented clinical Serratia marcescens strains*. *Infect Immun*, 1986. **51**(3): p. 932-5.
74. SA, A., et al., *PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THERMO TOLERANT ALKALINE PROTEASE FROM SERRATIA MARCESCENS*.
75. Sader, H.S., et al., *Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012*. *Int J Antimicrob Agents*, 2014. **43**(4): p. 328-34.
76. Salarizadeh, N., et al., *Purification and characterization of 50 kDa extracellular metalloprotease from Serratia sp. ZF03*. 2014.
77. Sandner-Miranda, L., et al., *The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus Serratia*. *Front Microbiol*, 2018. **9**: p. 828.
78. Sandner-Miranda, L., et al., *Complete Genome Sequence of Serratia marcescens SmUNAM836, a Nonpigmented Multidrug-Resistant Strain Isolated from a Mexican Patient with Obstructive Pulmonary Disease*. *Genome Announc*, 2016. **4**(1).

79. Schmitz, G. and V. Braun, *Cell-bound and secreted proteases of Serratia marcescens*. J Bacteriol, 1985. **161**(3): p. 1002-9.
80. Shanks, R.M., et al., *Identification of SlpB, a Cytotoxic Protease from Serratia marcescens*. Infect Immun, 2015. **83**(7): p. 2907-16.
81. Shanks, R.M., et al., *Serratamolide is a hemolytic factor produced by Serratia marcescens*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36398.
82. Shanks, R.M.Q., et al., *Suppressor analysis of eepR mutant defects reveals coordinate regulation of secondary metabolites and serralyisin biosynthesis by EepR and HexS*. Microbiology (Reading), 2017. **163**(2): p. 280-288.
83. Shimizu, T., K. Ichimura, and M. Noda, *The Surface Sensor NlpE of Enterohemorrhagic Escherichia coli Contributes to Regulation of the Type III Secretion System and Flagella by the Cpx Response to Adhesion*. Infect Immun, 2016. **84**(2): p. 537-49.
84. Sousa, F., et al., *A novel metalloprotease from Bacillus cereus for protein fibre processing*. 2007. **40**(7): p. 1772-1781.
85. Stella, N.A., et al., *SlpE is a calcium-dependent cytotoxic metalloprotease associated with clinical isolates of Serratia marcescens*. Res Microbiol, 2017. **168**(6): p. 567-574.
86. Stella, N.A., et al., *Serratia marcescens Cyclic AMP Receptor Protein Controls Transcription of EepR, a Novel Regulator of Antimicrobial Secondary Metabolites*. J Bacteriol, 2015. **197**(15): p. 2468-78.
87. Stock, I., T. Grueger, and B. Wiedemann, *Natural antibiotic susceptibility of strains of Serratia marcescens and the S. liquefaciens complex: S. liquefaciens sensu stricto, S. proteamaculans and S. grimesii*. Int J Antimicrob Agents, 2003. **22**(1): p. 35-47.
88. Su, L.H., et al., *Extended epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by Serratia marcescens*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(10): p. 4726-32.
89. Tanikawa, T., Y. Nakagawa, and T. Matsuyama, *Transcriptional downregulator hexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in Serratia marcescens*. Microbiol Immunol, 2006. **50**(8): p. 587-96.

90. Tariq, A., A. Reyaz, and J.J.J.A.J.o.M.R. Prabakaran, *Purification and characterization of 56 KDa cold active protease from Serratia marcescens*. 2011. **5**(32): p. 5841-5847.
91. Warner, T.D., et al., *Human brain contains a metalloprotease that converts big endothelin-1 to endothelin-1 and is inhibited by phosphoramidon and EDTA*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(3): p. 505-6.
92. Wu, D., et al., *Structure of a thermostable serralysin from Serratia sp. FS14 at 1.1 Å resolution*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2016. **72**(Pt 1): p. 10-5.
93. Yiallourous, I., E. Grosse Berkhoff, and W. Stocker, *The roles of Glu93 and Tyr149 in astacin-like zinc peptidases*. FEBS Lett, 2000. **484**(3): p. 224-8.
94. Yoon, H.J., et al., *Outbreaks of Serratia marcescens bacteriuria in a neurosurgical intensive care unit of a tertiary care teaching hospital: a clinical, epidemiologic, and laboratory perspective*. Am J Infect Control, 2005. **33**(10): p. 595-601.
95. Yu, V.L., *Serratia marcescens: historical perspective and clinical review*. N Engl J Med, 1979. **300**(16): p. 887-93.
96. Zhang, L., A.J. Morrison, and P.H. Thibodeau, *Interdomain Contacts and the Stability of Serralysin Protease from Serratia marcescens*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0138419.
97. Zimmerman, M., E. Yurewicz, and G. Patel, *A new fluorogenic substrate for chymotrypsin*. Anal Biochem, 1976. **70**(1): p. 258-62.

