

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENDOLISINA G1 RECOMBINANTE
MARCADA CON LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SmbP y CusF3H+ Y SU
EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA CONTRA *Staphylococcus aureus***

Por

EDUARDO HERNÁNDEZ VILLALOBOS

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

Junio, 2023

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENDOLISINA G1 RECOMBINANTE
MARCADA CON LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SmbP y CusF3H+ Y SU
EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA CONTRA *Staphylococcus aureus***

Revisión de la Tesis:

**Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de Tesis**

**Dr. José Rubén Morones Ramírez
Comité Tutorial**

**Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Comité Tutorial**

**Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez
Comité Tutorial**

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENDOLISINA G1 RECOMBINANTE
MARCADA CON LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SmbP y CusF3H+ Y SU
EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA CONTRA *Staphylococcus aureus***

Aprobación de la Tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Presidente

Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez
Secretario

Dr. José Rubén Morones Ramírez
Vocal

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Ma. Guadalupe Villalobos Medrano y Julián Hernández Pérez, quienes siempre me han apoyado en las decisiones que he tomado, como estudiar este posgrado y quienes siempre están allí cuando los necesito.

A mis hermanos, César y Daniela, por su ayuda incondicional en cualquier aspecto, por ser para mí ejemplos a seguir y por todo el cariño brindado a lo largo de mi vida.

A mis sobrinos, Pablo, Ana Paula, Raydel y Julieta, quienes tan fácilmente logran sacarme una sonrisa sin importar mi estado de ánimo, por llenarme de energía cada vez que los veo y por pensar en ellos en mi intento de ser una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron presentes durante la realización de este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A CONACyT por la beca de manutención y a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por las instalaciones prestadas, así como materiales y reactivos brindados.

Agradezco a mi asesor el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por todo al apoyo brindado durante el trayecto de mi maestría, por su paciencia y por todos los conocimientos y consejos que me compartió.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. José Rubén Morones Ramírez, el Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez y el Dr. Gustavo Raúl Reyna Martínez, por todas sus observaciones, correcciones, consejos y tiempo durante la elaboración de este trabajo.

También agradezco a la Sub-directora de estudios de posgrado, la Dra. María Elena Cantú, por su atención y apoyo.

A todos los profesores del posgrado por compartir sus conocimientos en clases y ayudarme en mi formación académica.

A mis compañeros del laboratorio PEP: Felipe, Evelyn, David, Teresa, Jessica, Guillermo, Julius, Atika, César y Valeria, por enseñarme, aconsejarme y hacer mejor el tiempo pasado en el laboratorio.

A mi compañero de generación y orientación César por su toda ayuda en las clases de la maestría.

A mis amigos Jaime y Carlos Iván, por su amistad, consejos y ayuda todos estos años.

A mi familia por siempre apoyarme, alentarme cuando es necesario y formar a la persona que soy el día de hoy. Gracias por todo.

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1 | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Problemática de la resistencia a antimicrobianos | 1 |
| 1.2 Resistencia antimicrobiana en patógenos ESKAPE | 5 |
| 1.3 Biopelículas | 9 |
| 1.4 Endolisinas | 16 |
| 1.5 Proteínas Recombinantes | 20 |
| 1.6 Proteínas de Fusión..... | 22 |
| CAPÍTULO 2 | 25 |
| 2. ANTECEDENTES | 25 |
| 2.1 Las de Proteínas de Fusión SmbP y CusF | 25 |
| 2.2 Expresión de Endolisinas y su Actividad Antimicrobiana | 27 |
| CAPÍTULO 3 | 32 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 32 |
| 3.1 Hipótesis..... | 32 |
| 3.2 Objetivo General | 32 |
| 3.3 Objetivos Específicos..... | 32 |
| CAPÍTULO 4 | 34 |
| 4. METODOLOGÍA | 34 |
| 4.1 Obtención del Gen de la Endolisina G1..... | 35 |
| 4.2 Construcción de los Plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+- EndolisinaG1 | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3 Expresión de la Endolisina G1 en <i>E. coli</i> BL21(DE3) | 40 |
| 4.4 Purificación de Proteínas | 43 |
| 4.5 Cuantificación de Proteínas por el Método Bradford | 44 |
| 4.6 Remoción de la Proteína de Fusión | 45 |
| 4.7 Segunda Cromatografía de Afinidad | 45 |
| 4.8 Cuantificación de Endolisina Pura | 45 |
| 4.9 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la Endolisina G1 | 46 |
| 4.10 Evaluación de la Actividad Disruptiva de Biopelícula de la Endolisina G1 | 47 |
| CAPÍTULO 5 | 49 |
| 5. RESULTADOS | 49 |
| 5.1 Secuencia de la EndolisinaG1 Optimizada para su Expresión en <i>E. coli</i> | 49 |
| 5.2 Construcción <i>in silico</i> de los Plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 | 50 |
| 5.3 Digestión del Plásmido pUC57-EndolisinaG1..... | 51 |
| 5.4 Digestión de los Plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina | 52 |
| 5.5 Amplificación por PCR de SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1..... | 53 |
| 5.6 Secuenciación de las Construcciones pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 | 55 |
| 5.5 Expresión a Pequeña Escala y Análisis por SDS-PAGE de las Construcciones..... | 58 |
| 5.6 Purificación de SmbP-Endolisina y CusF3H+-Endolisina por Cromatografía IMAC..... | 59 |
| 5.7 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford. | 62 |
| 5.8 Remoción de la Proteína de Fusión y Segunda Cromatografía de Afinidad | 64 |
| 5.9 Cuantificación de Endolisina Pura..... | 65 |
| 5.10 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la Endolisina G1 | 66 |
| 5.11 Evaluación de la Actividad Antibiopelícula de la Endolisina G1..... | 68 |
| CAPÍTULO 6 | 70 |
| 6. DISCUSIONES | 70 |
| CAPÍTULO 7 | 79 |
| 7. CONCLUSIONES | 79 |
| CAPÍTULO 8 | 81 |
| 8. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS | 81 |
| CAPÍTULO 9 | 82 |
| 9. REFERENCIAS | 82 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Iniciadores Utilizados para la Amplificación de SmbP-Endolisina y CusF3H+-Endolisina mediante PCR..... | 40 |
| Tabla 2. Secuencia Aminoacídica de SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-Endolisina G1. | 57 |
| Tabla 3. Datos de la Curva de Calibración para el Método Bradford. | 62 |
| Tabla 4. Disposición de los Residuos Generados..... | 81 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Cronología del desarrollo y liberación de antibióticos y en paralelo la cronología de la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos..... | 4 |
| Figura 2. Ciclo de la biopelícula de estafilococos..... | 12 |
| Figura 3. Estructura modular de la mayoría de endolisinas de fagos de <i>S. aureus</i> | 18 |
| Figura 4. Representación esquemática de los sitios de corte en el peptidoglicano por los diferentes módulos de una endolisina de fago de <i>S. aureus</i> | 18 |
| Figura 5. Estrategia general de trabajo..... | 34 |
| Figura 6. Secuencia nucleotídica de la EndolisinaG1 optimizada para su expresión en <i>E. coli</i> | 49 |
| Figura 7. Secuencia aminoacídica de la EndolisinaG1. | 50 |
| Figura 8. Construcción <i>in silico</i> del plásmido pET30a-SmbP-EndolisinaG1. | 50 |
| Figura 9. Construcción <i>in silico</i> del plásmido pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1. | 51 |
| Figura 10. Gel de agarosa al 1 % de la digestión de pUC57-EndolisinaG1..... | 52 |
| Figura 11. Gel de agarosa al 1 % de la digestión de los plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina..... | 53 |
| Figura 12. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de SmbP-Endolisina..... | 54 |
| Figura 13. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de CusF3H+-Endolisina.. | 55 |
| Figura 14. Cromatograma obtenido de la secuenciación de pET30a-SmbP-Endolisina. | 56 |
| Figura 15. Cromatograma obtenido de la secuenciación de pET30a-CusF3H+-Endolisina. | 56 |
| Figura 16. Alineamiento de secuencias aminoacídicas. Secuenciación, SmbP, Sitio de corte de Enteroquinasa y Endolisina G1. | 57 |
| Figura 17. Expresión a pequeña escala de Endolisina G1 con las proteínas de fusión SmbP y CusF3H+, fracción soluble..... | 59 |
| Figura 18. Cromatograma de la purificación de SmbP-Endolisina por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). | 60 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Análisis de purificación de SmbP-Endolisina por IMAC. SDS-PAGE 10 %..... | 60 |
| Figura 20. Cromatograma de la purificación de CusF3H-Endolisina por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC). | 61 |
| Figura 21. Análisis de purificación de CusF3H+-Endolisina por IMAC. SDS-PAGE 10 %..... | 62 |
| Figura 22. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm. | 63 |
| Figura 23. Corte de SmbP-Endolisina con Enteroquinasa. Gel Tricina 12%..... | 64 |
| Figura 24. Corte de CusF3H+-Endolisina con Enteroquinasa. Gel Tricina 12%..... | 65 |
| Figura 25. Evaluación antimicrobiana de la Endolisina G1 | 67 |
| Figura 26. Evaluación antibiopelícula de la Endolisina G1..... | 69 |
| Figura 27. Estructuras tridimensionales de la Endolisina G1, dominio CHAP y amidasa-2 | 78 |

NOMENCLATURA

| | |
|-----------|---|
| °C | Grados centígrados |
| μg | Microgramo |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| Δ | Cantidad de cambio en una variable |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| Ag | Plata |
| AltA | Autolisina |
| Amp | Ampicilina |
| AMP | Péptidos antimicrobianos |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| Aur | Aureolisina metaloproteasa |
| BamHI | Enzima de restricción |
| Bap | Proteína de superficie de <i>S. aureus</i> involucrada en la formación de biopelícula |
| Bin1 | Péptido antimicrobiano |
| BL21(DE3) | Cepa de <i>E. coli</i> para expresión de proteínas |
| blaZ | Gen codificante de la β-lactamasa |
| BSA | Albúmina de Suero Bovino |
| CBD | Dominio de unión a pared celular |
| CHAP | Dominio amidohidrolasa/peptidasa dependiente de histidina y cisteína |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria |
| Co | Cobalto |
| Cu | Cobre |
| CusF | Proteína parte del complejo CusCFBA |
| CusF3H+ | Modificación a CusF donde se han agregado tres histidinas |
| CWA | Proteínas ancladas en la pared celular |
| D-Ala | D-Alanina |
| dfrA | Gen codificante de la dihidrofolato reductasa. |
| DH5α | Cepa de <i>E. coli</i> para producción y mantenimiento de ADN recombinante |
| dNTPs | Desoxirribionucleótidos |
| EAD | Dominio de actividad enzimática |
| eDNA | Ácido desoxirribonucleico extracelular |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| EndoG1 | Endolisina del bacteriófago G1 de <i>S. aureus</i> |
| EPS | Sustancia polimérica extracelular |

| | |
|--------------------|---|
| ermC | Gen codificante de la ARNr adenina N-6-metiltransferasa. |
| ESKAPE mortales | Acrónimo de un grupo de patógenos nosocomiales potencialmente mortales |
| ETK | Enteroquinasa |
| Fe | Hierro |
| FPLC | Fast protein liquid chromatography |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| GST | Glutación S transferasa |
| h | Hora |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| hGH | Hormona del crecimiento |
| His | Histidina |
| ica | Operón de adhesión intracelular |
| icaA-D | Genes del operón ica que codifican las enzimas relacionadas con la producción del polisacárido de adhesión intercelular |
| IcaR | Represor del operón ica |
| IMAC | Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados |
| Kan | Kanamicina |
| kDa | Kilodaltones |
| L-Ala | L-Alanina |
| LB | Luria Bertani |
| LL-37 | Péptido antimicrobiano |
| LovR | Proteína regulador respuesta de LovK |
| LysK | Endolisina del fago de estafilocócico K |
| MBP | Proteína de unión a maltosa |
| MDR | Resistente a múltiples medicamentos |
| mecA | Gen codificante de la proteína de unión a la penicilina PBP2a |
| mg | Miligramo |
| MIC | Concentración Mínima Inhibitoria |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| MPa | Megapascal |
| mQ inversa | Con grado de laboratorio que ha sido filtrado y purificado por ósmosis inversa |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina |
| MSSA | <i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina |
| NaCl | Cloruro de sodio |
| NcoI | Enzima de restricción |
| NDPK2 | Proteína nucleótido difosfato quinasa |
| Ni | Níquel |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |
| nM | Nanomolar |
| nucl | Gen que codifica para la nucleasa termoestable 1 |
| Nuc1 | Nucleasa termoestable 1 |
| OD ₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nanómetros |

| | |
|---------|--|
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida |
| pb | Pares de bases |
| PBP2a | Proteína alterada de unión a la penicilina, responsable de la resistencia a la meticilina |
| PBS | Solución amortiguadora fosfato salino |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PDR | No susceptible a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos |
| pET30a | Vector de expresión bacteriano con promotor T7 |
| PGH | Hidrolasas de péptidoglicano |
| pH | Potencial Hidrogeno |
| PIA | Adhesina intercelular de polisacáridos |
| pmoles | Picomoles |
| PNAG | Poli- β (1-6)-N-acetilglucosamina |
| PSM | Grupo de moléculas que participa en la formación de la estructura de la biopelícula de estafilococos |
| pUC57 | Vector de clonación con un marcador de resistencia a la ampicilina |
| RFP | Proteína rojo fluorescente |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| rSAL-1 | Forma recombinante de la endolisina SAL-1 |
| SAP | Fosfatasa alcalina de camarón |
| ScpA | Cisteína proteasa |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| SH3b | Tipo de dominio de unión a pared celular |
| SHY2 | Hipocótilo corto 2 |
| SMAP-29 | Péptido antimicrobiano mieloides de oveja de 29 aminoácidos |
| SmbP | Small metal-binding Protein |
| SplA-F | Serina proteasas |
| SspA-B | Cisteína proteasas |
| T7 | Bacteriófago que infecta a la mayoría de las cepas de <i>E. coli</i> |
| TAE | Tris-ácido acético-EDTA |
| tetL | Gen codificante del péptido líder de resistencia a tetraciclina. |
| TGS | Tris-glicina-dodecilsulfato de sodio |
| U | Unidades |
| VpDef | Péptido antimicrobiano |
| VRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la vancomicina |
| WTA | Ácidos teicoicos de la pared celular |
| XDR | No susceptible al menos un agente en todas las categorías de antimicrobianos |
| XhoI | Enzima de restricción |

RESUMEN

Eduardo Hernández Villalobos

Fecha de graduación: Junio 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA ENDOLISINA G1 RECOMBINANTE MARCADA CON LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN SmbP y CusF3H+ Y SU EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA CONTRA *Staphylococcus aureus*

Número de páginas: 93

Candidato para el grado de
Maestría en Ciencias con
Orientación en Microbiología
Aplicada

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y Método de Estudio: Expresar la endolisina del bacteriófago G1 de *Staphylococcus aureus* (EndolisinaG1) en dos sistemas de expresión y purificación utilizando las proteínas de fusión SmbP y CusF3H+ y como hospedero *Escherichia coli*, así como evaluar la actividad antibacteriana y antibiopelícula contra *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a meticilina y comparar su efectividad con otras endolisinas.

La metodología consistió en los siguientes pasos: construcción de plásmidos, transformación en la cepa DH5 α , extracción de ADN plasmídico, transformación en la cepa BL21(DE3), expresión de proteínas, purificación de proteínas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, remoción de la proteína de fusión,

cuantificación de proteínas y por último la evaluación de su actividad antibacteriana y antibiopelícula contra *S. aureus*.

Contribuciones y conclusiones: Se obtuvieron dos construcciones SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1 para la producción de EndolisinaG1 en *E. coli*.

Tanto SmbP como CusF3H+ demostraron ser efectivas para la producción de EndolisinaG1 ya que con ellas se obtuvo proteína soluble.

Dado que las proteínas de fusión utilizadas en este proyecto son afines a diversos metales entre ellos Ni(II), se puede usar cromatografía de afinidad para su purificación facilitando el proceso.

Se evaluó la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de la endolisina del fago G1, los resultados muestran que esta proteína no presenta actividad antimicrobiana o antibiopelícula contra *S. aureus* o su biopelícula.

Este proyecto describe una estrategia eficiente para la expresión y purificación de la Endolisina G1.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática de la resistencia a antimicrobianos

El término “antibiótico” hace referencia a sustancias producidas de manera natural por diversos microorganismos, como bacterias u hongos y que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. En la era moderna, con la producción de derivados semisintéticos, el término “antibiótico” ha sido reemplazado por el término “antimicrobiano” que hace referencia a sustancias naturales, semisintéticas y sintéticas capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos [1].

Antes del surgimiento de los antibióticos, algunas enfermedades infecciosas como la neumonía, la meningitis o la tuberculosis no podían ser tratadas en absoluto. Asimismo, en algunas especialidades como la cirugía, pediatría y hematología se presentaban altas tasas de mortalidad como consecuencia de las infecciones [2].

La era moderna de los antibióticos comienza con el concepto de “*magic bullet*” o “bala mágica” de Paul Erlich a principios del siglo XX, quien junto al químico Alfred

Bertheim y el bacteriólogo Sahachiro Hata, descubrieron el colorante arsénico arsfenamina, más tarde llamado Salvaran, como un fármaco eficaz contra la sífilis [3].

Posteriormente, la penicilina fue descubierta por Alexander Fleming en 1928; sin embargo, la producción en masa comenzó más de 15 años después durante la Segunda Guerra Mundial [4].

En 1944, Selman Waksman (considerado “el padre de los antibióticos” y quien acuñó el término) descubrió un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, producido por *Streptomyces griseus* y lo llamó estreptomicina [5]. Esto marcó el inicio de una edad de oro para los antibióticos, lo que llevó al descubrimiento de más de 20 grupos diferentes de antibióticos en las décadas siguientes, incluyendo sulfonamidas, β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, péptidos cíclicos, tetraciclinas, macrólidos, anfenicoles, nitroimidazoles, lincosamidas, oxazolidinonas y ansamicinas [6]. Sin embargo, la resistencia a los antibióticos comenzó a surgir rápidamente. El desarrollo de la resistencia es una respuesta directa a la exposición a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos debido al mal uso de los antibióticos en diferentes campos, tales como, el cuidado de la salud, la industria animal, la agricultura y la acuicultura [7]. El uso indebido se refiere al uso sin necesidad terapéutica, adquisición sin receta, automedicación, dosificación irregular o interrumpida e intercambio de antibiótico [8].

Además de la presión selectiva del inadecuado uso de antibióticos, la resistencia también surge como consecuencia de mutaciones en los microorganismos, que les proporciona una ventaja competitiva para las cepas mutadas. Las dosis subóptimas de antibióticos provocan la selección gradual de la resistencia. Además, existen genes de resistencia que se encuentran en elementos cromosómicos y en elementos

extracromosómicos transmisibles, como los plásmidos. Las clonas resistentes resultantes se diseminan rápidamente por todo el mundo. La propagación se ve facilitada por la transmisión de genes entre especies, la deficiencia en el saneamiento y en la higiene en las comunidades y hospitales, y la frecuencia cada vez mayor de los viajes [9].

Un ejemplo del rápido surgimiento de resistencia a los antibióticos es la resistencia de *Staphylococcus* a la penicilina, la cual para el año 1940 ya se había detectado, incluso antes de que comenzara la producción en masa de este antibiótico, mientras que la resistencia a la meticilina se informó en 1961, solo dos años después de su introducción (figura 1). Sin embargo, en los años posteriores continuó la investigación y el desarrollo de antimicrobianos para uso clínico.

El glucopéptido vancomicina se introdujo en la práctica clínica en 1958; sin embargo, en 1986 se reportó el primer caso de resistencia en *Enterococcus*. Para finales del siglo XX, se reportaron casos de resistencia a vancomicina en *Staphylococcus* (figura 1).

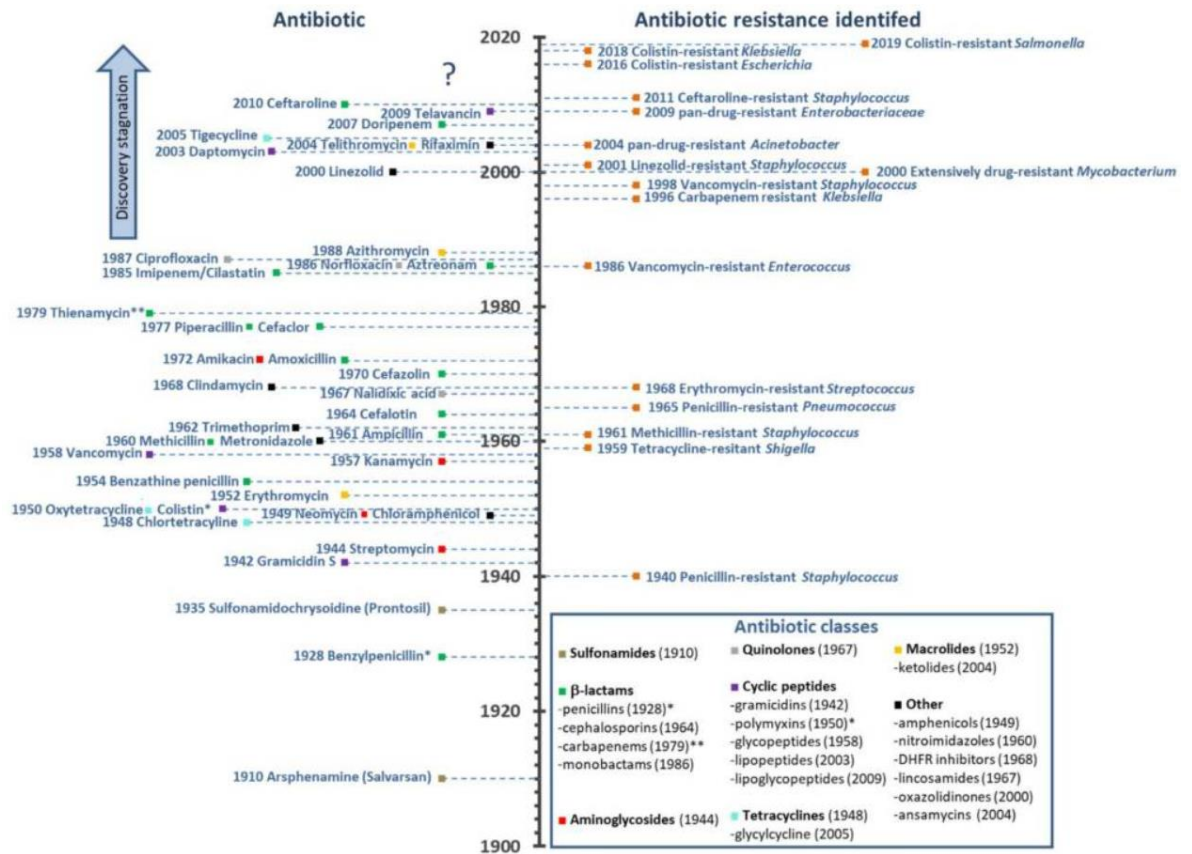


Figura 1. Cronología del desarrollo y liberación de antibióticos, y en paralelo la cronología de la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos [6].

En entornos nosocomiales, la propagación de una clona resistente puede ser rápida y tener graves consecuencias para los pacientes vulnerables. *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) adquirido en hospitales prevalece en todo el mundo. En los países de altos ingresos, se aborda con una combinación de nuevos antibióticos y un mejor control de infecciones hospitalarias, pero las cepas comunitarias de MRSA continúan proliferando. En países de bajos y medianos ingresos como Sudáfrica, el 52 % de aislados de *S. aureus* provenientes de pacientes hospitalizados con bacteriemia son MRSA [10].

Las bacterias multirresistentes (MDR) se han convertido en una gran preocupación con la aparición de cepas panresistentes (PDR) o extremadamente resistentes (XRD), por

ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* resistente a fluoroquinolonas y a todos los fármacos inyectables de segunda línea (kanamicina, capreomicina o amikacina) [11].

Cada año, 700.000 personas mueren a causa de infecciones causadas por una bacteria resistente a los antibióticos. En un informe de Wellcome Trust y el gobierno británico se estimó que, al ritmo actual de aumento, 10 millones de personas morirán durante el año 2050 como resultado de la resistencia a antimicrobianos [12]. Diez millones de muertes en 2050 superarían los 8.2 millones de muertes por cáncer en 2019 [13].

Además de los costos de vidas humanas, existen altos costos económicos para la atención médica y estos recursos podrían utilizarse en otros aspectos. Las infecciones causadas por microorganismos resistentes son más costosas de tratar y es más probable que los pacientes infectados requieran una hospitalización prolongada y tengan costos de tratamiento más altos que los pacientes infectados con cepas sensibles a los antimicrobianos [14].

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antibióticos es una "amenaza a la seguridad mundial" que afecta a la salud global, la seguridad alimentaria y el desarrollo, y es tan importante como el terrorismo y el cambio climático [15].

1.2 Resistencia antimicrobiana en patógenos ESKAPE

“ESKAPE” es un acrónimo de un grupo de patógenos intrahospitalarios, y se refiere a: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.* El acrónimo

ESKAPE refleja la capacidad de estos organismos para "escapar" de ser eliminados a causa de los antibióticos y desafiar su erradicación por terapias convencionales. Estos patógenos también se denominan "*superbugs*" o "superbacterias" [16].

Los patógenos ESKAPE resistentes a los antimicrobianos representan una amenaza global para la salud humana. La adquisición de genes de resistencia a los antimicrobianos por parte de los patógenos de ESKAPE ha reducido las opciones de tratamiento para infecciones graves, aumentando la gravedad de la enfermedad y aumentando las tasas de mortalidad debido al fracaso del tratamiento y también requiere una respuesta global coordinada para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos [17]. Sin embargo, los esfuerzos globales para controlar los organismos resistentes a múltiples fármacos se han visto obstaculizados por su capacidad para escapar de los fármacos antibacterianos [16].

En febrero de 2017, con la finalidad de enfocar y guiar la investigación y el desarrollo relacionados con nuevos antibióticos, la OMS publicó su lista de patógenos para los cuales se necesita con urgencia el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Dentro de esta amplia lista, los patógenos ESKAPE fueron designados como "estado de prioridad" [18].

La ineficacia de los antimicrobianos frente a estos patógenos se debe a diversos mecanismos de resistencia, como la inactivación del fármaco, la modificación de los sitios blanco de unión del fármaco, los cambios en la permeabilidad celular y/o mutación [19]. Mediante mutación genética y adquisición de elementos genéticos móviles, los patógenos ESKAPE han desarrollado mecanismos de resistencia frente a oxazolidinonas, lipopéptidos, macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, β -lactámicos y antibióticos de

última línea de defensa, incluidos carbapenémicos, glucopéptidos y polimixinas [20]. En contraste, la resistencia a los lipogluco péptidos es rara y solo recientemente ha sido documentada. Esto puede atribuirse potencialmente a la acción dual de los lipogluco péptidos al inhibir la síntesis de peptidoglicano y desestabilizar la membrana celular bacteriana [21].

S. aureus, es una bacteria Gram-positiva perteneciente al grupo ESKAPE, que además puede colonizar al ser humano. Esta bacteria se encuentra en el ambiente y con frecuencia en las superficies de las mucosas (narinas, garganta y recto) y en las regiones húmedas de la piel (axila, ingle y perineo) [22]. El 60 % de la población es colonizado transitoriamente, mientras que en el 30 % la colonización es persistente [23].

S. aureus (tanto sensible (MSSA), como resistente a meticilina) es un patógeno exitoso y adaptable, relevante tanto en infecciones hospitalarias y asociadas a la comunidad [24]. Es una causa importante de infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones osteoarticulares, infecciones relacionadas con dispositivos médicos, neumonía, endocarditis y bacteriemia [25].

S. aureus se vuelve potencialmente mortal cuando logra evadir el sistema inmune del hospedero, cruza la barrera epitelial y accede a tejidos más profundos, como la sangre, las válvulas cardíacas, tejidos blandos o los huesos [26]. Las personas corren un mayor riesgo de infecciones por *S. aureus* cuando ingresan en hospitales, se someten a una cirugía o se les colocan dispositivos médicos implantables, o cuando entran en contacto con pacientes infectados por *S. aureus* [27].

Antes de la llegada de los antibióticos, las infecciones graves por *S. aureus* solían ser consideradas como una sentencia de muerte. Estas infecciones se volvieron tratables con éxito después del descubrimiento de la penicilina por parte de Alexander Fleming, debido a la actividad de la penicilina contra *S. aureus* [28]. Sin embargo, solo unos años después de la introducción de la penicilina, se describieron las primeras cepas resistentes, que producían una enzima extracelular, llamada penicilinasas [29].

En vista de la tendencia a la resistencia, las compañías farmacéuticas desarrollaron la meticilina, considerada el prototipo de las penicilinas antiestafilocócicas (grupo que consiste en oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina y flucloxacilina) [28]. En poco tiempo, las cepas también desarrollaron resistencia contra estos agentes antimicrobianos. El fenómeno de la resistencia a la meticilina en las cepas de *S. aureus* se describió por primera vez en 1961 y se caracterizó por una proteína alterada de unión a la penicilina (PBP2a) que tenía una afinidad reducida por la meticilina y, por lo tanto, la síntesis de peptidoglicano podía continuar sin interrupciones en presencia de este fármaco [30].

Se han identificado genes de resistencia para varios antibióticos tanto en MSSA como en MRSA, como penicilina (*blaZ*), eritromicina (*ermC*), clindamicina (*ermC*), tetraciclinas (*tetL*) y trimetoprima (*dfrA*) [31]. MRSA ha adquirido resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos a través de dos mecanismos distintos: (1) la producción de la proteína de unión a penicilina 2a (PBP2a, codificada por el gen *mecA*), una transpeptidasa que es altamente resistente a la inhibición por los antibióticos β -lactámicos y puede mantener el entrecruzamiento de peptidoglicano, por lo tanto permitir que la cepa sobreviva en presencia de β -lactámicos [32] y (2) la producción de β -lactamasas, que

hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de cuatro miembros, inactivando al antibiótico antes de que llegue al blanco PBP [33].

Además, MRSA a menudo es resistente a otras clases de antibióticos que actualmente están en uso clínico. La mayoría de los MRSA adquirido en hospital son resistentes a aminoglucósidos, lincosamidas, fluoroquinolonas y macrólidos [34]; sin embargo, la resistencia a los fármacos de referencia vancomicina y linezolid es poco frecuente [35].

1.3 Biopelículas

El término biopelícula bacteriana fue acuñado en 1978 por Costerton, quien lo describió como una comunidad microbiana estructurada que está adherida a una superficie y rodeada por una matriz extracelular [36]. Sin embargo, los agregados celulares que se forman en ausencia de cualquier superficie, también se consideran tipos de biopelículas [37]. Desde la introducción del modelo de biopelícula hace más de 40 años, ha quedado claro que la mayoría de las bacterias tienen la capacidad inherente de crecer en estos ecosistemas.

Peters [38] demostró con estudios iniciales de microscopía electrónica que las células de estafilococos se adhieren a los catéteres centrales venosos, donde están incrustadas en un "material viscoso", es decir, la matriz de la biopelícula. El papel de la matriz de biopelícula o sustancia polimérica extracelular (EPS), que consiste principalmente en polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eDNA), es proteger a las

células de factores ambientales nocivos, incluidos los antibióticos y el sistema inmunitario del hospedero [39].

Los miembros del género *Staphylococcus*, incluidos *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, son patógenos oportunistas y ambos producen biopelículas sólidas en superficies abióticas y bióticas. Si bien la colonización nasal y de la piel con estos patógenos ocurre ampliamente en humanos sin ningún síntoma [40], el cambio entre células individuales que flotan libremente, conocido como "estado planctónico" y una biopelícula multicelular es un paso fundamental para que los estafilococos causen diferentes tipos de infecciones, incluidas la endocarditis infecciosa, la osteomielitis y las infecciones de prótesis articulares [41].

Aunque en el pasado investigadores han estudiado extensamente la base molecular de la formación de biopelículas de estafilococos *in vitro*, el conocimiento sobre la formación de biopelículas de estafilococos en condiciones *in vivo* aún es limitado. A diferencia de la formación de biopelículas *in vitro*, los estafilococos *in vivo* están sujetos a las defensas innatas del hospedero, como neutrófilos, macrófagos y péptidos antimicrobianos (AMP) [42].

Durante la infección, las biopelículas de estafilococos confieren protección contra el sistema inmune del hospedero, así como al tratamiento antibiótico. Mientras que la persistencia de la biopelícula ante la respuesta inmune se atribuyó durante mucho tiempo al microambiente de la biopelícula que actúa como una barrera física contra las células inmunitarias del hospedero [43], ahora se conoce que las biopelículas protegen a las células bacterianas de la detección por parte del sistema inmunitario al enmascarar los patrones moleculares asociados con los patógenos [44].

Originalmente se hipotetizó que la biopelícula evita la difusión de antibióticos, puesto que las células de la biopelícula son resistentes al tratamiento con antibióticos. Sin embargo, nueva evidencia sugiere que las células que residen dentro de las biopelículas tienen una baja actividad metabólica, lo que aumenta su tolerancia frente a los antibióticos que se dirigen principalmente a las células metabólicamente activas [45].

Las células dentro de una biopelícula se encuentran con una baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes, lo que resulta en una baja actividad metabólica celular y una caída en los niveles de ATP intracelular, lo que contribuye a una elevada tolerancia a los antibióticos. Las células dentro de una biopelícula son de 10 a 1000 veces más tolerantes a los antibióticos que las células planctónicas [46]. Por lo tanto, las estrategias antibiopelícula que interfieren con las células de la biopelícula independientemente de su actividad celular, las modificaciones de la superficie para evitar la adhesión bacteriana, las nanopartículas con actividad antimicrobiana y las nuevas tecnologías para la eliminación física de biopelícula, se consideran enfoques muy atractivos [47].

El desarrollo de la biopelícula de estafilococos es un proceso complejo que se puede dividir en tres fases principales: (1) adhesión inicial, (2) producción de matriz extracelular y proliferación celular, y (3) estructuración de la biopelícula y desprendimiento celular.

Descripción general de los pasos de formación de biopelícula en *S. aureus* y proceso mostrado en la figura 2.

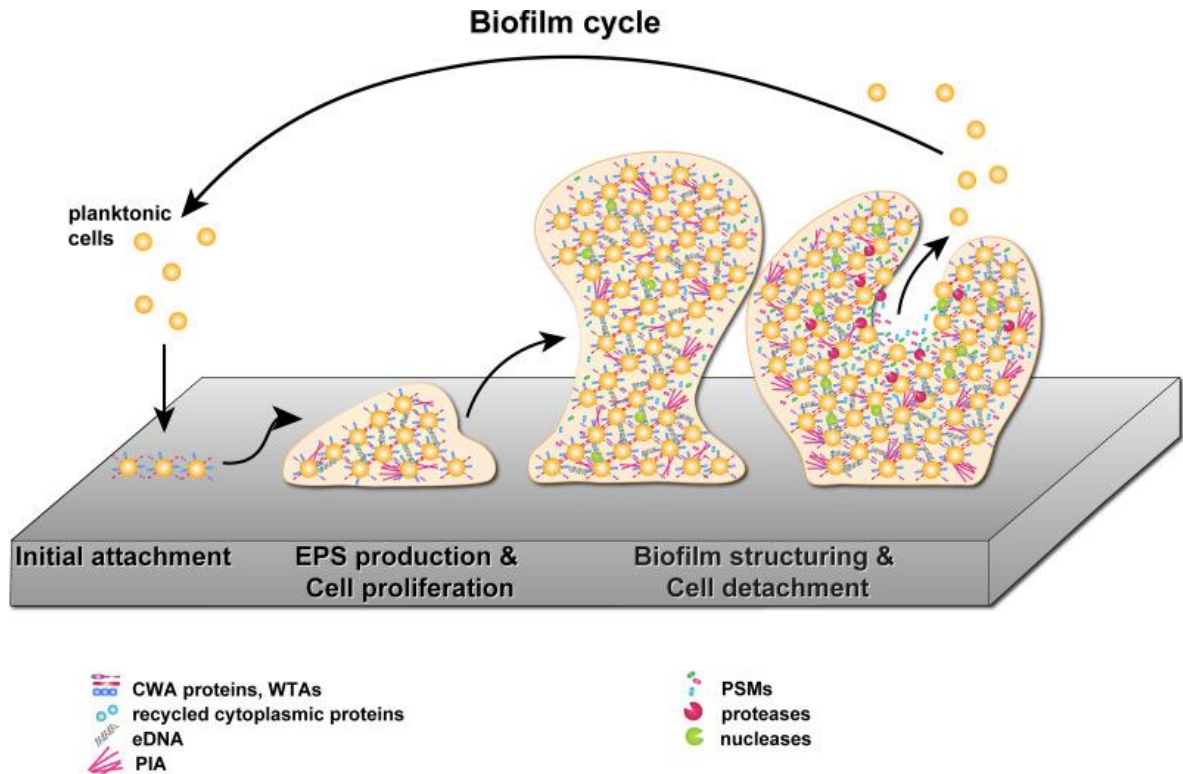


Figura 2. Ciclo de la biopelícula de estafilococos. Durante el primer paso, las células de estafilococos planctónicas se unen a una superficie con proteínas CWA y WTA (unión inicial). La producción de PIA, eDNA y adhesinas para establecer interacciones intercelulares aumenta y conduce a la formación de microcolonias en la superficie (producción de EPS y proliferación celular). En el último paso, la biopelícula se dispersa por la acción de los PSM y las proteasas, permitiendo que las células bacterianas se desprendan de la biopelícula para colonizar nuevos nichos (estructuración de la biopelícula y desprendimiento celular) [48].

1.3.1 Adhesión inicial

La unión a la superficie es la primera etapa de la formación de biopelícula, en la que las células planctónicas se adhieren a las superficies bióticas o abióticas utilizando una variedad de factores y mecanismos diferentes, que incluyen adhesinas de superficie unidas a sortasa, ácidos teicoicos de la pared celular (WTA), cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular y producción de eDNA [48]. Durante la infección, los estafilococos

se encuentran principalmente con superficies bióticas compuestas por una matriz que incluye fibrinógeno, fibronectina y colágeno. La unión a estas superficies bióticas se ve facilitada por proteínas ancladas en la pared celular (CWA), de las cuales el grupo mejor caracterizado se denomina componentes de superficie microbiana que reconocen moléculas de matriz adhesiva [49].

La unión a superficies abióticas de catéteres e implantes y también a las superficies de poliestireno de las placas de microtitulación que se utilizan para experimentos de biopelículas *in vitro*, se facilita a través de interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Los glicopolímeros extracelulares se han identificado como los principales impulsores de estas interacciones en *S. aureus* y en *S. epidermidis* [50].

1.3.2 Producción de matriz extracelular y proliferación celular

Después de la unión inicial de células individuales a una superficie, estas células comienzan a proliferar, dando como resultado la formación de las llamadas microcolonias. Como parte del proceso temprano de maduración de la biopelícula, las bacterias también comienzan a producir EPS, que eventualmente forma la matriz de la biopelícula. El EPS consiste principalmente en polisacáridos, proteínas, ácidos teicoicos y eDNA; si bien estos son los componentes principales de la matriz de la biopelícula, la composición exacta de la matriz de la biopelícula puede variar según la disponibilidad del sustrato y los factores físicos [51].

Dependiendo de la composición del EPS, las biopelículas de estafilococos se pueden dividir en dos grandes categorías: biopelículas que consisten en una matriz de polisacáridos y biopelículas con una matriz proteica [52]. En las biopelículas dependientes

de polisacáridos, el principal componente de EPS es la poli- β (1-6)-N-acetilglucosamina (PNAG), también conocida como adhesina intercelular de polisacáridos (PIA) [53]. La producción de PIA depende del operón de adhesión intracelular (*ica*), que comprende cuatro genes dispuestos en el siguiente orden: *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*. La transcripción de este operón está regulada principalmente por *icaR*, un represor ubicado río arriba del operón *ica* [54].

Además de las biopelículas dependientes de polisacáridos, también se ha demostrado que los estafilococos forman biopelículas con matrices que consisten principalmente en material proteínico. Dichas biopelículas se han observado principalmente en aislamientos de MRSA y aislamientos clínicos de *S. epidermidis*, mientras que los aislamientos de MSSA son más a menudo dependientes de *ica* [55]. En un estudio, la proteína de superficie Bap de *S. aureus* se identificó como el principal factor determinante de la adherencia exitosa a la superficie, así como de la acumulación intercelular durante el desarrollo de la biopelícula [56].

Un tercer tipo de biopelícula de estafilococos es la dependiente principalmente de eDNA. El descubrimiento inicial de este tipo de biopelícula está respaldado por la observación de que un mutante deficiente en AtlA, la principal autolisina en *S. aureus* responsable de la liberación de eDNA, mostró un fenotipo de formación de biopelícula reducido en experimentos *in vitro* [57]. Finalmente, las biopelículas maduras de estafilococos son sensibles a la DNasa I añadida externamente, lo que demuestra que el eDNA es un componente estructural de la matriz de la biopelícula [58].

1.3.3 Estructuración de la biopelícula y desprendimiento de células

Las biopelículas de estafilococos consisten en estructuras similares a torres intercaladas por canales llenos de líquido que se desarrollan durante un proceso denominado maduración de biopelícula. La estructura tridimensional de las biopelículas está formada por actividades de diferentes enzimas y moléculas que pueden degradar o interrumpir la matriz de la biopelícula [59]. Dado que los componentes principales de la matriz de la biopelícula son los polisacáridos, las proteínas y el eDNA, los estafilococos tienen una amplia gama de exoenzimas que pueden atacar componentes específicos de la matriz de la biopelícula.

Las biopelículas de proteínas son más susceptibles a la dispersión mediada por proteasas. *S. aureus* produce y secreta 10 proteasas conocidas de diferentes familias de proteasas: la metaloproteasa aureolisina (Aur), las dos cisteína proteasas SspB y ScpA, y siete serina proteasas conocidas como SspA y SplA a -F. La importancia de las proteasas individuales para la degradación y dispersión de la biopelícula es altamente específica de la cepa y hasta hoy se ha demostrado que las proteasas SspA, SspB, ScpA y Aur degradan las biopelículas de *S. aureus* [60].

Otro componente importante de la matriz de la biopelícula de estafilocócicos es el eDNA, el cual está sujeto a degradación por nucleasas. La nucleasa termoestable Nuc1, es expresada por *S. aureus*. La mutación del gen *nuc1* conduce a una mayor formación de biopelículas de estafilococos, mientras que la sobreexpresión de *nuc1* conduce a una reducción en la formación de biopelículas. La expresión de Nuc1 está altamente reprimida en condiciones de crecimiento de biopelículas *in vitro*. [61].

Existe otro grupo de moléculas que participa en la formación de la estructura de la biopelícula de estafilococos. Estas moléculas, denominadas PSM, pueden dispersar biopelículas, muy probablemente al interrumpir las interacciones no covalentes entre los componentes de la matriz debido a naturaleza anfipática. De hecho, la adición externa de PSM a biopelículas de estafilococos en crecimiento inhibe su formación. La actividad de PSM también contribuye de manera importante al desprendimiento de biopelículas y la posterior diseminación de células de estafilococos *in vivo* [62].

Estrategias antibiopelícula basadas en bacteriófagos

Una estrategia alternativa para combatir las infecciones asociadas a la biopelícula es el uso de bacteriófagos, virus que infectan específicamente las células bacterianas. Históricamente, la terapia con bacteriófagos contra las infecciones bacterianas ya se había utilizado hace más de 100 años, pero con el descubrimiento de los antibióticos, esta forma de tratamiento perdió popularidad. Sin embargo, el aumento de bacterias multirresistentes ha despertado un nuevo interés en el uso potencial de los bacteriófagos y sus productos para combatir las infecciones bacterianas [63]. Los bacteriófagos producen endolisinas, que pueden degradar enzimáticamente el peptidoglucano bacteriano, lo que da como resultado la lisis celular y la eliminación de la biopelícula [64].

1.4 Endolisinas

Las endolisinas son hidrolasas de peptidoglucano (PGH), codificadas por bacteriófagos que lisan las paredes celulares de bacterias desde el interior de las células bacterianas para liberar los fagos de la progenie después de la replicación en el ciclo de

vida del bacteriófago [65]. Las endolisinas obtienen acceso al peptidoglicano a través de la acción y regulación de una segunda proteína del fago, denominada holina. Las holinas son formadoras de poros en la membrana citoplasmática, causan que la membrana se despolarice y se permite que las endolisinas se difundan a través de la membrana y degraden su objetivo de peptidoglicano, lo que ocasiona una "lisis desde dentro" [66].

Las endolisinas se clasifican por su especificidad catalítica, es decir, los enlaces diana dentro del sustrato de peptidoglicano. Los enlaces entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina en las hebras del peptidoglicano son objetivo de las glucosaminidasas, muramididasas y transglucosilasas. Por el contrario, las endopeptidasas escinden varios enlaces dentro de la porción peptídica del peptidoglucano y las amidadasas hidrolizan los enlaces amida que unen los restos de azúcar y péptido en la capa de peptidoglicano [67].

El diseño modular de las endolisinas difiere en función del tipo de bacterias sobre las que actúan. En el caso de las endolisinas que actúan contra bacterias Gram-negativas, la función catalítica suele estar ubicada dentro de un solo dominio globular [68]. Por el contrario, las endolisinas que actúan sobre bacterias Gram-positivas suelen mostrar un diseño modular en el que la función catalítica y el reconocimiento de la pared celular se separan en dos o más dominios funcionales [69].

La estructura de la mayoría de las endolisinas de bacteriófagos de *S. aureus* presentan una arquitectura de tres dominios (figura 3), con dos dominios de actividad enzimática (EAD) (uno en el extremo N y el segundo ubicado en el centro) y un dominio de unión a pared celular (CBD) de tipo SH3b en el extremo C, estos dominios generalmente están conectados por una región conectora o enlazadora corta. Sin embargo,

existen arquitecturas más complejas, con múltiples EAD y/o CBD en diferentes posiciones [70].

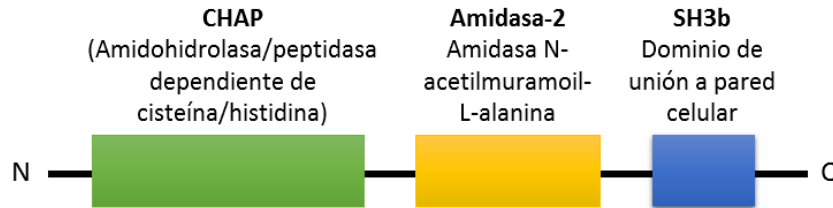


Figura 3. Estructura modular de la mayoría de endolisinas de fagos de *S. aureus*. Consta de 2 dominios enzimáticamente activos (CHAP y amidasa-2) y un dominio de unión a la pared celular bacteriana (SH3b) [71].

En la mayoría de los casos, el EAD N-terminal es una amidohidrolasa/peptidasa (CHAP) dependiente de histidina y cisteína, que rompe el enlace entre D-Ala y el puente de pentaglicina. El EAD ubicado en el centro tiene actividad amidasa, cortando entre el ácido N-acetilmurámico y la L-Ala. Se sabe que el dominio SH3b requiere de un puente de pentaglicina intacto para su actividad de unión [71]. Los sitios de corte de cada módulo de endolisina en el peptidoglicano se muestran en la figura 4.

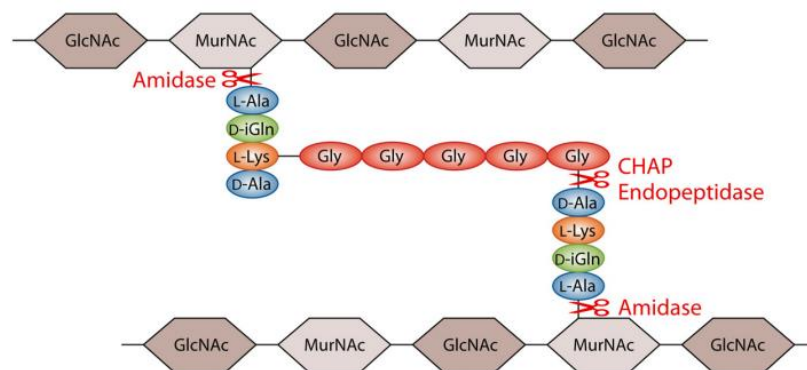


Figura 4. Representación esquemática de los sitios de corte en el peptidoglicano por los diferentes módulos de una endolisina de fago de *S. aureus* [71].

No obstante, se ha demostrado para varias endolisinas de doble EAD que uno de esos dos EAD es virtualmente inactivo, mientras que el otro es dominante y exhibe una alta actividad lítica en pruebas de lisis desde el exterior [70]. Si bien la actividad lítica de algunas endolisinas depende estrictamente de la presencia de un CBD [72], no siempre es así, hay otros ejemplos de endolisinas cuya actividad no se ve comprometida o incluso aumenta tras la eliminación del CBD [70].

A medida que el tratamiento de las infecciones bacterianas resulta cada vez más difícil debido a la creciente incidencia de cepas resistentes a los antibióticos, se ha sugerido que las endolisinas de fagos son alternativas terapéuticas antibacterianas prometedoras [65]. Aplicadas exógenamente han mostrado una lisis rápida *in vitro* y también en varios modelos animales de infección. Al actuar por contacto pueden lisar rápidamente las bacterias independientemente de su fase de crecimiento o perfil de resistencia a los antibióticos [73]. Aunque se han identificado endolisinas con una amplia gama de actividad lítica, la mayoría de las endolisinas muestran una especificidad cercana a nivel de especie y se cree que esta es una de sus propiedades más ventajosas en esta era de amplia resistencia a los antibióticos, al evitar la presión selectiva sobre poblaciones comensales [74].

Las endolisinas utilizadas terapéuticamente evitan la mayoría de los posibles mecanismos de resistencia (por ejemplo, salida activa de la célula o disminución de la permeabilidad de la membrana) que desempeñan un papel en la resistencia a la mayoría de los antibióticos convencionales [75]. Varias endolisinas también poseen dos dominios catalíticos que hidrolizan diferentes enlaces en el peptidoglicano, lo que también se cree que reduce aún más la posibilidad de desarrollo de resistencia [76]. Asimismo, para

potenciar su actividad terapéutica y evitar el desarrollo de resistencias, se pueden utilizar múltiples endolisinas en combinación con antibióticos para tratar infecciones bacterianas. Se han informado efectos sinérgicos entre endolisinas y entre endolisinas y otros agentes antimicrobianos [77].

A raíz del problema de resistencia mencionado anteriormente, *S. aureus* se ha convertido en un objetivo principal para la tecnología de las endolisinas en los últimos años. Numerosos estudios que describen la clonación, la producción recombinante y la caracterización de hidrolasas de peptidoglicano de estafilococos nativas y modificadas *in vitro* se han informado durante la última década [78].

La endolisina recombinante utilizada en este proyecto es la proveniente del bacteriófago G1 de *Staphylococcus aureus*. Este bacteriófago pertenece al género Twortlikevirus, dentro de este grupo se encuentran otros bacteriófagos para los cuales se tiene reportado el desarrollo de alguna terapia contra *S. aureus* y la obtención de endolisinas y el análisis de su actividad antimicrobiana, estos bacteriófagos ya investigados son: Twort [79], K [80], MSA6 [81], GH15 [82], Romulus y Remus [83]. En cuanto al bacteriófago G1 no se tiene documentado la obtención recombinante o determinación de actividad antimicrobiana de la endolisina proveniente de este fago.

1.5 Proteínas Recombinantes

Los productos biofarmacéuticos son en su mayoría proteínas recombinantes terapéuticas obtenidas mediante procesos biotecnológicos. Aunque se pueden emplear varios sistemas de expresión diferentes, incluyendo líneas celulares de mamíferos,

insectos y plantas, continuamente se realizan nuevos avances tecnológicos para mejorar la producción de biofarmacéuticos por microorganismos [84]. Esto se ve facilitado por la disponibilidad de genomas caracterizados, la versatilidad de los vectores plasmídicos, la disponibilidad de diferentes cepas y la rentabilidad en comparación con otros sistemas de expresión [85].

El bioproceso es una parte crucial de la biotecnología. Se calcula que dentro de los próximos 5 a 10 años, hasta el 50% de todos los medicamentos en desarrollo serán biofarmacéuticos incluyendo proteínas recombinantes obtenidas a través del proceso de fermentación microbiana [86]. El uso de proteínas como fármacos se ha destacado principalmente por la gran versatilidad de estas biomoléculas, que tienen diferentes funciones fisiológicas en el cuerpo humano, como catalizadores, receptores, canales de membrana, transportadores de macromoléculas y agentes de defensa celular [87].

La tecnología del ADN recombinante comprende la alteración del material genético fuera de un organismo para obtener características mejoradas y deseadas en los organismos vivos o en sus productos. Esta tecnología involucra la inserción de fragmentos de ADN de una variedad de fuentes, que tienen una secuencia de gen de interés utilizando un vector apropiado [88]. Con los avances de la biología molecular y el ADN recombinante, se podrían obtener proteínas humanas por expresión heteróloga utilizando *E. coli*, así como otras bacterias. El ejemplo clásico es la insulina humana, que se utiliza para tratar la diabetes mellitus tipo I y II. Inicialmente, la insulina se purificaba a partir de extractos de páncreas bovino y porcino. Sin embargo, el proceso fue costoso y se informaron muchos casos de respuestas inmunitarias causadas por insulina animal en

pacientes [89]. Luego se aisló el gen de la insulina humana y esta pudo obtenerse por expresión heteróloga utilizando *E. coli*.

La producción de proteínas recombinantes requiere una relación exitosa entre la expresión del gen, la solubilidad de la proteína y su purificación. El nivel de producción de proteína recombinante sintetizada en *E. coli* ya no es una limitación para el éxito del proceso general, pero se debe tener cuidado con la solubilidad de la proteína, que sigue siendo un reto importante en el campo de las proteínas recombinantes [90]. Una estrategia que se enfoca en la producción de proteínas solubles en *E. coli*, así como también en su purificación son las proteínas de fusión, estas son péptidos o proteínas muy estables y solubles que están unidas genéticamente con la proteína de interés para mediar su solubilidad y su purificación [91].

1.6 Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión son utilizadas para mejorar los rendimientos de producción de proteínas, la solubilidad y el plegamiento, y sobre todo para facilitar la purificación de la proteína de interés [92]. Las proteínas de fusión pueden ser pequeñas cadenas peptídicas hasta proteínas completas; una de sus principales características es su elevada afinidad hacia un ligando específico. Esta afinidad se puede utilizar en un sistema de cromatografía por afinidad, donde el ligando se emplea unido a una fase estacionaria. La proteína de fusión se une al ligando de manera específica y se separa del resto de las proteínas, finalmente la proteína es eluida empleando una solución amortiguadora de elución que permite deshacer la unión entre la proteína de fusión y el ligando unido a la fase

estacionaria [93]. Cuando una proteína es purificada mediante cromatografía de afinidad es posible obtener una alta pureza en tan solo un paso.

Para purificar una proteína recombinante empleando una proteína de fusión, es necesario clonar el gen de la proteína de fusión junto al gen de la proteína de interés. De esta manera, al expresar la proteína de interés, la proteína de fusión se expresará en conjunto formando una proteína quimérica. Esta proteína quimérica poseerá la proteína de fusión en uno de sus extremos permitiendo su unión a un ligando específico y su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad obteniendo un alto grado de pureza [93].

Además del gen codificante de la proteína de fusión, en el vector de expresión se puede contener una secuencia de reconocimiento de proteasa entre el gen codificante de la proteína de fusión y el gen codificante de la proteína de interés que permita remover la etiqueta cuando la proteína de interés se empleará de manera aislada, por ejemplo, en un análisis estructural o de actividad de la proteína de interés [94].

SmbP (del inglés: Small metal-binding Protein) es una proteína con un peso molecular de 9.9 kDa que consiste en un monómero de 4 alfa hélices, aislada de *Nitrosomonas europaea*. La proteína madura contiene 93 aminoácidos, con un alto número de residuos de histidina y es capaz de unirse a una diferente variedad de metales divalentes como el Ni(II) y el Cu(II) y algunos trivalentes como el Fe(III) [95]. Esta capacidad de unión a metales se vuelve de gran interés debido a que puede ser empleada como proteína de fusión para expresar proteínas recombinantes y así facilitar su purificación utilizando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) [96].

CusF es una proteína de 9.9 kDa, y es parte del complejo de flujo CusCFBA de *E. coli*; se encarga de regular las concentraciones de iones metálicos como Ag(I) y Cu(I) y se localiza en el periplasma. Posee una estructura de forma de barril con 5 plegamientos beta la cual le confiere cierta resistencia a la degradación por proteasas [97]. Las proteínas recombinantes marcadas con CusF se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) esto debido a su afinidad por el ion Cu(II). CusF3H+ es una modificación de CusF a la cual se le han agregado 3 histidinas en el extremo N para fomentar la afinidad a iones Ni(II), ya que con éstos se obtiene mayor pureza que utilizando Cu(II) [98].

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Las de Proteínas de Fusión SmbP y CusF

Después del aislamiento en 2004 de SmbP de *N. europaea* y darse a conocer el análisis de sus características físicas y químicas [95], se decidió que podría ser un buen candidato para ser usada como proteína de fusión dada su afinidad por metales y su bajo peso molecular. Sin embargo, fue utilizada con este fin hasta el año 2015 en *E. coli* [99]. SmbP ha sido utilizada para expresar proteínas tales como: proteína rojo fluorescente (RFP), proteína verde fluorescente (GFP), proteína nucleótido difosfato quinasa (NDPK2), proteína regulador respuesta de LovK (LovR), hipocótilo corto 2 (SHY2) [100], hormona del crecimiento (hGH) y péptidos antimicrobianos como Bin1, VpDef y LL-37 [101]. También ha sido utilizada como proteína de fusión para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* en diferentes compartimentos celulares como en el citoplasma y periplasma [99].

El desempeño de SmbP como proteína de fusión ha sido evaluado utilizando la proteína verde fluorescente (GFP), mostrando altos niveles de proteína soluble comparado

con la proteína de unión a la maltosa (MBP) y la enzima glutatión S transferasa (GST). Para purificarla se utilizó una resina IMAC cargada con Ni(II) obteniendo altos niveles de pureza. Además, se realizó la expresión de GFP en comparación con una etiqueta de histidinas. Utilizando SmbP como proteína de fusión se obtuvo 5.6 mg/L de GFP pura, mientras que con el uso de la etiqueta de histidinas se obtuvo 3.5 mg/L [99].

CusF es una proteína que se encuentra en el periplasma de *E. coli*, y que participa en la regulación de iones metálicos con el exterior; además, posee una alta afinidad por iones metálicos monovalentes como Ag(I) y Cu(I). Al ser también una proteína de unión a metales, se evaluó su capacidad para ser usada como proteína de fusión, de la misma forma que SmbP. En el 2015 se utilizó para expresar la proteína roja fluorescente (RFP), proteína verde fluorescente (GFP), proteína regulador respuesta de LovK (LovR) e hipocótilo corto 2 (SHY2) [102]. También ha sido utilizada como proteína de fusión para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* en diferentes compartimientos celulares como en el citoplasma y periplasma [102].

Asimismo, se ha comparado el desempeño de CusF con otras proteínas de fusión como MBP y GST. Las pruebas de expresión mostraron un incremento en la expresión y solubilidad de las proteínas de interés marcadas con CusF equiparable al presentado con las otras proteínas de fusión GST y MBP. Además, la expresión de GFP utilizando CusF como proteína de fusión en comparación con una etiqueta de histidinas generó 6.0 mg/L de GFP pura, mientras que con el uso de la etiqueta de histidinas se obtuvieron 3.5 mg/L [102].

A pesar de que las proteínas marcadas con SmbP pueden ser fácilmente purificadas mediante IMAC con Ni(II), las proteínas marcadas con CusF no muestran esta posibilidad

y la purificación debe ser realizada empleando IMAC con Cu(II). El uso de Cu(II) como ligando implica comprometer en gran medida la obtención de una elevada pureza en un solo paso de purificación [98]. Debido a lo anterior, en 2017 se realizó una modificación a la proteína de fusión CusF agregando tres residuos de histidina (CusF3H+), mediante mutagénesis dirigida para potenciar su afinidad al Ni(II). Dicha modificación mejoró la purificación utilizando cromatografía IMAC con Ni(II). Además, la modificación de la proteína de fusión no afectó su capacidad para incrementar la expresión proteica [98].

2.2 Expresión de Endolisinas y su Actividad Antimicrobiana

El uso de endolisinas como proteínas recombinantes para lisar bacterias se describió por primera vez en 1959 [103]. Desde entonces, se han caracterizado varias endolisinas, en particular las de fagos que infectan Gram-positivos, como lo es *S. aureus*. LysK fue una de las primeras endolisinas para las que se dispuso de información estructural [104]. O'Flaherty et al [105] fueron los primeros en producir la endolisina LysK en *Lactococcus lactis*, utilizando un sistema de expresión inducible por nisina, con el fin de superar los problemas de solubilidad encontrados al intentar la expresión en *E. coli*. Aunque no se secretó la endolisina activa, se detectó su actividad contra *Staphylococcus* en los lisados del cultivo de *L. lactis*. LysK provocó reducción del 99% en el número de bacterias MRSA en una hora, lo que demostró que LysK producida de manera recombinante en *L. lactis* es capaz de erradicar las células vivas de *Staphylococcus* patógenos [105].

Posteriormente, se utilizó el mismo sistema de expresión para la producción de la endolisina LysH5 (proveniente de otro fago de *Staphylococcus*). Se probaron otros promotores de *Lactococcus* constitutivos e inducibles para optimizar la producción y se fusionó un péptido señal con la endolisina LysH5. El resultado fue la detección de hasta 80 U/mg de endolisina extracelular activa en los sobrenadantes de cultivo; sin embargo, la mayor parte de la proteína (hasta 323 U/mg) permaneció en los extractos celulares [106].

En un estudio con la endolisina el bacteriófago Twort, se analizaron los módulos que conforman la estructura de esta endolisina. Los resultados indicaron que el dominio CHAP individual es suficiente para la lisis de *S. aureus*, mientras que el dominio amidasa-2 individual es insuficiente para la lisis celular. La falta de CBD da como resultado una reducción de aproximadamente 10 veces la actividad enzimática tanto en la reducción de turbidez como en los ensayos de lisis de placa en comparación con la proteína completa. La deleción del dominio amidasa-2 dio como resultado una proteína con actividad lítica que sobrepasaba la actividad de la proteína completa en los ensayos de reducción de turbidez y lisis en placa [79].

Zhang et al [82] analizaron la capacidad de la endolisina LysGH15 para eliminar las células planctónicas y las biopelículas formadas por *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* y *Staphylococcus hominis*. Dichas especies fueron sensibles a LysGH15, mostrando reducción en los recuentos bacterianos de aproximadamente 4 unidades logarítmicas dentro de los 30 minutos posteriores al tratamiento con 20 µg/ml de LysGH15, y las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) variaron de 8 µg/ml a 32 µg/ml. LysGH15 evitó eficazmente la formación de biopelículas por las cuatro especies

de *Staphylococcus* a una concentración de 50 µg/ml. A concentración de 100 µg/ml, LysGH15 también mostró una notable actividad disruptiva contra las biopelículas de 24 h y 72 h formadas por *S. aureus*.

Son et al [107] analizaron la actividad antibacteriana y antibiopelícula de un nuevo bacteriófago de *S. aureus*, SAP-2 de la familia Podoviridae y de una enzima que degrada la pared celular, SAL-2 que se deriva de dicho fago. La enzima SAL-2 se expresó en *E. coli* en forma soluble utilizando un cultivo a baja temperatura. La enzima SAL-2 tuvo actividad lítica específica contra *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes a meticilina, y mostró una CMI de 1 µg/ml. Además, esta enzima mostró un espectro de actividad más amplio dentro del género *Staphylococcus* en comparación con el bacteriófago SAP-2 en su capacidad para eliminar las biopelículas, ya que presentó actividad contra la biopelícula de cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. haemolyticus*.

En otro estudio, se analizaron nueve enzimas hidrolasas de peptidoglicano (80α, phi11, LysK, P68, Lisostafina, 2638A, Twort, phiSH2 y WMY) mediante ensayos de reducción de turbidez y lisis en placa. A pesar de tener una estructura modular en su mayoría conservada, las enzimas mostraron grados muy diferentes de actividad lítica específica (expresada como $\Delta OD_{600} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) mostrando un rango que va desde 0.1 (phiSH2) a 1.3 (LysK) contra bacterias vivas en suspensión. La lisostafina, una potente proteína lítica contra *Staphylococcus* bien caracterizada, mostró actividad moderada en los ensayos de reducción de turbidez ($0.4 \Delta OD_{600} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) en comparación con otras enzimas. Con la excepción de phiSH2 y 2638A, la mayoría de las enzimas exhibieron actividad antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* y contra otras especies del género

Staphylococcus, tales como *S. chromogenes*, *S. epidermidis*, *S. hyicus*, *S. simulans*, *S. warneri* y *S. xylosus* [64].

En este mismo estudio, las nueve hidrolasas de peptidoglicano se compararon por su capacidad para degradar las biopelículas de *S. aureus* cultivadas durante 24 h en placas de poliestireno. En una primera serie de experimentos con PGH marcadas con 6×His en el extremo C en el buffer de elución, la mayoría de las enzimas degradaron las biopelículas de manera dependiente de la concentración. Mientras que LysK y lisostafina fueron eficaces en concentraciones tan bajas como 40–80 nM, phi11, P68 y 2638A no mostraron efectos medibles o solo efectos débiles en estas condiciones. En experimentos similares las proteínas marcadas con 6xHis N-terminal en PBS, phi11, 2638A y P68 degradaron notablemente las biopelículas a 160 nM, 310 nM y 2.5 mM, respectivamente, mientras que LysK, lisostafina, Twort y phiSH2 fueron menos eficaces en estas condiciones (hasta un orden de magnitud) [64].

Tham et al [108] clonaron y expresaron la endolisina del fago 88 en el vector pET28a en *E coli*. Inicialmente, la endolisina se clonó usando BamHI/XhoI, obteniendo una endolisina recombinante que se expresó en cuerpos de inclusión. Sin embargo, la proteína permaneció no funcional, probablemente debido a la agregación de aminoácidos adicionales del plásmido pET28a en la proteína recombinante al clonar usando BamHI, o a que la etiqueta His N-terminal causó el plegamiento inadecuado de la proteína, o bien, a una combinación de ambos. La clonación de la endolisina usando NcoI/XhoI resultó en la expresión de proteínas solubles y funcionales a 18 °C. La endolisina fue capaz de formar zonas de halo en las placas de MRSA y mostró una reducción en la turbidez del crecimiento de MRSA.

Antonova et al [109] compararon el efecto de dos proteínas de fusión diferentes sobre la endolisina LysECD7: His-tag, con diferente cantidad de aminoácidos de histidina: (6-His, 8-His y 12-His); y SMAP-29 (péptido antimicrobiano mieloides de oveja de 29 aminoácidos) con diferente tipo de conector entre la proteína de fusión y la endolisina (sin conector, conector rígido y conector flexible). La proteína 8-His fue la más efectiva de las His-tag, mostrando actividad antibacteriana a concentración de 100 µg/ml, mientras que para SMAP-29, la variedad más efectiva fue la versión sin conector, que mostró actividad a 50 µg/ml.

Recientemente, SAL200 se convirtió en el primer fármaco utilizado en seres humanos a base de endolisina mediante infusión intravenosa como parte de un ensayo clínico de fase 1 y se utilizó para tratar infecciones por *Staphylococcus*. Contiene una forma recombinante de la endolisina SAL-1 (rSAL-1) como ingrediente farmacéutico activo. La rSAL-1 se deriva del bacteriófago SAP-1, que infecta a *Staphylococcus*, incluidas cepas de MRSA y de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) [110].

CAPÍTULO 3

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La endolisina recombinante proveniente del bacteriófago G1, producida utilizando SmbP y CusF3H+ como proteínas de fusión, mostrará actividad antibacteriana y actividad antibiopelícula contra *S. aureus*.

3.2 Objetivo General

Producir una endolisina recombinante proveniente del bacteriófago G1 utilizando SmbP y CusF3H+ como proteínas de fusión y evaluar su actividad antibacteriana y antibiopelícula contra *S. aureus*.

3.3 Objetivos Específicos

1. Construir plásmidos para la expresión de endolisina recombinante marcada con SmbP y CusF3H+.

2. Expresar y purificar la endolisina recombinante en *E. coli*.
3. Evaluar la actividad antibacteriana de la endolisina recombinante contra *S. aureus*.
4. Determinar la actividad antibiopelícula de la endolisina recombinante contra *S. aureus*.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

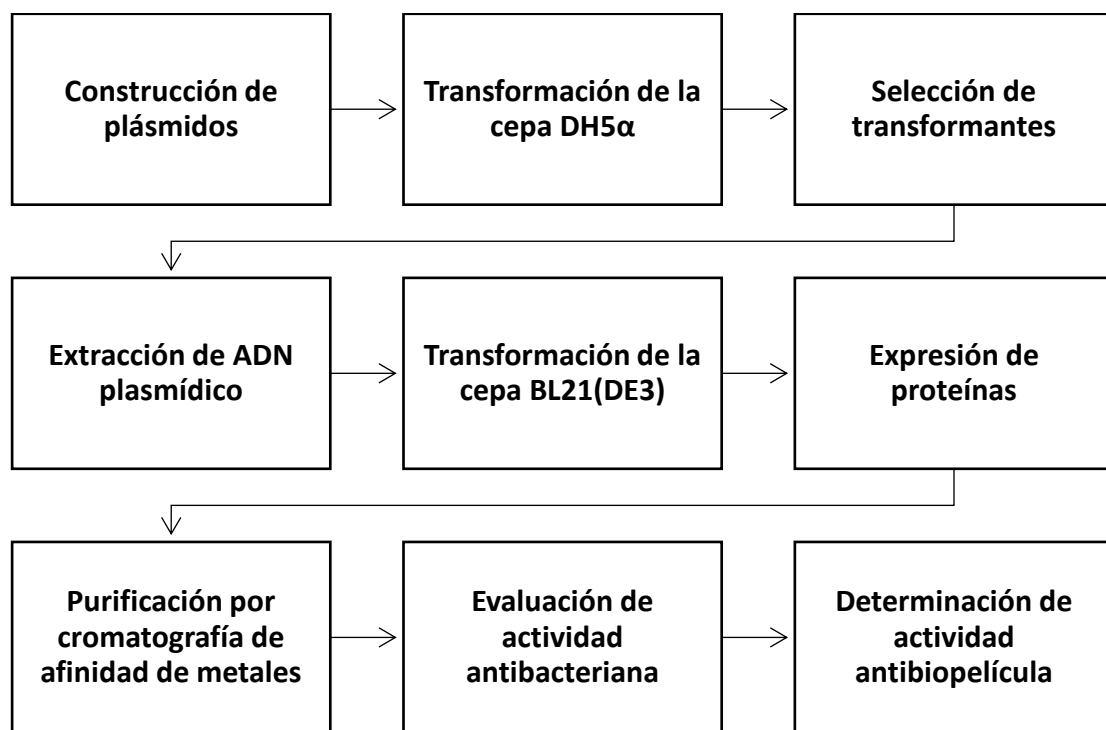


Figura 5. Estrategia general de trabajo.

4.1 Obtención del Gen de la Endolisina G1

4.1.1 Síntesis de la Cadena Nucleotídica que Codifica para la Endolisina del Bacteriófago G1 de *S. aureus*

Se agregaron sitios de corte de las enzimas de restricción NcoI y XhoI a la secuencia que codifica para la endolisina del bacteriófago G1 de *S. aureus* con la finalidad de insertarla en el plásmido pET30a. La secuencia se sintetizó en WATSON Bio Lab (Texas, Estados Unidos) con los codones optimizados para su expresión en *E. coli*.

La secuencia sintetizada se recibió contenida dentro del plásmido liofilizado pUC57 que contiene un determinante de resistencia a ampicilina. El liofilizado fue disuelto en 100 μ L de agua mQ para obtener una concentración final de 60 ng/mL.

4.1.2 Transformación del Plásmido pUC57-EndolisinaG1

Se utilizaron 10 ng del plásmido pUC57-EndolisinaG1 y se mezcló con 30 μ L de células de *E. coli* DH5 α rubio-competentes en un microtubo de 1.5 mL y se incubó en hielo por 30 minutos. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, y finalmente se colocó de nuevo en hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregaron 800 μ L de caldo LB, se mezcló suavemente y se llevó a incubación durante 1 hora a 37 °C y a 200 rpm de agitación. Luego del tiempo de incubación, se centrifugó el microtubo a 13,000 rpm por 4 minutos, y se retiró el sobrenadante dejando de 50 a 100 μ L de caldo LB. Se resuspendieron las células y se transfirieron a placas con agar LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se inoculó en la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

4.1.3 Extracción del ADN Plasmídico de pUC57-EndolisinaG1

Después de la incubación, algunas colonias obtenidas fueron seleccionadas e inoculadas en 6 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) cada una y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Se recolectó la biomasa del cultivo líquido mediante centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos, a partir de la cual se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit DNA-Spin. iNtRON Biotechnology siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.1.4 Digestión Enzimática del Plásmido pUC57-EndolisinaG1

Se tomaron 1500 ng del plásmido pUC57-EndolisinaG1 para la digestión enzimática. El volumen final de esta reacción de digestión fue 50 µL, la cual estaba compuesta por 15 µL de ADN plasmídico, 5 µL de solución amortiguadora NI 10x, 1.5 µL de NcoI (10 U/µL), 1 µL de XhoI (20 U/µL). La reacción de digestión se dejó incubando 3 horas a 37 °C. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1 % usando TAE 1X como solución amortiguadora y se purificó el fragmento de ADN cortado por las enzimas de restricción con el kit de extracción en gel MEGAquick-spinPlus siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2 Construcción de los Plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1

Para la construcción de los plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 se tomaron los fragmentos de pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ de plásmidos ya elaborados anteriormente en el laboratorio de trabajo (los plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina) los cuales fueron

sometidos a digestión enzimática y purificados con un kit de extracción en gel para extraer el fragmento de interés de cada plásmido.

4.2.1 Digestión Enzimática de los Plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina

Se tomaron 1500 ng de cada plásmido de pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina para la digestión enzimática. El volumen final de cada reacción de digestión fue 50 μ L, las cuales estaban compuestas por 8 μ L de ADN plasmídico (de cada uno de los plásmidos), 5 μ L de solución amortiguadora NI 10x, 1.5 μ L de NcoI (10 U/ μ L), 1 μ L de XhoI (20 U/ μ L). La reacción de digestión se dejó incubando 3 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μ L de SAP (1 U/ μ L) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Posteriormente se realizó un gel de agarosa al 1 % usando TAE 1X como solución amortiguadora y se purificó el fragmento de ADN cortado por las enzimas de restricción con el kit de extracción en gel MEGAquick-spinPlus.

4.2.2 Ligación de los Fragmentos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ con el Inserto EndolisinaG1

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo simultáneamente en un volumen final de 40 μ L; se probaron dos diferentes cantidades del ADN inserto 10 μ L y 14 μ L. Para las reacciones de ligación con el fragmento pET30a-SmbP las cantidades de reactivos fueron las siguientes: 9 μ L del fragmento pET30a-SmbP previamente digerido (4.7 ng/ μ L), 10 μ L y 14 μ L del inserto de EndolisinaG1 (1.4 ng/ μ L), 4 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x, 1 μ L de T4 DNA ligasa (5 U/ μ L) y completando los 40 μ L con agua mQ.

Para las reacciones de ligación con el fragmento pET30a-CusF3H+ las cantidades de reactivos fueron las siguientes: 16 μ L del fragmento pET30a-CusF3H+ previamente

digerido (2.4 ng/ μ L), 10 μ L y 14 μ L del inserto de EndolisinaG1 (1.4 ng/ μ L), 4 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x, 1 μ L de T4 DNA ligasa (5 U/ μ L) y completando los 40 μ L con agua mQ.

Como control negativo se realizó una reacción de ligación sin inserto. Las reacciones de ligación se dejaron incubar por 1 hora a 22 a $^{\circ}$ C y posteriormente a 4 $^{\circ}$ C toda la noche. Para finalizar, la T4 DNA ligasa se inactivó a 65 $^{\circ}$ C durante 10 minutos a baño María.

4.2.3 Transformación de los Plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1

Se mezclaron 20 μ L de cada reacción de ligación con 30 μ L de células *E. coli* DH5 α rubio-competentes en un microtubo de 1.5 mL y se incubó en hielo por 30 minutos. Después se realizó un choque térmico a 42 $^{\circ}$ C por 45 segundos, y finalmente se colocó de nuevo en hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregaron 800 μ L de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 $^{\circ}$ C y 200 rpm de agitación. Luego del tiempo de incubación, se centrifugó el microtubo a 13,000 rpm por 4 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 μ L de caldo LB. Se resuspendieron las células de este volumen y se transfirieron a placas con agar LB con kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 $^{\circ}$ C.

4.2.4 Extracción de ADN Plasmídico

Se seleccionaron algunas colonias obtenidas en las placas. Estas se inocularon en 6 mL de caldo LB con kanamicina a una concentración final de 50 μ g/mL y se incubaron

a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Se recolectó el sedimento celular de estos 6 mL mediante centrifugación a 13,000 rpm por 2 minutos, una vez obtenido el pellet de células se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit DNA-Spin Miniprep. iNtRON Biotechnology.

4.2.5 Análisis Confirmatorio por PCR

A partir del ADN plasmídico obtenido se realizó un análisis para corroborar la presencia del plásmido. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores T7 delantero y reverso que flanquean el sitio de clonación múltiple en el cual se encuentran insertados los fragmentos SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico, 5 µL de solución amortiguadora Taq 10x, 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10 nM) de dNTPs, 0.5 µL (5000 U/mL) de Taq DNA polimerasa y se completó para los 50 µL con agua mQ.

Como control negativo se llevó a cabo una reacción sin ADN plasmídico conteniendo los mismos reactivos de la reacción antes mencionada y se completó el volumen final con agua mQ.

La amplificación se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones: La desnaturalización inicial fue de 30 segundos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, alineamiento por 45 segundos a 55 °C y elongación por 50 segundos a 72 °C y por último una extensión final por 5 minutos a 72

°C. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con TAE 1X como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

Para la amplificación de los insertos se usaron los siguientes iniciadores:

Tabla 1. Iniciadores Utilizados para la Amplificación de SmbP-Endolisina y CusF3H+-Endolisina mediante PCR

| Iniciador | Secuencia de nucleótidos (5' - 3') |
|-----------------------------------|---|
| T7 promotor. Iniciador delantero. | TAATACGACTCACTATAGGG |
| T7 terminador. Iniciador reverso. | GCTAGTTATTGCTCAGCGG |

4.2.5 Análisis Confirmatorio por Secuenciación

Las construcciones pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 fueron enviadas a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

4.3 Expresión de la Endolisina G1 en *E. coli* BL21(DE3)

4.3.1 Transformación de *E. coli* BL21(DE3) con las Construcciones pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1

Se utilizaron 10 ng de cada una de las construcciones pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 y se mezclaron con 30 µL de células de *E. coli* BL21(DE3) calcio-competentes en un microtubo de 1.5 mL, se incubó en hielo por 30

minutos. Después se realizó un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, al pasar este tiempo se colocó de nuevo en hielo por 2 minutos.

Posteriormente se agregó 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se puso en incubación 1 hora a 37 °C y 200 rpm de agitación. Luego del tiempo de incubación, se centrifugó el microtubo a 13,000 rpm por 4 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente de 50 a 100 µL de caldo LB. Se resuspendieron las células de este volumen y se transfirieron a placas con agar LB con kanamicina a una concentración final de 50 µg/mL y se esparció por la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron durante 16 horas a 37 °C.

4.3.2 Expresión a Pequeña Escala de Proteínas

Se seleccionó una colonia por construcción y utilizando un aplicador se transfirió a un tubo de ensayo con 2 mL de caldo LB con kanamicina (50 µg/mL) y se incubó a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación se tomó 40 µL del cultivo y se inoculó en otro tubo de ensayo conteniendo 4 mL de caldo LB con kanamicina a 50 µg/mL. Estos tubos se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6.

Una vez alcanzado la D.O.₆₀₀ se detuvo la incubación y se atemperaron los cultivos, posteriormente se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Se evaluaron diferentes condiciones de expresión (tiempo de incubación después de la inducción y temperatura): los cultivos se llevaron a incubación a 25°C y a 37°C con agitación a 200 rpm por 4 horas y 16 horas. Posteriormente, se recolectó la biomasa centrifugando a 13,000 rpm durante 3 minutos y se descartó el sobrenadante.

4.3.3 Lisis Celular

Las células obtenidas en el paso anterior fueron suspendidas en 200 μ L de solución amortiguadora de equilibrio (Tris 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8). Se agregó un volumen aproximado de 300 μ L de perlas de vidrio de un diámetro de 0.1 mm a cada tubo y se agitaron en vórtex por 4 minutos. Después los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante obtenido después de la centrifugación se consideró la fracción soluble.

4.3.4 Análisis de la Fracción Soluble por SDS-PAGE

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 10%, un gel apilador al 4% y TGS como solución amortiguadora. Una vez terminada la electroforesis se realizó la tinción con azul de Coomassie para observar las bandas correspondientes..

4.3.5 Escalamiento Usando 1 L de Medio de Cultivo

Las expresiones se llevaron a cabo en 8 matraces de 500 mL, teniendo cada uno 125 mL, obteniendo un volumen final de 1 L. Los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente preparado de la colonia seleccionada y se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado la D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación a 25 °C con agitación a 200 rpm por 16 horas. Después del tiempo de incubación, se recolectó el sedimento celular en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15

minutos a 8,500 rpm, para esto se utilizaron 4 tubos cónicos de 50 mL entre los cuales se dividió el sedimento celular total del litro del cultivo.

El sedimento celular de cada tubo se resuspendió en 10 mL de una solución amortiguadora de lisis que contenía 50 mM de Tris, 500 mM de NaCl, y 5 mM de imidazol a pH 8.0. Se añadieron perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a una razón de 1.5 g por mL de suspensión celular. Los tubos se colocaron en hielo y se llevaron a agitación por 1 h a 300 rpm en una incubadora. Posteriormente, el lisado se centrifugó a 4 °C por 15 minutos a 8,500 rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo cónico de 50 mL y de esta manera se obtuvo el clarificado con las proteínas.

4.4 Purificación de Proteínas

Se describirá a continuación la metodología empleada para la purificación de las proteínas SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1.

4.4.1 Cromatografía IMAC Empleando el Sistema ÄKTA Prime Plus

Se utilizó una columna HiTrap FF de 1 mL (GE Healthcare) la cual fue previamente cargada con iones níquel. La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de solución amortiguadora de equilibrio que contenía Tris 50 mM, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol a pH 8.0 utilizando un flujo de 0.8 mL/min y una presión máxima de seguridad de 0.5 MPa. Se cargó la muestra en la columna utilizando un flujo de 0.8 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa y se recolectó la fase no unida. Posterior a esto la columna se lavó con solución amortiguadora conteniendo Tris 50 mM, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol pH 8.0 hasta que la señal U.V. descendiera y se mantuviera constante. Finalmente se llevó a cabo la elución con una solución amortiguadora (Tris 50 mM, 500 mM NaCl y 200 mM imidazol)

a pH 8.0. El flujo fue mantenido a 0.8 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando fracciones de 1 mL las cuales fueron conservadas para su posterior análisis mediante SDS-PAGE como en el punto 4.3.4.

4.4.2 Diálisis para la Remoción de Imidazol

De las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con el sistema ÄKTA prime plus, se seleccionaron las que mostraron una cantidad considerable de la proteína por SDS-PAGE. Estas fracciones fueron colectadas en una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y fueron dializadas para retirar el exceso de imidazol utilizando una solución amortiguadora de Tris 50 mM y NaCl 500 mM a pH 8.0. Se realizaron dos diálisis de una hora cada una y una de 16 horas. Una vez que la muestra fue dializada, se conservó en congelación a -20 °C.

4.5 Cuantificación de Proteínas por el Método Bradford

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones (1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.4 mg/mL y 0.2 mg/mL) del estándar de albúmina de suero bovino (BSA). Las muestras se prepararon colocando 20 µL del estándar como de las muestras a analizar, en diferentes celdas. Posteriormente se adicionó 1 mL del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos, para finalmente realizar la medición de la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

4.6 Remoción de la Proteína de Fusión

La remoción de la proteína de fusión se realizó mediante la digestión con enteroquinasa. Para la digestión, por cada 250 μg de proteína dializada previamente se le adicionó 1 μL (5 U/ μL) de la enzima enteroquinasa. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 16 horas.

4.7 Segunda Cromatografía de Afinidad

Con el fin de remover la proteína de fusión cortada en el paso anterior y eliminar cualquier impureza restante se realizó una segunda cromatografía de afinidad utilizando la resina High Affinity Ni-Charged Resin de GenScript (Nueva Jersey, Estados Unidos) cargada con iones níquel. La muestra fue incubada en la resina durante 1 hora a 4°C y se recolectó la muestra conteniendo la proteína de interés. La elución se realizó utilizando solución amortiguadora de elución Tris 50 mM, 500 mM NaCl y 200 mM imidazol a pH 8.0. Las muestras de las digestiones fueron analizadas por SDS-PAGE empleando un gel de Tricina-SDS-PAGE al 12%. Los geles se revelaron utilizando una tinción con Azul Brillante de Coomassie.

4.8 Cuantificación de Endolisina Pura

Después de realizar la segunda cromatografía de afinidad para remover la proteína de fusión se procedió a cuantificar la endolisina pura obtenida mediante el método de Bradford, para esto se siguió la metodología descrita en el punto 4.5.

4.9 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la Endolisina G1

Se determinó la actividad antibacteriana de la Endolisina G1 frente a *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (CMI) para el ensayo de inhibición de crecimiento en líquido [111].

Primeramente, se preparó una solución de la Endolisina G1 a una concentración de 512 µg/ml, enseguida se llevaron a cabo diluciones en una placa de 96 pocillos, obteniendo las siguientes concentraciones en un volumen de 50 µL por pocillo: 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml.

Las bacterias *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina se inocularon en 5 mL de caldo TSB y se incubaron durante 16 horas a 37 °C, posteriormente se diluyeron en solución de NaCl 0.85 % a una concentración de 10⁵ UFC/mL.

Los tratamientos estuvieron compuestos por 50 µL de endolisina purificada diluida, 30 µL de suspensión de bacterias diluidas y 20 µL de medio de cultivo TSB. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, se observó la microplaca para identificar la CMI y se midió la D.O.₆₀₀ en un lector de placas. Cada ensayo se realizó por triplicado. Una solución amortiguadora de Tris 50 mM, NaCl 500 mM fue usada como control negativo. La enzima lítica lisostafina fue usada como control positivo.

4.10 Evaluación de la Actividad Disruptiva de Biopelícula de la Endolisina G1

Se determinó la actividad disruptiva de biopelícula de la Endolisina G1 frente a *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina utilizando un método con placa de microtitulación de 96 pocillos descrito anteriormente [82], con algunas modificaciones.

Primero, las bacterias se inocularon en 5 mL de medio TSB y se cultivaron durante 16 horas a 37 °C. Después, fueron diluidas utilizando el medio TSB + 0.5 % glucosa para obtener una concentración de 10⁵ UFC/mL. Se agregaron 200 µL del cultivo diluido por pocillo, para cada concentración de la Endolisina a evaluar se utilizaron tres pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas sin agitación para la formación de la biopelícula.

Posteriormente, las células planctónicas se eliminaron, se retiró el líquido de los pocillos y se realizaron tres lavados con PBS estéril y se dejó secar la placa a temperatura ambiente.

Las biopelículas se trataron con 200 µL de la Endolisina G1 a diferentes concentraciones: 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml, 32 µg/ml, 16 µg/ml, 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml y 0.25 µg/ml durante 3 horas a 37 °C. Enseguida se realizó un lavado con agua desionizada estéril para retirar la solución con endolisina y se dejó secar la placa a temperatura ambiente.

Después, cada pocillo se tiñó con 200 µL del colorante cristal violeta al 0.1 % durante 30 minutos. Se realizó otro lavado con agua desionizada estéril y se dejó secar la placa a temperatura ambiente.

A continuación, se añadieron 200 µL de ácido acético glacial al 33 % a cada pocillo durante 30 minutos para solubilizar el cristal violeta unido a las biopelículas teñidas.

Por último, se transfirieron 100 μ L de la mezcla cristal violeta/ácido acético glacial a una nueva placa y se midió la D.O.₅₉₀. Cada ensayo se realizó por triplicado. Una solución amortiguadora de Tris 50 mM, NaCl 500 mM fue usada como control negativo. La enzima lítica lisostafina fue usada como control positivo.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS

5.1 Secuencia de la EndolisinaG1 Optimizada para su Expresión en *E. coli*

La secuencia enviada a sintetizar a WATSON Bio Lab con los sitios de corte para las enzimas de restricción NcoI y XhoI tiene 801 pares de bases (figura 6) y la secuencia aminoacídica 267 aminoácidos (figura 7).

```
CCATGGCT ← NcoI
ATGGCAAAAACCCAGGCAGAAATTAATAAACGCCTGGATGCATATGCAAAAAGGTACCGTGGATAGTCCGTATCGCGTTA
AAAAAGCCACCAGCTATGATCCGAGTTTTGGTGTGATGGAAGCCGGTGCCATTGATGCAGATGGCTATTATCATGCCCA
GTGTCAGGATCTGATTACCGATTATGTGCTGTGGCTGACCGATAATAAAGTGCCTACCTGGGGCAATGCAAAAAGATCAG
ATTAACAGAGCTATGGTACCGGTTTTAAATTCATGAAAACAAACCGAGCACCGTTCCGAAAAAAGGTTGGATTGCAG
TGTTTACCAGTGGTAGCTATGAACAGTGGGGTCATATTGGTATTGTGTATGATGGCGGTAATACCAGTACCTTTACCATT
CTGGAACAGAATTGGAATGGTTATGCAAATAAAAAGCCGACCAAACGCCTGGATAATTATTATGGTCTGACCCATTTAT
CGAAATTCGGGTGAAAGCCGGTACCACCGTTAAAAAAGAAACCGCCAAAAAAGTGAAGTAAAAACCCCGGCACCGAA
AAAAAAGCAACCCTGAAAGTTAGCAAAAATCATATTAACACACAATGGATAAGCGTGGTAAAAAACCGGAAGGTATG
GTTATTCATAATGATGCAGGCCGAGCAGTGGCCAGCAGTATGAAAATAGCCTGGCAAATGCAGGCTATGCACGTTATG
CCAATGGTATTGCACATTATTATGGTAGCGAAGGCTATGTTGGGAAGCAATTGATGCCAAAAATCAGATTGCATGGCA
TACCGGTA
TAACTCGAG ← XhoI
```

Figura 6. Secuencia nucleotídica de la EndolisinaG1 optimizada para su expresión en *E. coli*.

MAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPYRVKKATSYDPSFGVMEAGAIADADGYHAQCQDLITDYVLWLTDNKVRTWGNKADQI
 KQSYGTGFKIHENKPSVPPKKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPV
 KAGTTVKKETAKKSASKTPAPKKKATLKVSKNHINYTMKRGKKPEGMVIHNDAGRSSGQQYENSLANAGYARYANGIAHYH
 GSEGYVWEAIDAKNQIAWHTGK

Figura 7. Secuencia aminoacídica de la EndolisinaG1.

5.2 Construcción *in silico* de los Plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1

Las figuras 8 y 9 representan esquemáticamente las construcciones de los plásmidos pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1.

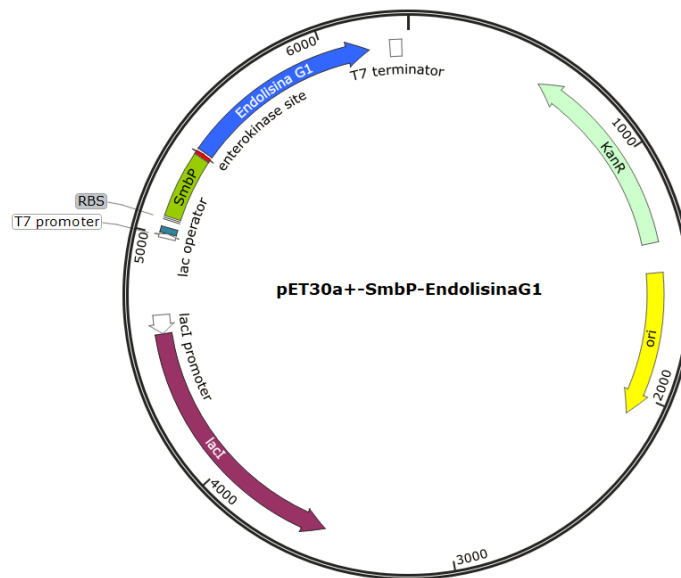


Figura 8. Construcción *in silico* del plásmido pET30a-SmbP-EndolisinaG1 elaborada en el software bioinformático SnapGene.

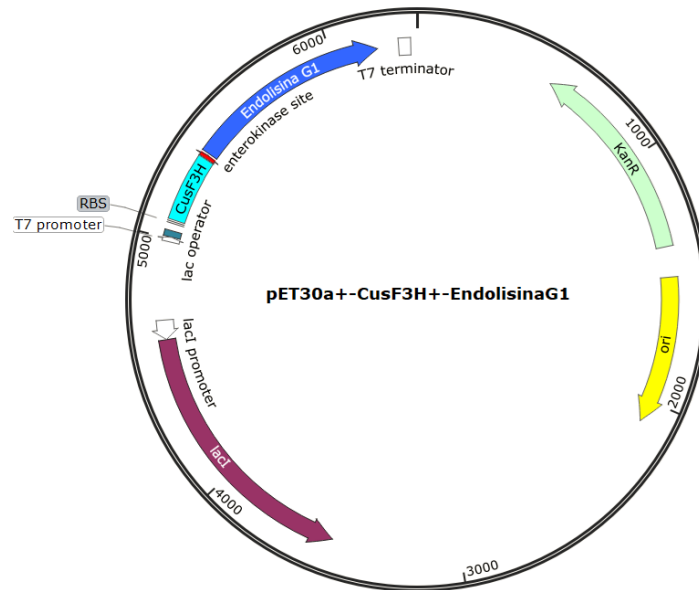


Figura 9. Construcción *in silico* del plásmido pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1 elaborada en el software bioinformático SnapGene.

5.3 Digestión del Plásmido pUC57-EndolisinaG1

En la figura 10 se muestra la electroforesis realizada después de la digestión con las enzimas NcoI y XhoI. En el carril 1 se puede observar el marcador de peso molecular, en el carril 2 se pueden apreciar dos bandas, la primera de aproximadamente 2900 pb perteneciente al plásmido pUC57 mientras que la otra con 801 pb es la correspondiente a la EndolisinaG1 (EndoG1).

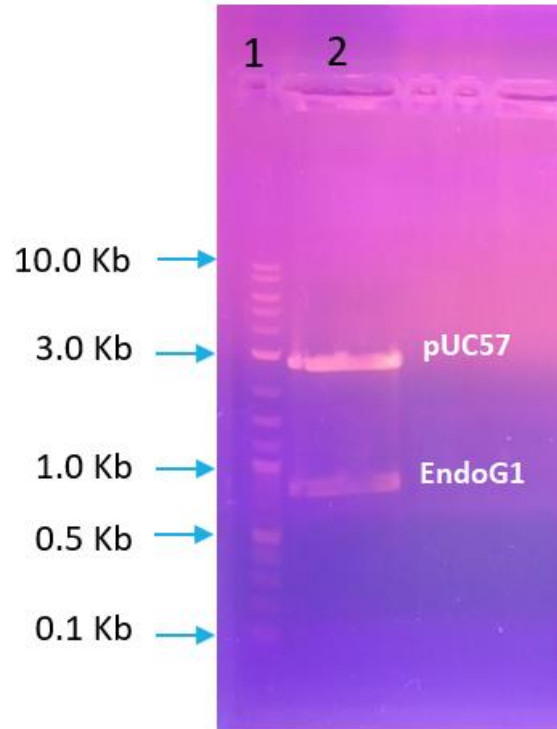


Figura 10. Gel de agarosa al 1 % de la digestión de pUC57-EndolisinaG1. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Digestión del plásmido pUC57-EndolisinaG1.

5.4 Digestión de los Plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina

En la figura 11 se muestra la electroforesis realizada después de la digestión de los plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina con las enzimas NcoI y XhoI. En el carril 1 se puede observar el marcador de peso molecular, en los carriles 2 y 3 se pueden apreciar dos bandas, la primera de aproximadamente 5,550 pb perteneciente a los plásmidos pET30a-SmbP y pET30a-CusF3H+ mientras que la banda de 651 pb es la correspondiente a la Cigonadina.

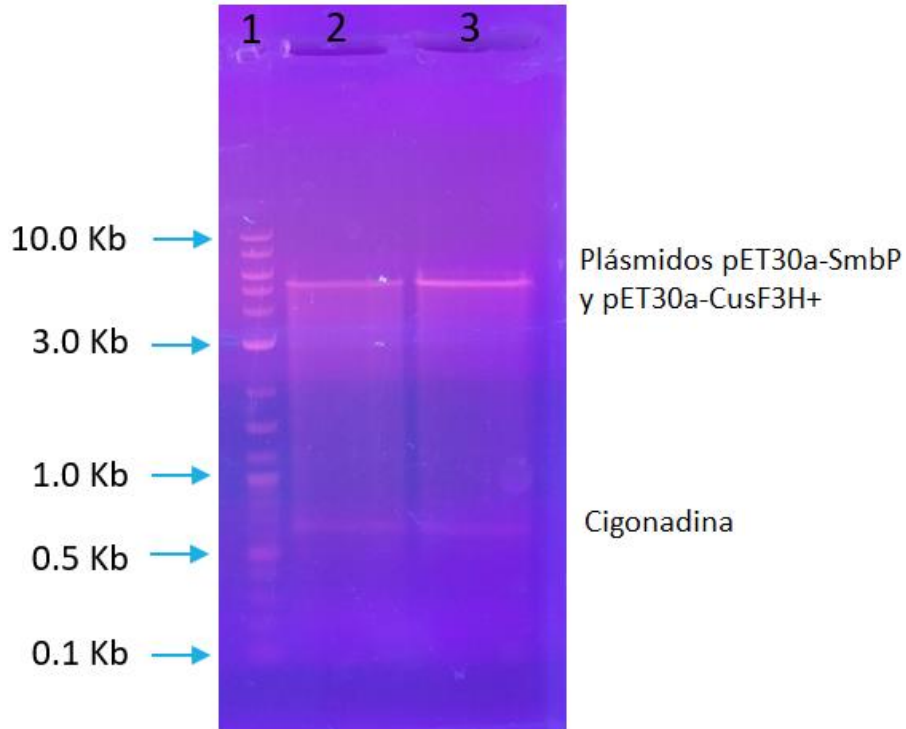


Figura 11. Gel de agarosa al 1 % de la digestión de los plásmidos pET30a-SmbP-Cigonadina y pET30a-CusF3H+-Cigonadina. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Digestión del plásmido pET30a-SmbP-Cigonadina. Carril 3: Digestión del plásmido pET30a-CusF3H+-Cigonadina.

5.5 Amplificación por PCR de SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1

En la figura 12 se puede ver en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 la banda de pET30a sin ningún inserto y los carriles 3, 4 y 5 corresponden a 3 colonias donde se investigó la presencia del inserto SmbP-EndolisinaG1, obteniendo una banda alrededor de 1,300 pb en los tres carriles; estas bandas están dentro del peso esperado al amplificar SmbP-EndolisinaG1 (1,289 pb).

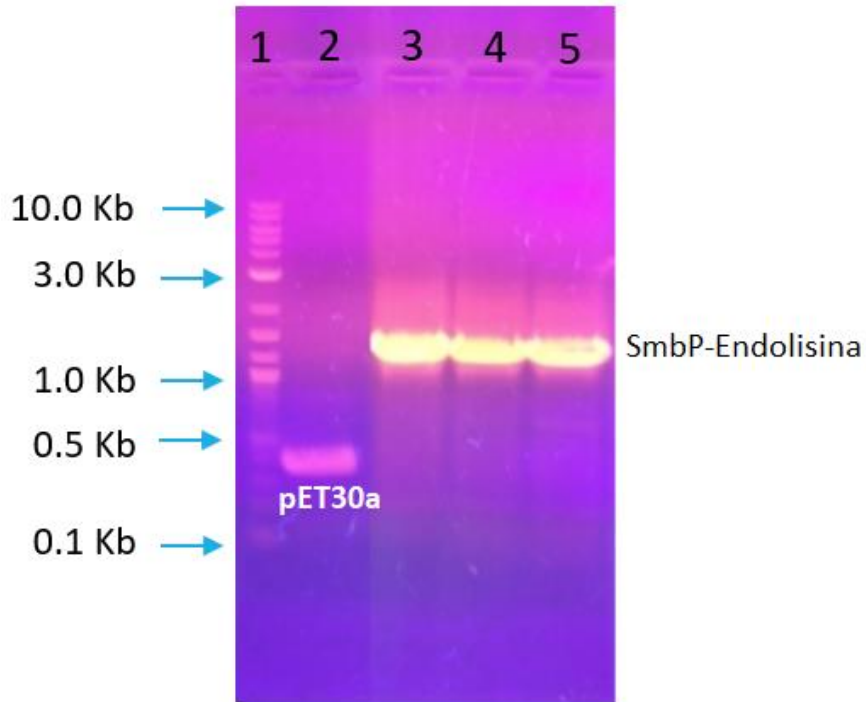


Figura 12. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de SmbP-Endolisina. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: pET30a sin inserto. Carriles 3 – 5: SmbP-EndolisinaG1 (1,289 pb).

En la figura 13 se puede ver en el carril 1 el marcador de peso molecular, en el carril 2 la banda de pET30a sin ningún inserto y los carriles 3, 4 y 5 corresponden a 3 colonias donde se investigó la presencia del inserto CusF3H+-EndolisinaG1, obteniendo una banda alrededor de 1,300 pb, estas bandas están dentro del peso esperado al amplificar CusF3H+-EndolisinaG1 (1,277 pb).

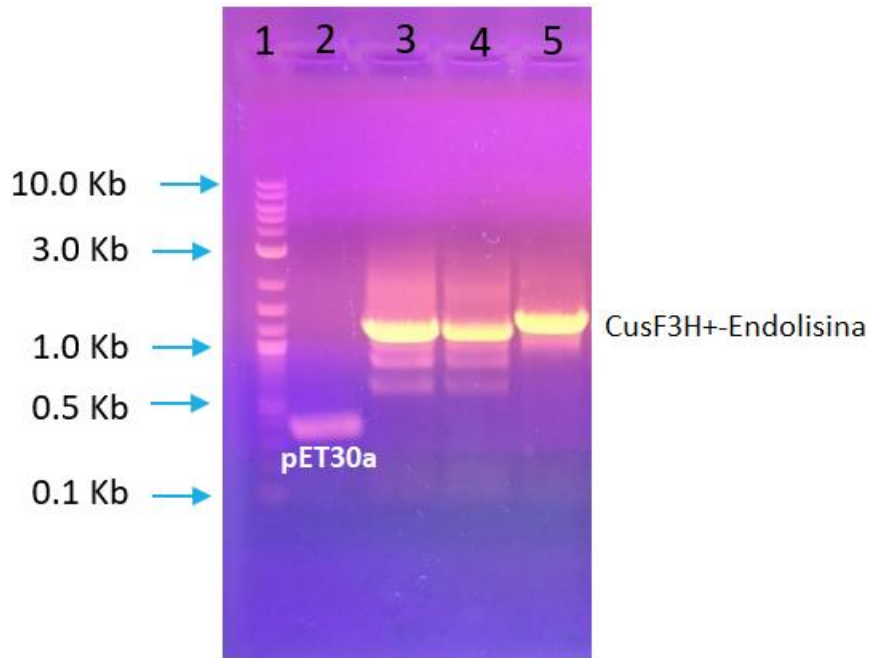


Figura 13. Gel de agarosa al 1 % de la amplificación de CusF3H+-Endolisina. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: pET30a sin inserto. Carriles 3 – 5: CusF3H+-EndolisinaG1 (1,277 pb).

5.6 Secuenciación de las Construcciones pET30a-SmbP-EndolisinaG1 y pET30a-CusF3H+-EndolisinaG1

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron interpretados con ayuda del software Finch TV (figura 14 y figura 15). La secuenciación mostró el resultado esperado por lo que se confirmó que las construcciones fueron hechas de manera correcta.

Tabla 2. Secuencia Aminoacídica de SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-Endolisina G1.

| Inserto | Secuencia aminoacídica |
|-----------------------------|---|
| SmbP-EndolisinaG1 | MSGHTAHVDEAVKHAEAEVAHKGKEGHTDQLLEHAKESL THAKAASEAGGNTHVGHGIKHLLEDAIKHGEEGHVGVAT KHAQEAIEHLRASEHKSHDDDDKMAKTQAEINKRLDAYAK GTVDSPYRVKATSYPDFSGVMEAGAIDADGYYHAQCQDLI TDYVLWLTDNKVRTWGNAKDQIKOSYGTGFKIHENKPSTVP KKGWIAVFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGY ANKKPTKRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSASKTP APKKKATLKVSKNHINYTMDKRGKKPEGMVIHNDAGRSSG QQYENSLANAGYARYANGIAHYYGSEGYVWEAIDAKNQIA WHTGK |
| CusF3H+-EndolisinaG1 | MHHHHHHEMSEAQPQVISA TG VVKGIDLESKKITIHHD PIAAVNWPENTMRFTITPQTKMSEIKTGDKVAFNFVQQG NLSLLQDIKVSQDDDDKMAKTQAEINKRLDAYAKGTVDSPY RVKATSYPDFSGVMEAGAIDADGYYHAQCQDLITDYVLW LTDNKVRTWGNAKDQIKOSYGTGFKIHENKPSTVPKKGWIA VFTSGSYEQWGHIGIVYDGGNTSTFTILEQNWNGYANKKPT KRVDNYYGLTHFIEIPVKAGTTVKKETAKKSASKTPAPKKKA TLKVSKNHINYTMDKRGKKPEGMVIHNDAGRSSGQQYENSL ANAGYARYAN GIAHYYGSEGYVWEAIDAKNQIAWHTGK |

Se observa en el alineamiento (figura 16) que la secuencia obtenida de la secuenciación contiene las secuencias esperadas de la proteína de fusión, el sitio de corte de la enteroquinasa y la EndolisinaG1 en el orden y orientación correcto.

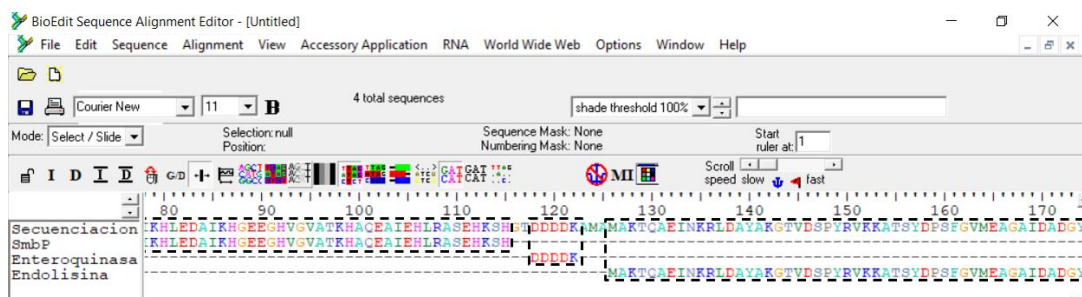


Figura 16. Alineamiento de secuencias aminoacídicas. Secuenciación, SmbP, Sitio de corte de Enteroquinasa y Endolisina G1.

5.5 Expresión a Pequeña Escala y Análisis por SDS-PAGE de las Construcciones

Las mejores condiciones de expresión fueron determinadas mediante SDS-PAGE al 10 % (figura 17). En el gel se muestra la fracción soluble de cada condición de expresión y al lado un control (lisado de *E. coli* BL21(DE3) sin plásmido). En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, los carriles del 2 al 7 muestran el lisado obtenido de expresión SmbP-EndolisinaG1 y los carriles del 8 al 13 muestran el lisado obtenido de la expresión de CusF3H+-EndolisinaG1. Los tiempos de incubación después de la inducción con IPTG y las temperaturas de incubación se indican en cada carril.

En el gel se observa una banda a 40 kDa (29 kDa de EndolisinaG1 y 10 kDa de cada proteína de fusión) para ambas construcciones es a un tiempo de 16 horas de incubación después de la inducción a 25 °C. El carril donde se observa una mayor intensidad de banda, representa las mejores condiciones de expresión para producir la mayor cantidad de proteína de interés (banda indicada en el gel).

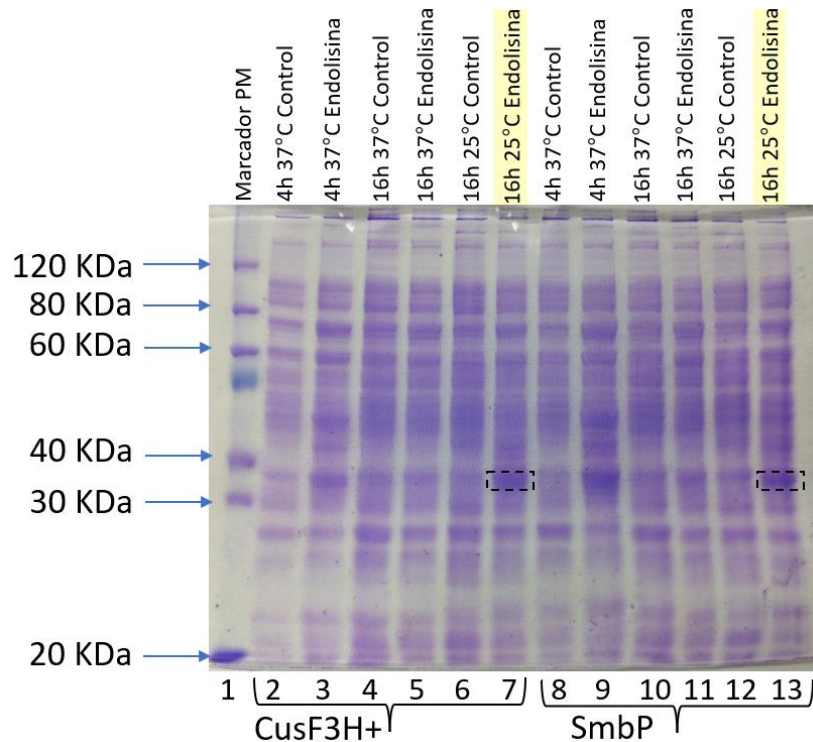


Figura 17. Expresión a Pequeña Escala de Endolisina G1 con las proteínas de fusión SmbP y CusF3H+, fracción soluble. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2 – 7: expresión de Cus3H+-Endolisina a diferentes tiempos y temperaturas de incubación y controles. Carriles 8 – 13: expresión de SmbP-Endolisina a diferentes tiempos y temperaturas de incubación y controles.

5.6 Purificación de SmbP-Endolisina y CusF3H+-Endolisina por Cromatografía IMAC

La siguiente gráfica (figura 18) muestra el cromatograma de elución obtenido con el equipo de FPLC ÄKTA prime plus. Se puede apreciar claramente el pico de elución de SmbP-Endolisina, este pico es característico cuando se realiza la elución en un solo paso, en este caso se utilizó para eluir una solución amortiguadora con imidazol a 200 mM.

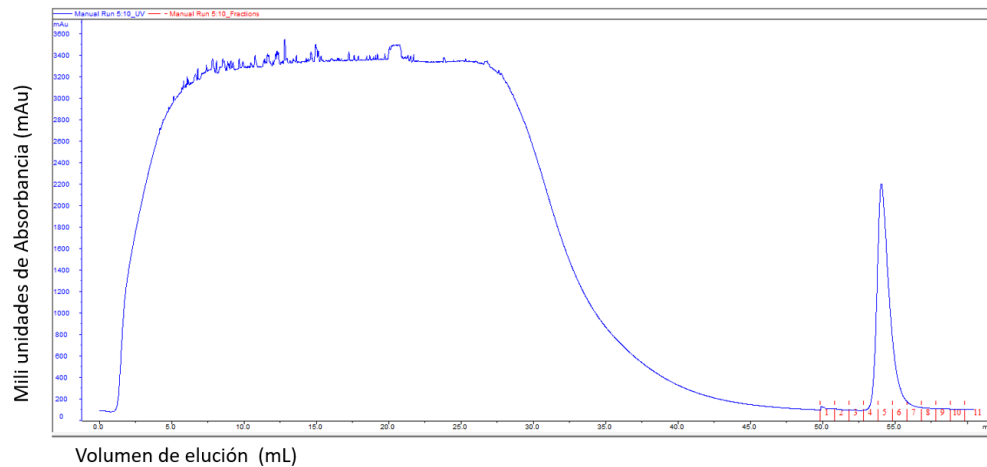


Figura 18. Cromatograma de la purificación de SmbP-Endolisina por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC).

Se elaboró un SDS-PAGE al 10%. En la figura 19 se muestra el lisado, el percolado y las fracciones de elución recolectadas. En los carriles donde se muestran las fracciones de elución se aprecia la banda correspondiente a SmbP-Endolisina (banda marcada).

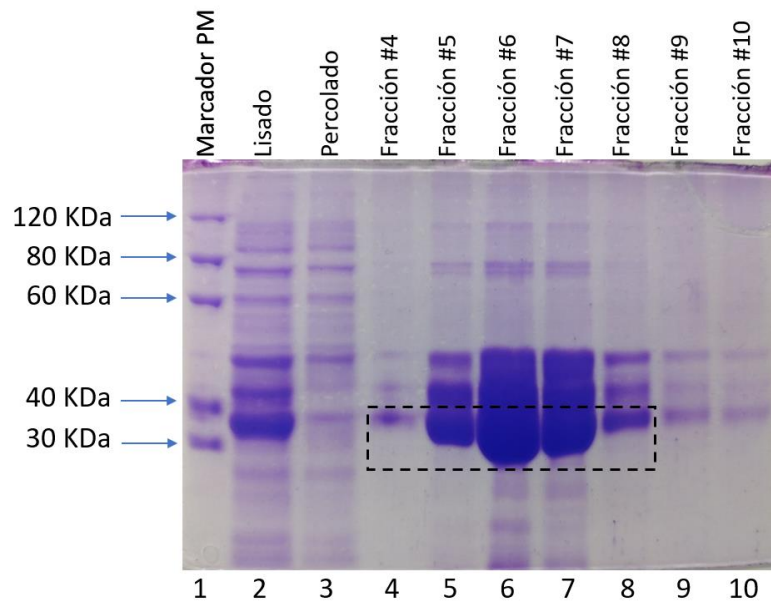


Figura 19. Análisis de purificación de SmbP-Endolisina por IMAC. SDS-PAGE 10 %. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: lisado. Carril 3: percolado. Carriles 4 – 10: fracciones de elución recolectadas.

La siguiente gráfica (figura 20) muestra el cromatograma de elución obtenido con el equipo de FPLC ÄKTA prime plus. Se puede apreciar claramente el pico de elución de CusF3H+-Endolisina; este pico es característico cuando se realiza la elución en un solo paso, se utilizó para eluir una solución amortiguadora con imidazol a 200 mM.

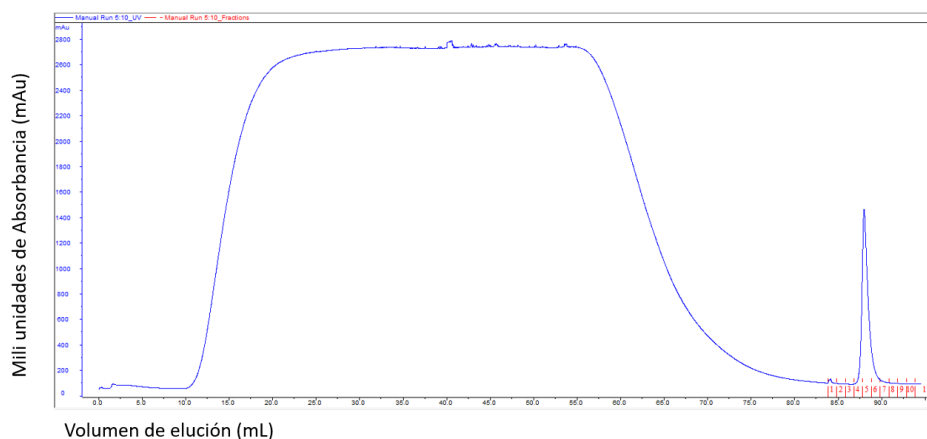


Figura 20. Cromatograma de la purificación de CusF3H-Endolisina por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC).

Para analizar esta purificación se elaboró una electroforesis en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE al 10% (figura 21). Se muestra el lisado, el percolado y las fracciones de elución recolectadas. En los carriles donde se muestran las fracciones de elución se aprecia la banda correspondiente a CusF3H+-Endolisina (banda marcada).

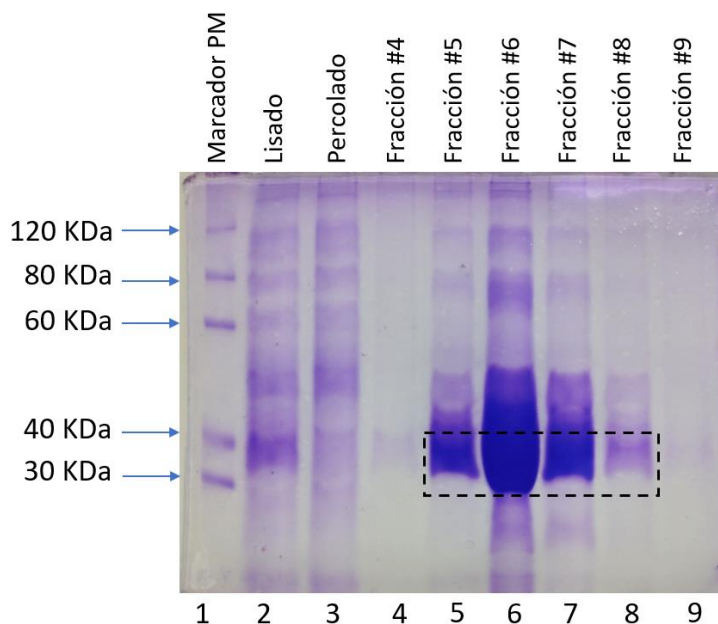


Figura 21. Análisis de purificación de CusF3H+-Endolisina por IMAC. SDS-PAGE 10 % mostrando el carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: lisado. Carril 3: percolado. Carriles 4 – 9: fracciones de elución recolectadas.

5.7 Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

A las fracciones obtenidas se les realizó una diálisis para eliminar el imidazol, se cuantificó la concentración de la proteína por el método Bradford a diferentes concentraciones del estándar de BSA. En la Tabla 3 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración, los cuales fueron graficados (figura 22) para obtener la ecuación de la recta.

Tabla 3. Datos de la Curva de Calibración para el Método Bradford.

| | Concentración de estándares | Volumen de muestra | Reactivo Bradford | Absorbancia 595 nm |
|------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Estandar 1 | 1.0 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.582 |
| Estandar 2 | 0.8 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.44 |

| | | | | |
|------------|-----------|------------|------|--------|
| Estandar 3 | 0.6 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.364 |
| Estandar 4 | 0.4 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.1975 |
| Estandar 5 | 0.2 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.1155 |
| Estandar 6 | 0.1 mg/mL | 20 μ L | 1 mL | 0.062 |

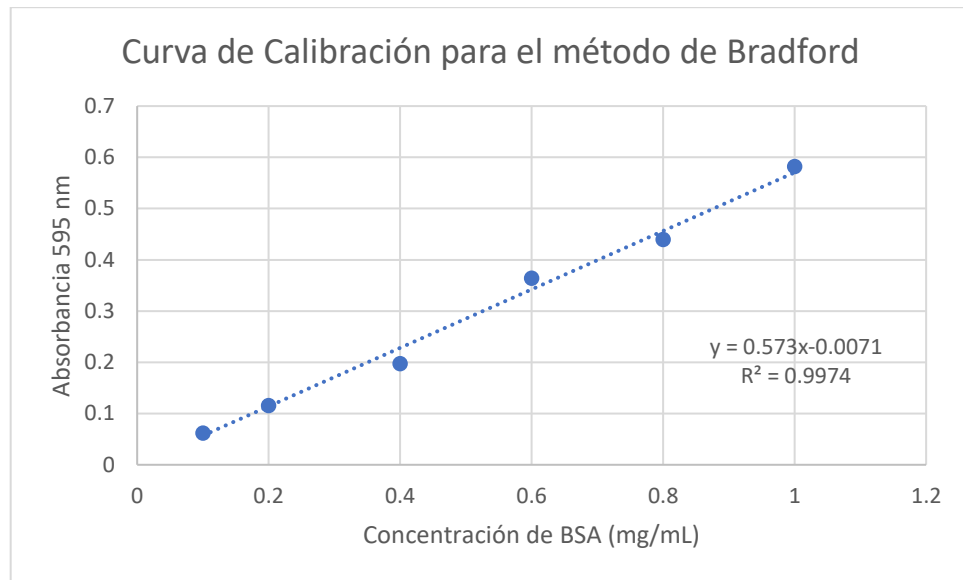


Figura 22. Gráfica de la curva de calibración del método Bradford a 595 nm.

A partir de los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se obtuvo una concentración de SmbP-EndolisinaG1 de 2.092 mg/mL correspondiente a 6.28 mg en 1 L cultivo expresado. Para CusF3H+-EndolisinaG1 se obtuvo una concentración de 1.653 mg/mL correspondiente a 4.96 mg en 1 L de cultivo expresado.

5.8 Remoción de la Proteína de Fusión y Segunda Cromatografía de Afinidad

Una vez escindida la proteína de fusión, se realizó la segunda cromatografía de afinidad para separar las dos proteínas. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de tricina al 12%. El corte de SmbP-EndolisinaG1, se observa en la figura 23 y el corte de CusF3H+-EndolisinaG1 en la figura 24.

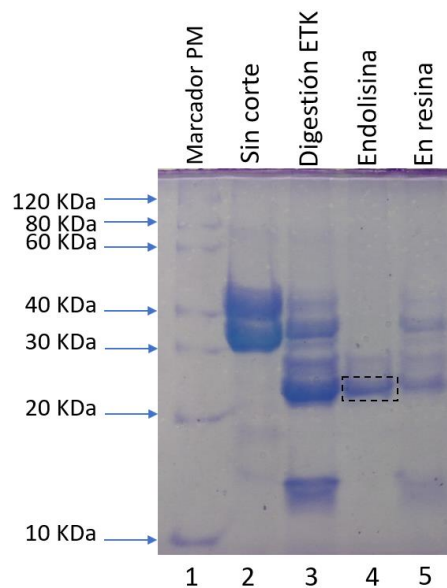


Figura 23. Corte de SmbP-Endolisina con Enteroquinasa. Gel Tricina 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: quimera SmbP-Endolisina sin cortar. Carril 3: corte con enteroquinasa (ETK). Carril 4: Endolisina pura. Carril 5: unido a la resina.

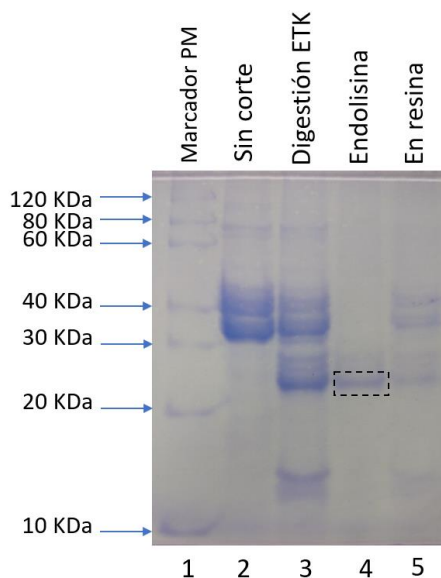


Figura 24. Corte de CusF3H+-Endolisina con Enteroquinasa. Gel Tricina 12%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: CusF3H+-Endolisina sin cortar. Carril 3: corte con enteroquinasa (ETK). Carril 4: Endolisina . Carril 5: unido a la resina.

5.9 Cuantificación de Endolisina Pura

Se cuantificó la concentración de endolisina pura por el método Bradford. A partir de los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta y la absorbancia de las muestras, se obtuvo una concentración de Endolisina de 0.787 mg/mL correspondiente a 2.36 mg en 1 L cultivo expresado utilizando la proteína de fusión SmbP. En cuanto a la expresión con la proteína de fusión CusF3H+ se obtuvo una concentración de Endolisina de 0.641 mg/mL correspondiente a 1.92 mg en 1 L cultivo expresado.

5.10 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de la Endolisina G1

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la Endolisina G1 en distintas concentraciones: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$, frente a *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina utilizando el método de CMI y midiendo la D.O. ₆₀₀.

Al analizar el efecto inhibitorio de crecimiento de la Endolisina G1 sobre este par de cepas bacterianas se observa que los tratamientos con las diferentes concentraciones de la Endolisina G1 no son capaces de inhibir el crecimiento de *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina como se puede observar en la figura 25. No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos con Endolisina G1 en comparación con el control negativo, considerando un valor de $p < 0.05$ (ANOVA de un factor). Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

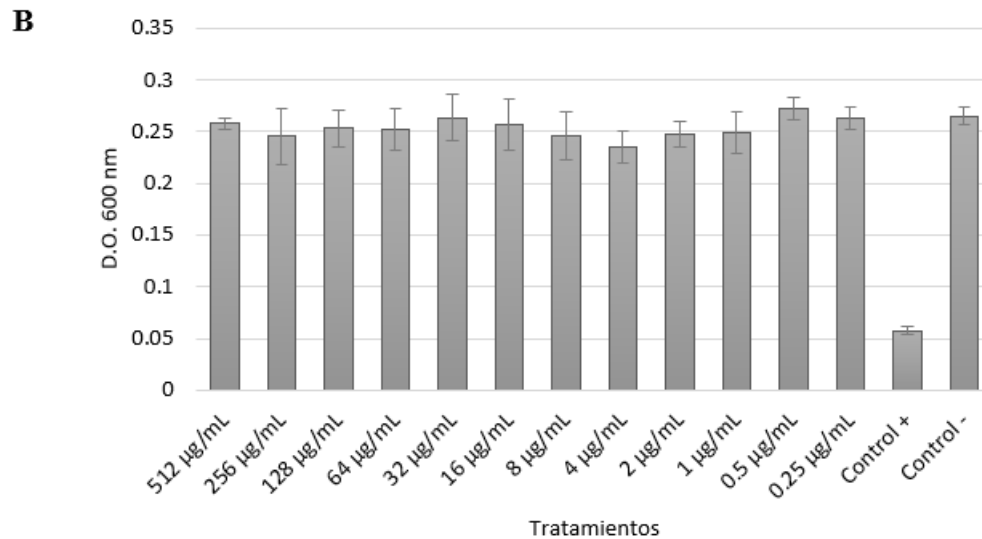
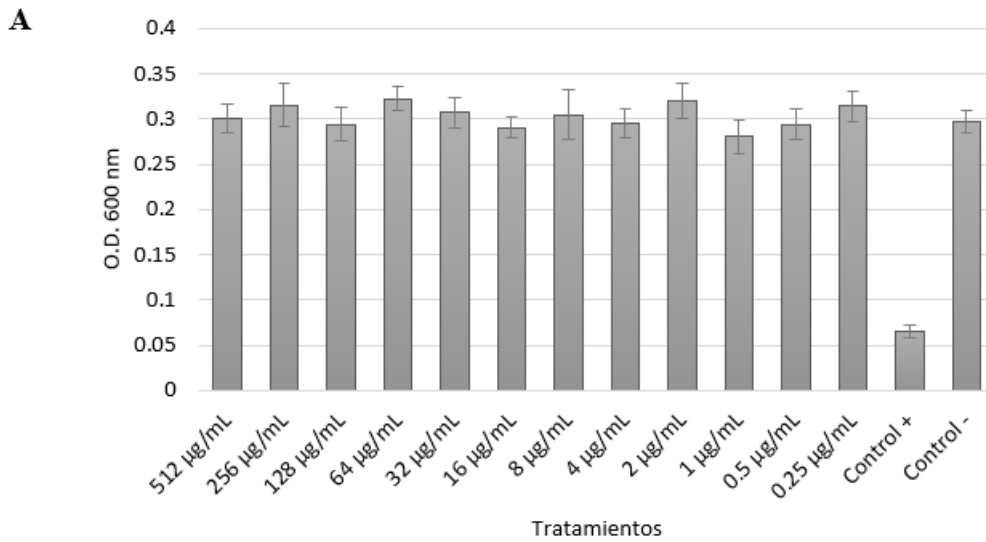


Figura 25. Evaluación antimicrobiana de la Endolisina G1 usando el método CMI. La actividad antimicrobiana fue probada contra A) *S. aureus* y B) *S. aureus* resistente a meticilina. Una solución amortiguadora de Tris 50 mM, NaCl 500 mM fue usada como control negativo. La enzima lítica lisostafina fue usada como control positivo (5 U/mL).

5.11 Evaluación de la Actividad Antibiopelícula de la Endolisina G1

Se evaluó la actividad antibiopelícula de la Endolisina G1 en distintas concentraciones: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/mL}$, frente a *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina utilizando un método con placa de microtitulación y midiendo la D.O. ₅₉₀.

Al analizar el efecto disruptivo de biopelícula de la Endolisina G1 sobre este par de cepas bacterianas se observa que los tratamientos con las diferentes concentraciones de la Endolisina G1 no son capaces de eliminar las biopelículas producidas por *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina como se puede observar en la figura 26. No existe diferencia significativa entre las medias de los tratamientos con Endolisina G1 en comparación con el control negativo, considerando un valor de $p < 0.05$ (ANOVA de un factor). Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

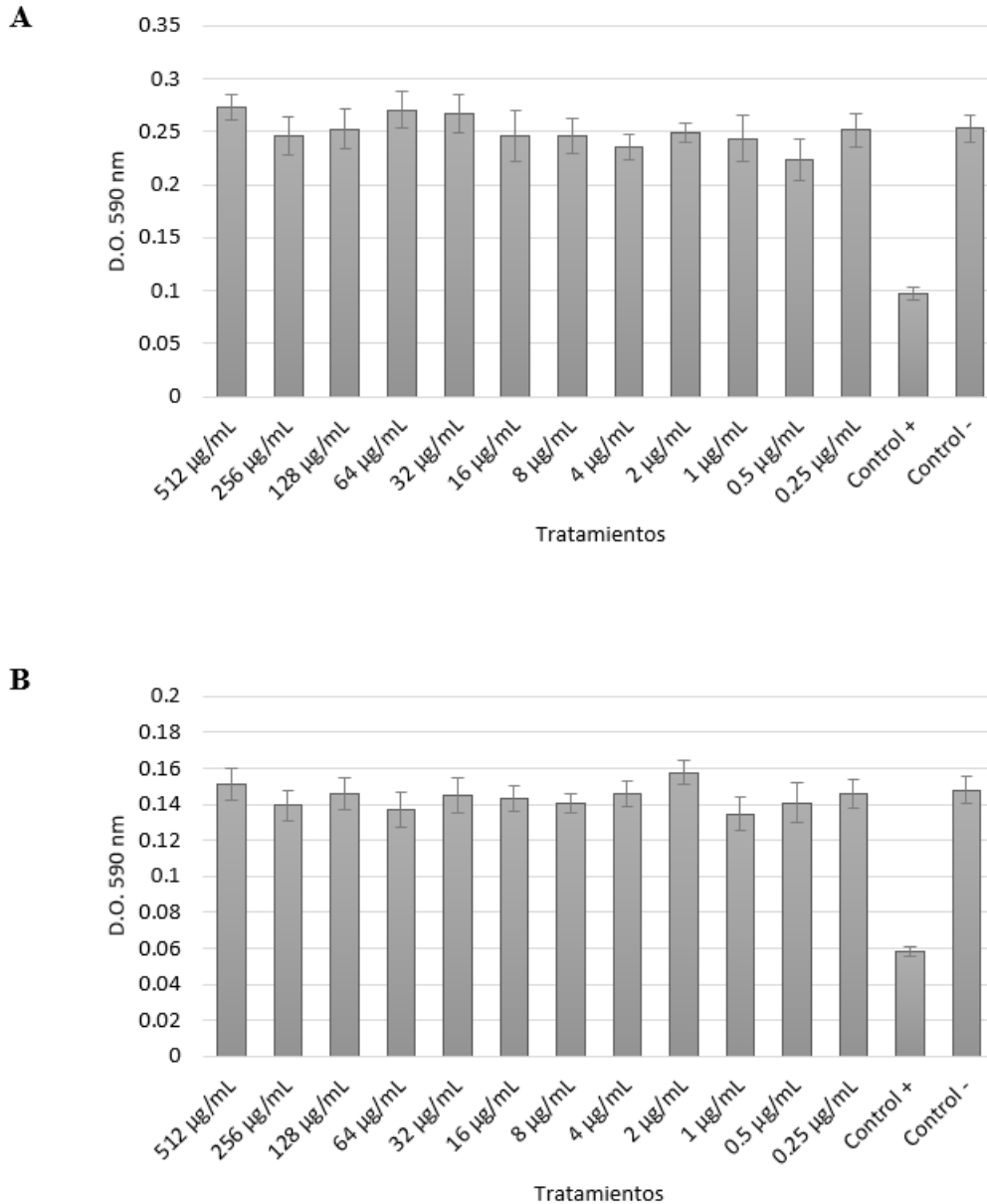


Figura 26. Evaluación antibiopelícula de la Endolisina G1 usando un método con placa de microtitulación. La actividad antibiopelícula fue probada contra A) *S. aureus* y B) *S. aureus* resistente a meticilina. Una solución amortiguadora de Tris 50 mM, NaCl 500 mM fue usada como control negativo. La enzima lítica lisostafina fue usada como control positivo (5 U/mL).

CAPÍTULO 6

6. DISCUSIONES

En el presente trabajo se realizaron dos construcciones para la expresión de una proteína de importancia antimicrobiana, como lo es la endolisina, específicamente la endolisina del bacteriófago G1 de *S. aureus*, usando como hospedero la bacteria *E. coli*. La secuencia que codifica para la endolisina G1 fue optimizada y sintetizada para su expresión en *E. coli*.

Muchas proteínas tienen secuencias de ARN mensajero que incluyen codones que se usan con poca frecuencia en *E. coli*, el tener este tipo de codones en la secuencia de interés a expresar, implica problemas en la traducción, por esta razón se realiza la optimización, la cual consiste en el cambio de estos codones poco frecuentes por codones sinónimos que son empleados comúnmente por el organismo que se usara como hospedero, en este caso *E. coli*. Este proceso tiene mucha importancia ya que se ha demostrado que la optimización puede afectar en la conformación y en la función de las proteínas y también se ve involucrado en aumentar los niveles de expresión [112, 113]. El proceso de optimización es muy usado en sistemas de expresión procariota y ya se ha usado con anterioridad para expresar endolisinas [114, 115].

Es bien conocido que uno de los principales problemas del uso de *E. coli* como microorganismo hospedero es la formación de cuerpos de inclusión, dichos agregados insolubles de proteína ocasionan que el proceso de purificación sea más complicado y largo, además de la generación de una proteína no funcional [90, 93]. Por estos motivos, para la producción de la endolisina se realizaron las construcciones que incluyen a las proteínas de fusión SmbP y CusF3H+.

Al visualizar la expresión a pequeña escala mediante electroforesis de gel de poliacrilamida se observó que tanto SmbP-Endolisina como CusF3H+-Endolisina presentan una banda a los 39 kDa, la cual es la suma del peso de la proteína de fusión utilizada (tanto SmbP como CusF3H+ tienen un peso aproximado de 10 kDa) más la EndolisinaG1 la cual tiene un peso de 29 kDa (figura 17 carriles 3, 5 y 7 para CusF3H+ y carriles 9, 11 y 13 para SmbP). Esta banda no se encuentra presente en la expresión de los carriles control, lo cual indicó que *E. coli* expresó la proteína de interés.

La baja formación de cuerpos de inclusión se debe al uso de las proteínas de fusión, a la optimización de los codones, así como a la temperatura a la que se expresó (25 °C). Se ha observado que a menor temperatura de expresión, mayor es la endolisina soluble que se obtiene [116, 117]. Se realizó la extracción de la proteína de interés por medio de la lisis total de las células, de acuerdo con lo descrito por Vargas-Cortez et al [99].

Una vez que se confirmó que la proteína de interés se podía producir y extraer satisfactoriamente del citoplasma de *E. coli* se procedió a expresar la EndolisinaG1 en un litro de cultivo, para esto se emplearon los mismos parámetros utilizados que en la expresión a pequeña escala. Para ello, se realizó la purificación SmbP-Endolisina y de CusF3H+-Endolisina utilizando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados

utilizando iones Ni(II). CusF y SmbP son proteínas nativas de *E. coli* y *N. europea* respectivamente y al ser ambas proteínas unión a metales y tener un bajo peso molecular son buenas opciones para usar como proteínas de fusión y producir proteínas en forma soluble, además de permitir la purificación de la proteína de interés mediante IMAC [98, 99].

IMAC es una técnica cromatográfica que se basa en la afinidad conocida de iones metálicos de transición tales como Zn(II), Cu(II), Ni(II) y Co(II) a histidina y cisteína en soluciones acuosas. Como se mencionó, anteriormente, tanto SmbP como CusF3H⁺ son afines a iones metálicos, y se optó por el uso de Ni(II) ya que estudios anteriores muestran mejores resultados en cuanto a pureza usando este metal [98, 99]. Los residuos de histidina presentes en las proteínas de fusión forman enlaces covalentes coordinados con el Ni(II) por este motivo se usó una solución amortiguadora de elución que contuviera 200 mM de imidazol. El imidazol compite por los sitios de coordinación presentes en el Ni(II) y desplaza a la proteína de fusión y esta es eluida junto con la proteína de interés [91, 96].

Se realizó la técnica de SDS-PAGE para visualizar las fracciones obtenidas usando SmbP-Endolisina (figura 20) y CusF3H⁺-Endolisina (figura 22), en donde se visualizaron las bandas de 39 kDa, lo cual indica que tanto la expresión como la purificación se llevó a cabo de forma satisfactoria. En ambos ensayos (figura 20 y 22), al comparar los carriles 2 (lisado antes de la purificación) contra los carriles 3 (fracción no unida o percolado) se observa que no hay una banda intensa alrededor de los 40 kDa en la fracción no unida, lo que indica que la proteína de interés se unió en su gran mayoría a la columna cromatográfica.

Posteriormente se realizó la remoción de la proteína SmbP y CusF3H⁺ de la endolisina utilizando la enzima enteroquinasa. La enteroquinasa es una de las enzimas más utilizadas para la remoción de proteínas de fusión por su alta especificidad y además tiene una alta tasa de recuperación comparada con otras enzimas utilizadas en la remoción de la proteína de fusión [118, 119]. Después del corte con enteroquinasa se realizó la segunda cromatografía de afinidad, esto con la finalidad de remover la proteína de fusión, así como eliminar algunos contaminantes que aun pudieran estar presentes.

Se corroboró el corte con la enzima enteroquinasa y la segunda purificación, tanto de SmbP-Endolisina (figura 21) como de CusF3H⁺-Endolisina (figura 23) por medio de SDS-PAGE. En el carril 2 de estos geles se puede observar la proteína antes del corte con solo la purificación en un paso, al comparar contra el carril 4 es evidente la disminución de los contaminantes, esto nos indica que la segunda purificación se llevó a cabo de forma satisfactoria y que se obtuvo la endolisina con un grado de pureza alto.

En los carriles 3 de dichos geles correspondientes a la digestión con enteroquinasa se pueden observar tres bandas principales, una de aproximadamente 39 kDa la cual es perteneciente a la Endolisina G1 junto con la proteína de fusión, otra banda de aproximadamente 29 kDa la cual pertenece a la proteína endolisina libre y la última banda de aproximadamente 15 kDa correspondiente a la proteína de fusión solamente. La presencia de estas bandas nos indica que la enteroquinasa realizó su función de forma correcta y separo la proteína de fusión de la proteína de interés.

Las bandas pertenecientes a las proteínas de fusión tienen un peso superior (~14 kD) del esperado (10 kD). Si bien aún no está completamente claro el mecanismo por el cual sucede esto, se cree que tiene relación con la cantidad de SDS que se une a la proteína

[120, 121]. Otra posible razón de este comportamiento puede deberse a la alta carga de aminoácidos ácidos en la composición de las proteínas, más específicamente, en SmbP. Armstrong et al [122] encontraron que en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, la proteína 16 E7 del virus del papiloma humano migra como una proteína de 17 kDa. Sin embargo, la masa molecular teórica de esta proteína es de aproximadamente 11 kDa. Ellos realizaron la sustitución de dos aminoácidos ácidos propios de la proteína por dos residuos básicos, lo que restauró la movilidad electroforética normal. Este resultado indica que la carga negativa neta de la proteína E7 es responsable de su comportamiento electroforético anómalo. Sin embargo, no se ha establecido la relación exacta entre la composición ácida de las proteínas y el peso molecular mostrado por SDS-PAGE [123].

Se calculó la concentración de proteína obtenida mediante el método Bradford, la concentración de SmbP-Endolisina fue de 6.28 mg/L de cultivo, lo cual después de remover la proteína de fusión resulta en una concentración de Endolisina de 2.36 mg/L de cultivo, y como se puede observar en la figura 24 con un alto grado de pureza. Los resultados obtenidos fueron comparados con lo reportado por Haddad Kashani et al [124]. En este trabajo se produjo el módulo quimérico CHAP-amidasa de endolisina en el citoplasma de *E. coli* BL21, utilizando el método de lisis de sonicación y para facilitar la purificación de la proteína se empleó una etiqueta de histidinas mediante cromatografía de afinidad con iones níquel. El rendimiento reportado fue de 8-12 mg/L de la proteína de interés con la etiqueta de histidinas.

Este resultado de proteína obtenida es una cantidad mayor a la obtenida en este proyecto (6.28 mg/L de endolisina con SmbP). Una posible causa de esta diferencia es el

método de lisis celular empleado, siendo sonicación en el trabajo de Haddad Kashani et al y para este trabajo lisis con perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro.

Se han realizado investigaciones en las cuales se comparan métodos de lisis celular en *E. coli*. Shrestha et al [125] compararon diferentes métodos de lisis en cuanto al rendimiento de proteína obtenido de *E. coli* BL21 (DE3); en dicho estudio se compararon la sonicación, vórtice de perlas de vidrio de 0.1 mm, entre otras técnicas de bajo costo. Encontraron que la lisis usando las perlas de vidrio resultó en rendimientos de producción de proteína más bajos y con una mayor variabilidad en comparación con los rendimientos de proteína obtenidos utilizando sonicación y homogenización por alta presión. Similarmente, Singh [126] realizó un estudio comparativo sobre los métodos de disrupción celular para la liberación de la aspartasa en *E. coli*. Comparó tres diferentes métodos mecánicos: sonicación, perlas de vidrio y prensa francesa. Los resultados mostraron un mayor porcentaje de aspartasa liberada utilizando la prensa francesa, seguido de la sonicación y finalmente las perlas de vidrio.

Con respecto a la evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de la Endolisina G1. En su secuencia se encuentra el dominio CHAP, el cual puede funcionar como una amidasa involucrada en la escisión del peptidoglicano, cortando el enlace entre la D-Alanina y el puente de pentaglicina. Se ha reportado que este dominio es necesario y suficiente para la lisis de *S. aureus* [71]. En la endolisina denominada LysK, una de las endolisinas mejor caracterizadas, también se encuentra el dominio CHAP y se ha reportado para LysK una actividad específica [$\Delta\text{OD}_{600} \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$] de 1.3 contra bacterias *S. aureus* vivas en suspensión y ser efectiva en concentraciones tan bajas como 40 nM en la degradación de su biopelícula [64]. El dominio CHAP dentro de la secuencia de la

Endolisina G1 se encuentra hacia el extremo N-terminal, primeros 165 aminoácidos, quedando otros 102 aminoácidos no pertenecientes a este dominio, si bien la estructura tridimensional del dominio CHAP dentro de la Endolisina G1 (figura 27 A, color blanco) es similar al dominio CHAP individual (figura 27 A, color azul), los aminoácidos hacia el extremo C-terminal (figura 27 A, color rojo) podrían interferir con el acoplamiento de este dominio con el peptidoglicano de *S. aureus*, tal como lo analizado por Tham et al [108] en la endolisina del fago 88, ellos expresaron esta proteína en el vector pET28a, usando las enzimas de restricción BamHI/XhoI lo que resultó en demasiados aminoácidos adicionales agregados del plásmido pET28a en la proteína recombinante, ocasionando que dicha endolisina fuera no funcional.

Hacia el extremo C-terminal de la endolisina codificada por el fago G1, se encuentra parte del dominio amidasa-2, este dominio hidroliza el enlace amida entre el ácido N-Acilmurámico y la L-Alanina en el peptidoglicano, éste se ha encontrado también en otras endolisinas, tal como en la endolisina LysGH15, la cual ha sido evaluada tanto en su actividad antimicrobiana como antibiopelícula, donde las CMI de LysGH15 frente a cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hominis* y *S. haemolyticus* oscilaron entre 8 y 32 µg/ml, mientras que las biopelículas producidas por estas cepas tuvieron como resultado una eliminación significativa por LysGH15 a una concentración de 150 µg/ml [82]. Sin embargo, la secuencia del dominio amidasa-2 de la Endolisina G1 (figura 27 B, color verde) no conforma completamente dicho dominio (57 de 140 aminoácidos) y por lo cual no comparte una estructura tridimensional similar a la que tiene el dominio completo, como lo es en la endolisina LysGH15 (figura 27 C, color verde). Por lo cual

esto podría ser un motivo de la carencia de actividad antimicrobiana y antibiopelícula de la Endolisina G1 contra *S. aureus*.

La actividad lítica de las endolisinas no depende del número de dominios de actividad enzimática con los que cuente, puesto que una endolisina esté conformada por dos o los tres dominios de actividad enzimática no siempre se traduce como una mayor actividad antimicrobiana. Existen ejemplos de endolisinas cuya actividad no se ve comprometida o incluso aumenta tras la eliminación del dominio CBD (dominio de unión a pared celular). Horgan et al [127] realizaron estudios de delección de los dominios amisada-2 y SH3b, conservando solo el dominio CHAP de LysK, que comprende los primeros 165 aminoácidos, este permaneció altamente activo y mostró una mayor solubilidad comparado con la endolisina de longitud completa. Del mismo modo, Becker et al [128] generaron construcciones de delección entorno a LysK y compararon sus actividades *in vitro* contra *S. aureus*. A diferencia del estudio de Horgan, una construcción de la investigación de Becker con solo el dominio CHAP, pero considerando los primeros 221 aminoácidos, retuvo solo una actividad marginal, posiblemente debido a un plegamiento incorrecto en el extremo C-terminal, por lo que más allá del número de dominios con actividad enzimática que pueda tener una endolisina, puede ser de mayor relevancia la disposición espacial y estructural que tengan los dominios dentro de la endolisina que les permita realizar su acción.

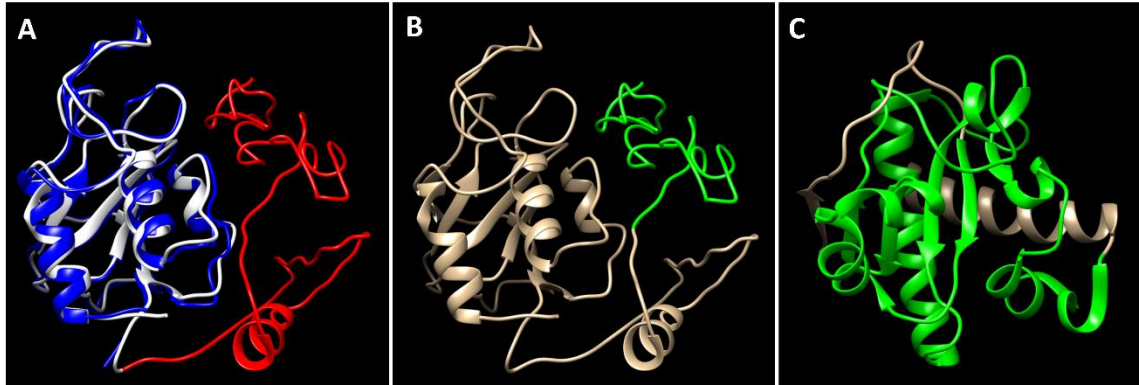


Figura 27. Estructuras tridimensionales de la Endolisina G1, dominio CHAP y dominio amidasa-2. A) Superposición del dominio CHAP individual (color azul) con la Endolisina G1 (dominio CHAP en color blanco y restante en color rojo). B) Estructura tridimensional de la Endolisina G1 (parte del dominio amidasa-2 en color verde). C) Estructura tridimensional de la endolisina LysGH15 (dominio amidasa-2 completo en color verde). El modelado de EndolisinaG1 fue elaborado con la herramienta I-TASSER [129], los archivos PDB para el dominio CHAP y la endolisina LysGH15 fueron obtenidos de la base de datos Protein Data Bank [104, 130], la visualización de estructuras se realizó en el software UCSF Chimera [131].

CAPÍTULO 7

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron las construcciones de SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1 confirmadas por PCR y secuenciación.
- Las condiciones ideales para la expresión de la Endolisina en el citoplasma de *E. coli* son: inducción con IPTG a una concentración final de 0.1 mM al llegar a una D.O.₆₀₀ de 0.4-0.6, temperatura de 25 °C a 200 rpm durante 16 horas.
- Tanto SmbP como CusF3H+ presentan altos niveles de expresión de Endolisina G1 en el citoplasma de *E. coli*.
- Se obtiene mayor producción de Endolisina quimérica utilizando SmbP comparado con CusF3H+ obteniendo 6.28 y 4.96 mg respectivamente de 1L de cultivo.
- La expresión citoplásmica con el uso de SmbP y CusF3H+ permite la solubilidad de la EndolisinaG1, evitando así la formación de cuerpos de inclusión.
- SmbP-EndolisinaG1 y CusF3H+-EndolisinaG1 pueden ser purificadas mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) con Ni(II).

- La enteroquinasa puede utilizarse de forma efectiva para separar las proteínas de fusión de la proteína de interés.
- El nivel de pureza aumenta con el segundo uso de la cromatografía de afinidad con Ni(II).
- La endolisina del fago G1 no muestra actividad antibacteriana contra *S. aureus* utilizando el método concentración mínima inhibitoria.
- La endolisina del fago G1 no muestra actividad antibiopelícula contra la biopelícula producida por *S. aureus* utilizando el método de disrupción de biopelícula en placa de microtitulación.

CAPÍTULO 8

8. SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos que se generaron durante el presente proyecto se gestionó de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos.

Los residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Disposición de los Residuos Generados.

| Colector | Residuo generado |
|--|---|
| Colector A (Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas) | <ul style="list-style-type: none">▪ Solución amortiguadora TAE (Tris, ácido acético, EDTA)▪ Solución amortiguadora TGS (Tris, Glicina, SDS)▪ Solución amortiguadora de equilibrio (Tris, NaCl)▪ Solución amortiguadora de elución (Tris, NaCl, imidazol) |
| Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas) | <ul style="list-style-type: none">▪ Agarosa▪ Poliacrilamida |
| Colorantes y Lugol | <ul style="list-style-type: none">▪ Azul de Coomassie |

CAPÍTULO 9

9. REFERENCIAS

- [1] K. I. Mohr, “History of antibiotics research,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 398, no. 7, pp. 237–272, 2016, doi: 10.1007/82_2016_499.
- [2] K. Lambrini, “The Rational Use of Antibiotics Medicine,” *J. Healthc. Commun.*, vol. 02, no. 03, pp. 1–4, 2017, doi: 10.4172/2472-1654.100067.
- [3] R. I. Aminov, “A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future,” *Front. Microbiol.*, vol. 1, no. 12, pp. 1–7, 2010, doi: 10.3389/fmicb.2010.00134.
- [4] H. Landecker, “Antibiotic Resistance and the Biology of History,” *Body Soc.*, vol. 22, no. 4, pp. 19–52, 2016, doi: 10.1177/1357034X14561341.
- [5] N. Kresge, R. D. Simoni, and R. L. Hill, “Selman Waksman: the Father of Antibiotics,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 48, pp. e7–e8, 2004, doi: 10.1016/s0021-9258(20)67861-9.
- [6] T. Rončević, J. Puizina, and A. Tossi, “Antimicrobial peptides as anti-infective agents in pre-post-antibiotic era?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 22, pp. 1–32, 2019, doi: 10.3390/ijms20225713.
- [7] R. A. Smith, N. M. M’ikanatha, and A. F. Read, “Antibiotic Resistance: A Primer and Call to Action,” *Health Commun.*, vol. 30, no. 3, pp. 309–314, 2015, doi: 10.1080/10410236.2014.943634.
- [8] W. Ricciardi, G. Giubbini, and P. Laurenti, “Surveillance and control of antibiotic resistance in the mediterranean region,” *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2016, doi: 10.4084/mjhid.2016.035.
- [9] R. Laxminarayan *et al.*, “Antibiotic resistance—the need for global solutions,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 13, no. 12, pp. 1057–1098, 2013, doi: 10.1016/S1473-3099(13)70318-9.
- [10] E. Y. Klein, L. Sun, D. L. Smith, and R. Laxminarayan, “The changing

epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States: A national observational study,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 177, no. 7, pp. 666–674, 2013, doi: 10.1093/aje/kws273.

- [11] F. Prestinaci, P. Pezzotti, and A. Pantosti, “Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon,” *Pathog. Glob. Health*, vol. 109, no. 7, pp. 309–318, 2015, doi: 10.1179/2047773215Y.00000000030.
- [12] Pr. Shankar, “Book review: Tackling drug-resistant infections globally,” *Arch. Pharm. Pract.*, vol. 7, no. 3, p. 110, 2016, doi: 10.4103/2045-080x.186181.
- [13] M. Bassetti, G. Poulakou, E. Ruppe, E. Bouza, S. J. Van Hal, and A. Brink, “Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach,” *Intensive Care Med.*, vol. 43, no. 10, pp. 1464–1475, 2017, doi: 10.1007/s00134-017-4878-x.
- [14] S. D. Holmberg, S. L. Solomon, and P. A. Blake, “Health and Economic Impacts of Antimicrobial Resistance,” *Rev. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 6, pp. 1065–1078, 1987, [Online]. Available: <http://cid.oxfordjournals.org/>.
- [15] S. Wall, “Prevention of antibiotic resistance—an epidemiological scoping review to identify research categories and knowledge gaps,” *Glob. Health Action*, vol. 12, no. 1, pp. 1–27, 2019, doi: 10.1080/16549716.2020.1756191.
- [16] R. Pandey, S. K. Mishra, and A. Shrestha, “Characterisation of escape pathogens with special reference to multidrug resistance and biofilm production in a nepalese hospital,” *Infect. Drug Resist.*, vol. 14, no. 1, pp. 2201–2212, 2021, doi: 10.2147/IDR.S306688.
- [17] D. M. P. De Oliveira *et al.*, “Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 3, pp. 1–49, 2020, doi: 10.1128/CMR.00181-19.
- [18] S. Harbarth *et al.*, “Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics.” 2017.
- [19] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu, and L. J. V Piddock, “Molecular mechanisms of antibiotic resistance,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, no. 1, pp. 42–51, 2014, doi: 10.1038/nrmicro3380.
- [20] N. R. Naylor *et al.*, “Estimating the burden of antimicrobial resistance : a systematic literature review,” *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 7, no. 1, pp. 1–17, 2018.
- [21] M. Kussmann *et al.*, “Emergence of a dalbavancin induced glycopeptide / lipoglycopeptide non- susceptible *Staphylococcus aureus* during treatment of a cardiac device-related endocarditis,” *Emerg. Microbes Infect.*, 2018, doi: 10.1038/s41426-018-0205-z.
- [22] C. SHAW, J. M. STITT, and S. T. COWAN, “Staphylococci and their classification.” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1010–1023, 1951, doi: 10.1099/00221287-5-5-1010.

- [23] S. Y. C. Tong, J. S. Davis, E. Eichenberger, T. L. Holland, and V. G. Fowler, "Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, no. 3, pp. 603–661, 2015, doi: 10.1128/CMR.00134-14.
- [24] M. Gajdács, "The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Antibiotics*, vol. 8, no. 2, p. 52, 2019, doi: 10.3390/antibiotics8020052.
- [25] B. C. Kahl and K. Becker, "Clinical Significance and Pathogenesis of Staphylococcal Small Colony," *Am. Soc. Microbiol.*, vol. 29, no. 2, pp. 401–427, 2016, doi: 10.1128/CMR.00069-15.Address.
- [26] D. Balasubramanian, L. Harper, B. Shopsin, and V. J. Torres, "Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments," *Pathog. Dis.*, vol. 75, no. 1, pp. 1–13, 2017, doi: 10.1093/femspd/ftx005.
- [27] A. S. Lee *et al.*, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 4, no. May, pp. 1–23, 2018, doi: 10.1038/nrdp.2018.33.
- [28] M. Lobanovska and G. Pilla, "Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?," *Yale J. Biol. Med.*, vol. 90, no. 1, pp. 135–145, 2017, doi: 10.1103/PhysRevA.32.435.
- [29] J. Davies and D. Davies, "Origins and evolution of antibiotic resistance.," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 74, no. 1, pp. 417–433, 2010, doi: 10.1128/mnbr.00016-10.
- [30] N. A. Turner *et al.*, "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research," *Nat Rev Microbiol*, vol. 17, no. 3, pp. 1–37, 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0147-4.Methicillin-resistant.
- [31] N. Malachowa and F. R. Deleo, "Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, no. 18, pp. 3057–3071, 2010, doi: 10.1007/s00018-010-0389-4.
- [32] B. J. Hartman and A. Tomasz, "Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*," *J. Bacteriol.*, vol. 158, no. 2, pp. 513–516, 1984, doi: 10.1128/jb.158.2.513-516.1984.
- [33] J. F. Fisher and S. Mobashery, " β -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium," *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 6, pp. 3412–3463, 2021, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01010.
- [34] B. Kot, K. Wierzchowska, M. Piechota, and A. Gruzewska, "Antimicrobial Resistance Patterns in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patients Hospitalized during 2015-2017 in Hospitals in Poland," *Med. Princ. Pract.*, vol. 29, no. 1, pp. 61–68, 2020, doi: 10.1159/000501788.
- [35] A. M. Rossato, M. Primon-Barros, L. da L. Rocha, K. C. Reiter, C. A. G. Dias, and P. A. d'Azevedo, "Resistance profile to antimicrobials agents in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospitals in South Brazil between 2014-2019," *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 53, no. August, p. e20200431, 2020,

doi: 10.1590/0037-8682-0431-2020.

- [36] K. J. Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, “How bacteria stick,” *Sci. Am.*, vol. 238, no. 1, pp. 86-95., 1978.
- [37] T. Trunk, H. S. Khalil, and J. C. Leo, “Bacterial autoaggregation,” *AIMS Microbiol.*, vol. 4, no. 1, pp. 140–164, 2018, doi: 10.3934/microbiol.2018.1.140.
- [38] G. Peters, R. Locci, and G. Pulverer, “Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters,” *J. Infect. Dis.*, vol. 146, no. 4, pp. 479–482, 1982, doi: 10.1093/infdis/146.4.479.
- [39] L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, 2004, doi: 10.1038/nrmicro821.
- [40] W. E. Kloos and M. S. Musselwhite, “Distribution and Persistence of Staphylococcus and Micrococcus Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin,” *Appl. Microbiol.*, vol. 30, no. 3, pp. 381–395, 1975, doi: 10.1128/am.30.3.381-395.1975.
- [41] L. K. Vestby, T. Grønseth, R. Simm, and L. L. Nesse, “Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 2, p. 59, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9020059.
- [42] C. Watters, D. Fleming, D. Bishop, and K. P. Rumbaugh, *Host Responses to Biofilm*, vol. 142. Elsevier Inc., 2016.
- [43] N. Høiby, H. Krogh Johansen, C. Moser, Z. Song, O. Ciofu, and A. Kharazmi, “Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth,” *Microbes Infect.*, vol. 3, no. 1, pp. 23–35, 2001, doi: 10.1016/S1286-4579(00)01349-6.
- [44] T. D. Scherr, C. E. Heim, J. M. Morrison, and T. Kielian, “Hiding in plain sight: Interplay between staphylococcal biofilms and host immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 5, no. 2, pp. 1–7, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00037.
- [45] R. Kolter and D. Hogan, “Why are bacteria refractory to antimicrobials?,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 5, no. 5, pp. 472–477, 2002, [Online]. Available: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527402003570>.
- [46] E. M. Waters, S. E. Rowe, J. P. O’Gara, and B. P. Conlon, “Convergence of Staphylococcus aureus Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells?,” *PLoS Pathog.*, vol. 12, no. 12, pp. 1–4, 2016, doi: 10.1371/journal.ppat.1006012.
- [47] H. Koo, R. N. Allan, R. P. Howlin, P. Stoodley, and L. Hall-Stoodley, “Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 12, pp. 740–755, 2017, doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
- [48] K. Schilcher and A. Horswill, “Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 84, no. 3,

pp. 1–36, 2020.

- [49] S. K. Mazmanian, G. Liu, H. Ton-That, and O. Schneewind, “Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall,” *Science* (80-.), vol. 285, no. 5428, pp. 760–763, 1999, doi: 10.1126/science.285.5428.760.
- [50] M. Gross, S. E. Cramton, F. Götz, and A. Peschel, “Key role of teichoic acid net charge in Staphylococcus aureus colonization of artificial surfaces,” *Infect. Immun.*, vol. 69, no. 5, pp. 3423–3426, 2001, doi: 10.1128/IAI.69.5.3423-3426.2001.
- [51] C. R. Schaeffer *et al.*, “Versatility of Biofilm Matrix Molecules in Staphylococcus epidermidis Clinical Isolates and Importance of Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression during High Shear Stress,” *Mosphere*, vol. 1, no. 5, pp. e00165-16, 2016, doi: 10.1128/msphere.00165-16.
- [52] P. Speziale, G. Pietrocola, T. J. Foster, and J. A. Geoghegan, “Protein-based biofilm matrices in staphylococci,” *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1–10, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00171.
- [53] D. Mack *et al.*, “The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear β -1,6-linked glucosaminoglycan: Purification and structural analysis,” *J. Bacteriol.*, vol. 178, no. 1, pp. 175–183, 1996, doi: 10.1128/jb.178.1.175-183.1996.
- [54] K. M. Conlon, H. Humphreys, and J. P. O’Gara, “icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in Staphylococcus epidermidis,” *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 16, pp. 4400–4408, 2002, doi: 10.1128/JB.184.16.4400-4408.2002.
- [55] F. Fitzpatrick, H. Humphreys, and J. P. O’Gara, “Evidence for icaADBC-independent biofilm development mechanism in methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 1973–1976, 2005, doi: 10.1128/JCM.43.4.1973-1976.2005.
- [56] C. Cucarella, C. Solano, J. Valle, B. Amorena, Í. Lasa, and J. R. Penadés, “Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation,” *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 9, pp. 2888–2896, 2001, doi: 10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001.
- [57] J. L. Bose, M. K. Lehman, P. D. Fey, and K. W. Bayles, “Contribution of the Staphylococcus aureus Atl AM and GL Murein hydrolase activities in cell division, autolysis, and biofilm formation,” *PLoS One*, vol. 7, no. 7, pp. 1–13, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042244.
- [58] E. E. Mann *et al.*, “Modulation of eDNA release and degradation affects Staphylococcus aureus biofilm maturation,” *PLoS One*, vol. 4, no. 6, pp. 1–13, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0005822.
- [59] M. Otto, “Staphylococcal infections: Mechanisms of biofilm maturation and

- detachment as critical determinants of pathogenicity,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 64, no. 7, pp. 175–188, 2013, doi: 10.1146/annurev-med-042711-140023.
- [60] M. Martı and A. L. Cheung, “Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*,” vol. 12, 2010, doi: 10.1016/j.micinf.2009.10.005.
- [61] M. R. Kiedrowski *et al.*, “Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,” *PLoS One*, vol. 6, no. 11, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0026714.
- [62] S. Periasamy *et al.*, “How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 4, pp. 1281–1286, 2012, doi: 10.1073/pnas.1115006109.
- [63] K. Abdelkader, H. Gerstmans, A. Saafan, T. Dishisha, and Y. Briers, “The preclinical and clinical progress of bacteriophages and their lytic enzymes: The parts are easier than the whole,” *Viruses*, vol. 11, no. 2, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/v11020096.
- [64] M. Schmelcher *et al.*, “Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 5, pp. 1453–1465, 2014, doi: 10.1093/jac/dku552.
- [65] M. Schmelcher and M. J. Loessner, “Bacteriophage endolysins: Applications for food safety,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 37, no. 3, pp. 76–87, 2016, doi: 10.1016/j.copbio.2015.10.005.
- [66] R. Young, “Phage lysis: Do we have the hole story yet?,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 16, no. 6, pp. 790–797, 2013, doi: 10.1016/j.mib.2013.08.008.
- [67] V. A. Fischetti, “Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens,” *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 300, no. 6, pp. 357–362, 2010, doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.002.
- [68] Y. Briers *et al.*, “The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 383, no. 2, pp. 187–191, 2009, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.161.
- [69] D. M. Donovan, J. Foster-Frey, S. Dong, G. M. Rousseau, S. Moineau, and D. G. Pritchard, “The cell lysis activity of the *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 endolysin relies on the cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase domain,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 7, pp. 5108–5112, 2006, doi: 10.1128/AEM.03065-05.
- [70] S. C. Becker, J. Foster-Frey, A. J. Stodola, D. Anacker, and D. M. Donovan, “Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain,” *Gene*, vol. 443, no. 1–2, pp. 32–41, 2009, doi: 10.1016/j.gene.2009.04.023.

- [71] H. Haddad Kashani, M. Schmelcher, H. Sabzalipoor, E. Seyed Hosseini, and R. Moniri, "Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant staphylococcus aureus: Current status of research and novel delivery strategies," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 31, no. 1, pp. e00071-17, 2018, doi: 10.1128/CMR.00071-17.
- [72] P. Sass and G. Bierbaum, "Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ 11 and ϕ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 347–352, 2007, doi: 10.1128/AEM.01616-06.
- [73] N. H. Kim *et al.*, "Effects of phage endolysin SAL200 combined with antibiotics on staphylococcus aureus infection," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 10, pp. 1–10, 2018, doi: 10.1128/AAC.00731-18.
- [74] M. Schmelcher, D. M. Donovan, and M. J. Loessner, "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials," *Future Microbiol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1147–1171, 2012, doi: 10.2217/fmb.12.97.
- [75] T. M. Viertel, K. Ritter, and H. P. Horz, "Viruses versus bacteria-novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, no. 9, pp. 2326–2336, 2014, doi: 10.1093/jac/dku173.
- [76] P. Szweda, M. Schielmann, R. Kotlowski, G. Gorczyca, M. Zalewska, and S. Milewski, "Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 96, no. 5, pp. 1157–1174, 2012, doi: 10.1007/s00253-012-4484-3.
- [77] S. C. Becker, J. Foster-Frey, and D. M. Donovan, "The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 287, no. 2, pp. 185–191, 2008, doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01308.x.
- [78] D. R. Roach and D. M. Donovan, "Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications," *Bacteriophage*, vol. 5, no. 3, p. e1062590, 2015, doi: 10.1080/21597081.2015.1062590.
- [79] S. C. Becker *et al.*, "Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 362, no. 1, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1093/femsle/fnu019.
- [80] H. H. Kashani, M. Schmelcher, H. Sabzalipoor, E. S. Hosseini, and R. Moniri, "Recombinant Endolysins as Potential Therapeutics against Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus*: Current Status of Research and Novel Delivery Strategies," 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1128/CMR.00071-17>.
- [81] V. Jarábková, L. Tišáková, M. Benešík, and A. Godány, "SH3 binding domains from phage endolysins: How to use them for detection of gram-positive pathogens," *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, vol. 9, no. 6, pp. 1215–1220, 2020, doi: 10.15414/jmbfs.2020.9.6.1215-1220.

- [82] Y. Zhang *et al.*, “Antibacterial Effects of Phage Lysin LysGH15 on Planktonic Cells and Biofilms of Diverse Staphylococci,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 15, pp. e00886-18, 2018.
- [83] K. Vandersteegen, A. M. Kropinski, J. H. E. Nash, J.-P. Noben, K. Hermans, and R. Lavigne, “Romulus and Remus, Two Phage Isolates Representing a Distinct Clade within the Twortlikevirus Genus, Display Suitable Properties for Phage Therapy Applications,” *J. Virol.*, vol. 87, no. 6, pp. 3237–3247, 2013, doi: 10.1128/jvi.02763-12.
- [84] J. D. Valderrama-rincon *et al.*, “An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 8, no. 5, pp. 434–436, 2012, doi: 10.1038/nchembio.921.
- [85] V. Rodríguez, J. A. Asenjo, and B. A. Andrews, “Design and implementation of a high yield production system for recombinant expression of peptides,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–10, 2014.
- [86] B. S. Sekhon, “Biopharmaceuticals: an overview,” *Thai J. Pharm. Sci.*, vol. 34, no. 34, pp. 1–19, 2010.
- [87] B. Leader, Q. J. Baca, and D. E. Golan, “Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 1, pp. 21–39, 2008.
- [88] F. M. Steinberg, “Biotech Pharmaceuticals and Biotherapy: An Overview,” *J Pharm Pharm Sci*, vol. 1, no. 2, pp. 48–59, 1998.
- [89] L. Rosenfeld and J. J. R. Macleod, “Insulin: Discovery and Controversy,” *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 2270–2288, 2002.
- [90] D. Esposito and D. K. Chatterjee, “Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 353–358, 2006, doi: 10.1016/j.copbio.2006.06.003.
- [91] J. E. Tropea, S. Cherry, S. Nallamsetty, C. Bignon, and D. S. Waugh, “A Generic Method for the Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* Using a Dual Hexahistidine-Maltose-Binding Protein Affinity Tag,” *Macromol. Crystallogr. Protoc.*, vol. 363, no. 1, pp. 1–19, 2007.
- [92] A. Malhotra, *Tagging for Protein Expression*, 1st ed., vol. 463, no. 09. Elsevier Inc., 2009.
- [93] K. Terpe, “Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 60, no. 5, pp. 523–533, 2003, doi: 10.1007/s00253-002-1158-6.
- [94] H. Motejadded and Æ. J. Altenbuchner, “Construction of a dual-tag system for gene expression, protein affinity purification and fusion protein processing,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 31, no. 4, pp. 543–549, 2009, doi: 10.1007/s10529-008-9909-9.

- [95] B. M. Barney, R. Lobrutto, and W. A. Francisco, "Characterization of a Small Metal Binding Protein from *Nitrosomonas europaea*," *Biochemistry*, vol. 43, no. 35, pp. 11206–11213, 2004.
- [96] J. A. Bornhorst and J. J. Falke, "Purification of proteins using polyhistidine affinity tags," *Methods Enzym.*, vol. 326, no. 1, pp. 245–254, 2000.
- [97] I. R. Loftin *et al.*, "A Novel Copper-Binding Fold for the Periplasmic Copper Resistance Protein," *Biochemistry*, vol. 44, no. 31, pp. 10533–10540, 2005.
- [98] T. Vargas-cortez, J. R. Morones-ramirez, I. Balderas-renteria, and X. Zarate, "Protein Expression and Purification Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the fusion protein CusF3H+," *Protein Expr. Purif.*, vol. 132, no. 1, pp. 44–49, 2017, doi: 10.1016/j.pep.2017.01.006.
- [99] T. Vargas-cortez, J. R. Morones-ramirez, I. Balderas-renteria, and X. Zarate, "Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 118, no. 1, pp. 49–54, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2015.10.009.
- [100] J. E. Cantu-bustos, K. D. Cano, T. Vargas-cortez, J. R. Morones-ramirez, I. Balderas-renteria, and X. Zarate, "Recombinant protein production data after expression in the bacterium *Escherichia coli*," *Data Br.*, vol. 7, no. 1, pp. 502–508, 2016, doi: 10.1016/j.dib.2016.02.074.
- [101] D. A. Perez-perez, T. D. J. Villanueva-ramirez, A. E. Hernandez-pedraza, N. G. Casillas-vega, P. Gonzalez-barranco, and X. Zarate, "The Small Metal-Binding Protein SmbP Simplifies the Recombinant Expression and Purification of the Antimicrobial," *Antibiotics*, vol. 10, no. 10, p. 1271, 2021.
- [102] J. E. Cantu-bustos *et al.*, "Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF," *Protein Expr. Purif.*, vol. 121, no. 1, pp. 61–65, 2016, doi: 10.1016/j.pep.2016.01.007.
- [103] E. H. Freimer, R. M. Krause, and M. McCarty, "Studies of L forms and protoplasts of group A streptococci: I. Isolation, growth, and bacteriologic characteristics," *J. Exp. Med.*, vol. 110, no. 6, pp. 853–874, 1959.
- [104] M. Sanz-Gaitero, R. Keary, C. Garcia-Doval, A. Coffey, and M. J. Van Raaij, "Crystal structure of the lytic CHAP K domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K Crystal structure of the lytic CHAP K," *Virol. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, 2014.
- [105] S. O. Flaherty, A. Coffey, W. Meaney, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross, "The Recombinant Phage Lysin LysK Has a Broad Spectrum of Lytic Activity against Clinically Relevant *Staphylococci*, Including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Bacteriol.*, vol. 187, no. 20, pp. 7161–7164, 2005, doi: 10.1128/JB.187.20.7161.
- [106] L. Rodríguez-rubio, D. Gutiérrez, B. Martínez, A. Rodríguez, and P. García, "Lytic Activity of LysH5 Endolysin Secreted by *Lactococcus lactis* Using the

- Secretion Signal Sequence of Bacteriocin Lcn972,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, no. 9, pp. 3469–3472, 2012, doi: 10.1128/AEM.00018-12.
- [107] J. Son, S. Lee, and S. Y. Jun, “Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae Staphylococcus aureus bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 5, pp. 1439–1449, 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2386-9.
- [108] H. Y. Tham, A. A. Song, K. Yusoff, and G. H. Tan, “Effect of different cloning strategies in pET-28a on solubility and functionality of a staphylococcal phage endolysin,” *Biotechniques*, vol. 69, no. 3, pp. 161–170, 2020.
- [109] N. P. Antonova *et al.*, “Modulation of Endolysin LysECD7 Bactericidal Activity by Different Peptide Tag Fusion,” *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, p. 440, 2020.
- [110] S. Y. Jun *et al.*, “Pharmacokinetics and Tolerance of the Phage Endolysin-Based Candidate Drug SAL200 after a Single Intravenous Administration among Healthy,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, no. 6, pp. e02629-16., 2017.
- [111] K. J. Wang, J. J. Cai, L. Cai, H. D. Qu, M. Yang, and M. Zhang, “Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide,” *Peptides*, vol. 30, no. 4, pp. 638–646, 2009, doi: 10.1016/j.peptides.2008.12.014.
- [112] D. M. Francis and R. Page, “Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*,” *Curr. Protoc. protein Sci.*, vol. 61, no. 1, pp. 1–29, 2010, doi: 10.1002/0471140864.ps0524s61.
- [113] A. B. Al-hawash, X. Zhang, and F. Ma, “Gene Reports Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems,” *Gene Reports*, vol. 9, no. 8, pp. 46–53, 2017, doi: 10.1016/j.genrep.2017.08.006.
- [114] H. Gerstmans, B. Criel, and Y. Briers, “Synthetic biology of modular endolysins,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 3, pp. 624–640, 2018, doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.12.009.
- [115] C. São-José, “Engineering of Phage-Derived Lytic Enzymes : Improving Their Potential as Antimicrobials,” *Antibiotics*, vol. 7, no. 2, p. 29, 2018, doi: 10.3390/antibiotics7020029.
- [116] L. Rodríguez-rubio *et al.*, “‘Artilycation’ of endolysin λ Sa2lys strongly improves its enzymatic and antibacterial activity against streptococci,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 6, no. 7, pp. 1–11, 2016, doi: 10.1038/srep35382.
- [117] M. Kong and S. Ryu, “Bacteriophage PBC1 and Its Endolysin as an Antimicrobial Agent against *Bacillus cereus*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, no. 7, pp. 2274–2283, 2015, doi: 10.1128/AEM.03485-14.
- [118] B. A. Fong, W. Wu, and D. W. Wood, “The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 5, pp. 272–279, 2010, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.02.003.

- [119] C. L. Young, Z. T. Britton, and A. S. Robinson, "Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications," *Biotechnol. journal*, vol. 7, no. 5, pp. 620–634, 2012, doi: 10.1002/biot.201100155.
- [120] Y. Shi *et al.*, "Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding," *Protein Sci.*, vol. 21, no. 8, pp. 1197-1209., 2012, doi: 10.1002/pro.2107.
- [121] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, and C. M. Deber, "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 6, pp. 1760–1765, 2009.
- [122] D. J. Armstrong and A. Roman, "The Anomalous Electrophoretic Behavior of the Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein Is Due to the High Content of Acidic Amino Acid Residues," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 192, no. 3. pp. 1380–1387, 1993, doi: 10.1006/bbrc.1993.1569.
- [123] Y. Guan, Q. Zhu, D. Huang, S. Zhao, L. J. Lo, and J. Peng, "An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–11, 2015, doi: 10.1038/srep13370.
- [124] H. H. Kashani, H. Fahimi, Y. D. Goli, and R. Moniri, "A Novel Chimeric Endolysin with Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*," *Front. Cell. Infect. Microbiol. 7290.*, vol. 7, no. 6, pp. 1–12, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00290.
- [125] P. Shrestha, T. M. Holland, and B. C. Bundy, "Streamlined extract preparation for *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing," *Biotechniques*, vol. 53, no. 3, pp. 163–174, 2012, doi: 10.2144/0000113924.
- [126] R. S. Singh, "A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 51, no. 11, pp. 997–1003, 2013.
- [127] M. Horgan *et al.*, "Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 3, pp. 872–874, 2009, doi: 10.1128/AEM.01831-08.
- [128] S. C. Becker, S. Dong, J. R. Baker, J. Foster-Frey, D. G. Pritchard, and D. M. Donovan, "LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 294, no. 1, pp. 52–60, 2009, doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01541.x.
- [129] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, J. Poisson, and Y. Zhang, "The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction," *Nat. Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 7–8, 2014, doi: 10.1038/nmeth.3213.
- [130] J. Gu *et al.*, "Structural and Biochemical Characterization Reveals LysGH15 as

an Unprecedented ‘EF-Hand-Like’ Calcium-Binding Phage Lysin,” *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 5, pp. 1–14, 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004109.

- [131] E. F. Pettersen *et al.*, “UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612, 2004, doi: 10.1002/jcc.20084.