



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA ENDOLISINA CON ACTIVIDAD LÍTICA
CONTRA *Staphylococcus aureus* PARA SU USO COMO AGENTE
ANTIMICROBIANO”**

**TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**EN LA OPCIÓN DE:
MICROBIOLOGÍA CELULAR Y GENÉTICA MOLECULAR**

**QUE PRESENTA:
Q.F.B. ADRIANA CAROLINA GIL CORREA**

**ASESOR:
Dr. JUAN JOSÉ VALDEZ ALARCÓN**

**CO-ASESOR:
Dr. VÍCTOR MANUEL BAIZABAL AGUIRRE**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO; SEPTIEMBRE 2020



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Biotecnología de las Enfermedades Infecciosas del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. Juan José Valdez Alarcón.

En la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la coordinación de la investigación científica de la UMSNH, beca de CONACYT (CONACYT no. 704114) y de PLTLab S.A.P.I. de C.V.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cumplir con esta meta.

A mi familia por todo su apoyo incondicional en todo momento.

A mis compañeros y profesores del CMEB, que hacían las jornadas de trabajo más amenas.

A los miembros del comité sinodal por todos sus consejos, por cada una de sus aportaciones que sin duda, enriquecieron en gran medida el trabajo realizado, por siempre motivarme a trabajar más y por todo el apoyo.

Y a todas y cada una de las personas que siempre estuvieron ahí en los buenos y no tan buenos momentos, soportando mi humor, ya fuera bueno o malo. Esas personas que iniciaron, permanecieron y aún siguen conmigo, siendo ese soporte de donde sostenerse en momentos de debilidad, y que muchas veces sin darse cuenta, fueron mi motor para seguir.

AGRADECIMIENTO ACADÉMICO

A mi asesor Dr. Juan José Valdez Alarcón, a mi co-asesor Dr. Víctor Manuel Baizabal Aguirre. A los miembros del comité sinodal: Dr. Javier Oviedo Boyso, Dr. Víctor Meza Carmen y Dr. Luis Y. Kameyama Kawabe por todos sus consejos, por cada una de sus aportaciones que sin duda, enriquecieron en gran medida el trabajo realizado, por siempre motivarme a trabajar más y por todo el apoyo.

Al Dr. Cesar Hugo Hernández Rodríguez del Instituto Politécnico Nacional por la amable donación de su colección de cepas ácido lácticas

A los Doctores Gerardo Argüello Astorga y Ángel Gabriel Alpuche Solís del Instituto Potosino de Investigación científica y Tecnológica A.C. (IPICYT) por toda su ayuda y por todo su apoyo durante mi estancia en el Instituto.

A todos ustedes GRACIAS!!!

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis a mis padres, porque gracias a ellos, he llegado a donde estoy, y todo lo que soy, es gracias a ellos. ¡Este logro es también de ustedes!

Índice

LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS	9
ABREVIATURAS	12
RESUMEN	13
SUMMARY	14
I. INTRODUCCIÓN	15
II. MARCO TEORICO.....	16
1. <i>Staphylococcus aureus</i>: características generales	16
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> como agente patógeno	16
1.2. Organización genómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.3. Pared celular de <i>Staphylococcus aureus</i>	19
1.4. Patogenia de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.5. Toxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.6. <i>Staphylococcus aureus</i> y su resistencia a antibióticos	23
2. Bacteriófagos	26
2.1. Historia de los bacteriófagos	26
2.2. Características de los bacteriófagos	27
2.3. Uso de bacteriófagos para el control <i>S. aureus</i>	28
2.4. Resistencia a bacteriófagos	29
2.4.1.- Prevención de la adsorción del fago	30
2.4.2. Prevención de la entrada de ADN en el fago	30
2.4.3. Corte de los ácidos nucleicos de los fagos.....	31
2.4.3.1. Sistemas de Restricción-Modificación(R-M).....	31
2.4.3.2.-Sistema CRISPR-Cas	32
2.4.4.- Sistemas de infección abortiva.....	33

3. Endolisinas	33
3.1. Estructura de las endolisinas.....	34
3.2. Mecanismo de acción de las endolisinas	35
3.3. Aplicación de las endolisinas	37
3.3.1. Uso médico.....	37
3.3.2. Alimentos	39
3.3.3. Uso veterinario	40
3.3.4. Agricultura	40
3.4. Ventajas de las endolisinas sobre los antibióticos.....	40
3.5. Sinergismo	41
3.6. Anticuerpos anti endolisinas.....	42
3.7. Resistencia a endolisinas	43
4. Endolisina LysK	44
5. Bacterias ácido lácticas	46
6. Bacterias ácido lácticas como vectores de expresión	47
7. Clonación en vectores inducibles	48
8. <i>Escherichia coli</i> como vector de expresión	49
III. JUSTIFICACIÓN	52
IV. HIPÓTESIS	52
V. OBJETIVOS	52
VI. METODOLOGÍA	53
6.1. Secuenciación extremo 3´ del gen de la endolisina	53
6.2. Búsqueda bibliográfica para el diseño del vector de expresión	53
6.3. Transformación en <i>E. coli</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
6.3.1. Obtención de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	53
6.3.2. Electroporación de <i>E. coli</i>	54
6.3.3. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	54
6.3.4. Verificación del plásmido por digestión con enzimas de restricción	55

6.3.5. Preparación de células electrocompetentes de <i>L. acidophilus</i>	55
6.3.6. Transformación en <i>L. acidophilus</i>	56
6.3.7. Extracción de ADN plasmídico de <i>L. acidophilus</i>	56
6.3.8. Identificación del fragmento PS-HT por PCR.....	57
6.4. Diseño del plásmido pFN-LysK.....	58
6.4.1. Amplificación del fragmento LysKPvKp.....	58
6.4.2. Limpieza del fragmento PvuI-LysK-KpnI para digestión enzimática	58
6.4.3. Digestión enzimática de PvuI-LysK-KpnI y pFN18A HaloTag® T7 Flexi®	59
6.4.4. Clonación de KpnI-LysK-PvuI en pFN18A HaloTag® T7 Flexi®.....	60
6.5. Electroporación pFN-LysK <i>E. coli</i>	60
6.5.1. Selección de transformantes.....	61
6.6. Identificación de la proteína mediante ensayo tipo Western blot	61
6.7. Purificación de la endolisina.....	62
6.7.1. Obtención del extracto proteico	62
6.7.2. Purificación de la endolisina: HaloTag® Protein Purification System... ..	63
6.8. Verificación de actividad lítica	63
6.9. Actividad enzimática de la endolisina.....	64
6.9.1. Curva estándar de glicina	64
6.9.2. Extracción de pared celular de <i>S. aureus</i>	64
6.9.3. Digestión de la pared celular.....	65
6.9.4. Actividad enzimática de la endolisina.....	65
VII. RESULTADOS	65
7.1. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen de la endolisina ..	65
7.2. Búsqueda bibliográfica para el diseño del vector de expresión.....	67
7.3. Verificación de Plásmido pCipSpHLysKNae	69
7.4. Transformación en <i>E. coli</i>.....	70
7.5. Transformación en bacterias ácido lácticas (BAL)	73

7.6. Expresión de LysK en <i>E. coli</i>	81
7.6.1. Construcción del plásmido Pfn-LysK.....	82
7.6.2. Electroporación en cepas de <i>E. coli</i>	84
7.6.3. Detección de la proteína LysK	87
7.6.4. Purificación de LysK.....	91
7.7. Extracción de la pared celular de <i>S. aureus</i>	94
7.8. Curva estándar de glicina	94
7.9. Medición de actividad catalítica: Método de Sanger	95
VIII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	96
IX. CONCLUSIONES	102
X.-REFERENCIAS	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tabla comparativa Fagos vs Endolisinas.

Tabla 2. Principales proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas por *E. coli*.

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados.

Tabla 4. Propiedades de restricción de las enzimas.

Tabla 5. Comparación entre los plásmidos considerados para la expresión de la endolisina.

Tabla 6. Elementos del vector de expresión.

Tabla 7. Elementos del cassette de expresión inducible con NaCl.

Tabla 8. Condiciones utilizadas en diferentes eventos de electroporación. Electroporador: Ecoli Pulser (BioRad) / ECM™ 830 (BTX).

Tabla 9. Condiciones utilizadas en diferentes eventos de electroporación.

Tabla 10. Concentraciones conocidas de Glicina y su D.O. a 420 nm tratadas con DNFB.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Estructura de la pared celular de *Staphylococcus aureus*.
- Fig. 2.** Línea del tiempo de la historia del uso de los fagos como agentes terapéuticos
- Fig. 3.** Estructura de peptidoglicano de bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y sitios de corte de endolisinas.
- Fig. 4.** Estructura de la endolisina LysK.
- Fig. 5.** Análisis de secuencias de endolisinas (Extremo N-terminal).
- Fig. 6.** Plásmido pCipSpHLysKNae.
- Fig. 7.** Cassette de expresión inducible con NaCl 0.3M y elementos que lo conforman.
- Fig. 8.** Secuencia de algunos elementos del plásmido pCipSpHLysKNae.
- Fig. 9.** Electroforesis en gel de agarosa.
- Fig. 10.** Verificación de Plásmido pCipSpHLysKNae.
- Fig. 11.** Colonias obtenidas en agar Lb Amp 50 ug/ml, tras electroporar.
- Fig. 12.** Electroforesis en gel de agarosa.
- Fig. 13.** a) Plásmido pCipSpHLysKNae y sitios de corte *Sma*I. b) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCipSpHLLysKNae.
- Fig. 14.** a) Esquema del fragmento PS-HT. b) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la amplificación del fragmento PS-HT
- Fig. 15.** a) Crecimiento bacteriano de BAL en agar MRS/Ery 5 μ después de electroporar. b) Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico. C) Electroforesis en gel de agarosa.
- Fig. 16.** Crecimiento de *L. acidophilus* en agar MRS/Eritromicina 5 μ g/ml tras electroporar con plásmido.
- Fig. 17.** Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN plasmídico.

Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la digestión con enzimas de restricción (SmaI).

Fig. 19. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la amplificación del fragmento PS-HT por PCR.

Fig. 20. Esquema del fragmento correspondiente al gen de resistencia a eritromicina.

Fig. 21. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR.

Fig. 22. Mapa de restricción del plásmido pFN18A HaloTag® T7 Flexi®.

Fig. 23. Esquema del fragmento LysKPvKp y oligonucleótidos diseñados para su amplificación.

Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del gen de endolisina LysK del plásmido pCipSpHLysKNae, con sitios de restricción PvuI-KpnI (Fragmento LysKPvKp).

Fig. 25. Electroforesis en gel de agarosa de limpieza de productos de PCR de la amplificación del fragmento LysKPvKp.

Fig. 26. Electroforesis en gel de agarosa de limpieza de productos de PCR de la amplificación del fragmento LysKPvKp.

Fig. 27. Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos extraídos de las posibles transformantes.

Fig. 28. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la amplificación del gen LysK de las probables clonas.

Fig. 29. Sitios de restricción PvuI y KpnI en plásmido pFN-LysK.

Fig. 30. Electroforesis en gel de agarosa de digestión con las enzimas de restricción PvuI y KpnI.

Fig. 31. Electroforesis en gel de agarosa de digestión con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI*.

Fig. 32. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie.

Fig. 33. Western Blot de cepas de *E.coli* lisadas con ebullición.

Fig. 34. Western Blot de cepas de *E.coli* con crecimiento a una D.O. 0.5 a 28 °C.

Fig. 35. Western Blot de cepas de *E.coli* con crecimiento a una D.O. 0.5 a 28 °C.

Fig. 36. Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos proteicos (crudos y purificados) extraídos de diferentes cepas.

Fig. 37. Western Blot de extractos proteicos (crudos y purificados) extraídos de diferentes cepas.

Fig. 38. a) Pared celular *S. aureus* MRI b) Tinción Gram pared celular *S. aureus*.

Fig. 39. Muestras de diferentes concentraciones de Glicina tratadas con DNFB.

Fig. 40. Comparacion entre la estructura de las paredes celulares de *S. aureus* y BAL (*L. lactis*).

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albumina de suero de bovino
CaCl ₂	Cloruro de Calcio
D.O.	Densidad óptica
g	Gramos
HCl	Ácido Clorhídrico
l	Litros
LB	Medio Luria Bertani
M	Concentración molar
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
MRS	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
NaCl	Cloruro de Sodio
Nm	Nanómetros
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador a base de 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v
TE	Solución amortiguadora a base de Tris-HCl y EDTA
TTBS	Tween 20 al 0.1% en TBS
UV	Luz ultravioleta
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración Micromolar
°C	Grados centígrados
%	Porcentaje

RESUMEN

En los últimos años se ha presentado un incremento alarmante en la resistencia a antimicrobianos por parte de bacterias patógenas. Tal es el caso de *Staphylococcus aureus*, la cual es conocida por poseer una serie de mecanismos que le confieren resistencia a los antibióticos, y por ser el agente causal de múltiples infecciones, no solo en humanos, si no también en animales. En este trabajo se propone la expresión heteróloga de LysK una endolisina de bacteriofago para el tratamiento y control de infecciones causadas por *S. aureus*. Las ventajas que tienen las endolisinas sobre el uso de otros agentes antimicrobianos es que hasta la fecha no se ha reportado resistencia por parte de las bacterias, y es posible diseñarlas genéticamente y ampliar el rango de hospedero. Como modelo de expresión se proponen *Escherichia coli*, debido al amplio conocimiento que se tiene sobre este microorganismo como herramienta para la expresión de genes. También se utilizaron bacterias ácido lácticas, debido a que estas son inocuas para el ser humano, con lo que se elimina el riesgo potencial que representa el uso de otras bacterias como vectores de expresión. Se diseñó y evaluó un vector de expresión para bacterias ácido lácticas. La endolisina LysK se expresó y purificó de *E. coli* en un vector de expresión comercial.

PALABRAS CLAVE

Bacteriófagos, vectores de expresión, bacterias ácido lácticas, *E. coli*, resistencia antimicrobiana.

SUMMARY

In recent years, there have been an startling increase in antimicrobial resistance in pathogenic bacteria. That is the case for *Staphylococcus aureus*, which is known to present several mechanisms to resist antibiotics, and for being the causal agent of multiple infections both in humans and other animals. In this work we proposed the heterologous expresión of LysK, and endolysin from bacteriophage for the treatment and control of infections caused by *S. aureus*. Advantages over endolysins over other antimicrobial agents are that there are no reports of resistance in bacteria and that they may be the subject of genetic engineering to widen host range. *Escherichia coli* was proposed as a model for the expression of LysK, due to the great amount of knowledge of this microorganism as a tool for gene expression. Lactic acid bacteria were also used due to its inocuity for human been, thus eliminating the potential risk of other bacteria as expression vectors. An expression vector was designed for lactic ácid bacteria. LysK endolysin was expressed and purified in *E. coli* using a commercial expression vector.

KEYWORDS

Bacteriophages, expression vectors, lactic acid bacteria, *E. coli*, antimicrobial resistance.

I. INTRODUCCIÓN

En 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la necesidad de coordinar acciones contra la resistencia a los antimicrobianos en humanos, la agricultura, los animales y el medio ambiente. En 2017 la OMS publicó su primera lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, en donde encontramos a *Staphylococcus aureus*, debido a la creciente resistencia a compuestos antimicrobianos que exhibe dicho patógeno.

Existe una necesidad urgente de desarrollar alternativas a los antibióticos convencionales para su uso, tanto en humanos, como en animales productores de alimentos. Una alternativa viable es el uso de bacteriófagos y sus endolisinas. Desde el descubrimiento de los bacteriófagos, se supo de su potencial para combatir agentes patógenos y fueron utilizados como antimicrobianos para el tratamiento de infecciones; sin embargo, con el desarrollo y comercialización de antibióticos, el uso de los bacteriófagos como agentes terapéuticos se hizo a un lado (Parracho *et al.*, 2012). Actualmente, el incremento en la resistencia a antibióticos en bacterias patógenas ha justificado la reconsideración del uso de bacteriófagos y sus endolisinas como agentes antibacterianos (O'Flaherty *et al.*, 2009).

Las endolisinas son enzimas hidrolíticas codificadas por fagos con doble cadena de ADN, y son las responsables de romper la pared de peptidoglicano de la bacteria (Hermoso *et al.*, 2007). Cuando la endolisina es agregada de manera exógena a la bacteria Gram-positiva, ésta es capaz de acceder e hidrolizar el peptidoglicano para finalmente lisar a la bacteria (Witzerath *et al.*, 2009). Recientemente las endolisinas han recibido especial atención como alternativa antibacterial ante el surgimiento de bacterias multirresistentes, en particular por su potencial para combatir patógenos resistentes a antibióticos como es el caso de *S. aureus* (Loeffler *et al.*, 2011).

Algunas endolisinas estafilocócicas presentan una estructura modular de tres dominios: dos dominios catalíticos CHAP (Aminohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína e histidina) y Ami2 (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa) con actividad de endopeptidasa y amidasa respectivamente, y un dominio de reconocimiento de la pared celular bacteriana SH3b, tal es el caso de LysK, endolisina sintetizada por el bacteriófago K, que presenta actividad lítica contra *S. aureus* (Haddad *et al.* 2018)

El uso de ingeniería genética para clonar y secretar proteínas bajo el control de vectores inducibles es una herramienta útil que permite la expresión de endolisinas para su aplicación como agentes antimicrobianos, si a esto se suma el uso de bacterias probióticas como fábricas celulares para la producción de estas

endolisinas, le da un valor agregado como alternativa biotecnológica (Gaeng *et al.*, 2000).

II. MARCO TEORICO

1. *Staphylococcus aureus*: características generales

En 1880, Alexander Ogston demostró que cocos agrupados en forma de racimo eran la causa de abscesos piógenos en humanos. En 1882, Ogston llamó a estos cocos "*Staphylococcus*", derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokkus* (frutilla) (Duglas *et al.*, 2000)

S. aureus es una bacteria inmóvil, Gram-positiva, esférica con un tamaño aproximado de 1 μ de diámetro, no esporulada, fermenta el manitol, catalasa positiva, oxidasa negativa, es tolerante a NaCl, crece en un rango amplio de temperatura que va desde 6.5°C a 50°C. Es una bacteria anaerobia facultativa, en medio agar sangre las colonias causan β -hemólisis, no son exigentes desde el punto de vista nutricional, por lo que son capaces de crecer en medios simples (Liu *et al.*, 2005).

S. aureus es una bacteria conocida por colonizar a los humanos de manera asintomática, teniendo preferencia por el área nasofaríngea, la piel, el tracto gastrointestinal y el perineo (van Belkum 2016). Aproximadamente del 20 al 30% de la población se reporta como portadores permanentes de *S. aureus* en fosas nasales y el 60% son portadores intermitentes (Kluytmans *et al.*, 1997). Es la especie más virulenta y mejor conocida de su género y la que se asocia con mayor frecuencia a enfermedades en el humano (Murray *et al.*, 2009).

1.1 *Staphylococcus aureus* como agente patógeno

S. aureus es un patógeno con distribución geográfica amplia, es un agente infeccioso de humanos y animales, incluyendo mamíferos, aves y reptiles (Lowy, *et al.*, 1998).

S. aureus se caracteriza por su capacidad para producir enzimas y toxinas que favorecen la invasión celular, la degradación de células del sistema inmune, la alteración de tejidos y la multiplicación de la bacteria, además intervienen en la aparición de síntomas en los diferentes cuadros clínicos. Entre los determinantes de virulencia se encuentran componentes de la pared celular, enzimas y diferentes toxinas. Con todos estos factores de virulencia *S. aureus* es capaz de producir lesiones superficiales de tejido cutáneo y subcutáneo, además de producir un amplio espectro de cuadros infecciosos y toxigénicos que van desde infecciones

leves de la piel y tejidos blandos hasta infecciones más graves, que incluyen bacteriemia, sepsis y osteomielitis.

Causa infecciones tanto adquiridas en el hospital (AH), que son aquellas infecciones cuyo origen está relacionado con intervenciones quirúrgicas u hospitalización prolongada, y adquiridas en la comunidad (AC), que son infecciones adquiridas fuera del hospital y que pueden ir desde intoxicaciones alimentarias hasta infecciones de piel o tejidos blandos (Lowy 1998).

El mayor riesgo de infección lo presentan personas con enfermedades crónicas, inmunodeprimidas, o que presentan heridas traumáticas que favorecen la penetración del microorganismo hasta otros tejidos pudiendo derivar en patologías más severas. Además *S. aureus* se relaciona con intoxicaciones alimentarias debido a la producción de enterotoxinas durante el crecimiento bacteriano en el alimento (Gordon, *et al.*, 2008). Además *S. aureus* es el más común entre los patógenos nosocomiales, y está asociado con morbilidad y mortalidad altas (Francis, *et al.*, 2005).

Las infecciones crónicas se asocian con la formación de biopelículas formadas a base de polisacáridos y proteínas, la cual permite a *S. aureus* adherirse y persistir en los tejidos del huésped, así como en dispositivos médicos como válvulas óseas y cardíacas, catéteres, articulaciones protésicas y marcapasos. Estos materiales implantados se cubren con proteínas del huésped después de la inserción, y las proteínas de unión a matriz en la superficie de *S. aureus* facilitan la unión a estas proteínas y el desarrollo de la biopelícula. La formación de biopelículas disminuye la susceptibilidad a antimicrobianos y defensas inmunes, lo que hace que estas infecciones sean difíciles de erradicar, además esta biopelícula facilita la propagación de la bacteria a sitios secundarios (Parsek, *et al.*, 2003).

S. aureus es reconocido además, por poseer genes que confieren resistencia a una gran variedad de antibióticos, como es el caso de la penicilina, que después de su descubrimiento por Alexander Fleming en 1928, en 1945 se informó de las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a dicho antibiotico. Posteriormente, en 1959, la meticilina aparece como una alternativa para el tratamiento de *S. aureus* resistente a penicilina, pero en 1961, se reportan las primeras cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (MRSA). Una historia similar ocurrió con la resistencia a la vancomicina (VRSA) y la vancomicina intermedia (VISA) *S. aureus* (Hiramatsu *et al.*, 2014).

1.2. Organización genómica de *Staphylococcus aureus*

Los genes de *S. aureus* se agrupan en tres grupos principales según la variabilidad genética (Baizabal *et al.*, 2009): 1) Genes del genoma basal (core genes), los cuales son altamente conservados; 2) Genes del genoma basal-variable (core-variable genes) que se encuentran ampliamente distribuidos entre los diferentes aislamientos pero presentan variabilidad genética, y es en este grupo en donde encontramos a la mayoría de genes de virulencia; 3) Genes asociados con elementos genéticos móviles, es el grupo de genes con mayor variabilidad, y dentro de este encontramos algunos genes de virulencia. Entre los elementos genéticos móviles más importantes encontramos plásmidos crípticos, casetes de resistencia a antibióticos, profagos, transposones, islas genómicas y las islas de patogenicidad.

En el caso de los plásmidos de *S. aureus*, estos se clasifican en tres clases. Los de Clase I, que son plásmidos con un tamaño menor a 5 kb, codifican uno a dos genes de resistencia a antibióticos y generalmente son transmitidos al ser empacados en bacteriófagos (transducción generalizada). Los de Clase II poseen tamaños de hasta 40 kb, codifican uno a varios genes de resistencia, y también se transmiten por transducción generalizada. Y los de Clase III que son plásmidos similares a los de Clase II, pero presentan los genes *tra*, lo que les permite transmitirse por conjugación (Baizabal *et al.*, 2009).

Dentro de los casetes cromosómicos que confieren resistencia a antibióticos y que es importante en las cepas de *S. aureus* de origen clínico, se encuentra el casete cromosómico de resistencia a meticilina (SCC-*mec*) que contiene al gen que confiere resistencia a meticilina (*mecA*) formando parte de un regulón conocido como complejo *mec*, constituido por los genes *mecA* o *mecC* (*mecALGA251*) que confieren resistencia en humanos y animales, para los cuales se han descrito al menos 11 variantes (Baizabal *et al.*, 2009).

Los profagos son bacteriófagos integrados en el genoma, en el caso de *S. aureus*, se han descrito al menos cuatro profagos (ϕ Sa1-4) de los cuales los ϕ Sa1-3 codifican toxinas que son importantes en la patogenicidad (Baizabal *et al.*, 2009).

Algunos genes de resistencia a antibióticos en *S. aureus* están codificados por transposones, de los cuales Tn554, Tn552, Tn5801 y Tn916-like son los más comúnmente encontrados en aislamientos clínicos. Ejemplo de esto es la resistencia a la vancomicina, la cual está mediada por un complejo de cuatro genes (*vanA*, *vanH*, *vanX*, *vanY*) transportados en un transposón, estos modifican un residuo de D-alanil a D-lactato, lo que hace que la estructura del peptidoglicano sea resistente a la unión de vancomicina. También se han reportado plásmidos *vanA*, uno de los cuales es transmisible de manera eficiente. Los estafilococos también presentan genes de resistencia a múltiples fármacos, como *erm* (que confieren resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B - MLSB-) y *vga* (que

confieren resistencia a lincosamidas, pleuromutilinas y estreptogramina A (Becker *et al.*, 2014).

Las islas genómicas y las islas de patogenicidad son regiones del genoma que fueron adquiridas por transferencia horizontal desde otras cepas de *S. aureus* u otras especies del género *Staphylococcus*. En el caso de islas genómicas, se han descrito al menos dos: *vSa α* y *vSa β* . *vSa α* codifica genes de exotoxinas y lipoproteínas, mientras que *vSa β* codifica genes de exotoxinas y genes homólogos a proteasas de serina. Por otra parte, han sido descritas cuatro islas de patogenicidad en *S. aureus* (SaPI1-4), estas codifican genes de virulencia, superantígenos, la toxina de choque tóxico y las enterotoxinas B y C. Las islas de patogenicidad son transferidas entre diferentes cepas de *S. aureus* mediante transducción, utilizando bacteriófagos, una vez integrados en el genoma, las cepas que adquirieron las SaPIs no suelen ser infectadas por otros bacteriófagos, perpetuándose así la presencia de genes de virulencia en el genoma receptor (Baizabal *et al.*, 2009).

1.3. Pared celular de *Staphylococcus aureus*

La pared celular de *S. aureus* está compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, un polímero compuesto por cadenas de polisacárido con uniones de tipo β (1-4) no ramificadas, que contienen subunidades alternantes de ácido N-acetil murámico y N-acetil glucosamina. Las cadenas laterales de pentapéptidos se hallan conectadas al residuo de ácido murámico y tienen unión cruzada por un puente de cinco glicinas consecutivas, el llamado puente de pentaglicina, fijado a la L-lisina de una cadena y la D-alanina de la otra cadena. El polímero básico se halla en muchos otros microorganismos, mientras la cadena de unión cruzada de pentaglicina parece ser específica de *S. aureus*. Otro rasgo característico del peptidoglicano de *S. aureus* es la O-acetilación en la posición C₆-OH del ácido murámico, lo que hace que la bacteria sea resistente a la lisozima (Bera *et al.*, 2005). El otro componente de la pared es el ácido teicoico, que constituyen alrededor del 40% del peso de la pared. Estos ácidos son polímeros de glicerol o ribitol fosfato, azúcares y algunas veces, D-alanina, unidos en forma covalente al peptidoglicano (Fig.1). Los ácidos teicoicos unidos covalentemente al peptidoglicano funcionan como reguladores del crecimiento celular, como receptores de fagos, epítomos, para atraer cationes y como herramientas para que los patógenos se comuniquen con el medio ambiente (Szweda *et al.*, 2012)

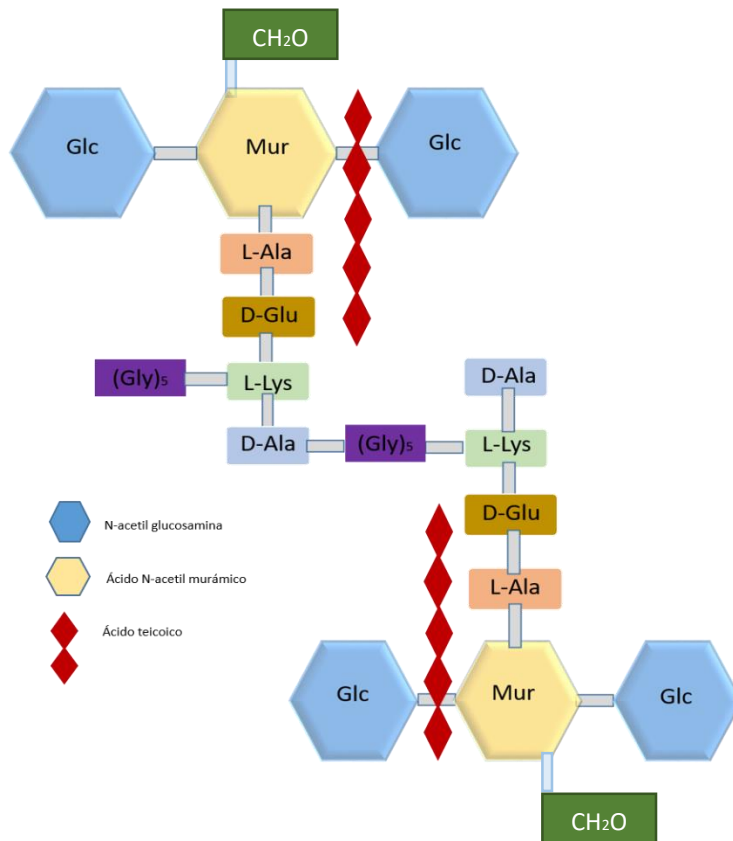


Fig. 1. Estructura de la pared celular de *Staphylococcus aureus*

Se sabe que la respuesta inmune innata tiene la capacidad de reconocer estructuras conservadas que están localizadas en la pared celular de las bacterias invasoras, para lograr este reconocimiento, el sistema de inmunidad innata cuenta con proteínas que actúan como receptores. La detección de tales estructuras químicas, le permite iniciar una serie de procesos celulares que conducen a la eliminación del patógeno. La activación del sistema innato está en íntima relación con la activación de la respuesta inmune adaptativa, y sin la inmunidad innata no habría una defensa adaptativa eficiente (Baizabal *et al.*, 2009). Los fragmentos de pared celular Gram-positivos, así como el peptidoglicano purificado inducen la liberación de las citosinas TNF- α , IL-1 β , e IL-6 de macrófagos / monocitos cultivados (Bhakdi, *et al.*, 1991). El peptidoglicano de bacterias gram-positivas también se une a CD14, lo que sugiere que este receptor está involucrado en la inducción de citocinas en la infección por Gram positivos (Dziarski, *et al.*, 1998).

La presencia de cápsula es variable pero es importante a nivel patogénico, ya que tiene propiedades antifagocíticas, las cepas de *S. aureus* que poseen cápsula son más virulentas. Algunas cepas de *S. aureus* pueden presentar receptores para la fibronectina, las cepas que muestran grandes cantidades de estos receptores parecen ser más invasivas y más hábiles para adherirse. La pared celular de *S.*

aureus posee una proteína característica llamada proteína A. Esta tiene la habilidad de unirse a la porción Fc de las moléculas de inmunoglobulina G (IgG), y por tanto funciona como factor de virulencia, ya que interfiere con la opsonización y la ingestión de los microorganismos por los PMN, activando el complemento y dando lugar a reacciones de hipersensibilidad (Duglas *et al.*, 2000).

1.4. Patogenia de *Staphylococcus aureus*

La versatilidad de *S. aureus* como patógeno es gracias al repertorio variable de factores de virulencia que posee, muchos de los cuales están codificados en elementos genéticos móviles (EGM), como plásmidos o profagos, y pueden transferirse entre cepas mediante la transferencia horizontal de genes (THG). THG en *S. aureus* puede ocurrir a través de la transducción de fagos, conjugación, o por la absorción directa de ADN "desnudo" por competencia genética (Morikawa, *et al.*, 2012).

Se considera que la adherencia de *S. aureus* a la superficie celular es el primer paso en el proceso de colonización e infección de la célula hospedera, esta adherencia se logra gracias a que *S. aureus* expresa un conjunto de adhesinas, denominadas componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas adhesivas de la matriz (MSCRAMMs). Entre estas adhesinas se encuentran la proteína de unión a fibronectina (FnBP), la proteína de unión a fibrinógeno, la adhesina de unión a elastina y la adhesina de unión a colágeno (Baizabal *et al.*, 2009).

Además *S. aureus* puede activar la respuesta inflamatoria iniciada por macrófagos al ser reconocido por receptores intracelulares como las proteínas Nod. Estas proteínas pueden reconocer motivos estructurales del PGN de *S. aureus*, aunque algunos componentes de superficie de *S. aureus* son pro-inflamatorios, es decir, activan la expresión de quimiocinas y evocan la afluencia de leucocitos y células fagocíticas, esta bacteria también tiene mecanismos para evadir la fagocitosis (Baizabal *et al.*, 2009).

Baizabal *et al.* (2009), hacen una clasificación de los factores de virulencia, asociándolos en 4 grupos: 1) exoenzimas (proteasas de serina, estafilocinasa, fosfodiesterasa, estafilocagulasa, hialuronidasa, proteasa de zinc e hidrolasas) las cuales intervienen en la invasión de tejidos y la evasión de la respuesta inmune del hospedador; 2) toxinas (exotoxinas, leucotoxinas D y E, leucocidinas F y M, leucocidina Panton-Valentine, toxina de síndrome de choque tóxico, enterotoxinas y hemolisinas α , β y δ) involucradas en su mayoría en la evasión de defensa celular y la invasión tisular; 3) adhesinas (como las proteínas de unión a fibrinógeno y fibronectina) características de unión a matriz extracelular y formación de

biopelículas; 4) otros, como el transportador ABC de ferricromo y el sistema de incorporación de hierro.

1.5. Toxinas de *Staphylococcus aureus*

Entre los factores de virulencia de *S. aureus* encontramos las toxinas, las cuales pueden ser agrupadas en 3 categorías:

- 1) Toxinas que dañan la membrana: Estas toxinas causan la formación de poros en la membrana, lo que conduce al flujo de moléculas y metabolitos vitales, y por lo tanto son citolíticas. Se pueden distinguir dos subgrupos:
 - a) Mediadas por receptor: *S. aureus* produce una variedad de toxinas citolíticas. Algunas capaces de lisar glóbulos rojos (hemolisinas) y / o blancos (leucotoxinas). La toxina más conocida dentro de este grupo es la α -toxina, la cual lisa glóbulos rojos y una serie de leucocitos, pero no neutrófilos, se ha observado que esta toxina presenta actividad dermonecrótica y neurotóxica, siendo letal para una gran variedad de animales. *S. aureus* también produce una serie de toxinas de dos componentes que son estructuralmente similares a la toxina alfa, una de ellas la leucocidina Pantón-Valentine (PVL), consiste en las proteínas LukS y LukF, una de las toxinas más virulentas y mejor conocidas, solo entre el 2 y 3% de las cepas de *S. aureus* producen esta leucotoxina que provoca destrucción leucocitaria y necrosis tisular, su presencia se asocia con infecciones de piel, partes bandas y neumonías necrotizantes, con una mortalidad muy elevada (Lina *et al.*, 1999). Otras toxinas que se encuentran dentro de este grupo, son las leucocidinas LukDE y LukAB (LukGH) y la toxina gamma (gamma-hemolisina, HlgA, HlgB, HlgC) (Löffler *et al.*, 2012).
 - b) No mediadas por receptores: Dentro de este grupo encontramos a la toxina delta, un miembro de una familia de péptidos secretados llamados modulinas solubles en fenol (MSP), que tienen múltiples funciones en la patogénesis estafilocócica. *S. aureus* produce altas cantidades de MSP altamente citolíticos, los cuales desencadenan respuestas inflamatorias por interacción con el receptor FPR2, pero su actividad citolítica es independiente de FPR2 (Kretschmer *et al.*, 2010). Recientemente, los péptidos PSM α de *S. aureus* se identificaron como las toxinas que contribuyen a la lisis de neutrófilos después de la fagocitosis, un mecanismo de patogénesis de inmensa importancia para la alta toxicidad encontrada en cepas de *S. aureus* (Chatterjee *et al.*, 2013).
- 2) Toxinas que interfieren con la función del receptor, pero no son dañinos para la membrana: En esta categoría encontramos a las enterotoxinas, toxinas

secretadas que interfieren con la función intestinal y suelen causar emesis y diarrea, encontrando una amplia variedad de estas en *S. aureus*, se han descrito un total de 18 enterotoxinas y algunas de ellas presentan variantes. Las enterotoxinas estafilocócicas son termostables y resistentes a las enzimas digestivas, los mecanismos por los que funcionan no son bien conocidos, pero pueden incluir la activación de la liberación de citocinas, que causa la muerte celular por apoptosis (Lin *et al.*, 2010). La toxina del síndrome de choque tóxico (TSST) de *S. aureus*, es el superantígeno (proteínas exocelulares capaces de estimular de manera no específica un número muy alto de linfocitos-T colaboradores o CD4+ en el hospedador, provocando la producción de citocinas) más famoso, es el causante del síndrome de shock tóxico (TSS) al estimular la liberación de IL-1, IL-2, TNF- α y otras citocinas, provocando un cuadro clínico en donde se presenta fiebre elevada, dolor de cabeza, desorientación, vómito, diarrea y erupciones. TSS es una enfermedad grave y potencialmente mortal conocida sobre todo por el brote asociado con el uso de tampones en la década de 1980, en estos casos, se observó que las pacientes presentaban una colonización intravaginal de cepas de *S. aureus* productoras de TSST (Wilson, *et al.*, 2011).

- 3) Enzimas secretadas: Muchas enzimas secretadas de *S. aureus* degradan las moléculas del huésped o interfieren con las cascadas de señalización. La mayoría de estas enzimas son proteasas relativamente no específicas que degradan las proteínas del huésped de una manera amplia. *S. aureus* produce dos coagulasas, estafilo-coagulasa y factor de von Willebrand (vWF), que contribuyen a la formación de coágulos de fibrina por la conversión de fibrinógeno. Estos coágulos en la superficie de las células de *S. aureus*, ayudan a inhibir la fagocitosis, causando la formación de abscesos y la adhesión de *S. aureus* a superficies por la formación de biopelícula (Vanassche, *et al.*, 2013).

1.6. *Staphylococcus aureus* y su resistencia a antibióticos

La resistencia a los medicamentos en *S. aureus* se puede adquirir mediante diferentes mecanismos, incluida la transferencia horizontal de genes a través de elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, así como mutaciones y selección espontáneas (Haddad *et al.*, 2018).

Esto condujo a la aparición de cepas que muestran resistencia a uno o a múltiples antibióticos, como es el caso de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) y *S. aureus* resistente a múltiples medicamentos. (MDRSA) (Lowy, 1998). En el caso de la prevalencia de MRSA, ha habido fluctuaciones en los últimos 20 años, y a pesar de que esta ha disminuido

ligeramente en algunos países occidentales, a escala mundial, los números siguen siendo alarmantemente altos (Haddad *et al.*, 2018).

La rápida evolución de las bacterias resistentes a los antibióticos se hizo evidente cuando las cepas resistentes de *S. aureus* surgieron solo 2 años después del descubrimiento de la penicilina en 1940 (Skinner *et al.*, 1941). Una penicilinasas codificada por un plásmido (beta-lactamasa) fue responsable de este fenotipo resistente (Lowy, 2003). Para combatir esta resistencia, en 1961 se desarrolló la meticilina resistente a la penicilinasas, sin embargo poco después, ciertas cepas mostraron resistencia a este nuevo antibiótico, lo que condujo a la identificación del gen de resistencia a la meticilina *mecA* (Chambers *et al.*, 2009). Después de la meticilina, surgió la vancomicina, como nuevo antibiótico de último recurso para tratar las infecciones por *S. aureus*. Sin embargo, la prescripción excesiva de vancomicina condujo a la resistencia total o parcial de las cepas de *S. aureus* a la vancomicina (Ruef, 2004). *S. aureus* vancomicina intermedia (VISA), fue identificado por primera vez a partir de una muestra clínica en Japón en 1997 (Levy *et al.*, 2004), mientras que la primera cepa de *S. aureus* resistente a vancomicina (VRSA) se identificó 5 años después en los Estados Unidos. Algunos aislamientos de VRSA son también resistentes a los antibióticos beta-lactámicos, lo que los hace resistentes a múltiples fármacos (Weigel *et al.*, 2003).

En las cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a vancomicina (VISA) se observan mutaciones en los genes *walRK*, *clpP*, *graRS* y *vraSR* (Shoji *et al.*, 2011). Los genes *graRS* y *vraSR* codifican proteínas reguladoras de la síntesis de la pared celular que confieren resistencia intermedia a la vancomicina. Las mutaciones de los genes *clpP*, *walRK*, *vraSR* y *graRS* provocan la síntesis de una pared celular anormalmente gruesa, lo que dificulta la penetración efectiva de vancomicina en la célula (Hiramatsu *et al.*, 2001). La presencia del gen *vanA* también ha sido revelada por estudios genéticos de VRSA, la presencia de este gen da como resultado una alteración en el peptidoglicano, en donde el D-alanil-D-alanina terminal es reemplazado con D-alanil-D-lactato, con esto se impide la unión de la vancomicina (Weigel *et al.*, 2003).

Inicialmente, el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* fue la penicilina; sin embargo, como ya se mencionó, la resistencia a la penicilina es extremadamente común en la mayoría de los países, por lo que antibióticos resistentes a la penicilinasas como la flucloxacilina u oxacilina son utilizados comúnmente para la terapia de primera línea (Levy *et al.*, 2004). En el caso de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina, estas también son resistentes a otros antibióticos betalactámicos, incluidas las penicilinas (penicilina V, penicilina G, ampicilina, oxacilina, carbenicilina y amoxicilina), carbapenems (imipenem-cilastatina), cefalosporina (cefalosporina) y monobactámicos (Rayner *et al.*, 2005).

Para el tratamiento de infecciones graves se puede utilizar terapia combinada con varios antibióticos; sin embargo, esta estrategia conlleva un alto riesgo de daño a los riñones (Cosgrove *et al.*, 2009). Por lo tanto, con el objetivo de combatir el MRSA, se usa comúnmente la vancomicina, sin embargo, ya se han informado de fracasos del tratamiento con vancomicina, incluso en pacientes infectados con cepas MRSA susceptible a vancomicinas (Haddad *et al.*, 2018). El linezolid, que pertenece a la clase de antibióticos oxazolidinona, está aprobado para tratar infecciones complicadas de tejidos blandos, piel y neumonía causadas por *S. aureus*; sin embargo, también se ha informado de cepas de *S. aureus* que son resistentes a este antibiótico (Gu *et al.*, 2012).

El antibiótico daptomicina, perteneciente a la nueva clase de lipopéptidos cíclicos, muestra actividad contra MRSA, este antibiótico es un poderoso agente bactericida contra *S. aureus*, y está aprobado para el tratamiento de adultos con infecciones complicadas de tejidos blandos y piel, y a pesar de que se ha informado resistencia a la daptomicina, el uso de altas concentraciones de antibiótico sigue siendo efectivo contra *S. aureus* (Bayer *et al.*, 2013). Una clase prometedora de antibióticos de amplio espectro son las quinolonas, que representan un papel crítico en el tratamiento de infecciones adquiridas en el hospital causadas por cepas resistentes a una amplia variedad de antibióticos. Las fluoroquinolonas, pueden ser eficaces contra el MRSA, sin embargo, también se ha observado resistencia a estas en *S. aureus* (Redgrave *et al.*, 2014), además, a esta clase de antibióticos se asocia con un mayor riesgo de colonización de MRSA, por lo que su uso no es tan recomendable (Tacconelli *et al.*, 2007).

Otro aspecto que debe ser considerado, es el costo de los tratamientos, en donde, según la susceptibilidad a los antibióticos de la cepa de *S. aureus* causante de la infección, el costo del tratamiento puede variar considerablemente. Tanto el aumento en los costos del tratamiento y la resistencia a los antimicrobianos, ha llevado a estadías prolongadas en el hospital y aumentos en las tasas de morbilidad y mortalidad (Laxminarayan *et al.*, 2013).

Como podemos observar, actualmente quedan pocas opciones para el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *S. aureus* resistentes a múltiples medicamentos, y esas opciones disponibles tienden a ser costosas, tóxicas para el paciente y poco efectivas en el tratamiento. Por este motivo se buscan nuevas alternativas para el tratamiento y control de infecciones causadas por *S. aureus*.

2. Bacteriófagos

2.1. Historia de los bacteriofagos

Los bacteriófagos (fagos) son virus que infectan células bacterianas, son ubicuos, son parásitos obligados, altamente específicos para su hospedero. Los bacteriófagos han sido propuestos como agentes antimicrobianos naturales para combatir infecciones tanto en humanos como en la agricultura, industria alimenticia y en hospitales.

La historia de la terapia con bacteriófagos (fagoterapia), comienza junto con el descubrimiento de los bacteriófagos, el cual ha sido objeto de controversia acerca de quien los descubrió oficialmente. Si bien Ernest Hanking fue el primero que reportó que existía actividad antimicrobiana contra *Vibrio cholerae* en las aguas de los ríos Ganges y Jumma en la India y dos años más tarde en 1896 Gamaleya observo el mismo fenómeno con *Bacillus subtilis*, ninguno de los dos investigadores dieron seguimiento a dichos estudios y fue hasta que Frederick Twort en 1915, informa de un fenómeno similar al de Gamaleya y hace avanzar la hipótesis de que este pudo haberse debido, entre otras posibilidades, a un virus. Por su parte Felix d'Herelle acuña el término bacteriófago (“que comen bacterias”) a partir del fenómeno observado con un brote de disentería hemorrágica grave entre las tropas francesas. d'Herelle propone que el fenómeno se debe a un virus capaz de parasitar bacterias y no a procesos enzimáticos como lo propuesto por investigadores años atrás. d' Herelle continua con la fagoterapia en humanos, en 1919 administra una preparación del fago a un niño de 12 años con disentería grave, con la cual, se recuperó en pocos días (Hermoso *et al.*, 2007). d'Herelle utilizó diversas preparaciones de fagos para tratar a miles de personas que padecían cólera y/o la peste bubónica o muerte negra (causada por *Yersinia pestis*). Otros investigadores animados por los resultados de d'Herelle continuaron con estudios sobre el uso terapéutico de los fagos. Además, varias empresas empezaron la producción activa comercial de fagos en contra de diversos patógenos bacterianos. Sin embargo, y a pesar del éxito de la fagoterapia, la comercialización de antibióticos en los años 40's llevo a un descenso en el uso de los fagos como agentes terapéuticos (Fig.2). (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

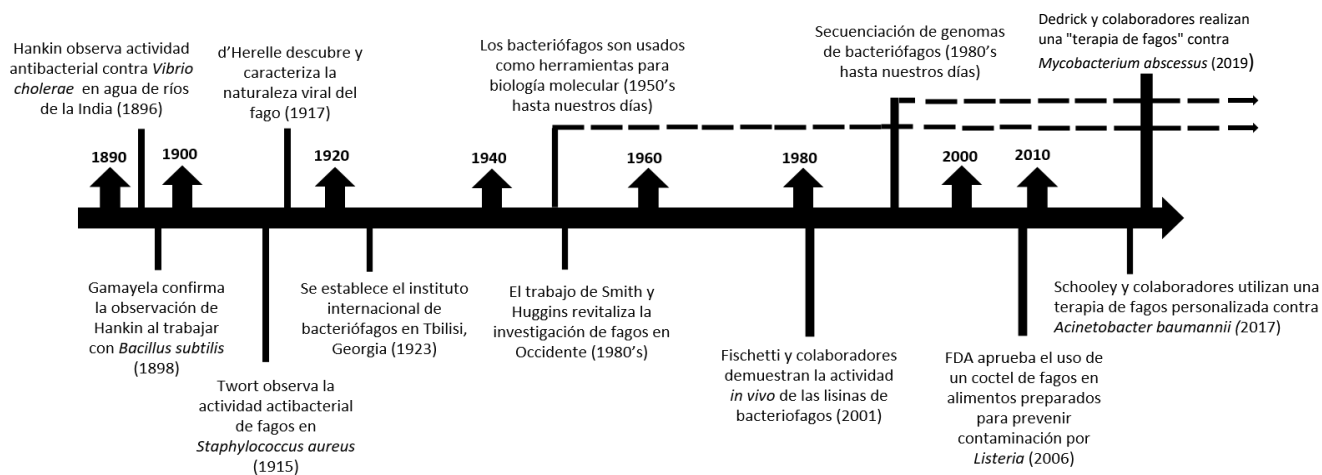


Fig. 2. Línea del tiempo de la historia del uso de los fagos como agentes terapéuticos

2.2. Características de los bacteriófagos

Los bacteriófagos son considerados como la entidad biológica más abundante de la naturaleza. Se encuentran en todos los ambientes, pero es en los sistemas acuáticos donde se encuentran en mayor proporción (Bergh, 1989).

Los bacteriófagos constan de una cabeza y una cauda o cola. La cabeza contiene ácido nucleico en forma de ADN o ARN, rodeado por una cubierta protéica denominada cápside. Ésta se encuentra formada por subunidades idénticas, agrupadas para formar una estructura geométrica, generalmente hexagonal. La cauda varía en cuanto a complejidad de un tipo a otro, las caudas más complejas constan por lo menos de tres partes: un tallo central hueco, una vaina contráctil y una placa basal terminal de forma hexagonal (Wong, 1994).

Los bacteriófagos se pueden clasificar según su ciclo de replicación en dos grandes grupos: líticos y lisogénicos.

El ciclo lítico lo llevan a cabo los fagos virulentos, en donde se da un reconocimiento de los receptores de la bacteria por el fago, una adsorción del fago a la célula huésped, seguido de la penetración del ácido nucleico fágico a la bacteria, el desarrollo intracelular de los componentes fágicos y la liberación de progenie viral con la lisis de la célula bacteriana (Segundo *et al.*, 2010).

El ciclo lisogénico, desarrollado por los fagos llamados temperados comprende prácticamente los mismos pasos que el lítico, pero después de la penetración, el ácido nucleico del fago se integra por eventos de recombinación genética en el cromosoma bacteriano y se replica como si fuera un gen más de la bacteria por una

o varias generaciones sin mayores consecuencias metabólicas para las bacterias, no obstante en éste ciclo, el fago tras un proceso de daño grave al material genético de la bacteria, puede salir del cromosoma bacteriano y llevar a cabo un ciclo lítico (Segundo *et al.*, 2010).

2.3. Uso de bacteriófagos para el control *S. aureus*

El uso de bacteriófagos representa una alternativa potencial para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*, a continuación se citan algunos ejemplos de aplicaciones que han sido descritas por diferentes autores.

En 2006 se utilizó el bacteriófago K para el tratamiento de 24 vacas Holstein lactantes con mastitis subclínica causada por *S. aureus*. Antes de la aplicación del bacteriófago en las vacas, las preparaciones de fagos fueron probadas en ratones con el objetivo de determinar los efectos tóxicos agudos. El tratamiento consistió en 10 ml de infusiones intramamarias de 1.25×10^{11} UFP de fago K e infusiones con solución salina como control, las cuales fueron administradas una vez al día durante 5 días. La tasa de curación se estableció mediante la evaluación de cuatro muestras en serie recolectadas después del tratamiento, la cual fue 3 de 18 cuartos (16.7%) en el grupo tratado con fagos, mientras que en los tratados con solución salina se tuvo una tasa de curación del 0%, ninguno de los 20 cuartos tratados con solución salina se curaron. Además observaron que los cuartos saludables infundidos con fagos continuaron arrojando bacteriófagos viables en la leche hasta 36 h después de la aplicación de la infusión (Gill *et al.*, 2006).

Otro ejemplo de la aplicación de bacteriófagos, es el estudio con el bacteriófago (M^{Sa}), para lo cual se administró una dosis letal de *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes a metilicina a 170 ratones; el fago M^{Sa} rescató el 97% de los ratones y erradicó completamente las bacterias *in vivo* dentro de los 4 días posteriores al tratamiento con fagos; cuando se aplicó a una infección no letal (5×10^6 UFC / ratón) durante 10 días, el fago también eliminó completamente las bacterias. El fago M^{Sa} fue bien tolerado por los animales, redujo drásticamente la inflamación y no estimuló la producción de anticuerpos neutralizantes (Capparelli *et al.*, 2007).

Otro grupo de trabajo aisló el bacteriófago ϕ MR11, el cual fue probado en ratones con bacteriemia causada por cepas de *S. aureus*, encontrando que la administración intraperitoneal del fago ϕ MR11 purificado protegía a los ratones con bacteriemia sin causar efectos adversos (Matsuzaki *et al.*, 2003).

2.4. Resistencia a bacteriófagos

Una de las principales preguntas sobre la terapia de fagos es la posible aparición de bacterias resistentes a los fagos. Como hospederos de virus predadores, las bacterias han desarrollado numerosos mecanismos de resistencia para asegurar su supervivencia (Petty *et al.*, 2007). El desarrollo de bacterias resistentes a fagos ya fue descrito hace casi un siglo por Luria *et al.*, (1943) quienes observaron que la lisis inicial inducida por fagos de una población bacteriana fue seguida de un nuevo crecimiento bacteriano, debido a la selección de subpoblaciones resistentes a los fagos.

Un estudio sobre la terapia de fagos y la aparición de resistencia fue el de Smith *et al.*; (1983), en donde utilizaron la terapia oral de fagos para prevenir diarrea inducida por cepas de *E. coli* en terneros. En un primer ensayo, en el que el bacteriófago era administrado 8 horas después de la inoculación con la bacteria, no se aislaron variantes de cepas resistentes a los fagos en los terneros. En otro ensayo, los fagos fueron administrados al inicio de los síntomas de diarrea, pero únicamente presentaron mejoría la mitad de los animales (14 de los 21 terneros murieron). Se recuperaron cepas resistentes a los fagos del intestino delgado de todos los terneros que no presentaron mejoría con la terapia de fagos. En forma paralela, se examinó por 14 días el contenido bacteriano de las heces de 11 terneros que respondieron a la terapia con fagos, observando que los títulos de *E. coli* disminuyeron progresivamente y el número de fagos aumento durante las primeras 48 horas. Las bacterias resistentes a los fagos aparecieron después de las 19 horas, alcanzaron un máximo a los 2 días y disminuyeron a niveles indetectables después de 10 días. Sin embargo observaron que estas mutantes resistentes no proliferaron en el intestino delgado y no causaron diarrea cuando se reinocularon a los terneros. Esta virulencia reducida se asoció con la pérdida del antígeno K, que se sabe que es un factor de virulencia para las cepas enteropatógenas.

El estudio más reciente es el de Schooley *et al.*; (2017), quienes informaron sobre un tratamiento terapéutico personalizado con bacteriófagos para un paciente diabético de 68 años de edad con pancreatitis necrotizante complicada por una infección por *A. baumannii*. Se identificaron nueve bacteriófagos diferentes con actividad lítica para un aislado de *A. baumannii* del paciente, con la aplicación de estos bacteriófagos, el paciente mostro gran mejoría. Sin embargo, durante el curso del tratamiento, los bacteriófagos utilizados en este estudio se examinaron para determinar la actividad *in vitro* frente a sucesivos aislamientos del paciente a medida que esos aislamientos estaban disponibles. En consecuencia, se descubrió que un aislado de *A. baumannii* (TP3), que se aisló 8 días después del inicio de la terapia con bacteriófagos, era resistente a los cócteles de bacteriófagos utilizados inicialmente. Por lo tanto, se usó TP3 para seleccionar bacteriófagos adicionales con actividad lítica contra este aislado. La administración de estos bacteriófagos por

vía intravenosa y percutánea en las cavidades del absceso se asoció con la mejoría del paciente y la eliminación de la infección por *A. baumannii*.

Estos estudios sugieren que las mutaciones bacterianas que confieren resistencia a los fagos pueden resultar en costos de acondicionamiento en la bacteria, lo que, a su vez, podría beneficiar al hospedero. Sin embargo, la fagoresistencia no debe subestimarse.

A continuación se describen los mecanismos desarrollados por las bacterias para la resistencia a los fagos.

2.4.1. Prevención de la adsorción del fago

La adsorción de los fagos a los receptores del huésped es el primer paso para que ocurra la infección, sin embargo, las bacterias han desarrollado una gama de barreras para evitar esta adsorción. Estos mecanismos de bloqueo de la adsorción se pueden dividir en al menos tres categorías (Labrie *et al.*, 2010):

- 1) Bloqueo de receptores de fagos: Las bacterias limitan la propagación del fago por la adaptación de la estructura de sus receptores de superficie celular o su conformación tridimensional, mediante la selección natural de mutaciones al azar en dichos receptores.
- 2) Producción de matriz extracelular: La producción de estructuras de polímeros extracelulares puede promover la supervivencia bacteriana en diversos nichos ecológicos protegiendo a las bacterias frente a condiciones ambientales adversas y, en algunos casos, proporcionando una barrera física entre los fagos y sus receptores. Algunos fagos también han evolucionado para reconocer específicamente estos polímeros extracelulares e incluso para degradarlos mediante la producción de enzimas como hidrolasas y liasas.
- 3) Producción de inhibidores competitivos: En este mecanismo de resistencia, las moléculas que están presentes de forma natural en el entorno bacteriano pueden unirse específicamente a los receptores a los que se une el fago, haciendo que estos receptores no estén disponibles para los fagos.

2.4.2. Prevención de la entrada de ADN en el fago

Los sistemas de exclusión por superinfección (Sie) son proteínas que bloquean la entrada del ADN del fago en las células hospedadoras, lo que confiere inmunidad contra fagos específicos. Estas proteínas están ancladas a la membrana o asociadas con componentes de la membrana. Los genes que codifican estas proteínas a menudo se encuentran en profagos (genomas de bacteriófago

integrados en el cromosoma bacteriano), lo que sugiere que en muchos casos los sistemas Sie son importantes para las interacciones entre fago-fago más que en interacciones fago-huésped. Se han identificado muchos sistemas Sie diferentes, aunque solo se han caracterizado algunos (Labrie *et al.*, 2010).

2.4.3. Corte de los ácidos nucleicos de los fagos

2.4.3.1. Sistemas de Restricción-Modificación(R-M)

La mayoría de los géneros bacterianos poseen sistemas R-M, su actividad se debe a varias proteínas heterogéneas que se han clasificado en al menos cuatro grupos (tipo I-tipo IV). Se cree que la función principal del sistema R-M es proteger a la célula contra la invasión de ADN, incluidos los virus, se considera el sistema inmune bacteriano innato contra el ADN extraño. Los sistemas R-M muestran dos actividades contrastantes: (a) una metiltransferasa (MTasa) que modifica las bases de ADN de una secuencia específica mediante la transferencia de un grupo metilo a ambas cadenas y (b) una endonucleasa de restricción (REasa) que reconoce y corta la misma secuencia de ADN si no está metilada . Las secuencias metiladas se reconocen como propias y están protegidas, mientras que las secuencias extrañas no metiladas se consideran no propias y se degradan (Tock *et al.*, 2005).

Cuando el ADN no metilado de un fago entra en una célula que alberga un sistema R-M, será reconocido por enzimas de restricción y lo degradarán rápidamente o, en menor medida, será metilado por una metilasa bacteriana para evitar la restricción, lo que conduce al inicio del ciclo lítico del fago. El destino del ADN del fago está determinado principalmente por las velocidades de procesamiento de estas dos enzimas. Como la enzima de restricción a menudo es más activa que la metilasa, el ADN entrante generalmente se escinde. Cuando el ADN del fago está metilado, los nuevos viriones se vuelven resistentes a la enzima de restricción e infectan fácilmente las células vecinas que contienen el mismo sistema R-M. El fago permanecerá resistente hasta que infecte a una bacteria que no codifica el mismo gen de metilasa, en cuyo caso los nuevos viriones volverán a ser no metilados de nuevo y, por lo tanto, serán susceptibles una vez más al sistema R-M de la bacteria original. Para hacer frente a estos sistemas R-M, los fagos han desarrollado varias estrategias antirrestricción. Una de estas estrategias es la ausencia de sitios de reconocimiento de endonucleasas en sus genomas a través de la acumulación de mutaciones puntuales (Labrie *et al.*, 2010).

2.4.3.2.-Sistema CRISPR-Cas

Recientemente se describieron los efectos de las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas con intervalos regulares (CRISPRs) y los genes asociados con CRISPR (cas) en la multiplicación de fagos (Barrangou *et al.*, 2007). El análisis comparativo ha revelado que los sitios CRISPR-cas están presentes en un número creciente de genomas completos de bacterias y arqueas (Godde *et al.*, 2006). Estos sitios CRISPR-cas generalmente están compuestos por repeticiones directas de 21-48 pb intercaladas por espaciadores no repetitivos (26-72 pb) de longitud similar y, generalmente, flanqueados por un número variable de genes cas (que varían entre 4 y 20 en número, si están presentes). En un principio, se propusieron muchas hipótesis para explicar el papel biológico de los sitios CRISPR-cas, pero en 2006 se descubrió que son un sistema de inmunidad que ataca a los ácidos nucleicos extraños, incluidos los genomas de bacteriófagos y plásmidos (Makarova *et al.*, 2006).

Los arreglos CRISPR forman la memoria genética de infecciones pasadas incorporando secuencias cortas derivadas de los genomas invasores. La resistencia es conferida cuando pequeños ARN CRISPR (ARNcr), se unen a secuencias complementarias (protoespaciadores) en el genoma invasor, lo que da como resultado su posterior degradación. Tres pasos conducen a la resistencia del fago, y las proteínas Cas son importantes para todas las etapas:

- 1) Adaptación: durante la cual los nuevos espaciadores son incorporados dentro de los arreglos CRISPR.
- 2) Biogénesis del ARNcr: mediante el cual los transcritos CRISPR son procesados dentro de pequeños fragmentos de ARNcr de interferencia.
- 3) Interferencia: durante la cual los crARN ayudan al reconocimiento y la degradación del objetivo.

Actualmente, los sistemas CRISPR-Cas se clasifican en tres tipos (Tipos I, II y III). Las proteínas Cas1 y Cas2 están presentes en todos los sistemas y son necesarias para la adquisición de la inmunidad. Cada tipo de CRISPR Cas se divide en subtipos (Mas de 11) que poseen combinaciones únicas de proteínas (Makarova *et al.*, 2011). A pesar de la diversidad de los sistemas, los mecanismos generales son similares y la mayoría de los sistemas se dirigen al ADN, aunque el sistema Tipo III-B se dirige al ARN (Hale *et al.*, 2009).

Sin embargo, el sistema CRISPR-Cas no es infalible, los fagos específicos de *S. thermophilus* pueden eludir la resistencia proporcionada por los espaciadores recién adquiridos mediante una mutación puntual simple (delección) en el objetivo del protoespaciador (Andersson *et al.*, 2008).

2.4.4.- Sistemas de infección abortiva

Las bacterias poseen una amplia gama de proteínas heterólogas que proporcionan resistencia a través del aborto de la infección por fagos. Estos sistemas de infección abortiva (Abi) también conducen a la muerte de la célula infectada. Ejemplos de estos sistemas Abi en *E. coli* son Lit y el anticodón nucleasa PrrC, que abortan la infección del fago al inhibir la maquinaria de la traducción. A pesar de que los estudios sobre los sistemas Abi comenzaron hace más de 50 años, sus modos de acción todavía no se comprenden completamente, en parte porque son complejos y en parte por las lagunas de conocimiento en la biología del fago (Labrie *et al.*, 2010).

Es esencial ir más allá del descubrimiento inicial de un sistema de resistencia de fagos para intentar comprender los mecanismos moleculares detrás de estas actividades antivirales. En ese sentido, el progreso en la biología del fago será necesario para comprender completamente estos sistemas biológicos. Sin embargo, como los fagos y las bacterias tienen una larga historia coevolutiva, se puede esperar que los fagos puedan elevar eficazmente una contraresistencia, por diversos medios para hacer frente a tales fuerzas selectivas.

3. Endolisinas

El término de endolisina fue acuñado en 1958 para designar una sustancia sintetizada en las bacterias durante la multiplicación de los fagos y que actúa en la pared celular dentro de las células. Las endolisinas son enzimas codificadas por fagos de ADN de doble cadena, las cuales se producen durante la fase tardía del ciclo de replicación lítico para degradar la pared celular bacteriana, facilitando así la liberación de nuevos viriones.

La mayoría de las endolisinas son sintetizadas como un solo péptido, pero dentro de su estructura están formadas por dos o más dominios funcionales. Generalmente las endolisinas presentan solo un tipo de actividad catalítica que es, en su mayoría de tipo hidrolítica; también han sido reportadas endolisinas con dos tipos de actividad catalítica independientes (Hermoso *et al.*, 2007).

Las endolisinas carecen de un péptido señal que las trasloque al espacio periplásmico para acceder al peptidoglicano, por lo que los bacteriófagos sintetizan pequeñas proteínas hidrofóbicas llamadas holinas que constituyen canales que exportan a la endolisina a través de la membrana bacteriana para que llegue a su objetivo. Se pueden encontrar fagos que no sintetizan holinas, en los que las endolisinas se secretan por otros mecanismos. Se sabe que cuando se agregan lisinas purificadas a cepas bacterianas Gram-positivas de manera exógena, las endolisinas serán capaces de lisar a la bacteria en cuestión de segundos, por lo que

estas enzimas son reconocidas como agentes antimicrobianos potenciales, también llamados enzibióticos (Hermoso *et al.*, 2007).

3.1. Estructura de las endolisinas

La estructura de las endolisinas generalmente difiere entre las que actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram-negativas, lo que refleja las diferencias en la arquitectura de la pared celular entre estos grupos bacterianos. Las endolisinas dirigidas a bacterias Gram-positivas poseen dos tipos distintos de dominios funcionales: dominios de unión a la pared celular (CBD) y dominios enzimáticamente activos (EADs) (Loessner *et al.*, 2005)

Mientras que EAD confiere el mecanismo catalítico de la enzima, escindiendo enlaces específicos dentro del peptidoglicano, el CBD, para algunas lisinas, dirige la proteína a su sustrato y la mantiene unida a los restos de la pared celular. (Loessner *et al.*, 2002)

Sin embargo, las estructuras de las endolisinas no están necesariamente limitadas a solo dos módulos, y la variación en la arquitectura y organización de los dominios que se encuentran en las bases de datos públicas es amplia (Schmelcher *et al.*, 2012). Ejemplos destacados incluyen la combinación de dos EADs N-terminal y un CBD C-terminal, como se encuentran frecuentemente en las lisinas estafilocócicas (Becker *et al.*, 2009), CBDs centralmente separados por dos EAD terminales (Pritchard *et al.*, 2007), y CBDs consistentes de hasta 18 repeticiones en tándem de un motivo de aproximadamente 20 aminoácidos (Hermoso *et al.*, 2007).

Aproximadamente el 75% de las endolisinas de fagos que actúan en contra de estafilococos, reportadas en la literatura, tienen una estructura modular que consiste en un dominio aminohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína e histidina, en el extremo N-terminal, (CHAP), un dominio amidasa central y un dominio de unión a la pared celular C-terminal (CBD) (Son *et al.*, 2018).

Varios estudios en donde se truncan endolisinas de *S. aureus* han reportado que los dominios CHAP confieren la mayor parte de la actividad lítica de la endolisina al escindir los múltiples enlaces peptídicos del peptidoglicano. Por otro lado, los dominios de amidasa central de endolisinas mostraron poca o ninguna actividad lítica por sí mismos. Aunque es común que un dominio catalítico de endolisinas tenga actividad dominante y el dominio silencioso pueda actuar de forma cooperativa para escindir múltiples enlaces peptidoglicanos, el papel exacto de los dominios de amidasa en las endolisinas con actividad lítica contra *S. aureus* sigue siendo poco claro (Becker *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Son *et al.*; (2018) en donde analizaron cada dominio de dos endolisinas de fagos de *S. aureus* (LysSA12 y LysSA97) se sugiere que el dominio CHAP confiere la actividad catalítica principal, mientras que el dominio amidasa juega papel auxiliar en la unión, aumentando la afinidad de unión de CBD, mejorando la actividad lítica global de la endolisina. En sus experimentos observaron que el dominio CHAP confería la actividad, mientras que el dominio amidasa por sí solo no mostraba actividad enzimática en la degradación de la pared celular. Sin embargo, las endolisinas con el dominio amidasa truncado tenían una actividad hidrolítica reducida en comparación con las endolisinas completas. Realizaron además la comparación de las afinidades de unión, para lo cual utilizaron dos proteínas de fusión que consistían en una proteína fluorescente (GFP) unida con CBD, y GFP unido con el dominio amidasa y CBD, revelando que la función principal del dominio amidasa era aumentar la afinidad de unión de CBD, lo que resulta en una mayor actividad lítica de endolisina. Además encontraron que la tríada catalítica Cys-His-Asn en el dominio CHAP, es conservada en LysSA12 y LysSA97, y estos residuos se conservan en otras endolisinas como LysH5, phi11 y LysK (Son *et al.*, 2018).

Casi todas las endolisinas Gram-positivas descritas hasta la fecha están codificadas por un único gen, a excepción de la endolisina PlyC del fago C1 de *Streptococcus* del grupo A es el único ejemplo de una lisina de fago multimérica compuesta por dos productos génicos diferentes, PlyCA y PlyCB. PlyC, es la endolisina con la actividad más alta informada hasta la fecha, con cantidades de nanogramos capaces de clarificar un cultivo turbio en segundos (Nelson, *et al.*, 2006).

3.2. Mecanismo de acción de las endolisinas

La degradación de peptidoglicano por la acción de una endolisina en circunstancias normales conduce a la lisis de la bacteria, muerte celular y desintegración de los principales componentes estructurales de la misma. Esto puede ser detectado a través de diversos ensayos como la disminución de la turbidez en una suspensión bacteriana medida espectrofotométricamente o, el desarrollo de una zona clara en un cultivo con bacterias en medio semisólido; o la ausencia de crecimiento bacteriano durante la noche en medio líquido (ensayo MIC) o en agar, ensayo de lisis en placa (Schmelcher *et al.*, 2012)

Las endolisinas se pueden clasificar en al menos cinco grupos diferentes dependiendo del enlace del peptidoglicano que ataquen: (A) N-acetil- β -muramidasa que cataliza la ruptura de los enlaces N-acetilmuramoyl- β -1,4-N-acetilglucosamina, (B) N-acetilglucosaminidasa cataliza la ruptura del enlace N-acetilglucosaminil- β -1,4-N-acetilmuramina, (C) Endopeptidasa que escinden dentro

de los péptidos que componen la porción principal de interconexión de las unidades de peptidoglicano, (D) N-acetilmuramoil-L- alaninaamidasas hidroliza el enlace amida que conecta la cadena del glicano con los residuos peptídicos que conforman la pared celular y (E) Transglicosilasas, que atacan los enlaces glicosídicos β -1,4 (Fig.3) (Loessner, *et al*; 2005)

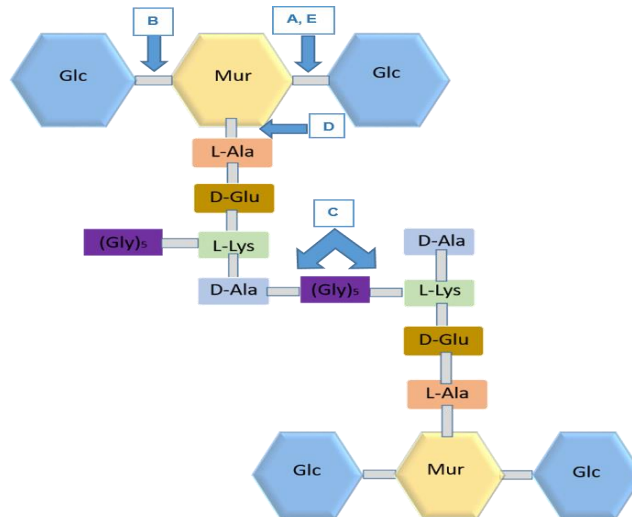


Fig. 3. Estructura de peptidoglicano de bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y sitios de corte de endolisinas. (A) N-acetil- β -muramidasa, (B) N-Acetilglucosaminidasa, (C) Endopeptidasa, (D) N-acetilmuramoil-L- alaninaamidasas y (E) Transglicosilasas.

De acuerdo a la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) la nomenclatura de las enzimas, tanto las muramidases como las glucosaminidamidas son glicosidasas, y todas las endolisinas excepto las transglicosilasas son hidrolasas. Las transglicosilasas rompen el enlace β -1,4-glicosídico por un mecanismo completamente diferente, que implica una reacción intramolecular. Las endopeptidasas se pueden dividir además en enzimas que cortan dentro del péptido principal del peptidoglicano y aquellas que atacan enlaces dentro del puente interpéptido (Thunnissen *et al.*, 1994)

Las actividades de amidasa y las muramidasa son las más comúnmente encontradas en las endolisinas, y también se encuentran entre las de mayor espectro de acción, ya que se dirigen a enlaces altamente conservados en el peptidoglicano (Loessner *et al.*, 2005).

3.3. Aplicación de las endolisinas

3.3.1. Uso médico

A pesar de que ya se tenían reportes de la actividad antimicrobiana por parte de los bacteriófagos y de sus endolisinas, con la llegada de los antibióticos en 1940, se dejó de un lado la investigación acerca de sus usos como agentes bactericidas, fue hasta épocas recientes que comenzó a observarse un incremento en la resistencia con antibióticos clásicos por parte de bacterias, que los investigadores volvieron la vista hacia las endolisinas y comenzaron a enfocarse en sus aplicaciones médicas, considerándolas como posibles alternativas al tratamiento convencional con antibióticos. Para las investigaciones de la aplicación de endolisinas se han utilizado muchos modelos animales, los cuales han sido colonizados en mucosas con patógenos humanos, para probar así, la efectividad de endolisinas como antimicrobianos.

Ejemplo de esto es el trabajo de Nelson *et al.* (2001), donde demostraron el potencial de la endolisina estreptocócica PlyC (denominada lisina C1) para prevenir y tratar la colonización de las vías respiratorias superiores en ratones por los estreptococos del grupo A. La administración de una dosis única de lisina a la cavidad oral antes de la inoculación con bacterias redujo el porcentaje de ratones colonizados de >70% en el grupo control a <30%.

Cheng *et al.* (2005), expresaron una enzima lítica para eliminar la colonización de *Streptococcus* grupo B en mucosa vaginal. La lisina recombinante (denominada PlyGBS) se expresó en *Escherichia coli*, la cual fue purificada para posteriormente ser utilizada en modelos de ratón, los cuales habían sido inoculados vía vaginal con 10^6 UFC de *Streptococcus* grupo B. Los animales tratados con una dosis única de PlyGBS mostraron una reducción significativa en la carga bacteriana entre 2 y 4 h después de su aplicación en comparación con el nivel en el grupo control. Con estos resultados, Cheng *et al.* (2005), sugirieron el uso de endolisinas como una alternativa para la profilaxis antibiótica intraparto, para reducir la colonización vaginal por *Streptococcus* grupo B en mujeres embarazadas antes del parto o para descontaminar a los recién nacidos, reduciendo así la incidencia de meningitis y sepsis neonatales asociadas a *Streptococcus* grupo B.

No solo la colonización de las membranas de las mucosas han sido tratadas con éxito con endolisinas, también las infecciones bacterianas sistémicas, tal es el caso de ratones que fueron infectados por vía intravenosa con *S. pneumoniae*, en donde una dosis de 2 mg de la endolisina Cpl-1 administrada 1 h después de la inoculación de la bacteria redujo los títulos de neumococos en la sangre de 4,7 log UFC / ml a niveles indetectables, sobreviviendo el 100% de los ratones el tratamiento, en comparación con el 20% en el control (Loeffler *et al.*, 2003).

En otro experimento, Jado *et al.* (2003), encontraron que las endolisinas de bacteriófagos protegen de bacteremia; usando ratones como modelo de infección. En estos experimentos los ratones fueron expuestos a 5×10^7 ufc de *Streptococcus pneumoniae* resistente a antibióticos, en el grupo control los ratones murieron en un periodo de 72hrs, mientras que los ratones a los cuales se les aplicó una sola inyección intraperitoneal de endolisinas purificadas (Cpl-1 o Pal) aplicada una hora después de la inoculación con la cepa, fueron protegidos eficazmente de la bacteremia. Por otro lado, en la bacteremia en ratones desprotegidos el recuento de colonias alcanzó $> 10^7$ ufc / ml, mientras que el recuento medio de colonias en animales protegidos con lisina fue $< 10^6$ ufc / ml y con el tiempo se volvió indetectable. Además observaron un efecto sinérgico *in vivo* con el uso combinado de 2.5 μ g cada una de las endolisinas, Cpl-1 y Pal.

Por su parte, Cheng *et al.* (2017), utilizaron la endolisina LysEF-P10 en modelos de ratón con bacteremia para la eliminación de cepas de *Enterococcus faecalis* multiresistentes. En el experimento, la inyección intraperitoneal (i.p.) de $\geq 2 \times 10^9$ (UFC) de *E. faecalis* E028 en ratones fue suficiente para producir una tasa de mortalidad del 100%. Se usó una carga de 4×10^9 células de *E. faecalis* E028 como dosis de prueba. Se logró una carga bacteriana de 10^6 - 10^7 UFC / ml en la sangre dentro de 1 hora después de la exposición. Cuando se administraron $\geq 5 \mu$ g de LysEF-P10, todos los ratones se recuperaron y la bacteremia se redujo en gran medida. Los ratones tratados tuvieron una disminución en la carga bacteriana en la sangre de aproximadamente 3,8 unidades logarítmicas a las 24 h después del tratamiento. Por el contrario, en el grupo control después del tratamiento con un buffer, las cargas bacterianas en sangre alcanzaron 8.3 unidades logarítmicas a las 24 h.

Otra aplicación que se le ha dado a las endolisinas dentro del campo de la medicina, es su uso para el control de la formación de biopelículas en dispositivos médicos, en donde *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* juegan un papel importante, ya que son encontradas frecuentemente como causantes de infecciones intrahospitalarias en humanos y animales, debido a su capacidad de formar biopelículas en dispositivos médicos, en donde son difíciles de tratar debido a su resistencia a los antibióticos. Sass *et al.* (2007), clonaron los genes de endolisinas de los bacteriófagos 11 y 12 de *S. aureus* NCTC8325 en *Escherichia coli* para su posterior análisis de la actividad lítica de las enzimas en paredes celulares, células completas y biopelículas. Determinaron la influencia de las endolisinas en biopelículas estafilocócicas, encontrando que la endolisina 12 no presentaba actividad hidrolítica en biopelículas, sin embargo, la endolisina 11 purificada pudo eliminar las biopelículas de *S. aureus* NCTC8325, pero no presentó efecto sobre las biopelículas de *S. epidermidis* O-47. Proponiendo el uso de la endolisina 11 como

una nueva estrategia para combatir infecciones nosocomiales que estén mediadas por la formación de biopelículas en dispositivos médicos.

3.3.2. Alimentos

Staphylococcus aureus es capaz de producir enterotoxinas responsables de intoxicaciones alimentarias, es uno de los patógenos más prevalentes causantes de gastroenteritis en todo el mundo. Además *S. aureus* es aislado comúnmente de leche cruda de ganado lechero que sufre de mastitis; su presencia en leche cruda es una gran preocupación para la seguridad y calidad de quesos producidos con métodos artesanales (Obeso *et al.*, 2008).

Numerosos estudios han demostrado el potencial de las endolisinas de bacteriófagos para el control y la detección de patógenos transmitidos por los alimentos. Nuevamente, una gran ventaja de las endolisinas sobre otros agentes antimicrobianos es su alta especificidad para el patógeno objetivo, dejando intacta la flora bacteriana natural y frecuentemente deseada del producto alimenticio (Schmelcher *et al.*, 2012).

Obeso *et al.* (2008), demostraron que la endolisina del fago para estafilococo LysH5 mata rápidamente a *S. aureus* en leche pasteurizada, reduciendo el número de bacterias por debajo del nivel de detección. Su trabajo consistió en clonar el gen de la endolisina lysH5 del genoma del bacteriófago *Staphylococcus aureus* ΦH5 en *Escherichia coli*. La endolisina purificada fue capaz de reducir rápidamente los niveles de *S. aureus* que crecía en leche pasteurizada hasta alcanzar niveles no detectables en un tiempo de 4 h de incubación a 37 °C.

Las preparaciones de endolisina purificada se analizaron a diferentes condiciones de pH y temperatura, observando que la actividad lítica óptima es a pH 7,0, 37 °C y sensible a altas temperaturas, lisando de manera eficiente en un rango de temperatura de 30 °C a 45 °C, pero disminuyó a temperaturas más bajas. Además se observó que después de un almacenamiento a -20°C sin crioprotectores, la actividad de la endolisina disminuía un 32%.

Por su parte, Schmelcher *et al.* (2012), evaluaron la actividad de λSA2-E-Lyso-SH3b y λSA2-E-LysK-SH3b, dos proteínas quiméricas, en muestras de leche. Se demostró que ambas enzimas son activas en la leche, observaron que agregando 100 µg/ml de λSA2-E-Lyso-SH3b o λSA2-E-LysK-SH3b a leche procesada se reducía la cantidad de *S. aureus* en 3 y 1 log respectivamente en 3 horas, comparado con el control.

3.3.3. Uso veterinario

Las endolisinas pueden contribuir al tratamiento de enfermedades zoonóticas, ejemplo de esto es el trabajo de Schmelcher *et al.* (2012), en donde evaluaron la actividad de λ SA2-E-Lyso-SH3b y λ SA2-E-LysK-SH3b, dos proteínas quiméricas formadas por el dominio de la endolisina de estreptococo λ SA2 fusionado con el dominio de la lisostafina para estafilococos (λ SA2-E-Lyso-SH3b) y con la endolisina LysK del fago K de estafilococos (λ SA2-E-LysK-SH3b), para el control de mastitis. Demostrando la efectividad de estas proteínas en contra de 16 aislamientos de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis, incluyendo aislamientos con resistencia a penicilina. Se utilizaron ratones como modelo de mastitis, en donde la infección de la glándula mamaria se produjo mediante la aplicación de una infusión de células de la cepa de *S. aureus* Newbould 305 proveniente de mastitis, en una solución de azul de tripano al 0,4% aplicada en el canal del pezón. Seguido de la inoculación, las glándulas infectadas fueron tratadas con 25 μ g de λ SA2-E-Lyso-SH3b o λ SA2-E-LysK-SH3b dentro de la glándula mamaria, observando que este tratamiento reduce entre 0.63 y 0.81 log la cantidad de UFC de *S. aureus*.

3.3.4. Agricultura

Las endolisinas pueden ser expresadas por plantas transgénicas para prevenir la infección por bacterias fitopatógenas. Düring *et al.* (1993), expresaron un gen quimérico para la lisozima T4 en plantas de patata con el objetivo de lograr resistencia de las patatas frente a bacterias fitopatógenas durante el cultivo y el almacenamiento, particularmente contra *Erwinia carotovora* que causa la pierna negra y la pudrición blanda. La sensibilidad de varias bacterias del suelo contra la lisozima T4 se determinó mediante un ensayo de supervivencia. Se encontró que seis cepas de *E. carotovora* (subsp. *carotovora* y *E. c.* subsp. *atroseptica*) eran similarmente sensibles como la cepa tipo empleada en un estudio de sensibilidad previo. Entre otras bacterias del suelo examinadas para la sensibilidad a la lisozima T4, la mayoría de las cepas Gram-negativas (8 de 10) y todas las cepas Gram-positivas resultaron ser sensibles.

3.4. Ventajas de las endolisinas sobre los antibióticos

El uso excesivo de antibióticos de amplio espectro ha acelerado la selección y distribución de los genes de resistencia dentro de la comunidad bacteriana mediante la aplicación de presión selectiva no solo sobre el patógeno objetivo, sino también sobre los organismos comensales (Nelson *et al.*, 2012).

A la luz de la resistencia bacteriana que emerge rápidamente a los antibióticos, se necesitan nuevos antimicrobianos que sean menos susceptibles al desarrollo de la resistencia. Las endolisinas representan una alternativa para el tratamiento y control de patógenos, presentando además ventajas sobre los antibióticos.

La coevolución de los bacteriófagos con sus huéspedes, ha llevado a las endolisinas a unirse a objetivos altamente conservados lo que hace que la resistencia a las endolisinas por parte de las bacterias sea un evento muy raro (Fischetti *et al.*, 2010).

Las endolisinas poseen alta especificidad de género y especie, por lo que las endolisinas destruyen específicamente al patógeno objetivo, sin afectar la microbiota comensal, a diferencia de los antibióticos, que eliminan un amplio espectro de bacterias, incluyendo microbiota comensal, lo que hace que el hospedero sea susceptible a infecciones secundarias. Aunado a esta susceptibilidad del hospedero a infecciones secundarias debido al abatimiento de la microbiota normal por parte de los antibióticos, nuestro equipo de trabajo, encontró que el uso de antibióticos de amplio espectro para disminuir la abundancia y la diversidad de la microbiota en ratas de laboratorio, condujo a alteraciones en la conducta, tornándola del tipo depresiva (Ruiz-González, 2018. Tesis de maestría). La eliminación específica de grupos microbianos utilizando bacteriófagos o endolisinas podría evitar este efecto en el tratamiento de las infecciones con antibióticos tradicionales.

3.5. Sinergismo

Los efectos sinérgicos entre dos agentes antimicrobianos pueden reducir significativamente las dosis requeridas para ciertas aplicaciones y aumentar la eficacia de un tratamiento, además de reducir potencialmente el riesgo de desarrollo de resistencia al atacar dos objetivos diferentes al mismo tiempo (Schmelcher *et al.*, 2012).

Un efecto sinérgico entre dos lisinas con diferentes sitios de corte en el peptidoglicano mejora su efecto, esto se debe a que la escisión del primer enlace por una enzima podría dar como resultado un mejor acceso al segundo sitio diana por parte de la otra lisina, lo que causaría una degradación más rápida del sustrato (Schmelcher *et al.*, 2012). Un ejemplo de sinergia entre lisinas incluye la combinación de la lisina del fago estafilocócico LysK y la lisostafina. LysK es la endolisina del bacteriófago K de estafilococos, mientras que lisostafina es una bacteriocina secretada por *Staphylococcus simulans* con efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus*. En dicho estudio Becker *et al.* (2009), demostraron mediante sus ensayos el sinergismo entre la lisostafina y LysK reduciendo el

desarrollo de dos cepas de *Staphylococcus aureus*: USA300 (MRSA) y *S. aureus* 305 la cual fue aislada de un caso de mastitis bovina.

También se presenta sinergismo entre endolisinas, ejemplo de esta combinación de dos endolisinas de bacteriófago es el uso de Pal y Cpl-1, dicha mezcla ha mostrado actividad sinérgica entre muchos aislamientos de *S. pneumoniae*, incluidos aislamientos que presentan resistencia a penicilina (Loeffler *et al.*, 2003).

Jado *et al.* (2003), además de demostrar que las lisinas de fagos protegen de bacteremia por *Streptococcus pneumoniae* en ratones, observaron un efecto sinérgico *in vivo* con el uso combinado de 2.5 µg de las endolisinas Cpl-1 y Pal.

Además se pueden producir efectos sinérgicos entre endolisinas de bacteriófagos y otros agentes antimicrobianos, hay varios ejemplos recientes de este tipo de efectos, incluido el causado por la endolisina estafilocócica del fago LysH5, que reduce los números de *S. aureus* en la leche de vaca en sinergia con la bacteriocina nisina (García *et al.*, 2010). La endolisina del fago Cpl-1 también mostró sinergia en combinación con los antibióticos penicilina y gentamicina (Djurkovic *et al.*, 2005).

3.6. Anticuerpos anti endolisinas

Cuando se considera la aplicación de endolisinas de manera sistémica o en mucosas en humanos o animales, la cuestión de la respuesta inmune tiene que ser considerada. Dado que las endolisinas son de naturaleza proteica, no es de sorprender que se produzcan anticuerpos contra estas enzimas y los títulos de anticuerpo se eleven ante una segunda administración.

Muchos estudios usando diferentes endolisinas y diferentes patógenos han reportado que anticuerpos contra las endolisinas pueden elevarse, pero no se observaron efectos adversos o anafilaxis después de la administración de endolisinas en los animales utilizados como modelos de infección, además de que estos anticuerpos no fueron capaces de inactivar a la endolisina (Jado *et al.*, 2003)

En los experimentos de Cheng *et al.* (2007), en donde utilizaron la endolisina LysEF-P10 en modelos de ratón con bacteremia para la eliminación de cepas de *Enterococcus faecalis* multiresistentes, observaron que la aplicación de LysEF-P10 indujo la formación de anticuerpos específicos cuando se administraba a ratones. Sin embargo la actividad de LysEF-P10 no se vio afectada por estos anticuerpos. Los anticuerpos fueron detectables 1 semana después de la administración de LysEF-P10 y alcanzaron un pico a las 3 semanas, con un título de 1:100. Observaron además que cuando se inyectaban 50 µg de LysEF-P10 por vía subcutánea, tres veces para inmunizar ratones, los títulos de anticuerpos policlonales específicos de LysEF-P10 en el suero de los ratones obtenido 1

semana después de la inmunización final fueron 1:32,000, sin embargo este suero tampoco afectó la actividad bactericida de LysEF-P10 en comparación con LysEF-P10 con suero de ratón normal. Sugiriendo así que los anticuerpos no bloquean los sitios clave de actividad de los dominios de unión y catalíticos o la afinidad de estas lisinas por sus dianas bacterianas sea más alta que para la unión anticuerpo-lisina.

3.7. Resistencia a endolisinas

La coevolución de los bacteriófagos y sus huéspedes ha llevado a las endolisinas a desarrollar la capacidad de unirse a objetivos altamente conservados y altamente inmutables en la pared celular, lo que convierte a la resistencia en un evento raro, asegurando así la supervivencia del fago (Fischetti *et al.*, 2005). Además, la naturaleza extracelular del peptidoglicano limita el número de posibles mecanismos de resistencia a endolisinas cuando se aplica de manera exógena, esto debido a que muchos mecanismos clásicos de resistencia se dirigen a antimicrobianos que actúan dentro de la célula. Estos mecanismos incluyen la reducción de la permeabilidad de la membrana, la salida activa de compuestos de la célula y la inactivación de antimicrobianos por enzimas citoplásmicas (Schmelcher *et al.*, 2012). En varios estudios del laboratorio han intentado generar e identificar cepas que son resistentes a las endolisinas de fagos nativos o modificadas si obtener los resultados deseados (Fischetti *et al.*, 2005). De forma similar, se ha intentado crear cepas de MRSA resistentes a endolisinas quiméricas; sin embargo, estos intentos no tuvieron éxito (Pastagia *et al.*, 2001). A pesar de estos resultados, debe considerarse un mecanismo de resistencia teóricamente factible, el enmascaramiento de un ligando de unión o sitio de corte de la enzima a través de modificaciones de la pared celular que crean impedimento estérico. Hasta el momento, con los datos disponibles, no hay una respuesta definitiva a la pregunta de qué tan susceptibles son estas enzimas a las estrategias de resistencia bacteriana (Schmelcher *et al.*, 2012). En la tabla 1 se hace una comparación entre las ventajas y desventajas del uso de fagos y endolisinas como agentes antimicrobianos.

Tabla 1. Tabla comparativa Fagos vs Endolisinas

Fagos	Endolisinas
Es necesario seleccionar únicamente fagos virulentos para prevenir la transferencia genética	Se elimina la posibilidad de que ocurra transferencia genética
Las cepas bacterianas pueden desarrollar resistencia	Aun no se ha reportado resistencia
Pueden tener un rango limitado de hospedero	Es posible diseñarlas genéticamente y ampliar el rango de hospedero

4. Endolisina LysK

A la luz del problema de resistencia que se presenta con cepas de *S. aureus*, este patógeno se ha convertido en un objetivo primordial para la tecnología de las endolisinas en los últimos años. Numerosos estudios que describen la clonación, la producción recombinante y la caracterización de endolisinas estafilocócicas nativas y modificadas *in vitro* y en modelos animales, se han reportado durante la última década. En su mayoría, estas endolisinas estafilocócicas cuentan con una estructura formada por 3 dominios, con dos dominios enzimáticamente activos (EADs), uno en el extremo N-terminal y un segundo ubicado en la región central, y un dominio de unión a la pared celular (CBD) de tipo SH3b en el extremo C-terminal (Haddad *et al.*, 2017).

Un ejemplo bien estudiado de endolisina estafilocócica es la endolisina LysK, una endolisina producida por el bacteriófago K, un fago virulento de la familia de *Myoviridae* que infecta cepas de estafilococos, tanto coagulasa negativos como positivos, cuya longitud de genoma es de 127,395 pb. LysK es una proteína de 54 kDa de 495 aminoácidos, codificada por dos marcos de lectura abiertos interrumpidos por un intrón. La endolisina madura se crea a partir de estas dos partes separadas a través de una reacción de empalme (O'Flaherty *et al.*, 2004).

La endolisina LysK conserva la estructura modular clásica de las endolisinas estafilocócicas antes mencionada, siendo una de las primeras endolisinas de las cuales se conoció información acerca de su estructura (Fig.4). Se sabe que en Lys K el dominio EAD N-terminal es una amidohidrolasa / peptidasa dependiente de cisteína, histidina (CHAP), que rompe el enlace entre D-Ala del péptido y el puente de pentaglicina del peptidoglicano estafilocócico. La EAD ubicada en el centro (Ami-2) muestra la actividad amidasa, cortando el enlace amida entre el polímero de aminoazucres y el tetrapeptido del peptidoglicano. Los sitios de escisión de los dominios CHAP y Ami-2 dentro del peptidoglicano estafilocócico han sido

dilucidados mediante análisis de espectrometría de masas de productos de digestión de peptidoglicano. (Haddad *et al.*, 2017).

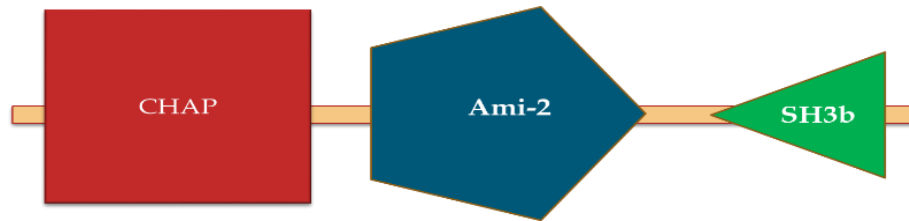


Figura 4. Estructura de la endolisina LysK. El dominio CHAP (Aminohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína e histidina). El dominio Ami-2 (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa). Y el dominio SH3b, de reconocimiento de la pared celular.

Se han realizado estudios, con LysK, de eliminación de los diferentes dominios que la forman, con lo que se demostró que al eliminar los dominios Ami-2 y SH3b, el dominio CHAP por sí solo, permaneció altamente activo y, además, mostró una solubilidad incrementada en comparación con la de la endolisina de longitud completa (Horgan *et al.*, 2009).

LysK fue también una de las primeras endolisinas estafilocócicas para las que se disponía de información estructural, Sanz *et al.* (2014), cristalizaron el dominio CHAP, que mostraba una topología parecida a la papaína con la tríada catalítica ubicada dentro de una hendidura hidrófoba. Se encontró que dos iones metálicos estaban asociados con la estructura: un ión de calcio estructural y un ión de zinc dentro del sitio activo. Además, estos autores informaron que el sitio de unión a ion calcio está ubicado en un llamado motivo cerca de la hendidura del sitio activo y que la presencia del ion calcio es crítica para la actividad lítica de la enzima.

Cabe mencionar que se encontró que la endolisina LysK es casi idéntica a la endolisina LysGH15, otra endolisina estafilocócica de la cual ya se han descrito con anterioridad sus tres dominios, estas dos endolisinas difieren únicamente en 4 aminoácidos, por lo que, las características estructurales descritas para LysGH15 son similares para las de LysK. En lo que respecta al dominio amidasa de LysGH15 se descubrió que presenta un surco bajo en su superficie, lo que ayuda en el acomodo y la escisión del sustrato (peptidoglicano). Se sabe también que un ion zinc está unido en el centro de la ranura en una disposición típica de las metaloenzimas dependientes de zinc. La importancia del ion zinc para la actividad catalítica está demostrada por el hallazgo de que la mutación de los residuos de

unión a zinc elimina la actividad del dominio amidasa. Por otro lado se encontró que el dominio SH3b de LysGH15 es estructuralmente muy parecido al del homólogo de lisostafina ALE-1. Mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) usando el péptido "AGGGGG", que simula el puente de pentaglicina del peptidoglicano estafilocócico, revelaron la interacción de este péptido con los residuos del supuesto surco de unión de peptidoglicano del dominio SH3b, además la mutación de los residuos respectivos eliminó la capacidad de unión del CBD al peptidoglicano de *S. aureus* (Gu *et al.*, 2014).

5. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo genética y ecológicamente diverso de bacterias que abarcan 31 géneros (König *et al*, 2009). Este grupo de bacterias está formado de cocos o bacilos Gram-positivos, no formadores de esporas, catalasa negativa y con una alta tolerancia al pH bajo. El pH óptimo de crecimiento para BAL es de 5.5 – 5.8, y estos microorganismos tienen requerimientos nutricionales complejos de aminoácidos, péptidos, bases de nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (Khalid 2011).

Se caracterizan por la producción de ácido láctico, como producto principal de la fermentación de la glucosa, además de ácido acético, etanol, compuestos aromáticos, exopolisacáridos y varias enzimas, y sustancias inhibitoras del crecimiento como las bacteriocinas, el peróxido de hidrógeno y los diacilos, que evitan la proliferación de bacterias y patógenos (Mokoena 2017).

Las bacterias ácido lácticas fermentan los carbohidratos para obtener energía, utilizando fuentes de carbono endógenas como último aceptor de electrones en lugar de oxígeno. Son aerotolerantes y están protegidos contra subproductos de oxígeno como el peróxido de hidrógeno por las peroxidasas (Mokoena 2017).

Se clasifican en microorganismos homofermentativos y heterofermentativos, basados en los productos de la fermentación. Las BAL homofermentativas producen principalmente ácido láctico a partir de azúcares, mientras que las heterofermentativas producen ácido láctico, ácido acético o alcohol y dióxido de carbono. (BAL) Las BAL se clasifican también, en función de la morfología celular, el modo de fermentación, el intervalo de crecimiento de la temperatura y los patrones de suplementación. Los géneros de LAB incluyen *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloioococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Mokoena, 2017).

Las BAL se encuentran en materiales vegetales y frutas en descomposición, en productos lácteos, carne fermentada y pescado, cereales, remolacha, verduras en escabeche, papas, masa fermentada, ensilajes, bebidas fermentadas, jugos, aguas

residuales y en cavidades de seres humanos y animales. En los seres humanos, habitan particularmente en la cavidad oral, el íleon, el colon y son los organismos dominantes en la vagina (Mokoena, 2017).

Las bacterias ácido-ácidas (LAB) tienen una larga historia de aplicación en alimentos fermentados debido a su influencia beneficiosa en las características nutricionales, organolépticas, además de evitar la descomposición de alimentos y prolongar su tiempo de vida útil. Varios aislamientos de BAL del género *Lactobacillus* y sus bacteriocinas se han aplicado en la conservación de alimentos y en el control de patógenos humanos, lo que hace que las BAL se encuentren entre los microbios más importantes que se utilizan en las fermentaciones de alimentos (Wood y Holzapfel, 1995)

Debido a sus beneficios para la salud, algunas BAL se utilizan como probióticos. Los probióticos son organismos tales como bacterias o levaduras que mejoran la salud humana o animal, ya que desempeñan funciones beneficiosas en la fisiología del huésped mediante la digestión y la asimilación de nutrientes, la estimulación y la maduración de los tejidos del huésped, la regulación de la respuesta inmunitaria del huésped y la prevención de la colonización patógena (Backhed *et al.*, 2005).

Podemos encontrar a las BAL como probióticos en suplementos y alimentos fermentados como el yogur, o como suplementos nutricionales que contienen bacterias vivas para desarrollar la microbiota intestinal, y una de las características de las BAL como probióticos es su potencial para combatir bacterias patógenas como *Helicobacter pylori*, *Escherichia Coli*, y *Salmonella*, principales causantes de infecciones gastrointestinales (De Vuyst y Leroy, 2007).

6. Bacterias ácido lácticas como vectores de expresión

Las bacterias del ácido láctico desempeñan un papel clave en la biotecnología de los alimentos y son fundamentales para las fermentaciones lácteas que conducen a los productos de queso y yogur. El desarrollo de las nuevas tecnologías genéticas ha abierto este grupo de especies al análisis detallado (Gingold, 1995)

Estas bacterias no son solo importantes por el desarrollo de sabor y textura en alimentos, sino también en su preservación. Muchos reportes han descrito la producción de bacteriocinas y otros metabolitos antimicrobianos por bacterias ácido lácticas contra patógenos como *Listeria* sp., *Clostridium* sp. y especies de *Bacillus*, ofreciendo efectos benéficos en la salud de los consumidores. La optimización genética de cultivos primarios proporcionan un efecto protector en contra de patógenos transmitidos por alimentos (Gaeng *et al.*, 2000).

En años recientes muchas investigaciones se han enfocado en la modificación genética de bacterias ácido lácticas con el objetivo de mejorar sus características y desarrollar nuevas aplicaciones.

La disponibilidad de sistemas heterólogos de expresión de genes en bacterias ácido lácticas está incrementando su interés debido a que estos organismos son reconocidos como seguros, puesto que son bacterias no invasivas y no patogénicas, que pueden ingerirse en dosis relativamente altas sin el riesgo potencial asociado con el uso de otras bacterias como vectores. Debido a su seguridad, las bacterias ácido lácticas son reconocidas como fabricas celulares potenciales de antígenos, proteínas y péptidos con fines terapéuticos. Las dos bacterias ácido lácticas más estudiadas son *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*; de ambas bacterias se conocen las secuencias de sus genomas y han sido estudiadas como vehículos para la liberación *in situ* de proteínas de interés terapéutico (Mathiesen *et al.*, 2008).

En las dos últimas décadas se han descubierto y estudiado varios sistemas de expresión para la producción de proteínas heterólogas en bacterias ácido lácticas, incluyendo sistemas de secreción y de sobreexpresión de proteínas (Karlskas *et al.*, 2014). Estas nuevas aplicaciones no podrían ser posibles sin los conocimientos adquiridos sobre la biología molecular del organismo; representando grandes avances que podrían tener implicaciones para el sector de la salud (Kok *et al.*, 2017).

7. Clonación en vectores inducibles

La ingeniería genética ha sido utilizada para clonar y secretar proteínas bajo el control de vectores inducibles, esto permite elegir el momento adecuado para que dichas proteínas se expresen. El uso de bacterias probióticas, como es el caso de las bacterias ácido lácticas, para clonar, expresar y secretar proteínas le da un valor agregado como alternativa biotecnológica. Por este motivo, un importante motor de la investigación de biología molecular en *L. lactis*, ha sido el descubrimiento y uso de sistemas de expresión génica inducibles. Se han descubierto varios promotores que responden a los cambios en el medio ambiente y se han utilizado para construir vectores de expresión génica inducibles, estos incluyen el promotor P170, que es regulado a un pH bajo durante la transición a la fase estacionaria; el promotor PADNJ; inducido por golpe de calor; así como los promotores regulados por purinas o azúcar, y promotores de bacteriófagos (Kok *et al.*, 2017).

Otro mecanismo de expresión y secreción de proteínas, es el sistema Sec-dependiente, que es el sistema más estudiado en ingeniería genética. Las proteínas secretadas por este sistema contienen un péptido señal (PS) en su extremo amino con propiedades muy características. Este PS es cortado durante la translocación

de la proteína, y la eficiencia de la secreción va a depender del PS y de la propia proteína que se secrete (Mathiesen *et al.*, 2008).

Este sistema de expresión fue utilizado por Mathiesen *et al.* (2008), quienes estudiaron el sistema de expresión pSIP de bacterias ácido lácticas, el cual es regulado por un péptido inductor de 19 aminoácidos (IP). Este sistema consta de una proteína (HPK) que reconoce la presencia del péptido IP en el medio, una vez que IP se une a HPK esta última enzima se fosforila, y a su vez permite la fosforilación de una proteína reguladora de respuesta (RR), una vez fosforilada RR se une al ADN y activa la expresión principalmente de la biosíntesis de bacteriocinas.

Por su parte Karliskas *et al.* (2014), utilizaron una variante de este sistema de expresión pSIP con el plasmido pSIP411 para la expresión de genes y secreción de proteínas en lactobacilos. El sistema fue probado en 14 aislamientos representativos de especies de *Lactobacillus*, de las cuales 10 secretaron con éxito la proteína β -glucuronidasa. Además el replicón original de pSIP411 (256rep) fue reemplazado por el replicón (SH71rep) y transformado en 5 especies de *Lactobacillus*, obteniendo la secreción de la proteína deseada en las 5 especies. Utilizaron además diferentes péptidos señal con lo que observaron diferencias en el rendimiento de la secreción de proteína.

Otro mecanismo de expresión y secreción de proteínas es el descrito por Sanders *et al.* (1998), el cual fue identificado en *Lactococcus lactis*, y consta del promotor P_{gad}, el cual es controlado por la proteína GadR y que es específicamente inducible por cloruro, transcribiendo a dos genes: *gadC* y *gadB*. Este mecanismo fue utilizado por Geldart *et al.* (2015), para la expresión, secreción y aplicación de péptidos antimicrobianos en *Lactococcus lactis* con el objetivo de reducir los conteos de *Enterococcus faecium in vitro*. Ellos observaron que este promotor inducible con cloruro de sodio, P_{gad}, expresa altos niveles de la proteína, comparado con otros promotores inducibles, además observaron una rápida disminución en los conteos de *Enterococcus faecium*. Demostrando con esto el potencial del promotor P_{gad} inducible con cloruro para la expresión de proteínas.

8. *Escherichia coli* como vector de expresión

De enero de 1996 hasta noviembre de 2000 más de la mitad de las licencias biológicas aprobadas (BLA) por la FDA fueron productos biotecnológicos fabricados mediante el uso de sistemas de células de mamíferos (Chu *et al.*, 2001). De igual manera, para el periodo 2006-2010, de un total de 58 productos aprobados, 32 fueron producidos empleando células de mamífero (Walsh, 2010). Tres líneas celulares son las principalmente utilizadas: células de ovario de hámster chino

(CHO); y las líneas de mieloma murino SP2 / 0 y NS0. Estas tres líneas celulares se han utilizado para producir la mayoría de los productos terapéuticos recombinantes (Chu *et al.*, 2001).

En el caso de producción de proteínas recombinantes en bacterias, *Escherichia coli* suele ser el hospedero de elección; aunque ahora se utilizan muchos organismos y sistemas de expresión alternativos para la producción de proteínas recombinantes como *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*, *E. coli* sigue siendo el hospedero más utilizado. La primera proteína recombinante aprobada para su uso en humanos fue la insulina humana, producida en *E. coli* por la empresa Genentech. Además en el periodo 2006-2010, de un total de 58 productos aprobados por la FDA, 17 fueron producidos usando *E. coli* (Walsh, 2010)

A pesar de que muchas de las proteínas recombinantes terapéuticas requieren modificaciones post-traduccionales que no pueden ser llevadas a cabo por cepas bacterianas silvestres, y por esta razón, tienen que ser producidas por células eucariontes superiores, *E. coli* presenta una serie de ventajas importantes para la producción de proteínas recombinantes (Demain y Vaishnav, 2009).

El amplio conocimiento que se tiene sobre la fisiología de *E. coli* y las herramientas genéticas avanzadas con que se cuentan actualmente, lo convierten, en uno de los sistemas de expresión más potentes (Swartz, 2001), por lo que en la actualidad, cada vez es mayor el número de vectores de clonación, promotores transcripcionales fuertes y / o regulados y cepas mutantes de *E. coli* que se utilizan, con el resultado final de una gran disponibilidad de sistemas de expresión génica eficientes y versátiles (Dulio *et al.*, 2004).

Las principales ventajas que tiene el uso de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes son las altas tasas de crecimiento con una alta densidad celular, las cuales pueden obtenerse fácilmente incluso usando caldos simples y bastante económicos, además de los altos niveles de expresión de proteínas que se pueden obtener (Tanji *et al.*, 2004).

Además se ha demostrado la capacidad de *E. coli* para llevar a cabo el plegamiento proteico oxidativo en el citoplasma, con lo que se abren más oportunidades para explotar a este organismo simple pero altamente productivo (Swartz, 2001). Además se conocen sistemas de secreción de proteínas en *E. coli*, los cuales tienen ventajas sobre la producción intracelular, ya que en la mayoría de los casos, dirigir la proteína al espacio periplásmico o al medio de cultivo facilita el procesamiento, el plegamiento y la estabilidad *in vivo*, lo que permite la producción de proteínas solubles y biológicamente activas a un costo de proceso reducido (Mergulhão *et al.*, 2005).

Todo esto ha permitido que muchas proteínas de gran importancia, incluidas hormonas, enzimas y vacunas, se produzcan utilizando sistemas de expresión de *E. coli*, ejemplo de ello es que en 2009, cerca del 30 % de las proteínas

recombinantes de uso terapéutico fueron producidas empleando a dicho hospedero (Ferrer *et al.*, 2009). En la tabla 2 se citan algunos ejemplos de proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas por *E. coli* que se sintetizan y su respectiva compañía productora.

Tabla 2. Principales proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas por *E. coli*
(Adaptada de Graumann y Premstaller, 2006)

Molécula	Compañías productoras
Activador del tejido del plasminógeno	Roche
Insulina humana y análogos	Eli Lilly, Aventis, Probiomed
Hormona de crecimiento humano	Genentech, Eli Lilly, Pfizer, entre otros
Análogo pegilado de hormona de crecimiento humana.	Pfizer
Hormona paratiroidea humana	Eli Lilly
Calcitonina de salmón	Unigene
Factor estimulante de la colonia de granulocitos, pegilado	Amgen
Interferón α -2a pegilado, interferón α -2b	Hoffmann-La Roche, Schering
Interferón β -1b	Schering AG, Chiron
Interferón γ -1b	Genentech, Intermune
Antagonista del receptor de interleucina-1	Amgen
Interleucina-2	Chiron
Toxina de fusión de la difteria	Seragen / Ligand
Interleucina-11	Genetics Institute
Lipoproteína rOspA	SmithKline Beecham
Péptido natriurético tipo B	Scios/ Johnson & Johnson
Factor de necrosis TNF α	Boehringer Ingelheim
Toxina pertussis (componente de vacuna combinada)	Chiron
Asparginasa	Merck

En el caso de endolisinas de bacteriófagos, varios autores ya han reportado la expresión de estas utilizando a *E. coli* como modelo de expresión, tal es el caso de la endolisina del bacteriófago T4, la cual produce lisis en aislamientos de *E. coli*. Esta endolisina fue clonada en el plásmido pACYC184, para posteriormente transformar células de *E. coli* JM109 con el objetivo de producir cepas con la capacidad de “auto destruirse”, las cuales puedan ser utilizadas a su vez en la producción de otras proteínas, facilitando con esto la liberación de estas proteínas al medio extracelular (Morita *et al.*, 2001).

En el caso específico de endolisinas que lisan aislamientos de *S. aureus*, ya también varios autores han reportado el uso de *E. coli* para la expresión de estas enzimas. Un ejemplo de esto es el caso de la endolisina Lys11, proveniente del bacteriófago

phi11, la cual fue clonada en el plásmido pET21a, esta construcción se introdujo en la cepa *E. coli* BL21 para la expresión de la endolisina, y su posterior purificación. Encontrando que la endolisina, una vez purificada, era capaz de lisar aislamientos de estafilococos causantes de mastitis, tanto coagulasa negativos como positivos, con lo que se demostró que la proteína expresada era funcional (Donovan *et al.*, 2006)

Un ejemplo más reciente es el de las endolisinas provenientes de los bacteriófagos SA12 y SA97 (LysSA12 y LysSA97), las cuales fueron clonadas en el plásmido pET28a y este a su vez, se introdujo en células competentes de la cepa *E. coli* BL21, con el objetivo de expresar y purificar estas endolisinas para su posterior evaluación, encontrando actividad en ambas proteínas (Son *et al.*, 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

Staphylococcus aureus es uno de los principales agentes patógenos causantes de infecciones, y es reconocido por presentar alta resistencia a los antibióticos, por este motivo se están buscando nuevas alternativas para el tratamiento y control de infecciones causadas por dicho patógeno. La expresión heteróloga de endolisinas, constituye una alternativa para la aplicación de dichas enzimas.

IV. HIPÓTESIS

La expresión heteróloga de una endolisina tipo LysK presenta actividad lítica contra *Staphylococcus aureus*.

V. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la expresión heteróloga de una endolisina con actividad lítica contra *Staphylococcus aureus*.

ESPECÍFICOS

- Expresar una endolisina de bacteriófago contra *Staphylococcus aureus* en una bacteria ácido láctica
- Evaluar la actividad de la bacteria probiótica que expresa la endolisina contra diferentes genotipos de *Staphylococcus aureus*.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Secuenciación extremo 3' del gen de la endolisina

Se realizó la secuenciación del extremo 3' del gen de las endolisinas de los 28 bacteriófagos que habían sido aislados previamente por nuestro equipo de trabajo, la secuenciación fue realizada por la empresa MacroGen (Korea). Una vez que se tuvo la secuencia del extremo 3' se procedió a realizar el ensamblaje y análisis de las secuencias completas del gen, ya que la secuenciación del extremo 5' ya se había realizado previamente. Para el ensamblaje de las secuencias se utilizó el software GeneStudio (GeneStudio Inc) y el análisis de similitud se realizó con el algoritmo CLUSTALW (Higgins *et al.*, 1994) para secuencias de ADN o MUSCLE para proteínas (Edgar, 2004) del software Mega7 (Megasoftware; Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias se compararon con la secuencia de la endolisina LysK, ya que se encontró que las endolisinas que se tenían son homólogas de esta.

El análisis de la secuencia completa se realizó con el objetivo de observar si existían polimorfismos en el extremo 3', el cual corresponde a la zona del dominio de unión, que pudieran estar relacionados con las diferencias en la especificidad. A partir de los resultados obtenidos del análisis de las secuencias, se elegiría la secuencia de la endolisina que sería insertada en un vector para ser expresada.

6.2. Búsqueda bibliográfica para el diseño del vector de expresión

Con el objetivo de elegir el mejor vector de expresión que sería utilizado para la expresión de la endolisina, se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar el que cumpliera con las características siguientes: que tuviera un origen de replicación para Gram-positivos y un origen de replicación para Gram-negativos (vector tipo binario o shuttle); la presencia de genes marcadores de selección que permitan la selección de los transformantes en Gram-positivos y Gram-negativos; que el vector estuviera bajo el control de un promotor inducible que permitiera elegir el momento en que se inicia la expresión de la endolisina; que el inductor que induzca la expresión, fuera accesible y de bajo costo; y que contara con la presencia de un péptido señal que permita la posterior secreción de la endolisina.

6.3. Transformación en *E. coli* y *Lactobacillus acidophilus*

6.3.1. Obtención de células electrocompetentes de *E. coli*

Para la transformación en *E. coli* se siguió la metodología descrita por Lessard (2013), para lo cual, se procedió a obtener células electrocompetentes. A partir de

un cultivo de toda la noche se tomó 1 ml y se inoculó en 100 ml de caldo LB, el cual se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O._{595nm} de 0.6. Una vez que se alcanzó esta D.O., el cultivo se colocó en hielo por 10min, una vez transcurrido el tiempo, las células fueron colectadas mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 100 ml de agua Milli-Q estéril previamente enfriada; la mezcla se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 10 min y el procedimiento se repitió 2 veces. El paquete celular se resuspendió en 50 ml de glicerol 10% en agua Milli-Q (estériles ambos) y nuevamente se centrifugó a a 8000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desechó, y el precipitado celular se resuspendió en 2.1 ml de la solución de glicerol 10%. Finalmente se prepararon alícuotas de 80 µl, las cuales fueron conservadas a – 70 °C.

6.3.2. Electroporación de *E. coli*

Para la transformación de *E.coli* se tomaron células electrocompetentes, las cuales se dejaron descongelar en hielo y se manejaron en frío. A las células electrocompetentes se les agregaron 100 ng de ADN plásmidico y se mezclaron suavemente. La mezcla se colocó en una cubeta de electrotransformación GenePulser, la cual había sido colocada previamente en hielo. La cubeta se colocó en el electroporador Ecoli Pulser (BioRad) y se dio un pulso de 2.5 kV. Inmediatamente después del pulso se agregó medio SOC liquido (triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, 2,5 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ 20 mM glucosa). El contenido de la celda se transfirió a un tubo estéril y se incubó a 37°C durante 1 hr. Finalmente el tubo se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min, el sobrenadante se desechó, el paquete celular se plaqueó en agar LB con ampicilina 50 µg/ml y se dejó incubar a 37 °C durante toda la noche. Una vez que se incubaron se seleccionaron las células transformantes.

6.3.3. Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

De las células transformantes se seleccionaron algunas colonias para realizar la extracción del ADN plasmídico. La extracción se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnbom (1983), para lo cual se tomaron colonias de las posibles transformantes y se inocularon en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina (50 µg/ml), y fueron incubadas en agitación a 37°C durante toda la noche. De los cultivos se tomaron 1.5 ml en tubos eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min. El paquete celular fue resuspendido en 100 µl de GTE (Tris-HCl pH8 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM), y la suspensión se dejó reposar durante 5 min, transcurrido el tiempo se agregaron 200 µl de buffer de lisis

(NaOH 0.2 N, SDS 1%), la muestra se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo 5 min. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 5 M, pH 4.8, frío y se mezcló por inversión. La mezcla nuevamente se dejó incubando 5 min sobre hielo y posteriormente se centrifugó 12,000 rpm durante 5 min., el sobrenadante fue recuperado en un nuevo tubo y se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1), la muestra se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, y una vez centrifugado la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se le agregó 1 volumen de isopropanol frío. Esta mezcla se incubó a -20 °C toda la noche y a la mañana siguiente, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., el sobrenadante se desechó y a la pastilla se adicionó 1 ml de etanol al 70 %, esto se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró y la pastilla se dejó secar, una vez seca, se resuspendió en 50 μ l de buffer TE_{10/1} (Tris-HCl pH8 10 mM, EDTA 1 mM). La muestra se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (30 minutos a 90 voltios) para verificar la integridad del plásmido. La concentración y pureza del ADN se midió utilizando un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

6.3.4. Verificación del plásmido por digestión con enzimas de restricción

Una vez realizada la extracción del plásmido, se realizó la digestión con enzimas de restricción, con el objetivo de comprobar la identidad del plásmido. Para la digestión se colocaron 500 ng del ADN plasmídico, 1 μ l de buffer Smart cut 10X, 1 μ l de la enzima de restricción, y cbp 10 μ l de H₂O desionizada. La mezcla se incubó a 37 °C durante 1hr, y una vez transcurrido el tiempo el volumen total se cargó en un gel de agarosa al 0.7% y se realizó la electroforesis (30 minutos a 90 voltios). Los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio al 0.2% y se observaron en un transiluminador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems).

6.3.5. Preparación de células electrocompetentes de *L. acidophilus*

Para la preparación de células competentes se utilizó el método reportado por Kathiriya *et al.* (2019), con algunas modificaciones. Para esto, un cultivo de toda la noche de *L. acidophilus* fue inoculado 1:50 en caldo MRS adicionado con glicina al 2% y sacarosa y fue incubado a 37°C hasta una D.O._{595 nm} 0.6. Las células fueron colectadas a 4,000 rpm durante 15 min y la pastilla se lavó 3 veces con solución de lavado (KH₂PO₄ 5mM, MgCl₂ 2mM, glicerol 10%, sacarosa 0.3M). Las células fueron resuspendidas 1:100 en esta misma solución y se tomaron alícuotas de 80 μ l, las cuales se almacenaron a -85 °C.

6.3.6. Transformación en *L. acidophilus*

La estrategia utilizada para transformar *L. acidophilus* fue la descrita por Kathiriya *et al.* (2019), modificada, para lo cual se mezclan porciones de 80 μ l de células competentes de *L. acidophilus* con 1 μ g de ADN plasmídico disuelto en una solución de TE_{10/1} pH 7.5 y posteriormente se dializó en agua desionizada esteril. La mezcla se transfirió a una cubeta de electrotransformación Gene Pulser / Micro Pulser (BioRad) de 2 mm fría y fue expuesta a un pulso eléctrico en un electroporador Ecoli Pulser (BioRad) o un electroporador ECM™ 830 (BTX) y es expuesta a un pulso eléctrico simple. El pulso eléctrico se dio a 25 μ F, 2.5 KV, la cubeta se conectó en paralelo a 200 Ω de resistencia en tiempos constantes de 4.5 a 5 milisegundos. Inmediatamente después de la descarga la suspensión se mezcló con 0.9 ml de medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) adicionado con MgCl₂ 20 mM y CaCl₂ 2mM y se incubó a 37 °C por 3 hrs en microaerobiosis. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el paquete celular se concentra centrifugando 5000rpm/5min, y se esparcen las porciones en agar MRS suplementado con sacarosa 0.3M y eritromicina a 5 μ g/ μ l para seleccionar los transformantes.

6.3.7. Extracción de ADN plasmídico de *L. acidophilus*

De las células transformantes se seleccionaron algunas colonias para realizar la extracción del ADN plasmídico. La extracción se realizó mediante el método de lisis alcalina (Birnbom 1983), modificado, para lo cual se tomaron colonias de las posibles transformantes y se inocularon en 5 ml de medio MRS con eritromicina (5 μ g/ml), y se incubaron sin agitación a 37°C durante toda la noche. De los cultivos se tomaron 1.5 ml en tubos eppendorf y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 min. El paquete celular se resuspendió en 100 μ l de GTE (Tris-HCl pH 8, 25 mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM) con ayuda de un agitador de vórtice, y la suspensión se dejó reposar durante 5min, y transcurrido el tiempo se agregaron 200 μ l de buffer de lisis (NaOH 0.2 N, SDS 1%) adicionado con lisozima 0.2 mg/ml, la muestra se mezcló por inversión y se incubó durante 45 min a 37°C. Posteriormente se adicionaron 150 μ l de acetato de potasio 5 M, pH 4.8, frío y se mezcló por inversión. La mezcla nuevamente se dejó incubando 5 min sobre hielo y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo y se agregó un volumen de Fenol-Cloroformo-Isoamilico (25:24:1) saturado, la muestra se mezcló en agitador de vórtice y se centrifugó 12,000 rpm durante 5 min. Una vez centrifugado la fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se le agregó 1 volumen de isopropanol frío. Esta mezcla se incubó a -20 °C toda la noche y a la mañana siguiente, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., el sobrenadante se desechó y se adicionó 1 ml de etanol al 70 %, esto se mezcló y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró y la pastilla se dejó secar, se resuspendió en 50 μ l de buffer TE_{10/1} (Tris-HCl pH8 10 mM, EDTA 1 mM).

La muestra se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% (30 minutos a 90 voltios) para verificar la integridad del plásmido, y la concentración y pureza del ADN se midió utilizando un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific).

6.3.8. Identificación del fragmento PS-HT por PCR

Para confirmar la presencia del plásmido en las colonias transformantes, se realizó un PCR para amplificar un fragmento dentro del plásmido pCipSpHLysKNae que corresponde a la zona del péptido señal y a la etiqueta de Halo Tag (Fragmento PS-HT), para lo cual se diseñaron los oligos PS-HT, y cuyas características se describen en la tabla 3. Para cada reacción se tomó en cuenta un volumen final de 50µl, se adicionaron a los tubos eppendorf los siguientes volúmenes: 2 µl de templado de ADN a una concentración de 20 ng/ µl, 2.5 µl de oligo PS-HT -FW, 2.5 µl de oligo reverso PS-HT -RV, 1 µl de DNTP's, 5 µl de Buffer, 1.5 µl de MgCl₂, 0.35 µl de Taq polimerasa y 35.15 µl de agua destilada estéril. Se programó el termociclador con las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min. 35 ciclos de extensión con un tiempo de 30 seg a 95°C para la separación de las hebras de ADN, 30 seg a 54°C para el alineamiento de oligos, 90 seg a 72°C para extensión, y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados

Primer	Secuencia	Tm °C	Longitud nt	%GC	Fragmento que amplifica
LysKpVkp FW	ACGTTACGATCGGCATGGCTAAGACTCAAGCAGAAA	100	36	47.2	Gen Lys K agregando los sitios de restricción PvuI y KpnI
LysKpVkp RV	TAACGTGGTACCCTATTTGAATACTCCCCAGGCA	106	34	47.1	
PS-HT FW	GGGTGAAGATAGTTGTCTG	60	20	50.0	Fusión Péptido señal-HaloTag
PS-HT RV	GTATTCTTCGACCAGCGCGA	62	20	55.0	
LysK FW	ATGGCTAAGACTCAAGCAGAAA	64	22	40.9	Gen LysK
LysK RV	CTATTTGAATACTCCCCAGGCA	62	22	45.5	
Ery FW	GGGCATTTAACGACGAAACTGG	66	22	50	Gen de resistencia a Eritromicina
Ery RV	TCTGGAACATCTGTGGTATGGC	66	22	50	

6.4. Diseño del plásmido pFN-LysK

El plásmido pFN-LysK contiene el gen que codifica para la endolisina Lys K, el cual fue ligado al vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi®, este plásmido posee el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección, y la etiqueta de Halo-tag para la purificación de la proteína recombinante. Para su construcción se siguieron los pasos que se describen a continuación.

6.4.1. Amplificación del fragmento LysK PvKp

Para insertar el gen *lysK* en el plásmido pFN18A HaloTag®T7 Flexi® en los sitios *PvuI* y *KpnI*, se amplificó el fragmento correspondiente del plásmido pCipSpHLysKNael, agregando los sitios de restricción *PvuI* y *KpnI* (fragmento LysK PvKp) mediante PCR. Para cumplir con dicho objetivo, fueron diseñados los oligos LysK PvKp, los cuales tenían integrados en los extremos los sitios de restricción *PvuI* y *KpnI* cuya secuencia y propiedades se muestran en la tabla 3.

Para cada reacción se tomó en cuenta un volumen final de 50µl, adicionando para cada tubo eppendorf 50 ng del ADN molde. El termociclador se programó con las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos. 30 ciclos de extensión con un tiempo de 1 minuto a 95°C, para la separación de las hebras de ADN, 1 minuto a 65°C, para el alineamiento de oligos, 1.5 minutos a 72°C para extensión. Y un ciclo de extensión final de 7 minutos a 72°C.

Para confirmar la amplificación del fragmento, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.7%, el cual fue teñido en una solución de bromuro y fue observado en un transiluminador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems), esperando encontrar un fragmento aproximado de 1500 pb.

6.4.2. Limpieza del fragmento Pvul-LysK-Kpnl para digestión enzimática

Una vez que se obtuvieron los fragmentos esperados, correspondientes al fragmento Pvul-LysK-Kpnl, se realizó la limpieza de los productos de PCR, con el objetivo de eliminar los restos de oligonucleótidos que pudieran estar presentes y poder llevar a cabo la digestión con las enzimas de restricción correspondientes. La limpieza de los productos de PCR se realizó con PEG/NaCl/EDTA realizando los siguientes pasos:

Al producto de PCR se le agregaron 1.2 volúmenes de solución PEG/NaCl/EDTA (PEG 8000 20%, NaCl 2.5M, EDTA 1mM) y se mezcló, esta mezcla se dejó en congelación durante dos noches.

Transcurrido el tiempo, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 minutos, se retiró el PEG por completo y a la pastilla se le agregaron 150µl de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó a 13000rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se eliminó y se realizó un segundo lavado con etanol al 70%. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 10 µl de buffer TE_{10/1}. La concentración de ADN se midió con un nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific) y se corrió una alícuota en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para confirmar que los oligonucleotidos ya no estuvieran presentes y comprobar la integridad del ADN. Una vez que se tuvieron los fragmentos limpios se procedió a realizar la digestión enzimática.

6.4.3. Digestión enzimática de PvuI-LysK-KpnI y pFN18A HaloTag® T7 Flexi®

Una vez que se obtuvieron los fragmentos del gen de la endolisina LysK y se limpiaron, se procedió a realizar la digestión con enzimas de restricción para dejar los extremos listos para ligar. Además de la digestión del fragmento *PvuI-LysK-KpnI*, se realizó también la digestión del vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® con el objetivo de liberar el gen de la barnasa y dejar los extremos libres para la ligación. El gen de la barnasa funciona como marcador de selección positivo, ya que la barnasa, codificada por dicho gen, es una enzima con actividad de ribonucleasa, y si este gen no se elimina, las clonas transformadas con este gen no sobrevivirán, y encambio, si el gen se elimina y la clonación es positiva, la bacteria sobrevive. Para realizar la digestión con las enzimas de restricción, estas se tuvieron que realizar en reacciones por separado, debido a que la eficiencia catalítica más alta para *PvuI* y *KpnI* se presenta con buffers diferentes. (Tabla 4.) Por lo que para *KpnI* se utilizó Buffer NEB1.1 y para *PvuI* se utilizó NEB3.1.

Tabla 4. Propiedades de restricción de las enzimas

Enzima	% Actividad con diferentes buffers				T Inc (°C)
	NEB1.1	NEB2.1	NEB3.1	CutSmart	
<i>KpnI</i>	100	75	<10	50	37
<i>PvuI</i>	<10	25	100	<10	37

Primeramente se realizó la digestión con *KpnI* como se describe a continuación: Se colocaron 2 µg vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® y 2 µg de fragmento *PvuI-LysK-KpnI* en tubos ependorf de 1.5 ml por separado, y se les agregaron los siguientes reactivos a cada tubo: 1X de buffer NEB 1.1, 2.5 U de enzima *KpnI* y H₂O cbp. 20µl. La mezcla se dejó incubando a 37 °C durante 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo, los productos de la digestión se limpiaron agregando 0.3M de NaCl y un volumen de isopropanol frío, esta mezcla se dejó incubando a -20 °C durante toda la noche, con el objetivo de precipitar los productos de la digestión. A la mañana

siguiente, la muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%, finalmente, la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 12 µl de H₂O para continuar con la digestión con *PvuI*. Para la digestión con *PvuI* se colocó 1 µg del producto de la digestión y se agregó 1X de buffer NEB 3.1, 2.5 U de enzima *PvuI* y H₂O cbp. 20µl. Las muestras se incubaron a 37 °C toda la noche, y nuevamente se realizó la limpieza de los productos de la digestión agregando 0.3M de NaCl y un volumen de isopropanol frío. Esta mezcla se dejó incubando a -20 °C toda la noche. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min., el sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70%. Finalmente, la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 10 µl de H₂O. Para verificar la integridad y eficiencia de la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% usando 2 µl del inserto y 2 µl del el vector limpios para cargar en el gel.

6.4.4. Clonación de *KpnI*-LysK-*PvuI* en pFN18A HaloTag® T7 Flexi®

Para realizar la clonación se prepararon las mezclas de reacción de ligación, para lo cual se colocaron 25 ng de vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® digerido, y se agregó el inserto LysK *KpnI*-*PvuI* digerido en un exceso molar de 3:1 o 5:1, es decir 3 o 5 moles de inserto por cada mol de vector (1 ng o 5 ng de inserto respectivamente por cada 10 ng de vector). A la mezcla se le agregó H₂O cbp para 20 µl finales de reacción. La muestra se calentó a 65°C por 5 min y posteriormente se dejó enfriar en baño de hielo, una vez fría, a la mezcla se le agregó 1X de amortiguador de ADN ligasa de T4 y 1µl de ADN ligasa de T4, la mezcla se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 hora y posteriormente se transfirió a 16°C durante toda la noche. Finalmente la muestra se incubó a 65°C durante 10 minutos con el objetivo de inactivar a la ligasa. Una vez realizada la ligación, las muestras fueron dializadas en una membrana 0.025 µm VS en agua desionizada estéril para eliminar sales presentes en la muestra y una vez dializada poder electroporar.

6.5. Electroporación pFN-LysK *E. coli*

Para la transformación en *E. coli* se siguió la metodología descrita anteriormente reportada por Lessard *et al.*, 2013, utilizando 3 cepas diferentes de *E. coli*: XLI Blue, DH5α ($\Delta lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 *recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)* *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*) y SURE2 (*mcrA-*, *mcrCB-*, *mcrF-*, *mrr-*, *hsdR-* *endA recB recJ*).

Cabe mencionar que además de la construcción del plásmido pFN-LysK, se hizo la construcción de un vector “vacío” como control negativo, en donde el gen de la barnasa fue eliminado del vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI*, de la misma forma que se hizo anteriormente con las enzimas, pero para este caso no se hizo la ligación con el gen de la endolisina,

únicamente se generaron extremos romos utilizando la enzima T4 polimerasa y dNTP's, para así poder ligar los extremos del vector ya sin el gen de la barnasa, con DNA ligasa, este vector vacío fue llamado pFNv, y fue electroporado en *E. coli* DH5 α .

6.5.1. Selección de transformantes

Una vez que se tuvieron posibles transformantes, se seleccionaron algunas colonias de las tres cepas transformadas (XLI Blue, DH5 α y SURE2), las cuales fueron aisladas en medio LB, a estas clonas se les realizó extracción de ADN plasmídico para comprobar la presencia del plásmido pFN-LysK, la extracción se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnbom (1983) previamente descrito. Las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% a 110 volteos durante 20 minutos y el gel fue teñido con bromuro de etidio y se observó en luz UV con ayuda de un transiluminador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems) para identificar aquellas muestras que tenían plásmidos. Una vez con los plásmidos aislados, estos fueron sometidos a digestión enzimática con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI* de la misma forma que se describió anteriormente para el inserto y el vector, digiriendo 1 μ g de plásmido. A los plásmidos que presentaron los fragmentos esperados se les realizó PCR utilizando oligonucleótidos para amplificar el gen de la endolisina LysK cuya secuencia y propiedades se muestran en la tabla 3. Para cada reacción se tomó en cuenta un volumen final de 50 μ l, adicionando a cada tubo eppendorf 50ng de ADN molde. Las condiciones en las que se corrieron las reacciones son las siguientes: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos. 35 ciclos de extensión con un tiempo de 30 segundos a 95°C, para la separación de las hebras de ADN, 30 segundos a 54°C, para el alineamiento de oligos, 1.5 minutos a 72°C para extensión. Y un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. Para confirmar la amplificación del fragmento, los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.7%, el cual fue teñido en una solución de bromuro y fue observado en el transiluminador MiniBis Pro (Bio-Imaging Systems), esperando encontrar un fragmento aproximado de 1500 pb. Aquellas clonas en las que la digestión con enzimas de restricción y amplificación del gen de la endolisina fueron positivas, fueron elegidas para realizar la identificación de la proteína mediante western blot.

6.6. Identificación de la proteína mediante ensayo tipo Western blot

Para la identificación de proteínas, se realizó un extracto lisando cepas de *E. coli* que expresan la proteína LysK, para lo cual, se prepararon cultivos de las clonas seleccionadas en 10 ml de medio LB, los cuales se incubaron a 37°C y 28°C hasta una D.O._{595m} de 0.5, se tomaron 10 ml, 4 ml, 3 ml y 1 ml de cada muestra y estas fueron centrifugadas durante 5 minutos a 12,000 rpm, el sobrenadante se desechó

y el paquete celular se lavó con 2 ml de agua desionizada estéril. El paquete celular se resuspendió en 40 µl de agua desionizada estéril, y se agregaron 20 µl de buffer de carga 3X al 15% de 2 mercaptoetanol. La mezcla se sometió a ebullición a 95°C durante 10 minutos, posteriormente se dejó atemperar y se dio un pulso en la centrifuga, de cada muestra se tomaron 20 µl para el análisis de proteínas.

La separación de las proteínas presentes en la muestra se realizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-SDS al 10% a un voltaje de 80 V durante 2 horas, inmersos en buffer SDS (25mM de tris, 192mM de Glicina y 0.05% SDS). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45µm (Bio-Rad, CA, USA) por la técnica de electro-transferencia en cámara húmeda, con una corriente de 250 mA durante 1h en buffer de transferencia (25mM Trizma base, 192 mM Glicina y 15% de metanol). Una vez realizada la transferencia, la membrana se colocó en solución de bloqueo (BSA (Promega) 5% p/v en TTBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v) y 0.1% de Tween 20 (Promega)) en agitación suave a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se procedió a inmunodetectar la proteína de interés (LysK) en la membrana mediante la exposición al anticuerpo primario (Anti-HaloTag® monoclonal antibody) diluido en TTBS (Tween 20 al 0.1% en TBS) a una dilución 1:1000, en agitación suave a temperatura ambiente durante 2h. Transcurrido el tiempo, la membrana se lavó con agua destilada, TBS (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v), TTBS, dejando 10 minutos cada solución en agitación suave a temperatura ambiente. Después la membrana se incubó en una solución 1:7500 del anticuerpo secundario (Anti-Mouse IgG (H+L)) conjugado a la enzima fosfatasa alcalina en TTBS (Tween 20 al 0.1% en TBS) durante 1h en agitación suave a temperatura ambiente. La membrana se lavó nuevamente con agua destilada, TBS (100mM Tris-HCl pH 7.5, 0.9% NaCl p/v), TTBS (Tween 20 al 0.1% en TBS), dejando 10 minutos cada solución. Finalmente para generar la señal colorimétrica, se agregaron 7.5 ml de sustrato de fosfatasa alcalina (Western Blue® de Promega) y se esperó 1-10 min para observar la señal. La reacción se detuvo eliminando el sustrato y agregando agua destilada.

6.7. Purificación de la endolisina

Para la purificación de la endolisina se utilizó el kit de purificación HaloTag® Protein Purification System, siguiendo el protocolo con algunas modificaciones debido a que la lisis con lisozima o proteasas liberan grupos amino-libres como los que se detectan para medir la actividad enzimática de endolisina.

6.7.1. Obtención del extracto proteico

Se realizó la extracción de proteínas mediante sonicación, para lo cual se inocularon 300 ml de caldo LB con ampicilina (50 µg/ml) con la clona que expresa la endolisina, el cultivo se incubó a 28°C hasta alcanzar una D.O._{595 nm} 0.5, posteriormente, la

células fueron recolectadas por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min, el paquete celular se lavó con agua desionizada estéril y se resuspendió en 10 ml de buffer de purificación Halo Tag adicionado con 10 mg/ml lisozima. Las muestras fueron sonicadas en baño de hielo con pulsos de 1s on/ 1s off durante 2min con una amplitud del 25%. Transcurrido el tiempo de sonicación las muestras fueron centrifugadas a 12,000rpm durante 30min, y el sobrenadante fue congelado hasta su purificación.

6.7.2. Purificación de la endolisina: HaloTag® Protein Purification System

Para la purificación del extracto crudo de proteínas, se tomó un tubo cónico de 15ml en donde se cargaron 4 ml de la resina Halo Link perfectamente mezclada, y se centrifugó durante 5 min a 2,000rpm. El sobrenadante se desechó, y se agregaron 10 ml de amortiguador de purificación Halo Tag al tubo. Nuevamente se centrifugó bajo las mismas condiciones y el sobrenadante se desechó, este paso se repitió dos veces. Una vez que la resina se lavó, se agregó el extracto proteico obtenido por la sonicación, en el cual se encuentra, entre otras proteínas, nuestra proteína de interés. Esta mezcla se dejó en agitación en un rotor durante 1 h a temperatura ambiente, y transcurrido el tiempo, la muestra fue centrifugada durante 5 min a 2,000rpm. El sobrenadante se desechó y la resina se lavó nuevamente con 10 ml de amortiguador de purificación Halo Tag 3 veces. Después de los lavados se agregó 1 ml de solución de escisión y nuevamente se incubó a temperatura ambiente durante 1 hr con agitación. Después de la agitación, la muestra se centrifugó a 3,000rpm durante 5 min, y el sobrenadante se recuperó en otro tubo (en este se encuentra la proteína de interés). A la resina se le agregó 1ml de amortiguador de purificación Halo Tag, nuevamente se centrifugó a 3,000rpm durante 5min y el sobrenadante se mezcló con el sobrenadante anterior. Finalmente, para remover la proteasa TEV, se agregó al sobrenadante 50 µl de resina HisLink, la muestra se incubó durante 20 min en agitación y la muestra se centrifugó a 3,000rpm durante 5 min. El sobrenadante se recuperó, ya que este contiene la proteína ya purificada. La proteína obtenida fue evaluada con un análisis de SDS PAGE y con Western blot.

6.8. Verificación de actividad lítica

La verificación de la actividad lítica se realizó mediante goteo utilizando la endolisina ya purificada, para lo cual, a partir de un cultivo de *S. aureus* en caldo BHI incubado con agitación a 37°C durante toda la noche se tomó un hisopado y se sembró en una placa de agar BHI mediante la técnica de estriado masivo, con el objetivo de obtener un tapete bacteriano uniforme en toda la placa. Posteriormente la placa se dejó secar, y una vez seca se colocaron 30 µl de la endolisina purificada. La placa

se dejó incubar durante 12 hrs a 37°C, y una vez incubada se observó la presencia de lisis en el cultivo de *S. aureus*.

6.9. Actividad enzimática de la endolisina

Para medir la actividad enzimática de la endolisina, se realizó método de Sanger (Navarre *et al*; 1999), este método se basa en medir los grupos amino libres que se generan cuando el peptidoglicano es cortado con enzimas con actividad amidasa, utilizando el reactivo de Sanger (2,4-dinitrofluorobenzeno; DNFB). Como sustrato para la reacción se utilizó pared celular de *S. aureus*, y para calcular la concentración de grupos amino libres presentes en las muestras problema se utilizó una curva estándar de glicina.

6.9.1. Curva estándar de glicina

La concentración de grupos amino libres se calcula en base a una curva de calibración de glicina, para lo cual se prepararon diluciones de glicina de concentración conocida (0.666 mM, 0.333 mM, 0.166 mM, 0.083 mM, 0.041 mM, 0.019 mM), de estas muestras se tomaron 100 µl, a cada muestra se le agregó 100 µl de K₂B₄O₇ al 2% y 20µl de solución DNFB. Las muestras fueron sometidas a calentamiento a 60 °C durante 30 minutos. Finalmente la reacción se detuvo agregando 800 µl de HCl 2N y se midió la absorbancia a 420nm. Los datos obtenidos se graficaron y en base a esta curva se calculó la concentración de grupos amino libres en las muestras problema.

6.9.2. Extracción de pared celular de *S. aureus*

Para la extracción de la pared celular, la cepa *S. aureus* MRI151, susceptible a la endolisina LysK, se creció en medio líquido Soya tripticaseína a una temperatura de 37°C hasta la fase estacionaria. El cultivo se sometió a centrifugación durante 25 minutos a 8,000 rpm, el sedimento se suspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, y las células se lisaron con ayuda de perlas de vidrio y vortex. Las paredes celulares obtenidas por la lisis celular se sedimentaron mediante ultra centrifugación (10,000 rpm durante 20 min) y se suspendieron en 20 ml de una solución de SDS al 1%, esta suspensión se hirvió durante 30 min. Las paredes celulares obtenidas se sedimentaron por centrifugación a 10,000 rpm por 20 min, se lavaron con agua, y finalmente se dejaron secar.

6.9.3. Digestión de la pared celular

Para la digestión con la endolisina, las paredes celulares estafilocócicas se resuspenden en agua (20 mg / ml) para obtener una solución madre. En cada tubo de reacción, se mezclaron 400 µl de la suspensión de pared con 400 µl de NaH₂PO₄ 100 mM, pH 7.5 y 100 µl de NaCl 0.5 M para dar una D.O.₅₉₅ inicial de 1.1. Se añadieron 100 µl de la endolisina, y se dejó en digestión durante 24hrs (tomando alícuotas a las 4, 8, 12 y 24 hrs). El material insoluble fue eliminado por centrifugación durante 20 minutos a 3,000 rpm, y el material soluble se transfirió a otro tubo, para medir la concentración de grupos amino libres.

6.9.4. Actividad enzimática de la endolisina

Para la medición de la actividad enzimática se tomaron 200 µl del material insoluble de la pared celular tratada. A cada tubo se agregaron 200µl de K₂B₄O₇ al 2% y 40µl de solución DNFB (130µl en DNFB en 10 ml de etanol), se mezcló y se calentó a 60 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo agregando 1600µl de HCl 2N. Finalmente se midió el cambio de absorbancia a 420nm.

VII. RESULTADOS

7.1. Secuenciación y análisis de la secuencia del gen de la endolisina

Se realizó la secuenciación del extremo 3' del gen de las endolisinas, una vez con las secuencias pertenecientes a este extremo, se procedió a alinear las secuencias con las correspondientes al extremo 5' que ya se tenían, se ensamblaron y se realizó el análisis de las secuencias, para este análisis, las secuencias se compararon con la secuencia de la endolisina LysK, ya que se encontró que nuestras endolisinas son homólogas de esta. Este análisis de secuencias se realizó debido a que algunos autores han demostrado que el dominio del extremo C-terminal es el que se une a la pared celular de la bacteria, por lo tanto se pensó, que este dominio de unión podría contribuir al reconocimiento del peptidoglicano y a la especificidad a la endolisina. De ser así, la especificidad debería estar dada por polimorfismos en este dominio. En base a los polimorfismos que se encontraran se pretendía seleccionar la(s) endolisina(s) a expresar, sin embargo, después del análisis de secuencias no se encontraron diferencias significativas en las secuencias del extremo C terminal (Fig 5a, 5b), por lo tanto, se decidió utilizar la secuencia de la endolisina LysK, previamente reportada (O'Flaherty *et al.*, 2004). Dentro de las secuencias de endolisinas, se encontraron polimorfismos en las posiciones 113 (Q/E), 305 y 306 (TA/SI), 372 y 373 (DK/SN), 405 (Q/H), 406 (Y/F), 414 (N/S) 479 (Q/S/W) respecto a la secuencia del gen de LysK. Estos polimorfismos aparentemente no se encuentran en posiciones involucradas en la

7.2. Búsqueda bibliográfica para el diseño del vector de expresión

Para la selección del vector se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva, con el objetivo de encontrar un vector que cumpliera con ciertas características, que tuviera: 1) un origen de replicación para bacterias Gram-negativas con el fin de manipularlo en *Escherichia coli*; 2) un origen de replicación para Gram-positivos (bacterias ácido lácticas) para su aplicación en el campo de la biotecnología (vector tipo shuttle), 3) que contara con la presencia de genes marcadores de selección que permitan la selección de los transformantes (Gram positivos y negativos); 4) que el vector estuviera bajo el control de un promotor inducible que permitiera elegir el momento en que se inicia la expresión de la endolisina; 5) que este inductor que encienda la expresión, fuera accesible y de bajo costo, y 6) que contara con la presencia de un péptido señal que permita la posterior secreción de la endolisina. Se encontraron los plásmidos descritos en la Tabla 5, sin embargo no fue posible conseguirlos ya que aparentemente están en proceso de patente, por lo que se procedió a diseñar un vector que contara con todos los elementos necesarios para que se adaptara a nuestras necesidades. Para ello se diseñó el plásmido pCipSpHLysKNae (Fig.6) el cual fue enviado a sintetizar a la empresa Genscript, y los elementos que lo componen se muestran en las Tablas 6 y 7.

Plásmido	Autor	Características
<i>pLp_3050sNucA-sh71</i>	Mhatiessen, <i>et al.</i> ; 2009	Plásmido que se replica en BAL, inducible por la presencia de un péptido inductor.
Plásmido pNZC	Geldart, <i>et al.</i> 2015	Plásmido que se replica en BAL con un promotor inducible con NaCl

Tabla 5. Comparación entre los plásmidos considerados para la expresión de la endolisina.

Este plásmido posee un cassette de expresión inducible con NaCl 0.3 M (Fig.7), el cual consiste en el promotor *PgadR*, que controla la expresión del gen *gadR*, el cual codifica a la proteína GadR, un regulador que en presencia NaCl 0.3 M activa la transcripción del promotor *Pgad*, el cual, a su vez, controla la expresión de nuestra proteína fusión. Cuenta además con un origen de replicación para bacterias ácido lácticas y un origen de replicación para Gram-negativos.

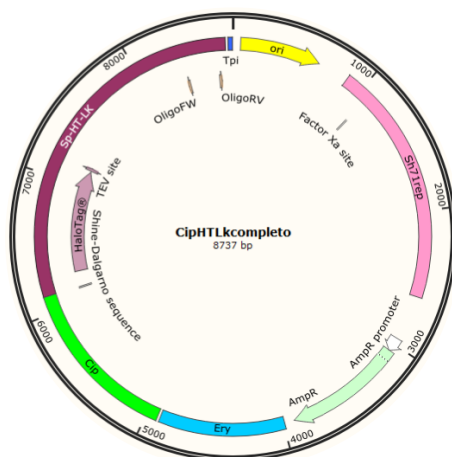


Fig.6. Plásmido pCipSpHLysKNae.

Tabla 6. Elementos del vector de expresión.

Vector de expresión			
Componente	Función	Origen	Referencia
Ori	Origen de replicación <i>E. coli</i>	<i>pBR322</i>	<i>Sutcliffe et al., 1978</i>
Sh71Rep	Origen de replicación BAL	<i>pLp3050sNucA-SH7</i>	<i>Karlskas et al., 2014</i>
bla (ampR)	Cassette de resistencia a Ampicilina	<i>pScaf-2268</i>	<i>Nafisi et al., 2018</i>
ery	Cassette de resistencia a Eritromicina	<i>pUCYIT356N</i>	<i>Kushiro et al., 2003</i>

Tabla 7. Elementos del cassette de expresión inducible con NaCl.

Cassette de expresión			
Elemento	Función	Origen	Referencia
PgadR	Promotor de la proteína reguladora GadR	<i>pNZc</i>	<i>Geldart et al., 2015</i>
gadR	Gen que codifica para proteína reguladora GadR	<i>pNZc</i>	<i>Geldart et al., 2015</i>
Pgad	Promotor inducible por cloruro de sodio	<i>pNZc</i>	<i>Geldart et al., 2015</i>
SP	Secuencia que codifica para el péptido señal	<i>pLp3050sNucA-SH7</i>	<i>Karlskas et al., 2014</i>
HaloTag	Secuencia que codifica para el péptido etiqueta HaloTag	Sistema de purificación HaloTag	Promega
lysk	Gen que codifica para la endolisina LysK	Bacteriófago K	<i>O'Flaherty et al., 2004</i>
tpi	Terminador de la transcripción	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Davidson et al., 1994</i>

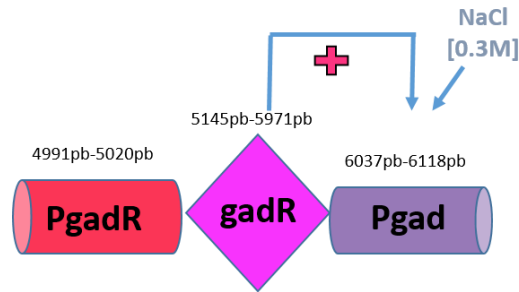


Fig.7. Cassete de expresión inducible con NaCl 0.3M y elementos que lo conforman.

Para el diseño del vector se cuidó que todos sus elementos estuvieran en fase (Fig. 8), esto con el objetivo de garantizar que la expresión de la endolisina fuera exitosa.

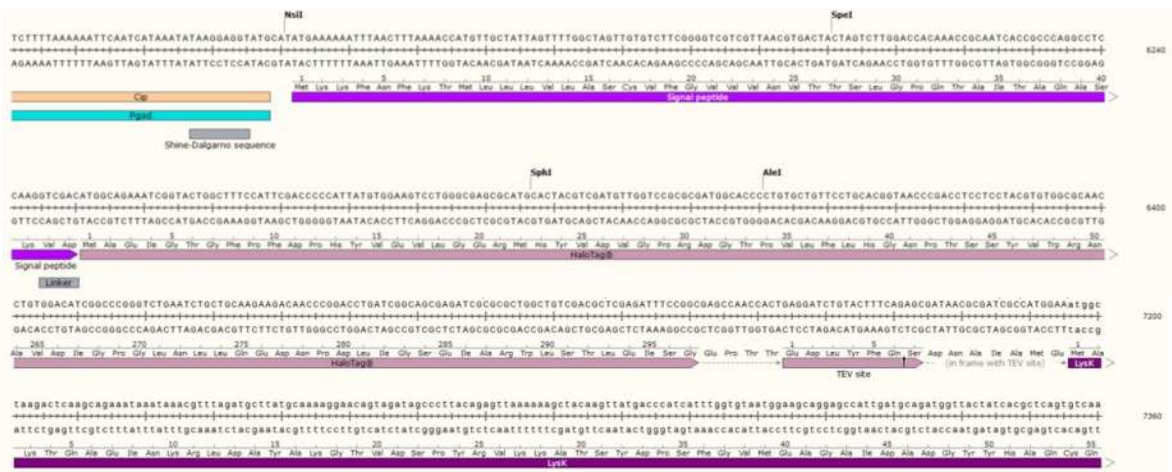


Fig.8. Secuencia de algunos elementos del plásmido pCipSpHLysKNae. En la imagen se observa que todos los elementos se encuentran en fase.

7.3. Verificación de Plásmido pCipSpHLysKNae

Una vez que el plásmido fue enviado por la empresa Genscript y se recibió en nuestro laboratorio, procedimos a comprobar que el plásmido recibido fuera el plásmido solicitado, páralo cual se realizó primeramente, una electroforesis del plásmido para comprobar que el peso molecular de este fuera el mismo del plásmido diseñado (Fig. 9).

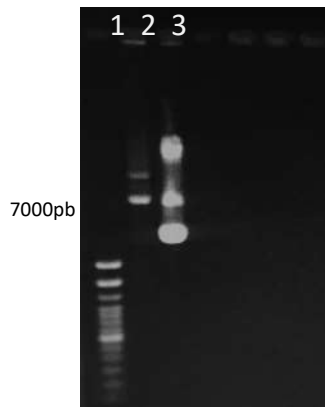


Fig. 9. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Plásmido pCipSpHLysKNae, carril 3: Plásmido control.

Además, como parte del certificado de calidad, la empresa realiza la secuenciación del plásmido diseñado y envía la secuencia obtenida, la cual fue comparada realizando un alineamiento con nuestra secuencia en el programa Mega, encontrando que toda la secuencia coincidía con la diseñada por nosotros (Fig. 10).

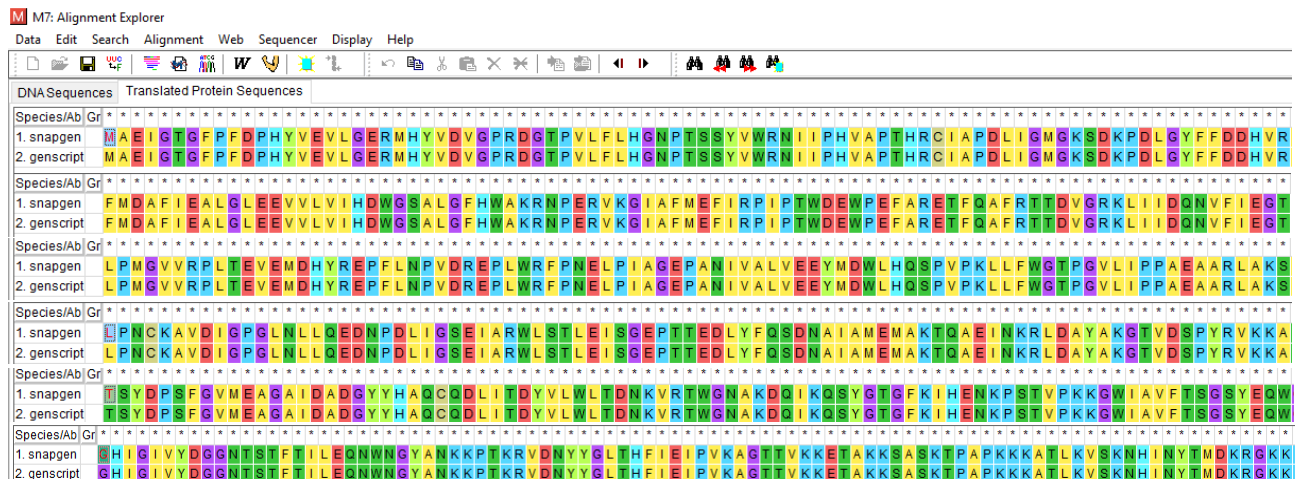


Fig. 10. Verificación de Plásmido pCipSpHLysKNae. Alineamiento de secuencias con el algoritmo MUSCEL (Mega 7).

7.4. Transformación en *E. coli*

Una vez que se comprobó que el plásmido recibido correspondía con la secuencia solicitada, se procedió a introducirlo en la cepa de *E. coli* XL1Blue (Strategene; *recA1*

endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F *proAB lacIqZΔM15 Tn10* (Tet^r)], esto mediante la técnica de electroporación utilizando el electroporador Ecoli Pulser (BioRad). Una vez que se lograron obtener colonias que corresponden a las posibles transformantes en el medio de selección (Fig. 11), se tomaron algunas de estas colonias y se inocularon en medio liquido LB con ampicilina 50 µg/ml y a partir de este cultivo se realizó la extracción del plásmido para comprobar que este estuviera presente.

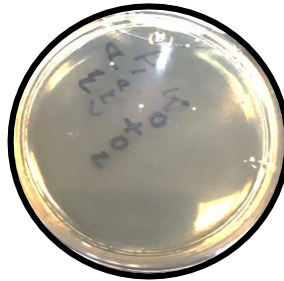


Fig. 11. Colonias obtenidas en agar Lb Amp 50 ug/ml, tras electroporar.

Una vez que se realizó la electroforesis en gel de agarosa se observaron bandas con el tamaño esperado (Fig. 12).

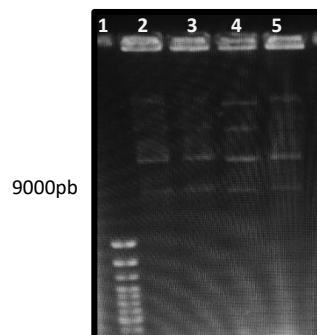


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: marcador de peso molecular, plásmido pCipSpHLysKNae extraído de cepas transformadas TpLysK1, TpLysK2, TpLysK3, TpLysK4 (carril No. 2-5).

Para verificar que el plásmido obtenido se trataba realmente del plásmido pCipSpHLysKNae se procedió a realizar la digestión enzimática con la enzima SmaI, sabiendo que nuestro plásmido cuenta con dos sitios de restricción de dicha enzima (Fig. 13a), y al realizar la digestión se obtuvieron los dos fragmentos

esperados, uno de 7039 pb y 1698 pb (Fig. 13b) confirmando con esto, que efectivamente se trataba de nuestro plásmido.

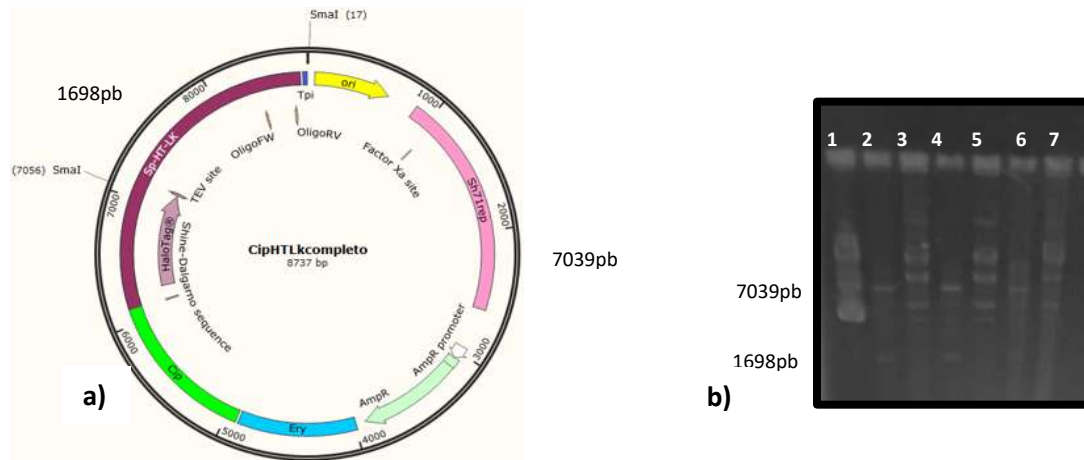


Fig.13. a) Plásmido pCipSpHLysKNae y sitios de corte *SmaI*. b) Electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCipSpHLLyskNae. Carril 1: Plásmido control. Carril 3, 5 y 7 plásmido pCipSpHLysKNae extraído de TpLysK1, TpLysK2, TpLysK3. Carril 2, 4 y 6 TpLysK1, TpLysK2, TpLysK3 digeridos con *SmaI*.

Se diseñaron además un par de oligonucleotidos PS-HT, los cuales amplifican un fragmento dentro del plásmido pCipSpHLysKNae que corresponde a la zona del péptido señal y a la etiqueta de Halo Tag (Fig. 14a), y al realizar la amplificación mediante PCR y correr la electroforesis en gel de agarosa, se logró observar el fragmento esperado de 879 pb (Fig. 14b). Con lo que se confirmó que los plásmidos extraídos corresponden al plásmido pCipSpHLysKNae.

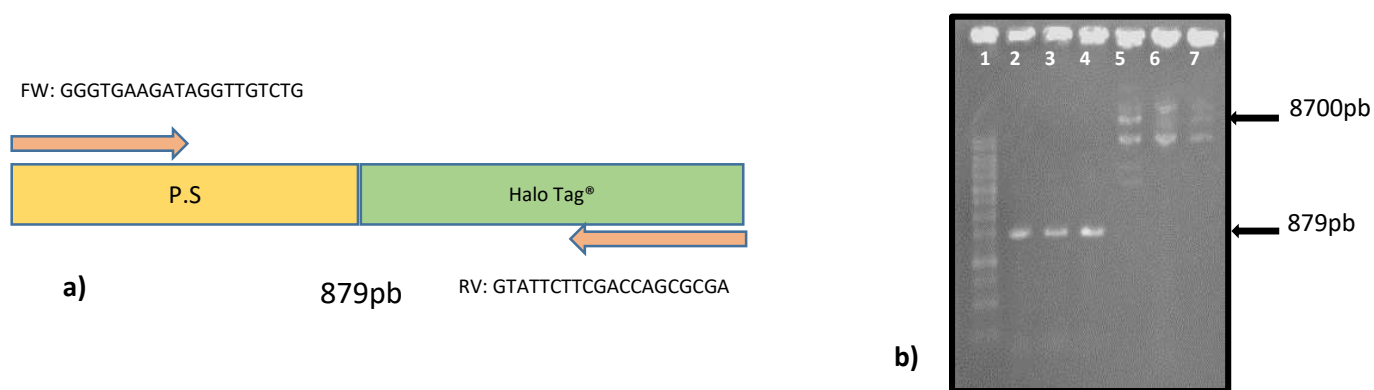


Fig. 14. a) Esquema del fragmento PS-HT. Sentido y secuencia de los oligonucleotidos para su amplificación. **b) Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de la amplificación del fragmento PS-HT.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2,3 y 4 producto de PCR de plásmidos pCipSpHLysKNae extraídos de las clonas TpLysK1, TpLysK2, TpLysK3. Carril 4, 5 y 6 plásmido pCipSpHLysKNae extraídos de las clonas TpLysK1, TpLysK2, TpLysK3.

7.5. Transformación en bacterias ácido lácticas (BAL)

Una vez que se confirmó la identidad de los plásmidos aislados, se procedió a realizar la transformación de las bacterias ácido lácticas con el plásmido pCipSpHLysKNae. A pesar de que en la literatura ya se han reportado varios protocolos para la transformación de *L. acidophilus*, en donde se logra introducir ADN exógeno con éxito, como es el caso de Palomino *et al.*, (2010) en donde lograron introducir plásmidos de diferentes tamaños y orígenes de replicación en diferentes especies de *Lactobacillus*, obteniendo una eficiencia de transformación mayor a 10^5 transformantes por microgramo de ADN plasmídico, en el presente trabajo no logramos obtener transformantes en donde se pudiera demostrar la presencia del plásmido pCipSpHLysKNae.

Inicialmente se realizaron electroporaciones siguiendo algunos protocolos citados en la literatura con algunas modificaciones, utilizando diferentes medios, diferentes voltajes, tiempos del pulso. Ante la posibilidad de que los patrones de metilación diferentes en *E. coli* XL-1Blue y *Lactobacillus acidophilus* pudieran impedir la transformación en esta última, se utilizó ADN metilado, así como ADN no metilado proveniente de una cepa de *Escherichia coli* deficiente en metilación dam-/dcm- (New England Biolabs). Se utilizaron diferentes cepas de BAL, entre otras condiciones (las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 8), y a pesar de que en algunos eventos de electroporación se observó el crecimiento de algunas colonias, al realizar la extracción del ADN plasmídico no se identificó nuestro plásmido, se realizó además PCR para identificar el gen de la endolisina, y no se

observó ninguna banda al realizar la electroforesis en gel de agarosa (Fig 15a, b y c).

Tabla 8. Condiciones utilizadas en diferentes eventos de electroporación. Electroporador: Ecoli Pulser (BioRad) / ECM™ 830 (BTX).

Autor	Medios de cultivo para bacterias competentes:	Solución de lavado para bacterias competentes:	Volts/tiempo:	Medio de cultivo para recuperación:	Tiempo de incubación para recuperación:	Concentración de ADN:	ADN	BAL utilizadas
Natori <i>et al.</i> , 1990	MRS	Tris-HCl 8mM- Sacarosa 0.4M	500V/10ms 500V/100ms 500V/100µs 1500V/100µs 2000V/150µs	MRS	2h	1µg	Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>
Aukrust <i>et al.</i> , 1995	MRS-Glicina 2%	Sacarosa 952mM- MgCl ₂ 3.5mM	500V/10ms 1500V/200µs	MRS-Sacarosa 0.5M- MgCl ₂ 0.1M	3h	1µg	Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>
Sanoja <i>et al.</i> , 1999	MRS-Glicina 1%	Glicerol 15%	2500V/120µs	MRS	3h	0.1µg	Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>
Serror <i>et al.</i> , 2002	MRS	Sacarosa 0.4M- MgCl ₂ 1mM- KH ₂ PO ₄ 5mM	2500V/120µs	MRS	3h	1µg	Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i>
Palomino <i>et al.</i> , 2010	MRS-NaCl 0.9M	H ₂ O Desionizada esteril	900V/300µs 2400V/125µs	MRS	4h	0.1µg, 0.5 µg, 1µg	No Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>E. faecium</i>
Kathiriya <i>et al.</i> , 2019	MRS-Glicina 1%-Sacarosa 0.5M	KH ₂ PO ₄ 5mM- MgCl ₂ 2mM- Glicerol 10%- Sacarosa 0.3M	900V/300µs 2400V/125µs	MRS-Sacarosa 0.5M- MgCl ₂ 0.1M	2.5h	1µg	Metilado	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. casei</i>

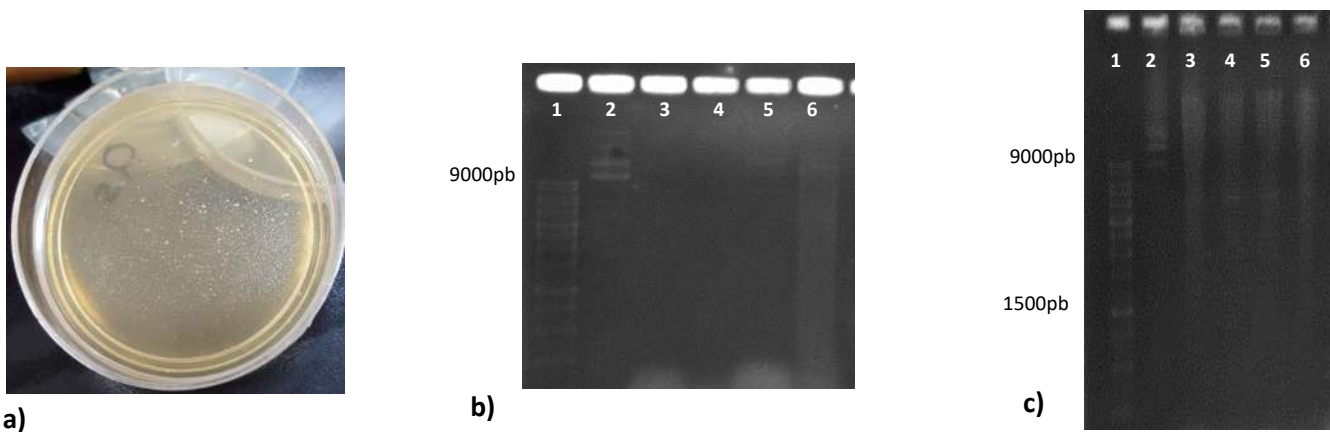


Fig. 15. a) Crecimiento bacteriano de BAL en agar MRS/Ery 5µ después de electroporar. b) Electroforesis en gel de agarosa de ADN plasmídico. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Plásmido pCipSpHLysKNae control. Carril 3, 4,5 y 6: Extracción de ADN plasmídico BAL. **C) Electroforesis en gel de agarosa.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Plásmido pCipSpHLysKNae control. Carril 3, 4,5 y 6: producto de PCR BAL. Tamaño esperado: 1500pb.

Estos eventos de electroporación se realizaron utilizando el electroporador Ecoli Pulser (BioRad) y el electroporador ECM™ 830 (BTX), sin embargo en estos dos electroporadores no es posible programar las condiciones citadas por la literatura (voltajes bajos/ resistencia alta/ tiempos largos), a lo que se atribuyó la falta de transformantes.

Con el objetivo de solucionar dicha limitante, se realizó una estancia en el Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), en donde cuentan con dos electroporadores en los que se pueden programar pulsos a voltajes bajos y resistencia alta, los cuales, según la literatura, son cruciales para una transformación exitosa, dichos electroporadores son el ECM™ 630 (BTX) y el Gene Pulser Xcell (BioRad). Estos dos electroporadores fueron utilizados para electroporar diferentes especies de *Lactobacillus*, siguiendo 3 protocolos de los ya utilizados anteriormente (Palomino *et al.* 2010; Kahiriya *et al.* 2019; y Sanoja *et al.* 1999). Las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 9.

Estos tres protocolos fueron elegidos debido a que según los autores presentan mayores eficiencias de transformación. Cabe mencionar, que como se muestra en la tabla 9, dentro de las principales diferencias entre cada uno de estos protocolos es el medio de cultivo para la preparación de células electrocompetentes y la solución de lavado para las células. Sin embargo, al intentar seguir estos protocolos como lo indican los autores, en el caso de Kahiriya *et al.* (2019) y Sanoja *et al.* (1999), al electroporar se generó arco eléctrico, lo cual se observó con la generación

de chispas al momento de dar el pulso, esto debido a que ambos autores utilizan sales en la solución de lavado de las células, por lo tanto, se decidió utilizar el medio de cultivo para la preparación de células electrocompetentes como lo indican los autores, y lavar las células únicamente con agua desionizada esteril, como lo indica el protocolo de Palomino *et al.*, 2010, con lo que se pudo dar los pulsos eléctricos sin inconvenientes.

Tabla 9. Condiciones utilizadas en diferentes eventos de electroporación. Los electroporadores utilizados fueron el Gene Pulser Xcell (BioRad) y el ECM™ 630 (BTX).

Medio de cultivo para preparación de células electrocompetentes	Cepa	Voltaje (KV)/ Resistencia (Ω)	Electroporador
Palomino <i>et al.</i> , 2010	<i>L. acidophilus</i> <i>L. paraplantarum</i>	2.5kV/200 Ω 2.4kV/400 Ω 1.7kV/200 Ω 1.4kV/600 Ω 1.25kV/100 Ω 1kV/800 Ω	ECM™ 630 (BTX) Gene Pulser Xcell (BioRad)
Kahiriya <i>et al.</i> , 2019	<i>L. acidophilus</i> <i>L. paraplantarum</i>	2.5kV/200 Ω 2.4kV/400 Ω 1.7kV/200 Ω 1.4kV/600 Ω 1.25kV/100 Ω 1kV/800 Ω	ECM™ 630 (BTX) Gene Pulser Xcell (BioRad)
Sanoja <i>et al.</i> , 1999	<i>L. acidophilus</i> <i>L. paraplantarum</i>	2.5kV/200 Ω 2.4kV/400 Ω 1.7V/200 Ω 1.4kV/600 Ω 1.25kV/100 Ω 1kV/800 Ω	ECM™ 630 (BTX) Gene Pulser Xcell (BioRad)

Tras los eventos de electroporación, las células electroporadas fueron plaqueadas en agar MRS suplementado con eritromicina 5 µg/ml e incubadas durante 5 días en microaerobiosis, tiempo tras el cual se logró observar el crecimiento de posibles transformantes (Fig. 16).

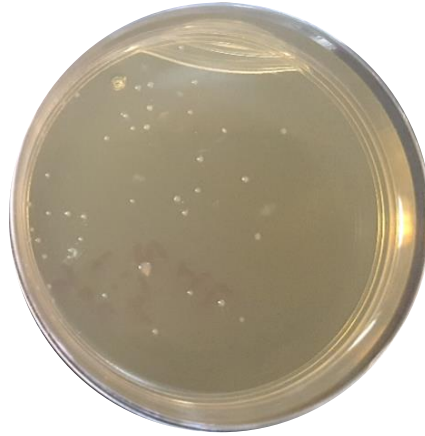


Fig. 16. Crecimiento de *L. acidophilus* en agar MRS/Eritromicina 5µg/ml tras electroporar con plásmido.

A estas posibles transformantes se les realizó extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina, y tras correr una electroforesis en gel de agarosa y teñir con bromuro de etidio se pudo observar la presencia de plásmidos en algunas clonas (Fig. 17).

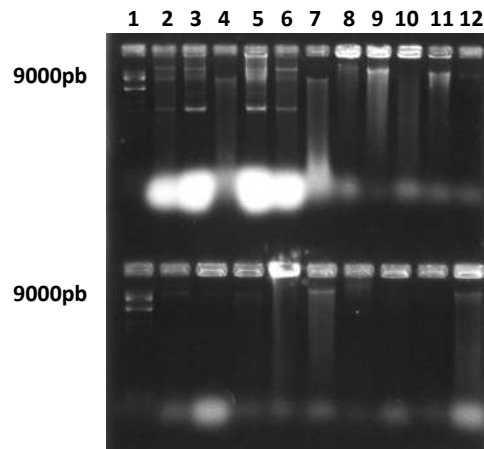


Fig. 17. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción de ADN plasmídico. Carril 1: Plásmido control. Carril 2-12: Transformantes *L. acidophilus*.

Estos plásmidos extraídos de las posibles clonas presentan bandas que corresponden al tamaño esperado (8700pb aproximadamente), por lo que fueron

sometidos a diferentes pruebas para confirmar que la identidad de pCipSpHLysKNae.

Por un lado, se realizó una digestión enzimática utilizando la enzima de restricción *Sma*I, ya que el plásmido pCipSpHLysKNae cuenta con dos sitios de restricción, por lo que se esperaba que tras digerir con la enzima *Sma*I, se generaran dos fragmentos, uno de 7039 pb y uno de 1698 pb, sin embargo, tras la digestión, el plásmido quedó intacto (Fig. 18), lo que significa que los plásmidos extraídos no cuentan con dichos sitios de restricción. En los carriles 6 y 7 se pueden observar dos transformantes sin plásmido que muestran solo el ADN genómico.

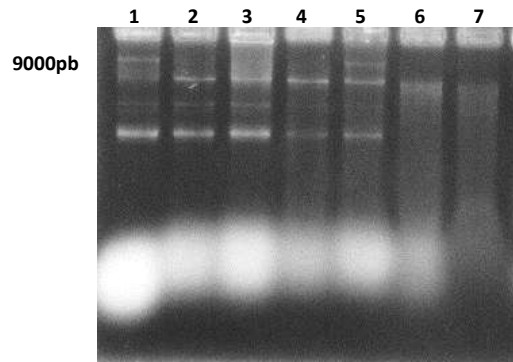


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la digestión con enzimas de restricción (*Sma*I). Carril 1: Plásmido completo. Carril 2-7 plásmido tras digestión con *Sma*I.

Por otro lado, se realizó la amplificación del fragmento que corresponde a la zona del péptido señal y a la etiqueta de HaloTag (fragmento Ps-HT), mediante PCR utilizando los oligos y las condiciones ya mencionadas anteriormente. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 0.7%, el cual fue teñido con bromuro de etidio, y al observarlo en el transiluminador no fue posible observar el fragmento buscado (Fig.19).

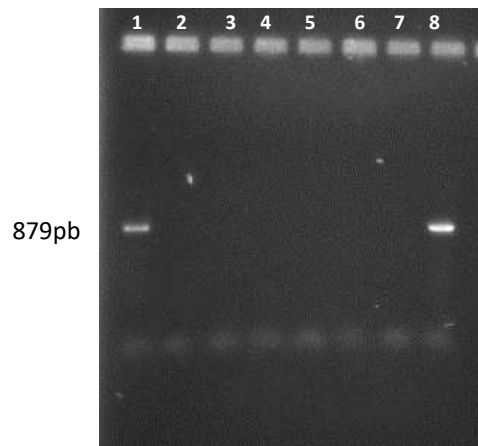


Fig.19. Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% de la amplificación del fragmento PS-HT por PCR. Carril 1 y 8: Plásmido pCIPSpHLysKNae. Carril 2-7: Plásmido extraído de transformantes.

Finalmente, se diseñó un par de oligos para la amplificación del gen de resistencia a eritromicina, (Fig. 20), cuyas propiedades se muestran en la tabla 3. La eritromicina fue el antibiótico elegido como marcador de selección para bacterias gram positivas en el diseño del plásmido pCipSpHLysKNae, por lo que el gen de resistencia a dicho antibiótico debía estar presente en las cepas transformadas con el plásmido pCipSpHLysKNae. Tras realizar la PCR y la electroforesis en gel de agarosa, se pudo observar la amplificación del fragmento del tamaño esperado correspondiente al gen de resistencia a eritromicina en algunas de las clonas, como se puede observar en la Fig. 21 en los carriles 6,7,8 y 9, en donde se observa la presencia de la banda correspondiente a la amplificación por PCR del gen de resistencia a eritromicina con el tamaño esperado de 900pb. Este resultado sugiere que probablemente el plásmido pCipSpHLysKNae si logró introducirse en la bacteria ácido láctica, pero tras un proceso de recombinación se perdieron algunos sitios del plásmido, como el fragmento Ps-HT, el gen *LysK* y la región con los sitios de restricción *SmaI*, que corresponden con la región SpHLysKNae, que contiene desde el péptido señal hasta la región codificante de *lysK*.

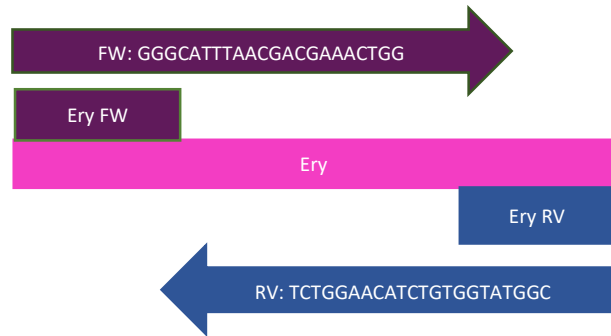


Fig. 20. Esquema del fragmento correspondiente al gen de resistencia a eritromicina. Sentido y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen de resistencia a eritromicina.

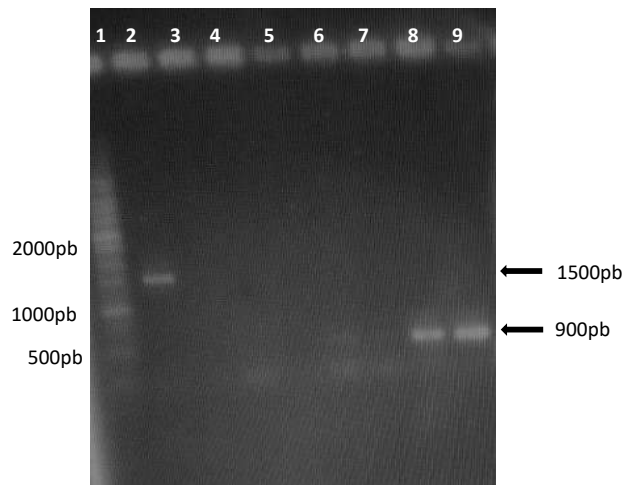


Fig. 21. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Amplificación del gen de endolisina (1500pb). Carril 5: Producto de PCR de la amplificación del gen de resistencia a eritromicina en *L. acidophilus* sin transformar. Carril 6-9: Producto de PCR de la amplificación del gen de resistencia a eritromicina en transformantes de *L. acidophilus*

Debido a que no se logró detectar el gen de LysK en las clonas de bacterias ácido lácticas, y por lo tanto no fue posible expresar a la proteína en este modelo, se decidió cambiarlo por *E. coli*.

Objetivos específicos nuevos:

- Expresar la endolisina LysK contra *Staphylococcus aureus* en *E. coli*
- Evaluar la actividad del lisado de *E. coli* que expresa la endolisina LysK contra diferentes genotipos de *Staphylococcus aureus*
- Medir la actividad enzimática de la endolisina LysK purificada

7.6. Expresión de LysK en *E. coli*

Para la expresión de la endolisina LysK en *E. coli*, se utilizó el vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi®. El vector cuenta con varios sitios de clonación (Fig. 22), de los cuales se seleccionaron PvuI y KpnI para insertar el gen de la endolisina. Como se puede observar en la figura 22, el vector pFN18A HaloTag® T7 cuenta con el gen que codifica para la proteína de la barnasa, una ARNasa bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* la cual, en ausencia de su inhibidor natural (barstar) es tóxica para la bacteria hospedera, funcionando como un marcador de selección positiva. Al digerir con las enzimas de restricción PvuI y KpnI, el gen de la barnasa es liberado y en su lugar se inserta el gen de la endolisina. Al electroporar el plásmido en *E. coli*, solo aquellas clonas que fueron transformadas con el plásmido al que se le eliminó el gen de la barnasa y se le introdujo el gen de la endolisina, crecerán en el medio con el antibiótico, mientras que aquellas clonas que hayan sido transformadas con plásmidos en donde el gen de la barnasa no se eliminó, no sobrevivirán.

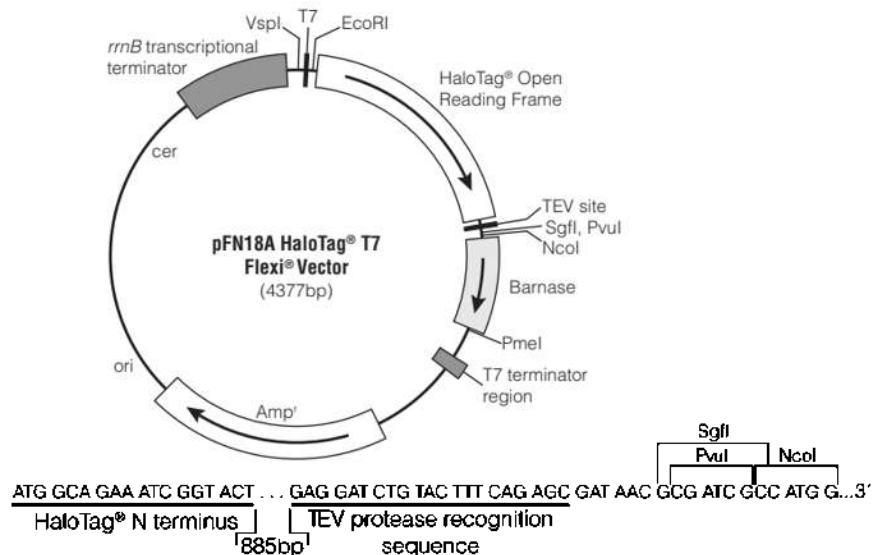


Fig. 22. Mapa de restricción del plásmido pFN18A HaloTag® T7 Flexi®.

7.6.1. Construcción del plásmido Pfn-LysK

Se realizó la digestión enzimática del vector con las enzimas *PvuI* y *KpnI*. Por otro lado, para obtener el fragmento a clonar, se amplificó el gen que codifica para la endolisina LysK mediante la técnica de PCR, utilizando el plásmido pCipLysKNaeI como ADN molde, utilizando las clonas de *E. coli* que contenían este plásmido para realizar la extracción de ADN plasmídico, utilizando aproximadamente 50 ng de ADN para llevar a cabo la reacción. Para la amplificación se diseñaron los oligonucleótidos que amplifican el gen de la endolisina e introducen sitios únicos de restricción *PvuI* (CGATCG) y *KpnI* (GGTACC), en cada uno de los extremos respectivamente, además se introdujeron algunos nucleótidos extras para mantener el marco de lectura abierto de la fusión entre el péptido Halo-Tag y LysK y para permitir la unión de la enzima de restricción al sitio correspondiente (Fig. 23).

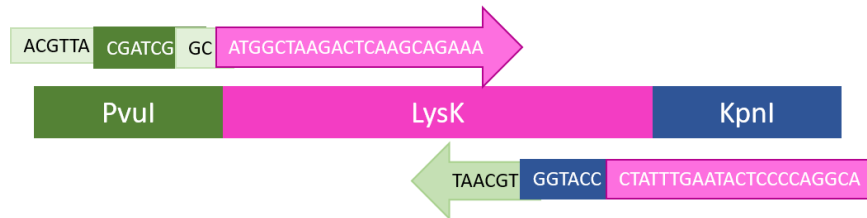


Fig. 23. Esquema del fragmento LysK PvKp y oligonucleótidos diseñados para su amplificación. En color rosa se indican las secuencias del marco de lectura abierta de la endolisina, en verde y azul los sitios de restricción *PvuI* y *KpnI* y en verde claro se muestran los nucleótidos adicionales. Tamaño aproximado del fragmento: 1520pb.

Una vez realizada la PCR, las muestras fueron cargadas en un gel de agarosa al 0.7% el cual se tiñó con bromuro de etidio. Se pudo comprobar que efectivamente, el fragmento había sido amplificado, al observar la presencia de las bandas del tamaño esperado (1500pb aproximadamente) (Fig. 24).

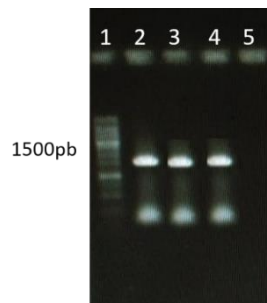


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del gen de endolisina LysK del plásmido pCipSpHLysKNae, con sitios de restricción *PvuI*-*KpnI* (Fragmento LysK PvKp). Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril: 2-4: Productos de PCR derivados de pCipSpHLysKNae.

Una vez que se comprobó la presencia del gen, las muestras se limpiaron con NaCl e isopropanol con el objetivo de eliminar los residuos de oligonucleotidos que pudieran quedar presentes en la muestra y que pueden afectar la digestión con enzimas de restricción. Una vez realizada la limpieza, se corrió una alícuota de 2 μ l en una electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% el cual se tiñó con bromuro de etidio, esto se realizó con el objetivo de comprobar la presencia del gen de la endolisina y que este no se hubiese perdido en los lavados, y comprobar además que los oligonucleotidos no estuvieran presentes en la muestra ya limpia, como se puede observar en la figura 25, en la muestra sin limpiar (carril 1) la presencia de una mancha al final del corrimiento, perteneciente a los oligonucleotidos que no se unieron en el fragmento amplificado, y la muestra limpia, en donde los oligonucleotidos ya no se observan.

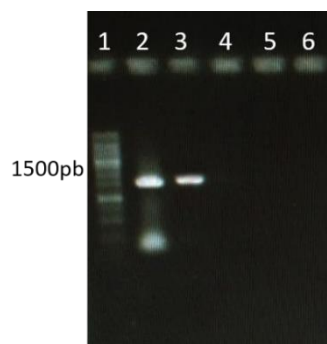


Fig. 25. Electroforesis en gel de agarosa de limpieza de productos de PCR de la amplificación del fragmento LysKPvKp. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Producto de PCR sin limpiar. Carril 3: Producto de PCR después de limpieza.

Una vez limpio el fragmento de la endolisina con sus sitios de restricción, se procedió a realizar la digestión enzimática, tanto del vector como del fragmento. El fragmento y el vector se digirieron de forma separada, tanto el fragmento y el vector fueron digeridos con *Pvu*I y *Kpn*I, y la digestión con cada enzima se realizó en reacciones separadas debido a que cada enzima tiene actividad catalítica en Buffers diferentes por lo que para *Kpn*I se utilizó Buffer NEB1.1 y para *Pvu*I se utilizó NEB3.1. Una vez hechas las digestiones, se corrió nuevamente un gel de agarosa al 0.7%, el cual se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz U.V en un trans iluminador, para comprobar la presencia de los fragmentos digeridos. Como se puede observar en la figura 26, en donde en el carril 2 presenta el fragmento del gen de la endolisina ya digerido, en donde el tamaño no varía mucho al fragmento sin digerir, ya que son solo algunos nucleótidos los que se pierden tras la digestión. Por otro lado, en el carril 3 se observa el vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® digerido, en el cual se observan dos bandas, una perteneciente al vector (4000 pb) y otra que corresponde al gen de la barnasa que fue liberado tras la digestión (335 pb). Con este resultado se procedió a realizar la ligación.

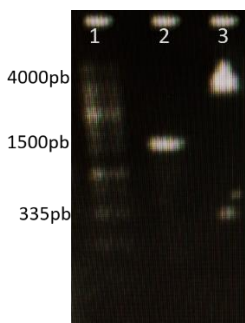


Fig. 26. Electroforesis en gel de agarosa de limpieza de productos de PCR de la amplificación del fragmento LysK PvKp. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Producto de PCR sin limpiar. Carril 3: Producto de PCR después de limpieza.

7.6.2. Electroporación en cepas de *E. coli*

Se realizó la reacción de ligación del vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® con el inserto LysK KpnI-PvuI, agregando un exceso molar de 3:1 y 5:1 de inserto, y posteriormente se realizó la electroporación en cepas de *E. coli* utilizando las dos reacciones, encontrando que en ambas se observaban transformantes y el número de colonias era similar (20 colonias en la reacción 3:1 y 17 colonias para la reacción 5:1). De las transformantes se seleccionaron algunas colonias, a las cuales se les realizó extracción de ADN plasmídico y se verificó la presencia del plásmido en una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 27).

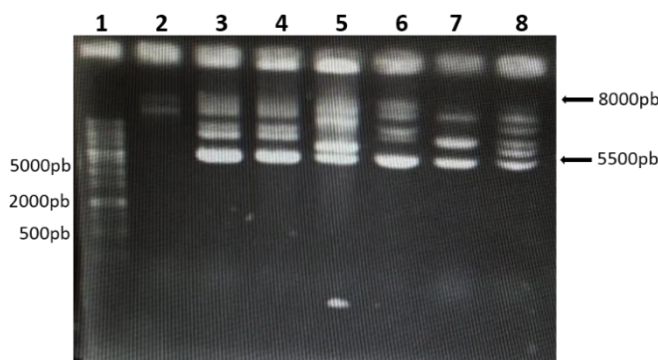


Fig. 27. Electroforesis en gel de agarosa de plásmidos extraídos de las posibles transformantes. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Plásmido Plásmido pCipSpHLysKNae. Carril 3 pfnlysk1. Carril 4 pfnlysk2. Carril 5 pfnlysk3. Carril 6 pfnlysk4. Carril 7 pfnlysk5. Carril 8 pfnlysk6

A las clonas en donde se observó la presencia de plásmido, se les realizó PCR para la búsqueda del gen de la endolisina y comprobar así que el plásmido que se había insertado era el correcto, encontrando 7 clonas en las cuales el gen que codifica para la proteína LysK estaba presente. Como se puede observar en la figura 28, en donde se presentan los productos de PCR de la amplificación del gen LysK en gel

de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio, observando las bandas del tamaño esperado (1400 pb aproximadamente) correspondiente al gen LysK en algunas de las transformantes.

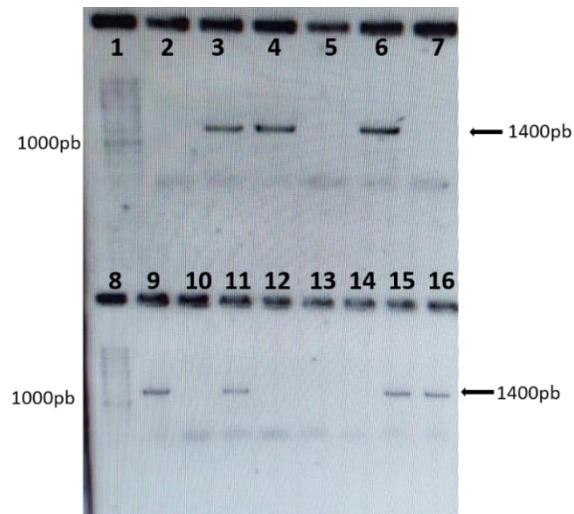


Fig. 28. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR de la amplificación del gen LysK de las probables clonas. Carril 1 y 8: Marcador de peso molecular. Carril 2: pfnlysk1. Carril 3: pfnlysk2. Carril 4: pfnlysk3. Carril 5: pfnlysk4. Carril 6: pfnlysk5. Carril 7: pfnlysk6. Carril 9: pfnlysk7. Carril 10: pfnlysk8. Carril 11: pfnlysk9. Carril 12: pfnlysk10. Carril 13: pfnlysk11. Carril 14: pfnlysk12. Carril 15: pfnlysk13. Carril 16: pfnlysk14.

Para asegurar la identidad de los plásmidos extraídos y que la construcción se hubiese realizado de la forma correcta, se realizó nuevamente la digestión con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI* en los plásmidos que se observó la presencia del gen que codifica para la proteína LysK, al digerir con estas enzimas de restricción, se espera liberar el gen LysK, como se ilustra en la figura 29, en donde se representa como debía quedar nuestra construcción completa, y se observan además los sitios de restricción *PvuI* y *KpnI*, los cuales liberan dar dos fragmentos uno de 1400 pb correspondiente al gen de LysK y otro de 4000 pb aproximadamente.

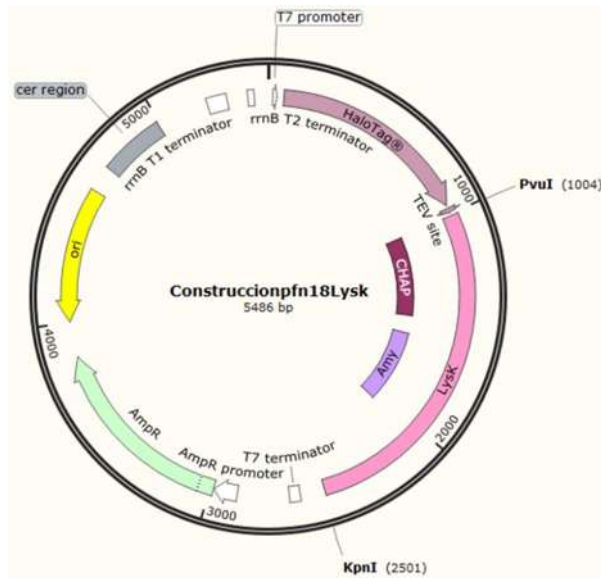


Fig. 29. Sitios de restricción PvuI y KpnI en plásmido pFN-LysK

En la figura 30, se observa la electroforesis en gel de agarosa en donde se presentan los plásmidos completos y en el carril siguiente su respectivo producto de la digestión enzimática, encontrando un tamaño de casi 5500 pb en el plásmido completo, que corresponde al tamaño de la ligación del gen de LysK en pFN18A HaloTag® T7 Flexi®, y como producto de la digestión enzimática se observan dos fragmentos de los tamaños esperado (1400pb y 4000pb).



Fig. 30. Electroforesis en gel de agarosa de digestión con las enzimas de restricción PvuI y KpnI. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: pfnlysk2. Carril 3: pfnlysk2 digerido. Carril 4: pfnlysk3. Carril 5: pfnlysk3 digerido. Carril 6: pfnlysk5. Carril 7: pfnlysk5 digerido. Carril 8: pfnlysk7. Carril 9: pfnlysk7 digerido. Carril 10: pfnlysk13. Carril 11: pfnlysk13 digerido.

Con esto se pudo confirmar que los plásmidos que dieron positivo a la PCR del gen LysK y positivo a la digestión enzimática con sus dos productos de la digestión eran

los plásmidos esperados tras la clonación del gen *LysK* en el vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi®, al cual se le dio el nombre a pFN-LysK.

Una vez que se confirmó la identidad de los plásmidos obtenidos, se realizó la extracción de ADN plasmídico para obtener una mayor concentración, y una vez con suficiente ADN se realizó la electroporación del plásmido pFN-LysK en otras cepas de *E. coli*, utilizando *E. coli* DH5α y *E. coli* SURE2, esto con el objetivo de comparar la expresión de la proteína una vez que se realizara la identificación de esta, mediante western blot, y utilizar la que presentara mejor expresión de proteína.

Además de la construcción del plásmido pFN-LysK, se hizo la construcción de un vector “vacío”, el cual contiene el gen de la etiqueta HaloTag pero esta no viene unida a ninguna otra proteína. Este plásmido se electroporó en *E. coli* DH5α y se utilizó como control negativo. Una vez que se obtuvieron colonias transformantes, se procedió a realizar la extracción de ADN plasmídico, y posteriormente, para comprobar la identidad de los plásmidos extraídos, se realizó la digestión con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI*, sabiendo que estos sitios de restricción fueron eliminados al crear los extremos romos y al momento de ligar, por lo tanto, se esperaba que al realizar la digestión enzimática, el plásmido quedará intacto, tal y como se puede observar en la figura 31, en donde se observa como el plásmido pFN-LysK, al ser digerido con las enzimas de restricción genera dos fragmentos, en cambio, los plásmidos obtenidos de las cepas transformadas con pFNv, tras digerirlos en las enzimas quedan intactos, además se puede observar la diferencia de tamaño entre pFN-LysK y pFNv, debido a que dentro de la secuencia de pFN-LysK se tiene el gen *LysK* y el cual está ausente en pFNv.



Fig. 31. Electroforesis en gel de agarosa de digestión con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI*. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: pfnlyskD3. Carril 3: pfnlyskD3 digerido. Carril 4: pfnvD3. Carril 5: pfnvD3 digerido. Carril 6 pfnvD4. Carril 7: pfnvD4 digerido. Carril 8: pfnvD5. Carril 9: pfnvD5 digerido

7.6.3. Detección de la proteína *LysK*

Una vez que se tuvieron las cepas transformadas con las construcciones, se procedió a realizar la extracción de proteína para posteriormente realizar la detección de la misma mediante ensayos de Western blot con anticuerpos anti-

HaloTag. Para realizar la extracción de proteína se seleccionaron las cepas que habían sido positivas tanto en la PCR del gen LysK como en la digestión con enzimas de restricción PvuI y KpnI, ya fueran cepas de *E.coli* XLI Blue, *E. coli* DH5 α o *E. coli* SURE2, nombrando como pfnlyskX a las transformantes provenientes de *E.coli* XLI Blue, pfnlyskD a las provenientes de *E. coli* DH5 α , y pfnlyskS a las provenientes de *E. coli* SURE2. A las cepas seleccionadas primero se les extrajo proteínas, y el extracto crudo se corrió en gel de acrilamida, con el objetivo de confirmar la presencia de proteínas en nuestro extracto, y una vez que se confirmó la presencia de proteínas en las muestras, como se observa en la figura 32, en un gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie, en donde se pueden identificar las bandas propias de las proteínas presentes en las muestras, se procedió a realizar el western blot para la detección de nuestra proteína de interés mediante el uso de anticuerpos específicos.

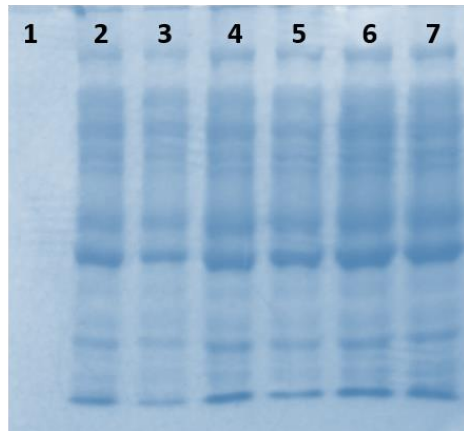


Fig. 32. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida, teñido con azul de Coomassie. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *E.coli* DH5 α sin transformar: Carril 3: pfnvD1. Carril 4: pfnvD2. Carril 5: pfnvD3. Carril 6: pfnvD4 Carril 7: pfnLysKD3.

Para la detección con anticuerpos, la extracción de proteínas se realizó utilizando cultivos bacterianos a una D.O._{595 nm} 0.5 en un volumen de 10 ml. En un primer ensayo, la temperatura de incubación del cultivo fue de 37°C y el volumen total (10 ml) se empastilló, y el paquete celular se lavó con agua desionizada estéril, para posteriormente lisar por ebullición en buffer de carga, sin embargo, bajo estas condiciones se observó la formación de muchas señales inespecíficas al momento de hacer la identificación de la proteína mediante western blot con el anticuerpo anti-HaloTag, además el corrimiento de la proteína no era uniforme y se veía un barrido. Por este motivo, se procedió a reducir el volumen del cultivo a empaquetar, de 10 ml a solo 1ml del volumen total, con lo que se logró mejorar el western blot, observando bandas más definidas (Fig. 33).

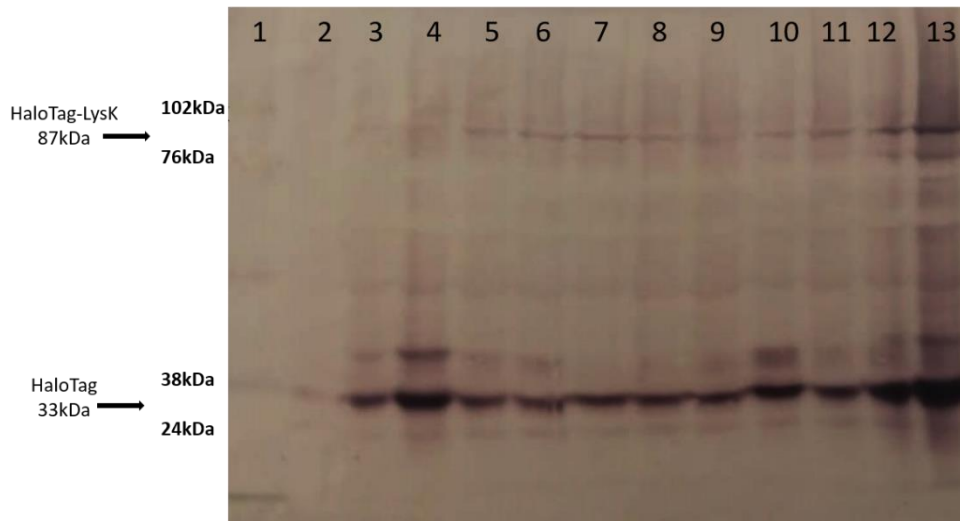


Fig. 33. Western Blot de cepas de *E.coli* lisadas con ebullición. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *E.coli* XLI Blue sin transformar. Carril 3: pfnlyskD2. Carril 4: pfnlyskD3. Carril 5: pfnlyskD5. Carril 6: pfnlyskD7. Carril 7: pfnlyskD13. Carril 8: pfnlyskD14. Carril 9: pfnlyskD15. Carril 10: pfnlyskX1 Carril 11: pfnlyskX2 Carril 12: pfnlyskX3 Carril 13: pfnlyskS1

A pesar de que aún se observaban señales inespecíficas, se lograban observar dos señales muy fuertes, una de un tamaño aproximado de 87 kDa, la cual coincide con el peso de la fusión de la proteína Halo-Tag y nuestra endolisina, y una segunda señal aún más intensa, de aproximadamente 33 kDa, que coincide con el peso del péptido Halo-Tag, lo cual nos lleva a la hipótesis de que en el medio, se encuentra una proteasa que corta la etiqueta de la endolisina, dejando sola a la etiqueta. Con el objetivo de tratar de eliminar las señales que aún se seguían observando, se procedió a realizar un nuevo ensayo, esta vez con las mismas condiciones anteriores, pero incubando a una temperatura de 28°C. Bajo estas condiciones se lograron eliminar las señales inespecíficas, como se puede observar en la figura 34, en donde además, se puede observar en algunos carriles, nuevamente la presencia de dos bandas, la correspondiente a proteína Halo-Tag y la de la endolisina.

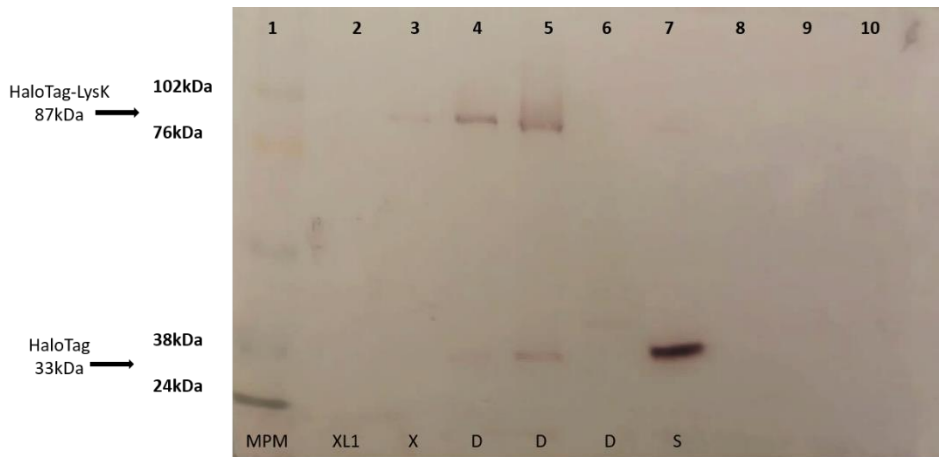


Fig. 34. Western Blot de cepas de *E.coli* con crecimiento a una D.O. 0.5 a 28 °C. Muestras obtenidas concentrando 3ml del cultivo y lisando con ebullición. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *E.coli* XLI Blue sin transformar. Carril 3: pfnlyskX1. Carril 4: pfnlyskD2. Carril 5: pfnlyskD3. Carril 6: pfnlyskD5. Carril 7: pfnlyskS1

Con este ensayo se realizó una comparación de la expresión de la proteína entre cada cepa, ya que se utilizaron extractos proteicos de de *E.coli* XLI Blue, DH5 α y SURE2, y como se puede observar en la figura 34, la intensidad de la señal es diferente entre algunas cepas, como en el carril 3 que corresponde a la clona pfnlyskX1, en donde se ve una señal de intensidad baja, sin embargo es la única banda que se observa, en cambio en los carriles 4 y 5 en donde se encuentran las clonas pfnlyskD2 y pfnlyskD3, que son clonas obtenidas de la transformación de *E.coli* DH5 α , en donde se observa una señal más intensa comparada con la señal de pfnlyskX1, que es una clona derivada de *E.coli* XLI Blue. Sin embargo, en pfnlyskD2 y pfnlyskD3, se puede observar que además de la banda que corresponde a la fusión de la endolisina con la etiqueta de HaloTag, también está presente la banda de la etiqueta, al igual que en el carril número 7, que corresponde a pfnlyskS1, una clona obtenida de la transformación de *E.coli* SURE2. En dicha clona se observa una señal muy intensa en la correspondiente a la etiqueta, y una señal muy ligera en lo que corresponde a la endolisina. Aunque la *E. coli* SURE 2 es una cepa que se recomienda para la expresión de genes heterólogos, parece que contiene una actividad proteolítica que escinde al péptido señal y no permite la detección del péptido de fusión y por tanto la posterior purificación de la endolisina. Con base en estos resultados se decidió continuar trabajando con la clona pfnLysKD3, que muestra una señal fuerte de la fusión endolisina-HaloTag y poca de la etiqueta.

Una vez seleccionada la cepa, se continuó realizando los ensayos de western blot ahora utilizando las clonas transformadas con el vector vacío con el objetivo de incluir un control negativo a los ensayos. Se seleccionaron algunas de las colonias transformadas que contenían el plásmido para realizar la extracción de proteínas y el western blot con estas, para nuevamente identificar si había diferencias en la

expresión entre cada clona. En este caso, que se tenía el vector con la etiqueta y sin la proteína LysK, se esperaba únicamente la señal correspondiente a la etiqueta, de un peso aproximado de 33 kDa, ya que esta no es eliminada al digerir con las enzimas de restricción *PvuI* y *KpnI*. Las condiciones de utilizadas tanto para el crecimiento, extracción de proteínas y western blot, fueron las mismas que se utilizaron para las clonas de pfnlysk. En la figura 35 podemos observar el western blot de los extractos proteicos de las clonas transformadas con el vector vacío (pfnv), en donde se observa, que de 5 clonas probadas, en solo una de estas se ve claramente la señal correspondiente a la etiqueta, que es la clona pfnvD3 (carril 5), como control, en el carril 7 se observa la clona pfnLysKD3, en donde se evidencia la diferencia en el tamaño de las bandas, la de 87 kDa correspondiente a la fusión de la etiqueta y la endolisina presentes en la clona pfnLysKD3, y la de 33 kDa correspondiente únicamente a la etiqueta, presente en la clona pfnvD3.



Fig. 35. Western Blot de cepas de *E.coli* con crecimiento a una D.O. 0.5 a 28 °C. Muestras obtenidas concentrando 3ml del cultivo y lisando por sonicación. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *E.coli* DH5α sin transformar: Carril 3: pfnvD1. Carril 4: pfnvD2. Carril 5: pfnvD3. Carril 6: pfnvD4 Carril 7: pfnLysKD3.

Con estos resultados se demuestra que la endolisina LysK se está expresando en las clonas de *E. coli* transformadas con el plásmido pFN-LysK, y que esta se encuentra unida a la etiqueta de Halo-Tag, lo que hace posible su purificación.

7.6.4. Purificación de LysK

Una vez que se detectó la presencia de la fusión Halotag-LysK, se realizó la purificación de la proteína, con el objetivo de eliminar la etiqueta y dejar a la endolisina sola. Para obtener la endolisina purificada se utilizó el kit de purificación HaloTag® Protein Purification System en el cual se utiliza una resina en donde la etiqueta Halo tag se queda adherida, posteriormente se agrega la TEV proteasa, la

cual corta entre la etiqueta y la proteína, posteriormente se recupera la endolisina ya sin etiqueta. Para comprobar que tras la purificación aun había proteína, que la endolisina era la única proteína presente en la muestra, y que efectivamente, se había eliminado la etiqueta, se procedió a realizar un gel de acrilamida y un wetern blot.

De las cepas que expresan la endolisina LysK se obtuvieron dos extractos de proteínas de manera diferente, uno mediante congelación, y otro sonicando, estos extractos, sin purificar y ya purificados, se cargaron en un gel de poliacrilamida, además, se corrieron como controles negativos, extractos proteicos de la cepa *E. coli* DH5 α sin transformar, y la cepa pfnvD3 (vector vacío), tanto purificados como sin purificar (Fig. 36).

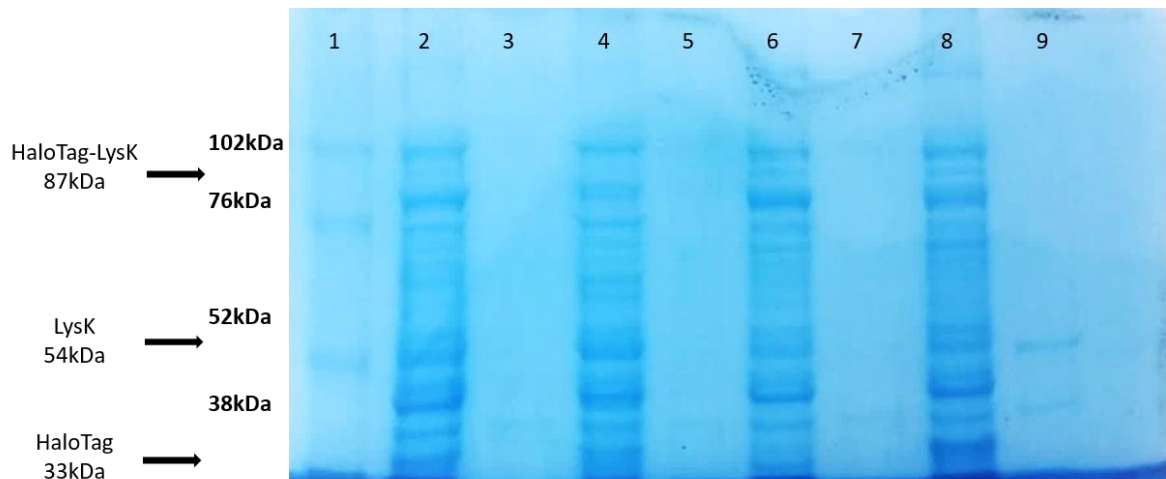


Fig. 36 Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos proteicos (crudos y purificados) extraídos de diferentes cepas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo *E.coli* DH5 α . Carril 3: Extracto purificado *E.coli* DH5 α . Carril 4: Extracto crudo pfnvD3. Carril 5: Extracto purificado pfnvD3. Carril 6: Extracto crudo pfnLysKD3 (lisada por congelación). Carril 7: Extracto purificado pfnLysKD3 (lisada por congelación). Carril 8: Extracto crudo pfnLysKD3 (lisada por sonicación). Carril 9: Extracto purificado pfnLysKD3 (lisada por sonicación).

Como se observa en la Fig. 36 en los carriles que se tienen los extractos crudos (carriles 2, 4, 6 y 8) se pueden observar las bandas correspondientes a las diferentes proteínas presentes en las muestras y en los carriles de extractos proteicos de cepas que no expresan la endolisina no se observa ninguna banda, debido a la ausencia de proteínas (carriles 3 y 5). Por otro lado, a pesar de que en los carriles 7 y 9 se encuentran extractos proteicos purificados de la misma clona pfnLysKD3, en la Fig. 36 se puede observar que en el carril 7 no se observan bandas como producto de la purificación, mientras que en el carril 9 se observa la banda del tamaño esperado (54 kDa) que corresponde al tamaño de LysK sin la etiqueta. Cabe mencionar, que la muestra del carril 7 es el producto de la purificación del extracto crudo de proteínas obtenido mediante congelación,

mientras que la muestra del carril 9, es el producto de la purificación del extracto crudo de proteínas obtenido mediante sonicación. Esto sugiere que la sonicación resulta más eficiente en la lisis de bacterias para la obtención de proteínas.

A estas mismas muestras, se les hizo la transferencia a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western blot (Fig. 37). En este caso, las muestras en las que no se encuentra la etiqueta de HaloTag no dan ninguna señal al momento de revelar, como es el caso de la muestra de *E. coli* DH5 α , tanto sin purificar como purificada (Carril 2 y 3), en el caso de la muestra de pfnvD3, antes de purificar se puede observar la señal propia de la etiqueta (Carril 4), la cual desaparece tras purificar (Carril 5). De igual forma, en la muestra de extracto crudo de pfnLysKD3 obtenido por sonicación (Carril 8), se observa la banda perteneciente a la fusión Halotag-LysK, la cual ya no se observa en la muestra purificada (Carril 9), con lo que se confirma que la etiqueta se queda pegada a la resina de purificación y es eliminada de la muestra una vez purificada, con lo que se puede afirmar que la purificación fue exitosa. Por otro lado, en el carril 6, se esperaba observar la señal correspondiente a la fusión Halotag-LysK, resultado similar al del carril 8, ya que son extractos de la misma muestra, sin embargo, no se observa señal en la muestra pfnLysKD3 lisada por congelación (Carril 6) como se observa en la muestra pfnLysKD3 lisada por sonicación (Carril 8), con este resultado, se confirma, que la lisis mediante congelación para la extracción de proteínas es menos eficiente que la sonicación.

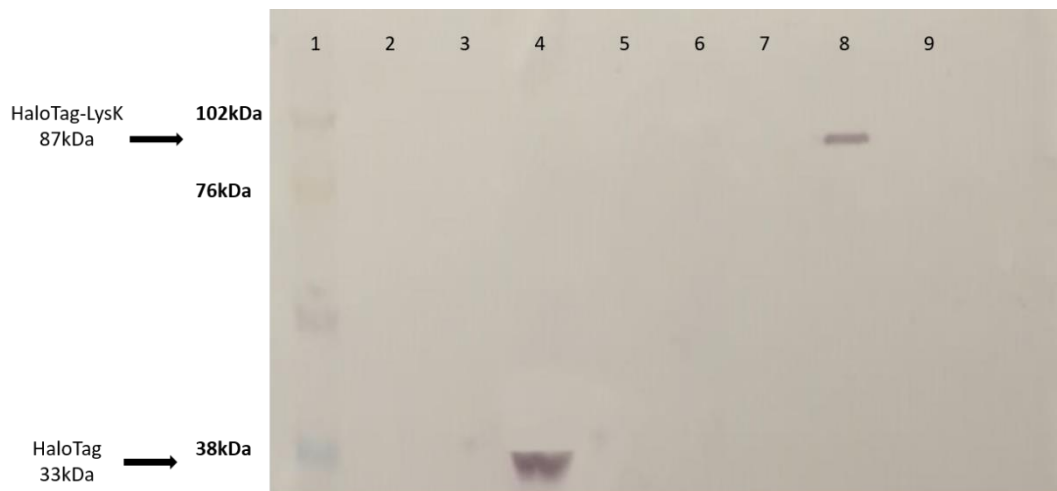


Fig. 37. Western Blot de extractos proteicos (crudos y purificados) extraídos de diferentes cepas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Extracto crudo *E.coli* DH5 α . Carril 3: Extracto purificado *E.coli* DH5 α . Carril 4: Extracto crudo pfnvD3. Carril 5: Extracto purificado pfnvD3. Carril 6: Extracto crudo pfnLysKD3 (lisada por congelación). Carril 7: Extracto purificado pfnLysKD3 (lisada por congelación). Carril 8: Extracto crudo pfnLysKD3 (lisada por sonicación). Carril 9: Extracto purificado pfnLysKD3 (lisada por sonicación).

7.7. Extracción de la pared celular de *S. aureus*

Se realizó la extracción de la pared celular de la cepa *S. aureus* MRI 151 siguiendo el protocolo de Navarre *et al*; (1999), con lo que se obtuvo el sustrato a utilizar para medir la actividad enzimática de la endolisina purificada.

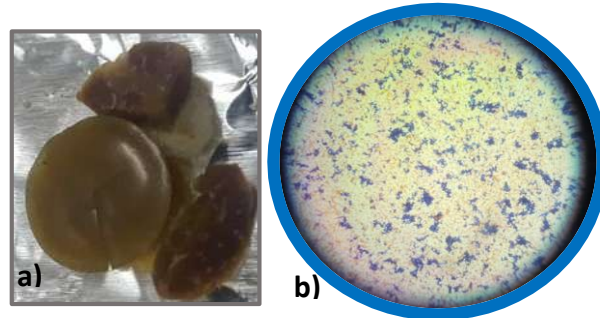


Fig. 38. a) Pared celular *S. aureus* MRI b) Tinción Gram pared celular *S. aureus*

7.8. Curva estándar de glicina

Para poder calcular, mediante el método de Sanger, la concentración de grupos amino libres en nuestras muestras problema, se realizó previamente una curva estándar de glicina. Se utilizaron concentraciones conocidas de glicina (0.666mM, 0.333mM, 0.166mM, 0.083mM, 0.041mM, 0.019mM) y estas fueron tratadas como lo indica el método de Sanger. A las muestras tratadas (Fig.39) se les midió la absorbancia a 420nm, y los resultados obtenidos de la lectura de cada muestra (Tabla 10) fueron graficados colocando en el eje X la concentración mM de cada muestra y en el eje Y la D.O obtenida (Grafica 1) A partir de esta curva y conociendo la D.O.₄₂₀ de nuestras muestras problema, se aplica la ecuación de la línea recta ($X = \frac{Y - 0.0676}{2.0107}$) lo que nos permitirá conocer el valor de X, el cual representa la concentración de grupos amino presentes en la muestra.

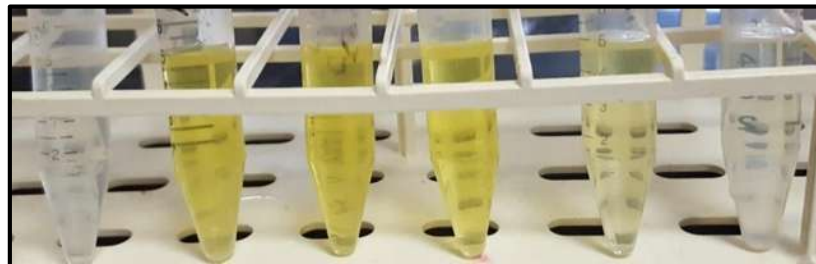
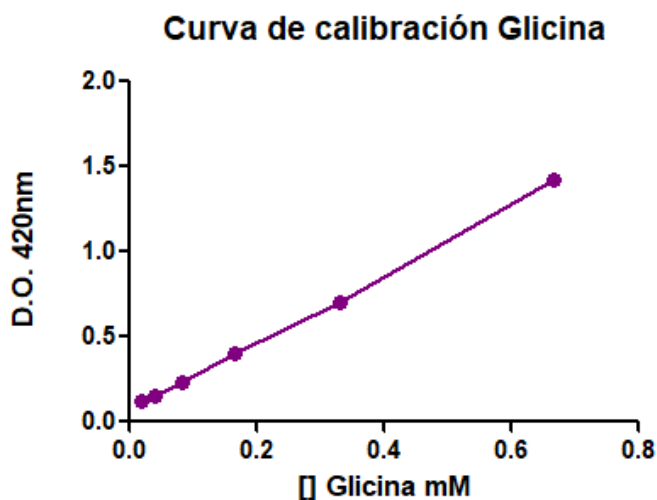


Fig.39. Muestras de diferentes concentraciones de Glicina tratadas con DNFB

Concentración de Glicina mM	D.O. 420nm
0.666	1.423
0.33	0.696
0.166	0.405
0.083	0.23
0.0413	0.156
0.019	0.12

Tabla 10. Concentraciones conocidas de Glicina y su D.O. a 420 nm tratadas con DNFB



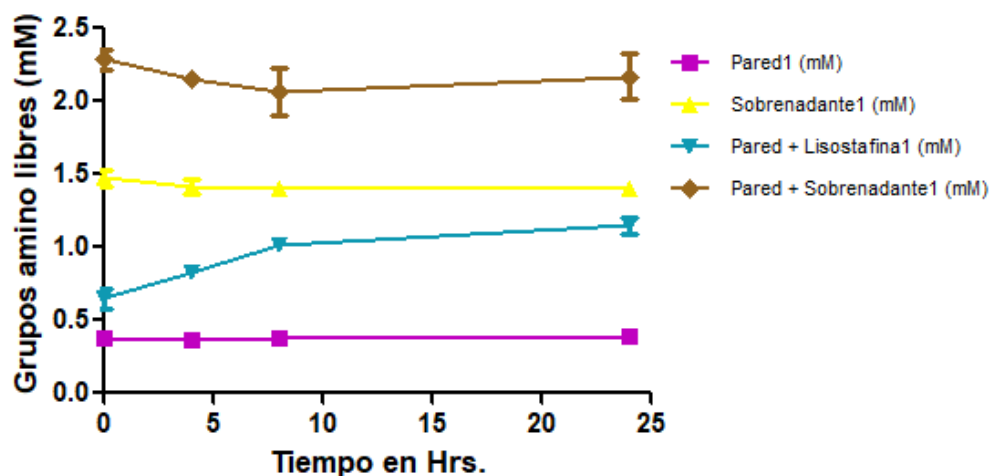
Grafica 1. Curva de calibración de Glicina. Concentraciones conocidas de Glicina (mM) tratadas con DNFB vs D.O. a 420 nm.

7.9. Medición de actividad catalítica: Método de Sanger

Para realizar este ensayo se utilizó la enzima purificada, y como controles se utilizó agua como control negativo y lisostafina como control positivo, ya que es una endopeptidasa de glicil-glicina que corta los enlaces glicina-glicina del puente de pentaglicinas en la pared celular de *S. aureus*, generando la liberación de grupos amino.

Todas las muestras fueron tratadas como lo indica el método de Sanger, y posteriormente se realizó la medición en el espectrofotómetro a 420 nm, tomando lecturas a las 0, 4, 8 y 24hrs, y en base a la lectura observada y a la curva estándar de glicina se calculó la concentración de grupos amino libres en cada muestra. Estos datos fueron graficados para observar cambios de concentración en donde efectivamente, como se esperaba en la muestra tratada con lisostafina fue muy claro el aumento en absorbancia, y por ende, en la concentración de grupos amino

al paso de las horas, mientras que en el resto de las muestras, las lecturas se mantuvieron constantes (Grafica 2). En la muestra tratada con la endolisina purificada, no se observó ningún cambio en la absorbancia, lo cual indica que no hay liberación de grupos aminos debido a la falta de actividad en la enzima.



Grafica 2 Cambio en la concentración de grupos amino libres en diferentes muestras. Tiempo Vs concentración de grupos amino libres.

VIII.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los últimos años se ha observado un incremento creciente en la resistencia a antibióticos por parte de patógenos. Dentro de estos patógenos que han presentado incremento en la resistencia a antimicrobianos encontramos a *S. aureus*, el cual no solo infecta a humanos, sino que también es responsable de infecciones en animales, presentando una serie de mecanismos que le confieren resistencia a una amplia gama de antibióticos. Debido a esto, hoy en día se buscan nuevas alternativas diferentes al uso de antibióticos para combatir infecciones causadas por patógenos resistentes a antibióticos, en este proyecto se sugiere la expresión heteróloga de endolisinas de bacteriófagos para el control de infecciones causadas por *S. aureus*.

Nuestro equipo de trabajo, realizó el aislamiento de bacteriófagos líticos para *S. aureus*, así como la identificación de las endolisinas de estos bacteriófagos aislados, en donde se encontró que las endolisinas presentes en estos bacteriófagos son del tipo LysK, la cual es expresada por el bacteriófago K (Barrera *et al.*, 2015). Una vez identificadas las endolisinas, se realizó el análisis de las secuencias de estas endolisinas, las cuales se compararon con la endolisina LysK, con el objetivo de identificar polimorfismos entre las diferentes secuencias que pudieran estar relacionados con la especificidad de la endolisina, y en base a esto identificar la

mejor endolisina para expresar, sin embargo, en el análisis de secuencias no se encontraron diferencias significativas, además, en base al análisis de las secuencias estos polimorfismos, aparentemente no se encuentran en zonas importantes que pudieran afectar la actividad de la enzima, como lo es el sitio activo, por lo que se eligió trabajar con la endolisina LysK, la cual es una de las endolisinas de bacteriofagos contra *S. aureus* más estudiadas.

Para la expresión de la endolisina LysK, en un inicio se propuso el uso de una bacteria ácido láctica, considerando las ventajas del uso de un probiótico para la expresión de proteínas heterologas sobre el uso de cualquier otra bacteria. Además se consideró que diferentes autores han reportado ya el uso de bacterias ácido lácticas para la expresión de proteínas heterologas como es el caso de Braat *et al.*, 2006, en donde se utilizó *L. lactis* como vehículo para la expresión y aplicación de la interleucina 10 con buenos resultados. Para lograr la expresión de LysK en nuestro probiótico se realizó el diseño de un vector de tipo shuttle para su replicación en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, cuidando todos los elementos del vector, los cuales fueron elegidos tras una búsqueda bibliográfica con el objetivo de garantizar que estos funcionaran, ya que dichos elementos han sido ya utilizados por diferentes autores con resultados exitosos (Sutcliffe *et al.*, 1978, Karlskas *et al.*, 2014, Nafisi *et al.*, 2018, Kushiro *et al.*, 2003, Geldart *et al.*, 2015, O'Flaherty *et al.*, 2004, Davidson *et al.*, 1994).

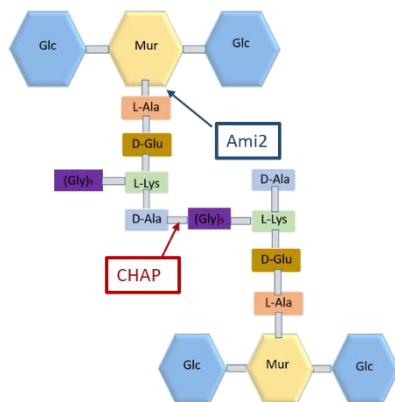
Este vector fue sintetizado en su totalidad por la empresa Genscript, y una vez que se tuvo se introdujo en cepas de *E. coli* en donde se comprobó que el origen de replicación para bacterias Gram-negativas, el gen de resistencia a ampicilina, el péptido señal, la etiqueta de Halo-Tag y el gen que expresa a la endolisina LysK estaban presentes en nuestro vector.

Posteriormente se realizó la electroporación del plásmido en bacterias ácido lácticas en donde se pudo demostrar la presencia del gen de resistencia a eritromicina y el origen de replicación de bacterias Gram-Positivas, dado que las cepas transformantes presentaban un plásmido que no se encontraba originalmente en dichas cepas. Sin embargo no se logró identificar la presencia del gen de la endolisina, ni del péptido señal. Lo anterior nos hace suponer que ocurrieron eventos de recombinación en donde se están eliminando algunos de los elementos introducidos en nuestro vector, sin embargo esto es una teoría basada en los resultados obtenidos, y en la literatura no se encuentra mucha información sobre mecanismos de recombinación en bacterias ácido lácticas.

El promotor *P_{gad}* se reportó como inducible por NaCl en un intervalo de concentraciones de 5 mM a 500 mM, incrementando la expresión a mayor concentración de NaCl (Geldart *et al.*, 2015). El medio MRS no contiene sales de cloro en su formulación, sin embargo contiene extracto de levadura. Para este componente se ha calculado una concentración de iones Cl⁻ del 0.2% (Thompson

et al., 2017). El medio MRS contiene 20 g/l de extracto de levadura, lo cual equivaldría a 0.04 g de ión Cl⁻ o aproximadamente 1 mM del mismo. Es posible que esta cantidad mínima de cloruro fuera suficiente para inducir la expresión de LysK. A pesar de que la estructura de la pared celular de bacterias ácido lácticas (Chapot-Chartier y Kulakauskas, 2014) y de *Staphylococcus aureus* son diferentes en los puentes peptídicos, (Fig 40) donde actúa LysK, es posible que ésta tuviera actividad sobre el enlace glicosídico entre la L-alanina del puente peptídico y el ácido murámico de bacterias ácido lácticas, ya que este enlace también es sustrato del dominio activo Ami-2 de LysK. Si este fuera el caso una inducción mínima por concentraciones basales de NaCl en el medio de cultivo pudo haber sido suficiente para hidrolizar la pared celular de las bacterias ácido lácticas. De este modo, las BAL que expresaran LysK a partir de pCIPSpHLysKNael no sobrevivirían. Los resultados demuestran que las cepas de BAL transformantes contenían plásmidos y fueron resistentes a eritromicina, gen cuya presencia se detectó además por PCR.

Pared celular *Staphylococcus aureus*



Pared celular *Lactococcus lactis*

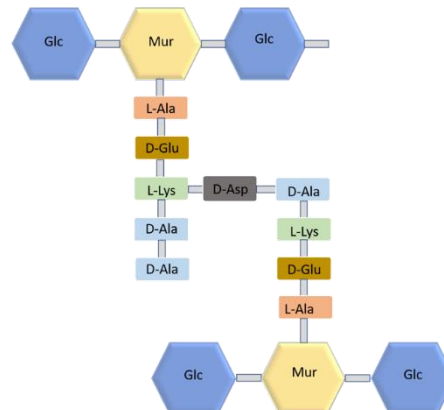


Fig. 40 Comparación entre la estructura de las paredes celulares de *S. aureus* y BAL (*L. lactis*). En la figura se indican los sitios de corte de CHAP y Ami 2 dentro de la estructura de la pared celular de *S. aureus*. El sitio de corte de Ami 2 se encuentra también dentro de la pared celular de BAL, mientras que el sitio CHAP es característico únicamente de *S. aureus*.

Lo anterior sugiere que los plásmidos presentes en las transformantes resistentes a eritromicina, pudieron originarse por el producto de la recombinación ilegítima que elimina la región que contenía el marco de lectura abierto de la proteína recombinante LysK. Debido al interés en las BAL como biorreactores, existen muchos reportes de recombinación genética dirigida a obtener bacterias recombinantes con las características deseadas. En cambio, la literatura referente a recombinación sitio-específica en bacterias ácido lácticas es escasa y no existen reportes de recombinación ilegítima en este grupo bacteriano. Por lo anterior, éste

plásmido podría funcionar como un modelo para el estudio de recombinación inducida por estrés en bacterias ácido lácticas.

Al no lograr expresar a la endolisina LysK utilizando el plásmido pCipSpHLysKNae en bacterias ácido lácticas, se decidió cambiar de modelo, utilizando el vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi® para clonar la endolisina LysK y lograr el objetivo de expresarla, pero ahora en cepas de *E. coli*.

Se logró la clonación del gen que expresa a la proteína LysK en el vector pFN18A HaloTag® T7 Flexi®, obteniendo el plásmido pFN-LysK, el cual se introdujo a cepas de *E. coli* mediante electroporación, y se demostró la presencia de todos sus elementos, el origen de replicación, el gen de resistencia a ampicilina, el cual se utiliza como marcador de selección, la etiqueta Halo-Tag, y se demostró la presencia del gen que expresa a la endolisina en plásmidos extraídos de las clonas transformantes mediante PCR amplificando dicho gen. La expresión de la endolisina por cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pFN-LysK se demostró mediante western blot, utilizando anticuerpos contra la etiqueta de Halo-Tag, a la cual se encuentra unida nuestra endolisina. En un primer ensayo se intentó identificar actividad lítica y enzimática en el extracto crudo de proteínas extraídas de las clonas transformantes de *E. coli*, sin embargo, no se observó ni actividad lítica, ni actividad enzimática, por lo que se pensó que la falta de actividad podría deberse a la baja concentración de enzima en el extracto crudo de proteínas. Por lo anterior se procedió a realizar la purificación de la endolisina una vez que se demostró que la proteína se estaba expresando. Sin embargo, tras realizar el protocolo de purificación y ya teniendo la endolisina purificada, se intentó nuevamente identificar actividad lítica y actividad enzimática utilizando el extracto de la endolisina ya purificada. A pesar de que se pudo demostrar la presencia de la proteína en el extracto puro mediante un gel de acrilamida teñido con azul de coomassie, no se logró observar ni actividad lítica ni actividad enzimática.

Esta falta de actividad por parte de nuestra enzima, puede deberse a diversos factores, y a pesar de que se intentaron controlar todos estos factores que pudieran afectar la integridad de la enzima, y por ende su actividad, como pH, temperatura y fuerza iónica, no logramos identificar actividad enzimática. Debido a cuestiones de tiempo, no se tuvo la oportunidad de probar más ensayos utilizando diferentes condiciones que nos pudieran llevar a identificar actividad por parte de la enzima.

Dentro de las condiciones que pudieran modificarse intentando encontrar actividad en nuestra enzima, es el pH, ya que como es sabido, cambios en el pH afectan la actividad enzimática, al provocar cambios en la carga neta de la proteína, dando lugar a la aparición de repulsiones electrostáticas y la destrucción de algunos puentes de hidrogeno. Las enzimas tienen un pH óptimo en el que su actividad es máxima, y a valores superiores o inferiores la actividad de la enzima disminuye, debido a que algunas cadenas laterales de aminoácidos pueden actuar como ácidos o como bases débiles que desarrollan funciones específicas dentro del sitio activo, y

estas funciones dependen del mantenimiento del estado de ionización, mientras que en otras zonas de la enzima, algunas cadenas laterales ionizadas pueden jugar un papel esencial en las interacciones que mantienen la estructura de la proteína, por lo que cambios en el pH podrían eliminar interacciones esenciales para la estabilización de la conformación activa de la enzima, por lo que se debe trabajar con pH's cercanos al óptimo según la enzima que se trate. En el caso de las endolisinas de bacteriófagos, se han reportado intervalos de pH que van de 6–10 (Becker *et al.*, 2008), siendo este un rango muy amplio, sin embargo, según lo descrito por Becker *et al.*, 2008, la mayor actividad se ha observado en pH's de 9, aunque otros autores han reportado pH's diferentes, como es el caso de Horgan *et al.*, 2009, reportando un pH óptimo de 6.5, mientras que Schmelcher *et al.*, 2015 reportan un pH óptimo de 7. Para nuestros ensayos siempre se trabajó manteniendo el pH de 7.5, sin embargo cabe la posibilidad de que en un pH diferente, dentro del rango ya reportado, se pudiera encontrar actividad enzimática

En lo que respecta a la temperatura, se tienen que cuidar dos aspectos, la temperatura óptima a la que trabaja la enzima, y la temperatura para conservar a la proteína íntegra y evitar que esta se desnaturalice. La mayoría de proteínas se desnaturalizan por calor, ya que este afecta las interacciones débiles de las proteínas, principalmente los puentes de hidrogeno, si se aumenta la temperatura, la proteína puede perder su estructura y con ello la pérdida de su función en un margen de temperatura muy estrecho. Para todos los ensayos las muestras se mantuvieron en hielo, incluso, durante la sonicación, para evitar que estas se sobrecalentaran y la proteína se desnaturalizara, de igual forma para centrifugar las muestras, siempre la temperatura se manejó dentro de los 4 °C. En cuanto a la temperatura utilizada para los ensayos para medir actividad catalítica se utilizó una temperatura de 37°C, de acuerdo a lo reportado por la bibliografía para endolisinas de bacteriófagos (Horgan *et al.*, 2009), por lo que en este parámetro no hay variación entre la bibliografía consultada.

El agua y los iones pueden debilitar las interacciones electrostáticas, reduciendo tanto su fuerza como la distancia sobre la que operan. La atracción electrostática también disminuye al aumentar la distancia del par de iones. Pero los efectos electrostáticos están fuertemente modulados por el blindaje proporcionado por el medio en el que se disuelven los grupos cargados, de ahí la importancia de mantener la concentración adecuada de sales dentro del medio en el que se tiene la enzima. Dentro de las concentraciones de sales utilizadas para probar la actividad de endolisinas de bacteriófagos, se encuentra una amplia variedad entre los diferentes autores, así como los amortiguadores utilizados. En el estudio realizado por Becker *et al.*, 2008, se probaron concentraciones de NaCl en un rango de 0.3–0.5M, encontrando una concentración óptima de 400mM NaCl en Tris 20mM. De manera similar Schmelcher *et al.*, 2012 utilizaron para sus ensayos NaCl en Tris pero en diferente concentración, utilizando NaCl 200 mM y Tris 10 mM. Por otro lado, en el estudio realizado por Horgan *et al.*, 2009, se utilizó acetato de sodio en

una concentración de 50 mM, a diferencia de Fenton *et al.*, 2010, quienes utilizaron también buffer de acetato de sodio pero en una concentración de 10 mM, en estos casos, ninguno de los dos autores adicionaron ninguna otra sal. Por su parte, Becker *et al.*, 2009 utilizaron PBS con una concentración de NaCl 300 mM y NaH₂PO₃ 50 mM. En nuestros ensayos utilizamos diferentes buffers y diferentes concentraciones de sales, se utilizó acetato de sodio 50 mM (pH 6.5) con y sin NaCl (200mM), Tris-HCl 10mM / NaCl 0.9% (pH 7), y el buffer de purificación Halo-Tag (HEPES 50mM / NaCl 150mM) (pH 7.5), sin embargo las opciones son muchas y se podrían hacer más ensayos a futuro a diferentes concentraciones de sales y con diferentes amortiguadores esperando encontrar actividad en la endolisina.

Algunas proteínas contienen componentes diferentes a los aminoácidos como parte de su estructura funcional, estos pueden ser metales específicos, que juegan un papel importante en la función de la proteína, colaborando la mayoría de las veces con la catálisis. En el caso de la endolisina LysK, se sabe que en el dominio CHAP se encuentra un ion Ca⁺² y un ion Zn⁺², los cuales son fundamentales para su actividad, por lo que deberían proporcionarse estos iones para la búsqueda de actividad de la endolisina. Sin embargo, dentro de la bibliografía consultada ninguno de los autores especifica el uso de Zn⁺² en sus ensayos. En el caso del ion Ca⁺² se ha reportado que en endolisinas de bacteriófagos, agregando iones Calcio a una concentración 10mM aumenta la actividad, sin embargo disminuye la estabilidad de la proteína para su conservación (Jun *et al.*, 2013). En uno de nuestros ensayos se utilizó CaCl₂ 20 mM, ya que se pensó que debido a la falta de este ion, la endolisina no presentaba actividad catalítica, sin embargo no se observó ningún cambio. En otro ensayo se utilizó CaCl₂ 20 mM y ZnSO₂ 10 mM para observar si con la presencia de estos iones se lograba ver actividad, sin embargo con estas concentraciones no se identificó actividad. Debido a la falta de bibliografía respecto al uso de estos cofactores (Ca⁺² y Zn⁺²) para la identificación de actividad catalítica en endolisinas de bacteriófagos, tendrían que hacerse más ensayos utilizando diferentes concentraciones de ellos con el objetivo de identificar si la presencia o ausencia de estos cofactores afecta la actividad catalítica de LysK.

Por otro lado, para que ocurra una reacción, los reactivos tienen que colisionar, porque los reordenamientos de enlaces entre dos moléculas requieren una proximidad muy cercana. La probabilidad de que ocurra la reacción por unidad de tiempo esta relacionada con las tasas de colisiones, por lo que la velocidad de reacción depende de la concentración, siendo esta otra condición que puede afectar la actividad enzimática. La concentración de la enzima purificada pudo haber sido muy baja, ya que en los geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomassie la banda correspondiente a la enzima ya purificada era tenue, lo cual sugiere una cantidad entre decenas a centenas de nanogramos, lo cual nos indica que la cantidad de proteína presente en la muestra es muy baja, lo que pudo ocasionar que no se observara actividad por parte de la enzima. En la bibliografía se reporta el uso de diferentes concentraciones de endolisinas recombinantes, que van

desde 2.5 μg (Becker *et al.*, 2009), algunos autores reportan 5 μg (Fenton *et al.*, 2010), mientras que algunos reportan 20 μg como la concentración óptima a la cual la enzima presenta mayor actividad (Becker *et al.*, 2008).

A pesar de haber realizado varios intentos modificando las condiciones para la extracción de proteínas de la bacteria que expresa la endolisina como el volumen de bacteria utilizada para la extracción de proteínas, las condiciones de lisis de la bacteria que expresa la endolisina (condiciones de sonicación y uso de enzimas) entre otros, no se logró ver alguna diferencia en el tamaño de las bandas. En futuros ensayos podrían realizarse más cambios que pudieran mejorar el rendimiento de proteína tras la purificación, con lo cual pudiera observarse actividad en la enzima al agregarla en mayor concentración en los ensayos.

Por lo anterior, aún es necesario hacer algunos ensayos para estandarizar tanto la expresión como la medición de la actividad de LysK expresada en *E. coli*.

IX. CONCLUSIONES

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias ácido lácticas mediante el uso de vectores, puede verse afectada por eventos de recombinación ilegítima, en donde el plásmido introducido, puede sufrir la eliminación de ciertas regiones, sin embargo, la información al respecto es un tanto desconocida, debido a que en la literatura no se encuentra mucha información, probablemente por tratarse de un modelo no tan conocido y estudiado como lo es *E. coli*.

Factores como, concentración, pH, presencia de cofactores, temperatura y fuerza iónica pueden afectar la actividad de una enzima, por lo que estos, deben ser controlados si se desea detectar actividad enzimática. En nuestro caso, no nos fue posible detectar actividad en la endolisina LysK expresada por el vector pFN18A-LysK, por lo que será necesario la estandarización de estas condiciones para la búsqueda de actividad de la endolisina LysK en futuras investigaciones.

X.-REFERENCIAS

Andersson, A. F. & Banfield, J. F. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* 320, 1047–1050 (2008). 102. Molineux.

Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005) Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307(5717):1915–1920.

Baizabal-Aguirre VM, Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcón JJ, Bravo-Patiño A, Cajero-Juárez M. (2009). Caracterización funcional de la interacción entre estructuras conservadas de *Staphylococcus aureus* y receptores celulares. En: Bustos JI, Castañeda PC, Rendon HE, Reyes VH, Romero AI. Mensaje Bioquímico vol. XXXIII: p181-200

Barrangou, R. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709–1712 (2007).

Barrera Rivas. 2015. Advances in the use of endolysins: general remarks, structure, applications, genetic modifications and perspectives. In: Mendez-Vilas A. (ed.) The battle against microbial pathogens. Microbiology book series No. 5. Vol. 1. Formatex. Pp. 259-258

Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. 2013. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci* 1277:139–158

Becker, S.C.; Dong, S.; Baker, J.R.; Foster-Frey, J.; Pritchard, D.G.; Donovan, D.M. LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 2009, 294, 52–60

Becker SC, Foster-Frey J, Stodola AJ, Anacker D, Donovan DM. Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. *Gene*. 2009; 443(1–2):32–41. [PubMed: 19422893]

Birnbom, H. C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 100: 243-255

Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer. 1991. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* 59:4614–4620.

Bergh, Ø., et al., High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 1989. 340(6233): p. 467-468.

Bera A, Herbert S, Jakob A, Vollmer W, Götz F. 2005. Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA

is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 55:778–787

Braat H, Rottiers P, Hommes DW et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol H* 2006; 4:754–9.

Chambers HF, DeLeo FR. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nat Rev Microbiol* 7:629–641

Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N Engl J Med* 348:1342–1347.

Chapot-Chartier MP, Kulakauskas S. 2014. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* 13: (S1) 59.

Chatterjee SS, Joo HS, Duong AC, Dieringer TD, Tan VY, Song Y, Fischer ER, Cheung GYC, Li M, Otto M. Essential *Staphylococcus aureus* toxin export system. *Nat Med*. 2013; 19:364–367.

Cheng Q, Nelson D, Zhu S, Fischetti VA. Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005; 49(1):111–117. [PubMed: 15616283]

Cheng, M.; Zhang, Y.; Li, X.; Liang, J.; Hu, L.; Gong, P.; Zhang, L.; Cai, R.; Zhang, H.; Ge, J.; et al. Endolysin LysEF-P10 shows potential as an alternative treatment strategy for multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* infections. *Sci. Rep.* 2017, 7, 10164.

Chu, Lily, Robinson, David K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture *Current Opinion in Biotechnology*, V. 12, 2001, 180.

Cosgrove SE, Vigliani GA, Champion M, Fowler VG, Abrutyn E, Corey GR, Levine DP, Rupp ME, Chambers HF, Karchmer AW. 2009. Initial low-dose gentamicin for *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis is nephrotoxic. *Clin Infect Dis* 48:713–721

Demain, A.L. and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27, 297306.

De Vuyst, L. and Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 194–199.

Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin

depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(3):1225–1228.

Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* 265(1), 133–139 (2006).

Duilio A, Tutino ML, Marino G (2004) Recombinant protein production in Antarctic gram-negative bacteria. *Methods Mol Biol* 267:225–238

Düring, K., et al., Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*. *The Plant Journal*, 1993. 3(4): p. 587-598.

Dziarski, R., R. I. Tapping, and P. S. Tobias. 1998. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J. Biol. Chem.* 273:8680–8690.

Edgar, Robert C. (2004), MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97

Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J.L., Vázquez, A. y Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 8, 17.

Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol.* 2005; 13(10): 491–496.

Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010; 300(6):357–362.

Francis JS, Doherty MC, Lopatin U, Johnston CP, Sinha G, Ross T, Cai M, Hansel NN, Perl T, Ticehurst JR, et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton-Valentine leukocidin genes. *Clin Infect Dis.* 2005; 40:100–107.

Gaeng, S., et al., Gene Cloning and Expression and Secretion of *Listeria monocytogenes* Bacteriophage-Lytic Enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000. 66(7): p. 2951-2958.

Garcia P, Martinez B, Rodriguez L, Rodriguez A. Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; 141(3): 151–155.

Geldart K, Borrero J, Kaznessis YN. Chloride-inducible expression vector for delivery of antimicrobial peptides targeting antibiotic-resistant *Enterococcus faecium*. *Appl Environ Microbiol.* 2015; 81:3889–97.

Gingold, E. B. (1995). Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Edited by M. J. Gasson & W. M. de Vos, Chapman & Hall, London, 1994, xi + 300 pp., price

£69.00. ISBN 0 7514 0098 X. Journal of Chemical Technology AND Biotechnology, 63(2), 195–196. doi:10.1002/jctb.280630217

Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clin Infect Dis*, 2008, vol. 46 Suppl 5 (pg. S350-9)

Godde, J. S. & Bickerton, A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. *J. Mol. Evol.* 62, 718–729 (2006).

Graumann, K. and Premstaller, A. (2006). Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal* 1,164-186.

Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. 2012. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 68:4–11

Gu J, Feng Y, Feng X, Sun C, Lei L, Ding W, Niu F, Jiao L, Yang M, Li Y. 2014. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented “EF-hand-like” calcium-binding phage lysin. *PLoS Pathog* 10:e1004109

Haddad Kashani, H.; Schmelcher, M.; Sabzalipoor, H.; Seyed Hosseini, E.; Moniri, R. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Current status of research and novel delivery strategies. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018, 31.

Hale CR, Zhao P, Olson S, DuffMO, GraveleyBR,etal. 2009. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA–Cas protein complex. *Cell* 139:945–56

Hermoso JA, Garcia JL, Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10(5):461–472.

Higgins D., Thompson J., Gibson T. Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9:486–493

Horgan M, O’Flynn G, Garry J, Cooney J, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP, McAuliffe O. 2009. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 75:872–874. <https://doi.org/10.1128/AEM.01831-08>

- Jado I, Lopez R, Garcia E, Fenoll A, Casal J, Garcia P. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003; 52(6):967–973. [PubMed: 14613958]
- Karlskås IL, Maudal K, Axelsson L, Rud I, Eijsink VGH, Mathiesen G. Heterologous protein secretion in Lactobacilli with modified pSIP vectors. *PLoS One.* 2014; 9: e91125
- Khalid, K. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. Biosci.* 2011, 1, 1–13.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10:505–520
- Kok, J., van Gijtenbeek, L. A., de Jong, A., van der Meulen, S. B., Solopova, A., & Kuipers, O. P. (2017). *The Evolution of gene regulation research in Lactococcus lactis.* *FEMS Microbiology Reviews*, 41 (Supp_1), S220–S243. doi:10.1093/femsre/fux028
- König H., Fröhlich J.. König H., Fröhlich J., Uden G.. Lactic acid bacteria, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* , 2009 Berlin, HeidelbergSpringer (pg. 3-29)
- Kretschmer D, Gleske AK, Rautenberg M, Wang R, Koberle M, Bohn E, Schoneberg T, Rabiet MJ, Boulay F, Klebanoff SJ, et al. Human formyl peptide receptor 2 senses highly pathogenic *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe.* 2010; 7:463–473. [PubMed: 20542250]
- Labrie, S. J., Samson, J. E. & Moineau, S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Rev. Microbiol.* 8, 317–327 (2010).
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13:1057–1098
- Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10:S122–S129
- Lin CF, Chen CL, Huang WC, Cheng YL, Hsieh CY, Wang CY, Hong MY. Different types of cell death induced by enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2010; 2:2158–2176. [PubMed: 22069678]

Lina G, Piédmont Y, Godaíl-Gamot F, et al. Involvement of Pantón-Valentine Leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. Clin Infect Dis. 1999;29 (5):1128-1132.

Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect. Immun. 2003; 71(11):6199–6204. [PubMed: 14573637]

Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47(1):375–377. [PubMed: 12499217]

Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, Bruck M, Holzinger D, Varga G, Roth J, Kahl BC, Proctor RA, Peters G. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. PLoS Pathog. 2010; 6:e1000715. [PubMed: 20072612]

Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. Mol. Microbiol. 2002; 44(2):335–349.

Loessner MJ. Bacteriophage endolysins – current state of research and applications. Curr. Opin. Microbiol. 2005; 8(4):480–487.

Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 339: 520–532.

Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 111:1265–1273

Luria, S.E.; Delbruck, M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics 1943, 28, 491–511.

Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol. Direct 1, 7 (2006).

Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, et al. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. 9:467–77 Morikawa K, Takemura AJ, Inose Y, Tsai M, Nguyen Thi le T, Ohta T, Msadek T. Expression of a cryptic secondary sigma factor gene unveils natural competence for DNA transformation in *Staphylococcus aureus*. PLoS Pathog. 2012; 8:e1003003. [PubMed: 23133387]

Mathiesen, A. Sveen, J.C. Piard, L. Axelsson, V.G.Eijsink Heterologous protein secretion by *Lactobacillus plantarum* using homologous signal peptides
J Appl Microbiol, 105 (2008), pp. 215-226

Mergulhão F.J., Summers D.K., Monteiro G.A. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. Biotechnol. Adv. 2005; 23:177–202.

Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. Appl Microbiol Biot 2005; 68:705–17

Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules* 22, 1255. doi: 10.3390/molecules22081255

Morita M, Asami K, Tanji Y, Unno H: Programmed *Escherichia coli* cell lysis by expression of cloned T4 phage lysis genes. Biotechnol Prog 2001, 17:573-576.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2009. Microbiología médica (6a edición) Ed. Elsevier Mosby, Barcelona España. p. 2009-223, 303-307.

Nau R, Eiffert H. Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(1):95–110. [PubMed: 11781269]

Navarre, W. W., H. Ton-That, K. F. Faull, and O. Schneewind. 1999. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage ϕ 11. Identification of a D-alanyl-glycine endopeptidase activity. *J. Biol. Chem.* 274:15847-15856.

Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, et al. Endolysins as antimicrobials. Adv. Virus Res. 2012; 83:299–365. [PubMed: 22748813] Comprehensive review of peptidoglycan hydrolases, featuring a classification of all staphylococcal, streptococcal and enterococcal lysin sequences available in public databases

Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001; 98(7):4107–4112.

Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006; 103(28):10765–10770.

Nucleic Acids Res. 22:4673-4680. (1994) Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. Molecular Evolutionary Genetic Analysis versión 7.0 for bigger data sets. Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.

Obeso JM, Martinez B, Rodriguez A, Garcia P. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage phiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. Int. J. Food Microbiol. 2008; 128(2):212–218. [PubMed: 18809219]

O'Flaherty S, Rosa PR, Coffey A. 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *FEMES Microbiol.Rcvm.*, 2009 33: 801-819. DOI:10.1111/j.1574-696.2009.00176.x.

O'Flaherty S, Coffey A, Edwards R, Meaney W, Fitzgerald G, Ross R. 2004. Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low GC content. *J Bacteriol* 186:2862–2871. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2862-2871.2004>

Parracho HM, Burrowes BH, Enright MC, McConville ML, Harper DR. 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J. Mol. Gen. Med.* 6: 279-286.

Parsek, M. R., and Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 677–701. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090720

Pastagia M, Euler C, Chahales P, Fuentes-Duculan J, Krueger JG, Fischetti VA. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(2):738–744. [PubMed: 21098252]

Petty NK, Evans TJ, Fineran PC, Salmond GP. 2007. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol.* 25:7–15

Pritchard DG, Dong S, Kirk MC, Cartee RT, Baker JR. LambdaSa1 and lambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(22):7150–7154. [PubMed: 17905888]

Rayner C, Munckhof WJ. 2005. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Intern Med J* 35:S3–S16.

Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. 2014. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol* 22:438–445

Ruef C. 2004. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* 32:315–327

Sanz-Gaitero M, Keary R, Garcia-Doval C, Coffey A, van Raaij MJ. 2014. Crystal structure of the lytic CHAP K domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K. *Virology* 11:133. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-133>.

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch ET. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2ed. Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU.; 1989:p. 1,82-1,84.

Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J. 1998. Achloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol Microbiol* 27:299–310. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00676.x>.

Sass P, Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(1):347–352. [PubMed: 17085695]

Schmelcher, M.; Donovan, D.M.; Loessner, M.J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* 2012, 7, 1147–1171.

Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, Camp MJ, Donovan DM: Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012;78:2297-2305. DOI: 10.1128/AEM.07050-11.

Schwartz, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 195–201 (2001).

Segundo N.A., Hernández E.B., López O.V., Torres O.A. 2010. Los bacteriofagos como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas bacterianas (Fagoterapia). *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.* 41(3):17-26

Shoji M, Cui L, Iizuka R, Komoto A, Neoh H, Watanabe Y, Hishinuma T, Hiramatsu K. 2011. walk and clpP mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3870–3881

Skinner D, Keefer CS. 1941. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Arch Intern Med* 68:851–875

Smith, H.W.; Huggins, M.B. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129, 2659–2675.

Son B, Kong M, Ryu S. 2018. The Auxiliary Role of the Amidase Domain in Cell Wall Binding and 529 Exolytic Activity of Staphylococcal Phage Endolysins. *Viruses* 10.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris Jr., J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 649-659.

Szweda P, Schielmann M, Kotlowski R, Gorczyca G, Zalewska M, Milewski S. 2012. Peptidoglycan hydrolases—potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 96: 1157–1174

Tacconelli E, De Angelis G, Cataldo MA, Pozzi E, Cauda R. 2007. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation? A systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 61:26–38.

Tanji Y, Asami K, Xing X-H, Unno H (1998) Controlled expression of lysis genes encoded in T4 phage for the gentle disruption of *Escherichia coli* cells. *J Ferment Bioeng* 85:74–78.

Thompson KA, Summers RS, Cook SM. 2017. Development and experimental validation of the composition and treatability of a new synthetic bathroom greywater (SynGrey). *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 3: 1120-1131.

Toock MR, Dryden DT. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:466–72

Thunnissen AM, Dijkstra AJ, Kalk KH, et al. Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by x-ray crystallography. *Nature.* 1994; 367(6465):750–753. [PubMed: 8107871]

van Belkum A. Hidden *Staphylococcus aureus* carriage: overrated or underappreciated? *MBio* 2016; 7:1–3

Vanassche T, Peetermans M, Van Aelst LN, Peetermans WE, Verhaegen J, Missiakas DM, Schneewind O, Hoylaerts MF, Verhamme P. The role of staphylothrombin-mediated fibrin deposition in catheter-related *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis.* 2013; 208:92–100. [PubMed: 23532100]

Waldvogel FA.. *Staphylococcus aureus*. Mandel, Douglas, Bennet Principles and Practice of Infectious diseases.. 2000. Ed WB Saunders

Walsh, G. Biopharmaceuticals benchmarks 2010. *Nature Biotechnology* 28, 917-924.

Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, Kolonay JF, Shetty J, Killgore GE, Tenover FC. 2003. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 302:1569–1571

Wilson GJ, Seo KS, Cartwright RA, Connelley T, Chuang-Smith ON, Merriman JA, Guinane CM, Park JY, Bohach GA, Schlievert PM, et al. A novel core genome-encoded superantigen contributes to lethality of community-associated MRSA necrotizing pneumonia. *PLoS Pathog.* 2011; 7:e1002271. [PubMed: 22022262]

Witzerath M. 2009. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit. Care Med.* 37, 642-649, doi:10.1097/CCM.0b013e31819586a6.

Wong, S.M., Chng, C.G., Lee, Y.H., Tan, K., Zettler, F.W., 1994. Incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses and their significance in orchid cultivation in Singapore. *Crop Protection*. 13, 235–239

Wood BJB, Holzapel WH: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London, Blackie Academic & Professional, 1995.

Wyszynska A, Kobierecka P, Bardowski J et al. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biot* 2015; 99: 2967–77