

IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS ACTIVOS DE LA MURAMIDASA TRANSMEMBRANAL DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.

Vianey Anahí Salas-Villagrán¹, Israel García-Cano² y Amelia Farrés¹, ¹Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 312, Facultad de Química, Ciudad de México, C.P. 04510.

²The Ohio State University, Department of Food Science and Technology, Columbus OH, USA
e-mail: farres@unam.mx

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, peptidoglucano hidrolasas, zimograma

Introducción. La resistencia a antibióticos por parte de microorganismos va en aumento lo que disminuye la capacidad para tratar enfermedades comunes. Por este motivo se ha intensificado la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos como las peptidoglucano hidrolasas (PGHs), enzimas responsables de hidrolizar el peptidoglucano de las bacterias. Previamente en el grupo de trabajo se identificó una proteína de 110-kDa proveniente de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 con actividad lítica contra diversos microorganismos (1). Esta se clonó y expresó en *E. coli*. A pesar de que se observó degradación de la proteína, su actividad lítica no se veía afectada. Las pruebas de actividad específica indican que la enzima presenta actividad de *N*-acetilmuramidasa, a pesar de que la secuencia de la proteína no es homóloga a ninguna *N*-acetilmuramidasa reportada en las bases de datos. Con ayuda de diversos programas computacionales se realizó la predicción estructural de la proteína (2).

El objetivo de este trabajo es identificar el o los dominios de la enzima encargados de la actividad antimicrobiana, clonando y expresando cada una de ellas de manera independiente.

Metodología. Con la predicción estructural de la proteína de 110-kDa (2), se dividieron tres regiones nombradas como RI, RII y RIII (Fig. 1), se utilizó el vector de expresión pET-22b. Se amplificaron las secuencias y se realizaron las subclonas de cada una de las regiones. Posteriormente se expresó cada proteína utilizando diferentes concentraciones de IPTG como inductor y se analizó por medio de SDS y zimogramas.

Resultados. Tomando la construcción pET19-110 (2), se amplificó el gen que codifica para la proteína completa el cual tiene un tamaño de 3,198 pb, el cual sirvió de templado para la subclonación de cada una de las regiones. En la Fig 2. B se pueden observar las amplificaciones a 1,502 pb para la RI, 1,076 pb para la RII y 683 pb para la RIII, las cuales fueron clonadas. Se realizó una PCR con cebadores específicos y con cebadores T7 para comprobar que el gen de interés había sido insertado en el vector de expresión (Fig. 2). Únicamente se lograron las construcciones de las regiones II y III, las cuales fueron nombradas como pET22-110RII y pET22-110RIII. Se obtuvo la proteína recombinante que corresponde a la construcción pET22-110RIII utilizando 1 mM de IPTG, se concentró el sobrenadante y se realizaron geles SDS-PAGE y zimogramas, observando actividad lítica en un peso molecular de 30 kDa aproximadamente (Fig. 3) para la subclona de esta región.

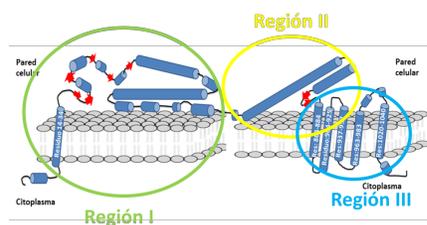


Fig. 1. Predicción estructural de la proteína de 110-kDa dividida en las tres regiones de interés (RI, RII y RIII) Tomado de Barbosa, 2018.

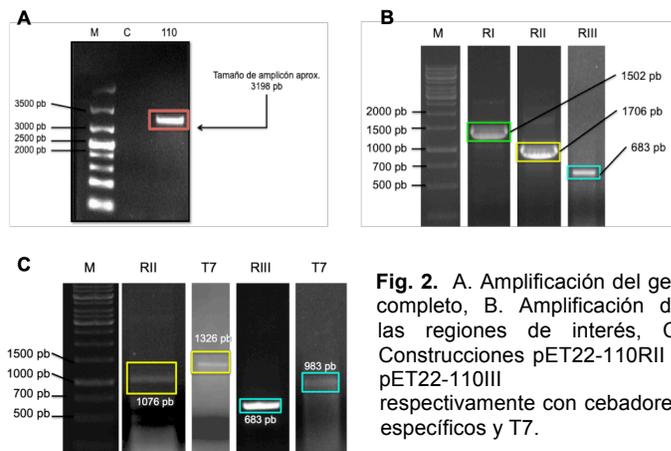


Fig. 2. A. Amplificación del gen completo, B. Amplificación de las regiones de interés, C. Construcciones pET22-110RII y pET22-110RIII respectivamente con cebadores específicos y T7.

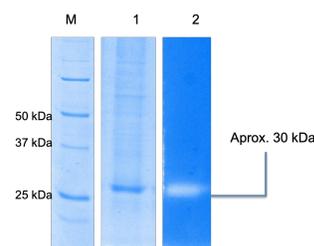


Fig. 3. Construcción RIII. Carril M, marcador de alto peso molecular, carril 1, SDS-PAGE 10%, carril 2, zimograma contra células de *M. lysodeikticus*.

Conclusiones. Se obtuvieron las subclonas de las regiones II y III, observando actividad lítica en la región III correspondiente al dominio transmembranal de la proteína, se seguirá trabajando en la expresión de la actividad de la región II, así como en la subclonación de la región I y en la identificación del péptido correspondiente.

Bibliografía.

- (1) García-Cano I. (2013). Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- (2) Barbosa González P. (2018). Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.