

I. ANTECEDENTES Y OBJETIVO

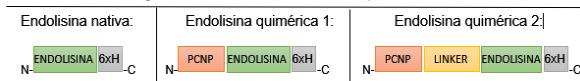
Las endolisinas, enzimas líticas derivadas de secuencias de fagos, son una alternativa terapéutica prometedora frente a la resistencia a los antimicrobianos (RAM), la adición exógena de endolisinas recombinantes resulta en una lisis hipotónica de las bacterias¹.

Sin embargo, se ha observado que en bacterias Gram-negativas, la membrana externa de la pared celular dificulta el acceso de las endolisinas a la capa de peptidoglicano, lo que puede limitar o inhibir completamente su acción.

No obstante, existen estrategias para superar esta limitación, como ser la adición por ingeniería genética de secuencias de nanopéptidos policatiónicos (PCNP)².

En el Área de Bioquímica Molecular del Instituto de Investigaciones FÁRMACO BIOQUÍMICAS, diseñaron tres constructos plasmídicos: el primero cuenta solo con la secuencia de la endolisina XFII, el segundo constructo tiene secuencia de la endolisina unida a la secuencia del PCNP y en el tercer constructo consta la endolisina XFII unida al PCNP a través de un LINKER.

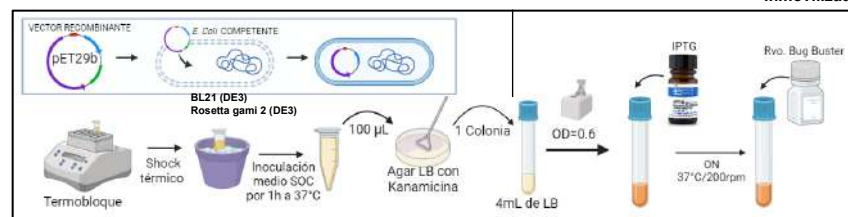
Fig. 1: Diseño de los constructos plasmídicos:



El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de las modificaciones comparando: actividad catalítica sobre diferentes sustratos sintéticos, condiciones óptimas de estabilidad (temperatura y pH) y parámetros cinéticos (Km, Vmax y Kcat) de las dos endolisinas químicas y de la endolisina nativa XFII.

II. METODOLOGÍA

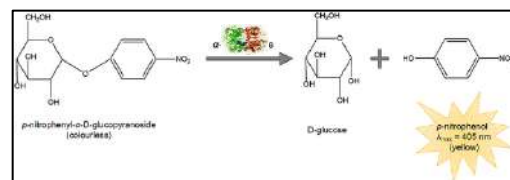
1. Transformación - Selección - Expansión - Inducción - Cosecha



2. Purificación de proteínas por Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (IMAC) - equipo AKTA Go



3. Actividad Catalítica con sustratos cromogénicos



Sustrato cromogénico	Tipo de enzima
4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	N-acetyl-β-D-glucosaminidasa
4-Nitrophenyl N-acetyl-α-D-glucosaminide	N-acetyl-α-D-glucosaminidasa
4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside	Glucosidasa
p-Nitrophenyl-β-D-xilopyranoside	β-D-xilosidasa
Clorhidrato de N-α-benzoyl-L-arginina 4-nitroanilida	Proteasa

4. Determinación de temperatura y pH óptimos



III. RESULTADOS

Fig. 3: Act. catalítica con diferentes sustratos



Fig.4: Ensayo de temperatura optima

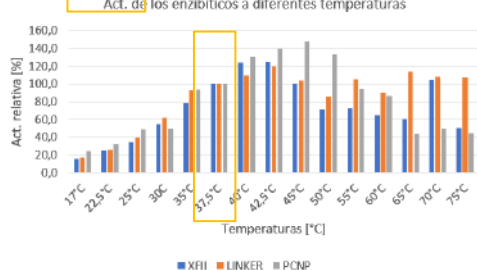


Fig.5: Ensayo de pH óptimo

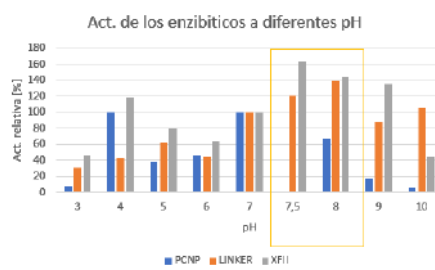


Tabla 1. Parámetros cinéticos de las endolisina XFII y PCNP-XFII

	Vmax [μmol/min]	Km [mM]	Kcat [min ⁻¹]	Kcat/Km [min ⁻¹ * Mm ⁻¹]
XFII	0,00206971	0,80905921	0,08943207	0,11053835
PCNP-XFII	0,00039453	0,23693607	0,01704772	0,07195071

IV. CONCLUSION

La endolisina nativa en general es un poco más eficiente, pero la endolisina química (PCNP-XFII) es mucho mejor para unirse al sustrato a bajas concentraciones.

V. REFERENCIAS

- Abeysekera, G. S., Love, M. J., Manns, S. H., Billington, C., & Dobson, R. C. J. (2022). Bacteriophage-encoded lethal membrane disruptors: Advances in understanding and potential applications. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1044143. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.1044143/BIBTEX>
- Boryowski, J., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2006). Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 231(4), 366-377. <https://doi.org/10.1177/153537020623100402>
- Briers, Y., Walmagh, M., Van Puyenbroeck, V., Cornelissen, A., Cenens, W., Aertsen, A., Oliveira, H., Azeredo, J., Verween, G., Pirnay, J. P., Miller, S., Volckaert, G., & Lavigne, R. (2014). Engineered Endolysin-Based "Artilylins" To Combat Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *mBio*, 5(4), e01379-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01379-14>
- Carratalá, J. V., Aris, A., García-Fruitós, E., & Ferrer-Miralles, N. (2023). Design strategies for positively charged endolysins: Insights into Artilylin development. *Biotechnology Advances*, 69, 108250. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2023.108250>