



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Tesis de Grado en Ciencias Biológicas



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy

Dilucidación de la secuencia codificante de una proteasa extracelular producida por *Flavobacterium* sp.

Bach. Juan José Marizcurrena



Tesis de Grado en Ciencias Biológicas

Opción Biotecnología

Montevideo Uruguay

Agosto 2014

**Dilucidación de la secuencia
codificante de una proteasa
extracelular producida por
*Flavobacterium sp.***

Orientador: Susana Castro Sowinski

Co-Orientador: Natalia Fullana

Sección Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Contenido

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1.1- Tipos de proteasas y su distribución	7
1.2- Mecanismos catalíticos	9
1.3- Aplicaciones biotecnológicas de las proteasas	11
1.3.1- Producción de bebidas alcohólicas	12
1.3.2- Producción de alimentos.....	12
1.3.3- Industria de los detergentes.....	13
1.3.4- Industria textil	14
1.3.5- Tratamiento de cueros.....	14
1.3.6- Industria química	15
1.3.7- Aplicaciones clínicas	15
1.4- Catálisis a baja temperatura	15
1.5- Características de las enzimas	17
1.6- Enzimas activas a bajas temperaturas.....	17
1.7- El género <i>Flavobacterium</i>	19
1.8- Antecedentes del trabajo	20
OBJETIVOS	20
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos	21
Objetivos Educativos.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
2. 1- Microorganismos utilizados durante este trabajo.....	22

2. 2- Producción de la proteasa extracelular producida por <i>Flavobacterium</i> sp. AU8...	23
2. 3- Zimograma.....	23
2. 4- SDS-PAGE e identificación de la proteasa por espectrometría de masas.....	24
2. 5- Extracciones de ADN.....	25
2. 5.1- Extracción de ADN genómico (ADNg).....	25
2. 5.2- Extracción de ADN plasmídico.....	26
2. 6- Identificación del aislamiento AU8.....	26
2. 7- Diseño de cebadores degenerados y específicos	28
2. 8 – Identificación de una región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8.....	28
2. 8.1 – Obtención de un fragmento de amplificación correspondiente a una región parcial del gen de interés.....	29
2. 8.2 Clonación del fragmento de amplificación	29
2. 8.3 Transformación y multiplicación del vector portando el inserto de interés. Análisis de la secuencia	30
2. 8.3.1 Preparación de células competentes.....	31
2. 8.3.2 Transformación	31
2. 8.3.3 Selección de clones y verificación de la presencia del inserto	32
2. 8.3.4 Análisis de secuencia	32
2. 8.2– Confirmación de la secuencia correspondiente a una región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8	32
2. 8.4– Obtención de la secuencia codificante del gen - PCR inversa	33
2. 8.5- Digestión del ADN genómico.....	33
2. 8.6- Reacción de autoligación de fragmentos de restricción	34
2. 8.7- Reacción de PCR	34
2. 9 - Southern Blotting.....	35
2. 9.1- Digestión del ADN genómico.....	36
2. 9.2- Transferencia	37
2. 9.3- Síntesis de la sonda y eficiencia de marcado	38
2. 9.4- Protocolo de hibridación	39
2. 9.5- Detección inmunológica	39

RESULTADOS	39
3.1- Verificación de la identidad del aislamiento AU8.....	40
3.2- Determinación del número de proteasas extracelulares producidas por AU8	42
3.3- Identificación de la proteasa extracelular producida por AU8, por espectrometría de masas (EM)	42
3.4- Extracción de ADN genómico	46
3.5- Diseño de cebadores degenerados y obtención de la secuencia parcial del gen codificante para la proteasa extracelular producida por AU8.....	46
3.6- Obtención de la secuencia codificante de la proteasa	51
3.6- Análisis de la secuencia codificante	53
3.7 Número de copias del gen MP8 y búsqueda de proteasas similares en otros aislamientos antárticos.....	57
DISCUSIÓN	58
4.1- Verificación de la identidad del aislamiento	59
4.2- La proteasa en estudio	60
CONCLUSIONES	63
ANEXO	63
Medios de cultivo	64
Southern Blot.....	64
Búferes.....	65
Electroforesis de Proteínas	66
Código de bases degeneradas	67
REFERENCIAS	67

RESUMEN

Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la degradación de proteínas mediante la hidrólisis de sus enlaces peptídicos. Estas enzimas cumplen funciones esenciales en el metabolismo de los organismos, pero también encuentran diversas aplicaciones en biotecnología.

La industria alimenticia, textil, curtiembre, detergentes, médica e incluso el tratamiento de desechos industriales y domésticos son solo algunas de las áreas en donde las proteasas se utilizan. Actualmente, las enzimas proteolíticas representan aproximadamente el 60% del mercado mundial de enzimas. La mayoría de las proteasas de uso tecnológico provienen de microorganismos mesófilos (temperaturas óptimas de crecimiento cercanas a los 35 °C) que producen enzimas con temperaturas máximas de actividad en el entorno de 40-65 °C. Sin embargo, en ciertos procesos industriales es necesario disponer de enzimas que sean activas a temperaturas menores.

Durante esta tesis se propuso verificar la identidad de un aislamiento de *Flavobacterium* de origen Antártico productor de una proteasa extracelular, identificar la región codificante (CDS) de la proteasa, realizar una caracterización parcial de la misma *in silico*, y estudiar el número de copias de la CDS presentes en el genoma. Para ello se trabajó con un aislamiento bacteriano, identificado como *Flavobacterium* sp. AU8, capaz de producir una proteasa extracelular cuando crece entre 4 y 20 °C, pero con actividad en un amplio rango de temperaturas. En el marco de esta pasantía se verificó la identidad del aislamiento *Flavobacterium* sp AU8 mediante la amplificación, secuenciación y análisis de la subunidad menor ribosomal 16S. Se determinó que AU8 produciría una sola proteasa extracelular según los estudios realizados en geles de actividad, y la misma se identificó como una metalo-proteasa mediante SDS-PAGE y posterior análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF. Se obtuvo la secuencia codificante mediante el ensamblado de segmentos de ADN de la proteasa obtenidos por PCR y PCR inversa. El análisis de la secuencia mostró que se trataría de una proteasa metálica con un alto porcentaje de similitud con proteasas metálicas extracelulares de varias *Pseudomonas*. Se realizó también una caracterización *in silico* de la misma. Finalmente, por ensayos de Southern blot se determinó el posible número de copias de ese gen en el genoma de AU8.

1. INTRODUCCIÓN

1.1- Tipos de proteasas y su distribución

El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) estableció un código numérico para los distintos tipos de enzimas, agrupándolas en seis clases: Oxidoreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6). Las hidrolasas reúnen el grupo de enzimas que hidrolizan macromoléculas, liberando sus unidades constituyentes a través de la ruptura de los enlaces covalentes de unión con una molécula de agua, de ahí proviene su nombre. Este tipo de clasificación presenta limitaciones ya que no considera la existencia de grupos estructurales semejantes que reflejen las relaciones evolutivas y filogenéticas de las enzimas.

Las enzimas encargadas de la hidrólisis de proteínas se conocen tradicionalmente como proteasas, proteinasas o enzimas proteolíticas. Un término más reciente es péptido-hidrolasas, que hace referencia a su capacidad de hidrolizar el enlace peptídico. El NC-IUBMB sugirió el uso del término peptidasa, englobando todas aquellas enzimas hidrolíticas que escinden uniones peptídicas.

Se conocen dos grandes grupos de proteasas, las endoproteasas y las exoproteasas, en referencia a si hidrolizan las uniones peptídicas en distintos puntos internos de la molécula o si remueven secuencialmente aminoácidos desde los extremos de la proteína (amino o carboxi terminal), respectivamente.

La clasificación de las proteasas es complicada si lo que se toma en consideración es su especificidad por el sustrato. Esto ha llevado a que se clasifiquen según sus diferentes mecanismos catalíticos. Se han establecido así cuatro grupos de proteasas: serínicas, cisteínicas, aspárticas y metálicas. Las proteasas serínicas y cisteínicas utilizan como nucleófilo a una serina o cisteína presente en el sitio activo, respectivamente; mientras que en las proteasas aspárticas y metalo-proteasas el nucleófilo es una molécula de

agua activada. Se han reportado también glutamo- y treonin-proteasas pero solo existen pocos ejemplos para cada tipo, por lo cual se las considera muy raras (Kakudo *et al.*, 1992; Barret *et al.*, 1998; Oda, 2012).

Existe una base de datos de proteasas conocida como MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), cuyo objetivo es clasificar estas enzimas tomando en cuenta sus características estructurales y relaciones evolutivas. El sistema agrupa a las peptidasas en familias y clanes. Una familia está constituida por un grupo de peptidasas cuya secuencia aminoacídica muestra una relación estadísticamente significativa entre los aminoácidos responsables o relevantes para la actividad de la misma (Rawlings *et al.*, 2008). Un clan describe el grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, pero que han divergido a tal punto que su relación no puede establecerse por comparación de su estructura primaria (Rawlings & Barrett, 1993).

La MEROPS describe familias de peptidasas de seis tipos catalíticos: aspárticas, cisteínicas, glutámicas, metálicas, serínicas y treonínicas, además de otras peptidasas con un mecanismo catalítico aún desconocido (Ver Fig.1.1).

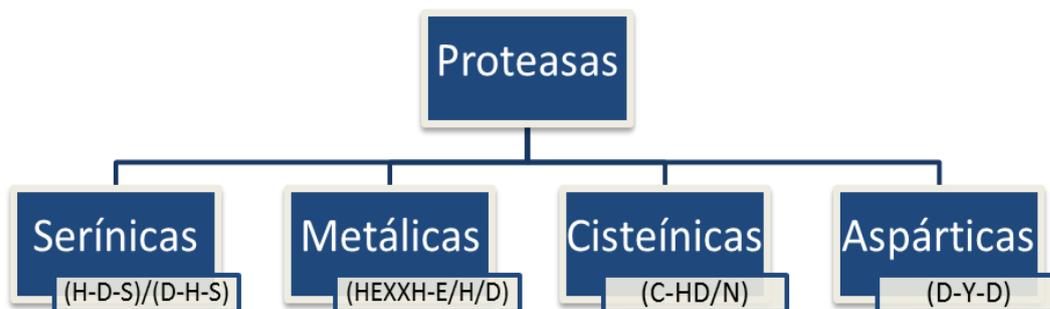


Figura 1.1. Clasificación de las proteasas. En los recuadros inferiores se muestran los motivos de aminoácidos involucrados en la catálisis.

1.2- Mecanismos catalíticos

Peptidasas serínicas – Este tipo de proteasas poseen una serina catalítica en su sitio activo. La hidrólisis del enlace peptídico comienza con la formación de un intermediario covalente derivado del ataque nucleofílico del oxígeno del hidroxilo de la serina al carbonilo del enlace peptídico del sustrato a hidrolizar. Como resultado se produce la liberación de la región N-terminal del péptido. En un segundo paso ocurre un nuevo ataque nucleofílico del agua al intermediario, con regeneración de la enzima libre y la liberación de la región C-terminal de la proteína a hidrolizar. El sitio catalítico se caracteriza por la presencia de la tríada Ser-Asp-His (Polgár, 2005) (Fig. 1.2A). En el siguiente link se puede encontrar una representación animada del mecanismo de reacción:

<http://www.bmb.uga.edu/bcmb8010/moremen/weblinks/WebSerineProteases/SerPro.html>

Su identificación es posible por la inhibición irreversible que sufren frente a los siguientes compuestos: 3,4-dicloroisocumarina (3,4-DCI), fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y fluoruro de fenilmetilsulfónico (PMSF), entre otros. En general, las serín-proteasas son activas a pH cercanos a la neutralidad o alcalinos, con una actividad óptima a pH entre 7 y 11.

Peptidasas cisteínicas – Este tipo de proteasas poseen una cisteína catalítica en su sitio activo. La enzima se caracteriza por una díada constituida por residuos de cisteína e histidina ubicadas en el sitio activo (Fig. 1.2B). Se produce una reacción de desprotonación del grupo tiol de la cisteína, por acción del residuo de histidina adyacente, que ahora se encuentra protonada. Luego, el anión sulfuro ataca el carbonilo del enlace peptídico, formando un intermediario covalente mediante una unión tioéster entre el nuevo extremo carboxilo del sustrato y el grupo tiol de la cisteína, liberándose un fragmento del sustrato con un extremo amino terminal. Luego, el residuo de histidina vuelve a su forma desprotonada y el enlace tioéster es subsecuentemente hidrolizado generando un ácido carboxílico en el fragmento

restante del sustrato, al mismo tiempo que se genera la enzima libre (Barrett, 2001; Rzychon *et al*, 2004).

Las cisteín-proteasas son generalmente susceptibles a compuestos como el benzoato de p-cloromercurio (pCMB), el fluorofosfato de diisopropilo (DFP), y el N-etil maleimida (NEM) (Rao *et al*, 1998; Rahman *et al*, 2006).

Peptidasas aspárticas – En este tipo de proteasas, la actividad catalítica depende de residuos de ácido aspártico que se ubican en el sitio activo. Son moléculas bilobuladas en las que cada lóbulo presenta un residuo de ácido aspártico, los cuales se aproximan formando el sitio activo (Fig. 1.2C). En la molécula activa, sólo uno de los residuos del ácido se ioniza. Cuando ocurre la unión del sustrato, se dan dos transferencias de protones que facilitan el ataque nucleofílico. Uno de los residuos del ácido actúa como base aceptando el protón de una molécula de agua (permitiendo su activación), mientras que el otro residuo actúa como ácido, donando un protón al oxígeno del grupo carbonilo del enlace peptídico. Luego, el agua realiza un ataque nucleofílico y se forma un intermediario (dihidrato de amina) en el cual el grupo hidroxilo dona un protón al residuo de ácido aspártico que se encuentra ionizado, mientras que el carboxilo protonado del otro aspartato dona un protón al átomo de nitrógeno de uno de los productos peptídicos resultantes (Garret *et al*, 1999).

La actividad de estas enzimas se inhibe por pepstatina y son sensibles a compuestos con grupos diazocetona (Rao *et al*, 1998). La mayoría muestra actividad a bajo pH, entre 3 y 4.

Peptidasas metálicas – Su actividad catalítica depende de la unión a cationes metálicos divalentes. La mayoría de las metalo-proteasas presenta Zn en su sitio activo, pero otras presentan Co o Ni. Durante la catálisis, el átomo de Zn^{++} promueve el ataque nucleofílico del átomo de oxígeno de una molécula de agua (ubicada en el sitio activo) a un grupo carbonilo (Fig. 1.2D). Un residuo aminoacídico ácido en el sitio activo facilita la reacción al extraer un protón de la molécula de agua (Shore, 1970; Klinman, 1972). En el siguiente link se puede encontrar una representación animada del mecanismo de reacción:

<http://www.bmb.uga.edu/bcmb8010/moremen/weblinks/WebMetalloproteinases/Metaloprot.html>

Estas proteasas pueden ser inactivadas por diálisis o agentes quelantes de metales, como el ácido etilen diamino tetra acético (EDTA), entre otros.

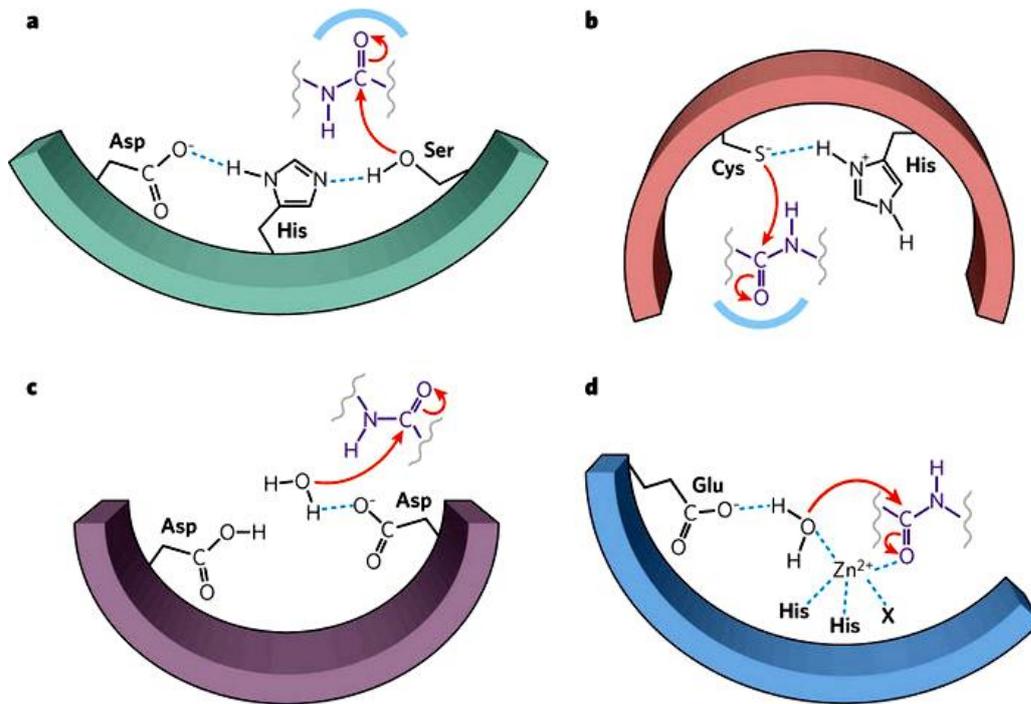


Figura 1.2. Mecanismos catalíticos de las proteasas. A) Serínicas. B) Cisteínicas. C) Aspárticas. D) Glutámicas. Tomado de Neitzel, 2010

1.3- Aplicaciones biotecnológicas de las proteasas

Las enzimas proteolíticas representan más de la mitad del mercado global de enzimas. El comercio mundial de enzimas, superó en la década de los 80s, los 500 millones de dólares anuales, mientras que en los 90, este monto ascendió a 1500 millones de dólares. El incremento producido en los últimos años fue del orden del 6,5% anual, superando en el 2010 los 5 mil millones de dólares. Se estima que las proteasas continuarán siendo las enzimas más requeridas a nivel productivo dado su uso creciente en el procesamiento de materiales de origen natural, así como también en la industria farmacéutica. (<http://www.marketsandmarkets.com/>). Más atrás se encuentran las lipasas y las celulasas.

Las proteasas se utilizan ampliamente en diversos procesos industriales, tales como la industria cárnica (tiernizado de la carne), como aditivo en detergentes biodegradables, fabricación de cerveza, producción de quesos, panificación, obtención de proteínas modificadas, manufactura de cueros, tratamiento de desechos industriales de alta concentración proteicas, entre otros. También encuentran su uso en el mercado farmacéutico, en el tratamiento de heridas purulentas, co-adyuvantes de trastornos digestivos y antiinflamatorios. Recientemente se están aplicando las proteasas en reacciones de síntesis en medios no acuosos, tal es el caso de la síntesis del aspartamo (Tsuchiyama *et al.*, 2007).

1.3.1- Producción de bebidas alcohólicas

En la industria cervecera, desde la preparación del extracto crudo hasta la filtración final y embotellamiento, existen varios puntos donde la introducción de enzimas hidrolíticas mejora la calidad del producto final (Landbo *et al.*, 2006). Las proteasas ayudan a reducir la turbidez de la cerveza, evitando la formación de aductos tanino-proteína que ocurren en frío. El uso de proteasas también evita la formación de turbidez por la precipitación de proteínas en medio alcohólico (He *et al.*, 2006).

1.3.2- Producción de alimentos

En la panificación, la adición de proteasas permite el uso de harinas de alto contenido proteico. Se produce entonces una masa más estable y una miga más suave por la degradación del gluten, dejando intacto el resto de los ingredientes. También se mejora la extensibilidad de la masa, una propiedad importante para el manejo mecánico, reduciendo el tiempo de amasado y por ende el costo energético (Moodie, 2001).

La mayor aplicación de las enzimas proteolíticas en la industria alimenticia, es sin duda, en la industria láctea. La primera fase de producción del queso consiste en la coagulación de la leche. Para este fin, usualmente se utilizan enzimas provenientes del abomaso de terneros. Las mismas hidrolizan la caseína, produciendo su desnaturalización y precipitación. El alto costo de obtención de la enzima de origen

animal ha incentivado a los industriales a buscar fuentes alternativas de proteasas. Inclusive en nuestro país, en el ámbito rural, se realiza la preparación de queso utilizando un preparado enzimático de flor de cardo (maleza perteneciente a la familia Asteraceae). Al día de hoy también se utilizan enzimas proteolíticas derivadas de microorganismos, lo que reduce el costo de producción. Así mismo, el uso de enzimas microbianas y no de origen animal, permite ampliar el consumo de queso a la comunidad vegetariana.

Junto con las lipasas, las proteasas juegan un rol importante en la maduración de quesos (Fox & Law, 1991; Chamba & Perreland, 2002; Alagasamy *et al.*, 2006). El agregado de determinado tipo de peptidasas permiten modificar el sabor y la textura de los quesos, así como también disminuir el tiempo necesario para alcanzar el sabor del queso maduro, lo que llevaría a una reducción del costo por el tiempo de almacenamiento (Park, 2001).

En la industria cárnica, las proteasas se utilizan en el proceso de tiernizado, actuando sobre las fibras de colágeno, miofibrillas y elastina (Sullivan, 2010; Janz 2005). La mayoría de las proteasas utilizadas en el tiernizado presentan una actividad muy escasa a la temperatura de almacenamiento de la carne (5 °C), presentando una temperatura de actividad óptima a los 45 °C (Ha, 2013).

1.3.3- Industria de los detergentes

Otra aplicación de las proteasas es como aditivos de detergentes, ya sea por su utilización como agente de lavado, o bien, como agente auxiliar. En 1969 se comenzaron a usar enzimas como parte de los detergentes, y actualmente el 90% de los detergentes de lavandería de origen europeo contienen proteasas. La aplicación de las mismas en el lavado ha aumentado debido al deseo del ahorro energético. Se ha demostrado que el remojo en un agente enzimático seguido de un lavado a baja temperatura resulta en un mejor lavado, comparado con un lavado normal a alta temperatura (Maase & Van Tilburg, 1983).

1.3.4- Industria textil

Las enzimas proteolíticas se emplean en el tratamiento de las fibras proteicas naturales de la lana, durante las fases de hilado, teñido y acabado de los tejidos, con el fin de obtener una superficie más limpia y suave. El uso de enzimas para este proceso es una alternativa ecológica comparado con los procesos químicos que producen efluentes contaminantes (Infante *et al.*, 2010).

Otra aplicación se encuentre durante el desgomado de la seda natural. La fibra de seda está formada por dos proteínas, la fibroína (centro estructural) y la sericina (material pegajoso que cohesiona la fibra). La sericina produce que la fibra de seda se vuelva rígida y carente de brillo (Fredy *et al.*, 2003; Horan *et al.*, 2005). La técnica de desgomado consiste en el tratamiento de la fibra con una proteasa alcalina en solución y un tensoactivo no iónico, seguido por un tratamiento con una solución de enzima capaz de degradar la sericina a pH 8.8 y 55-60 °C, por una o dos horas. Este método ha sustituido al proceso de hervir los hilos en una solución jabonosa alcalina.

1.3.5- Tratamiento de cueros

Dentro de la industria de la curtiembre, las proteasas se aplican en las etapas de remojo y depilación. Mediante el remojo se pretende rehidratar las pieles hasta aproximarse a su textura original para obtener cueros de alta calidad, donde las proteasas juegan un rol en el proceso de ablandamiento. En el depilado se elimina los pelos o la lana de la piel, utilizando con este fin cal hidratada y sulfuro de sodio que disuelven el pelo al abrir las estructuras de las fibras. Este tratamiento químico genera muchos residuos y efluentes químicos dañinos para el medio ambiente. Una alternativa ecológicamente amigable, es utilizar proteasas, solas o auxiliadas con los sulfuros, que generan menos residuos tóxicos. Además, las enzimas logran optimizar las propiedades del cuero dando una textura de fibras más ligera y suave (Dayanandan, 2003; Horan 2005).

1.3.6- Industria química

Las proteasas se utilizan también para la producción de peptonas, la base de la mayoría de los medios de cultivos de microorganismos. Las peptonas son el producto (soluble en agua) de una digestión enzimática de cualquier fuente proteica, y que varía según la materia prima de partida, el tipo de proteasa y las condiciones de hidrólisis utilizadas (Vasileva-Tonkova *et al.*, 2007). Cada peptona tiene sus propias características biológicas, y no todas cumplen con las exigencias para el cultivo de todos los microorganismos y células. Diferentes sustratos animales y vegetales se utilizan como fuente de proteínas para la producción de peptonas, muchas de ellas valiosas y caras, haciendo esta industria de las más rentables (Parrado *et al.*, 1993; Reissbrodt *et al.*, 1995; Martone *et al.*, 2005).

1.3.7- Aplicaciones clínicas

Las proteasas se utilizan en dermatología porque tienen la capacidad de remover tejido necrótico en el tratamiento de úlceras y quemaduras (Ayello & Cuddigan, 2004).

Entre otros, se ha descrito también el uso de enzimas proteolíticas para el tratamiento de heridas purulentas, lesiones por carbunco, forúnculos, y como agente trombolítico. Se incluye también el tratamiento local de úlceras de piel, eliminando el tejido necrótico de la herida, favoreciendo así el proceso de cicatrización y rejuvenecimiento epitelial (Kudrya & Simonenko 1994; Fornbacke & Clarsund 2013).

1.4- Catálisis a baja temperatura

La utilización de enzimas proteolíticas es vital para muchos procesos industriales. Sin embargo, muchos de estos procesos tienen como limitante la temperatura de trabajo, ya que algunos procesos deberían llevarse a cabo a temperaturas bajas, por ejemplo para mantener las características del producto final, o por la baja estabilidad de los compuestos de partida a alta temperatura. Esto supone un problema, dado que la mayor parte de las enzimas de uso industrial provienen de microorganismos mesófilos.

Mesófilos son aquellos microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento es cercana a los 35°C, por tanto, el arsenal de enzimas presentes en ellos, han evolucionado para presentar temperaturas óptimas entre 45 y 65°C (Wolf *et al.*, 2004). Siguiendo esta línea de razonamiento, sería esperable encontrar microorganismos productores de enzimas activas a bajas temperaturas en un ambiente frío.

Entre los ambientes fríos de nuestro planeta, se encuentra la Antártida, un continente geográficamente aislado y con influencia antropogénica casi nula. Posee una amplia diversidad de ambientes acuáticos desde océanos, mares y hielos marinos, y variados lagos de salinidad variable. Estos ambientes experimentan condiciones climáticas extremas, como aridez, fluctuaciones de temperatura y altas dosis de radiación solar. Sobre la mayoría del continente, predomina un frío polar. Estas condiciones limitan la diversidad de animales y vegetales superiores; sin embargo, la biodiversidad microbiana es alta. Los microorganismos que han logrado colonizar estos nichos han evolucionado para crecer y desarrollarse a bajas temperaturas. Aquellos microorganismos que presentan una temperatura óptima de crecimiento cercana a 15 °C (y no crecen más allá de los 20 °C) se denominan psicrófilos; mientras que aquellos que presentan temperaturas óptimas de crecimiento cercana a los 25 °C (y no crecen más allá de los 30 °C) se denominan psicrotolerantes. Estos microorganismos representan una fuente explotable de enzimas novedosas y con actividad a bajas temperaturas (Ohgiya *et al.*, 1998; Feller & Gerday, 2003; Van der Burg, 2003; Adekoya *et al.*, 2006; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011; Martínez-Rosales *et al.*, 2012). Las proteasas activas a bajas temperaturas podrían ser utilizadas en procesos industriales que requieran temperaturas de reacción menores a las requeridas por las enzimas provenientes de microorganismos mesófilos. Por otro lado, el uso de enzimas activas a bajas temperaturas podría suponer un ahorro energético durante la realización de algunos procesos, al poder efectuar las reacciones a temperatura ambiente.

1.5- Características de las enzimas

En general, las enzimas hidrolíticas siguen el comportamiento descrito por Michaelis y Menten. En las reacciones enzimáticas, la velocidad de catálisis sigue una cinética de saturación tomando en cuenta la concentración de sustrato. A concentraciones muy bajas de sustrato, la velocidad aumenta linealmente con la concentración de sustrato. Pero a medida que aumenta la concentración de sustrato, la relación comienza a perderse, llegando a la saturación, donde la velocidad de la reacción se ve limitada en un valor conocido como velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). La velocidad de una reacción que cumple las características definidas por Michaelis y Menten puede expresarse de forma cuantitativa en la ecuación:

$$v = \frac{[E][S]K_{cat}}{K_M + [S]}$$

Donde, $K_{cat}[E] = V_{m\acute{a}x}$

La concentración de sustrato en la cual la velocidad se iguala a la mitad de la velocidad máxima, se conoce como K_M , denominada constante Michaeliana. K_{cat} (constante catalítica o número de recambio) se corresponde al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo, en condiciones óptimas. La relación entre K_{cat} y K_M es una medida de la eficiencia enzimática, y mide la eficiencia con la cual una enzima convierte un sustrato en producto. Es por esta razón que se le denomina constante de especificidad.

1.6- Enzimas activas a bajas temperaturas

La actividad de una enzima depende de la temperatura a la cual se desarrollo la reacción, entre otras propiedades. Para un microorganismo mesófilo creciendo a una temperatura menor a su óptimo de crecimiento se evidencia una reducción de la actividad de las enzimas que presente en ese momento. Para resolver este problema, los microorganismos sicrofílicos y sicrotolerantes, poseen enzimas que se han adaptado y/o evolucionado sufriendo modificaciones que les permiten funcionar

apropiadamente a bajas temperaturas (enzimas psicrófilas). Estas adaptaciones usualmente tienen como diana aumentar la actividad específica y/o disminuir la temperatura óptima de catálisis. Entre otros, para mantener la actividad a temperaturas bajas, las enzimas de los microorganismos psicrófilos aumentan su eficiencia catalítica (K_{cat}/K_M). Para lograrlo, las enzimas sufren modificaciones estructurales que llevan a una mayor flexibilidad de la molécula, pero menor estabilidad (Morgan-Kiss *et al.*, 2006; Marx *et al.*, 2007). Entre los cambios estructurales se ha detectado que algunas enzimas psicrófilas presentan mayor número de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas expuestas al solvente, comparado con sus homólogas mesófilas (Rodríguez & Tiedje, 2008; Margesin & Miteva, 2011; Martínez-Rosales *et al.*, 2012). Se ha detectado también un aumento del número de glicinas y alaninas, y una disminución de asparaginas (disminución de enlaces de hidrógeno) en las enzimas producidas por los microorganismos psicrófilos en comparación con las enzimas homólogas de un microorganismo mesófilo (Gianese *et al.*, 2001). También se ha registrado una mayor proporción de aminoácidos con carga, principalmente treonina y glutamato (Saunders *et al.*, 2003).

1.7- El género *Flavobacterium*

Los integrantes del género *Flavobacterium* son bacterias en su mayoría comensales, aunque se incluyen algunos patógenos oportunistas (Cabrera *et al.*, 1961). Son Gram negativos en su tinción, presentando una morfología de bastón, son aeróbicas y su tamaño puede oscilar entre 2–5 μm de largo y 0.3–0.5 μm de ancho. Son generalmente móviles. Cuando crecen en medio sólido con agar forman colonias de color anaranjado, amarillo o crema. Presentan un bajo contenido G+C, 32–37%. Son quimiorganótrofos y buenos degradando muchos biopolímeros como la celulosa, quitina y pectina (Reichenbach & Dworkin, 1991; Manz *et al.*, 1996). Pueden encontrarse en casi cualquier hábitat, como alimentos (Kusaya, una comida tradicional japonesa con base de pescado pútrido) (Satomi *et al.*, 1997), en el rumen (Ramsak *et al.*, 2000), como endosimbiontes en las cucarachas (Bandi *et al.*, 1994), en fuentes hidrotermales (Sievert *et al.*, 2000), en los sedimentos de lagos y océanos (Llobet-Brossa *et al.*, 1998) e inclusive en rocas y aguas congeladas en la Antártida (Smith *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2005; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Entre las bacterias productoras de hidrolasas extracelulares, se ha descrito que los miembros del género *Flavobacterium* producen metalo-proteasas, con un átomo de zinc coordinando el sitio catalítico y con una estructura tridimensional estabilizada y sensible a la presencia de calcio (Zhang *et al.*, 2011).

1.8- Antecedentes del trabajo

Desde el año 2008, nuestro laboratorio trabaja en proyectos relacionados al aislamiento e identificación de bacterias psicrófilas y psicrotolerantes con potenciales aplicaciones biotecnológicas. En este contexto, se han obtenido varios aislamientos de origen antártico identificados como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, y *Flavobacterium* (Tesis de Grado de Cecilia Martínez-Rosales; 2008). Todos estos producen proteasas extracelulares activas a bajas temperaturas. En el caso del aislamiento *Pseudomonas* sp. AU10, se ha identificado el gen responsable de la síntesis de una proteasa extracelular (Tesis de Maestría de Natalia Fullana; 2014) y de una laccasa (polifenol oxidasa) (Tesis de Maestría de Victoria Braña, en curso). Ambas enzimas se están produciendo en forma recombinante y caracterizando sus propiedades bioquímicas.

Durante esta pasantía se trabajó con el aislamiento *Flavobacterium* sp. AU8, una bacteria Gram-negativa, capaz de crecer entre 4 °C y 20 °C (no crece a 30 °C) con un tiempo generacional de 25 y 13 h, respectivamente. AU8 produce al menos una proteasa extracelular (evidenciado por los estudios de zimogramas), cuando la bacteria crece entre 4 °C y 20 °C en un medio de cultivo suplementado con leche descremada (Tesis de Grado de Cecilia Martínez-Rosales; 2008). La producción de la proteasa se evidenció al observar la formación de un halo de transparencia, producto de la hidrólisis de las proteínas lácteas, cuando el microorganismo se cultivó en medio sólido suplementado con leche. Algunos estudios preliminares demostraron que la proteasa extracelular producida a 4 °C es activa entre 4 °C y 30 °C.

Objetivo General

Identificar la región codificante de una proteasa extracelular producida por un aislamiento de *Flavobacterium* de origen Antártico, y realizar su caracterización parcial *in silico*.

Objetivos Específicos

Verificar la identidad del aislamiento AU8

Analizar el número de proteasas extracelulares secretadas al medio

Identificar la proteasa extracelular producida por AU8 por espectrometría de masas

Obtener la secuencia codificante

Caracterizar algunas propiedades de la enzima *in silico*

Analizar el número de copias del gen en el genoma de AU8

Objetivos Educativos

Adquirir entrenamiento en algunas técnicas de microbiología, bioquímica y biología molecular, así como del uso de bases de datos y análisis de secuencias, tomando como objeto de estudio una enzima de potencial relevancia industrial.

2. Materiales y Métodos

2.1- Microorganismos utilizados durante este trabajo

Durante este trabajo se utilizaron aislamientos bacterianos de origen antártico y cepas de *Escherichia coli* para la multiplicación de plásmidos. Los microorganismos utilizados se describen en la Tabla 2.1.

Para el crecimiento bacteriano se utilizaron los medio LB (Anexo: Medios de cultivo) y ML según se describe más adelante.

Tabla 2.1. Microorganismos y algunas propiedades relevantes de los mismos.

Bacteria	Propiedades relevantes	Referencia
<i>Flavobacterium</i> sp. AU8	Sicrófila. Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011
<i>Flavobacterium</i> sp. AU13	Sicrófila. Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011
<i>Flavobacterium</i> sp. AU23	Sicrófila. Productora de una proteasa extracelular.	Diana, L. Comunicación personal
<i>Pseudomonas</i> sp. AU6	Sicotolerante. Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. AU9	Sicotolerante. Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011
<i>Pseudomonas</i> sp. AU10	Sicotolerante. Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales y Castro-Sowinski, 2011
<i>Janthinobacterium</i> sp. AU11	Sicotolerante Productora de una proteasa extracelular.	Martínez-Rosales, C. Comunicación Personal
<i>E. coli</i> DH5 α	Propagación de plásmidos. <i>hsdR17 endA1 thi-1 gyrA96</i> <i>relA1 supE44 ΔlacU169</i> (ϕ 80dlacZ Δ M15)	Sambrook et al. 1989

2. 2- Producción de la proteasa extracelular producida por *Flavobacterium* sp. AU8

Para la producción de la proteasa extracelular producida por *Flavobacterium* sp. AU8, los microorganismos se cultivaron en medio LB diluido 20 veces, suplementado con leche en polvo descremada al 5% (medio ML). Se esterilizaron en forma independiente el medio LB diluido diez veces (20 min a 121 °C) y la leche descremada en polvo (Conaprole) al 10% reconstituida en agua destilada (10 min a 121 °C). La solución de leche se esterilizó por separado para evitar la desnaturalización de las proteínas lácteas por la sobreexposición al calor. A continuación se mezclaron volúmenes iguales de ambas preparaciones, en condiciones asépticas, obteniendo el medio final (ML) a la concentración deseada.

Se realizó un precultivo, desde una colonia aislada de AU8, en medio LB y se creció hasta la fase exponencial tardía a 4 °C y agitación (220 rpm), siguiendo técnica aséptica. Para la producción de la proteasa, se transfirió un volumen de inóculo del 1% hacia el medio ML y se incubó a 4 °C con una agitación de 220 rpm. La producción de la proteasa extracelular se evidenció por la coagulación de las proteínas lácteas, unos 10 días más tarde.

Las células se sedimentaron por centrifugación durante 2 min a 12000 rpm y 4 °C, y el sobrenadante se filtró por filtros de 0.45 µm. El sobrenadante libre de células conteniendo las enzimas proteolíticas (sobrenadante proteolítico) se conservó a -20 °C.

2. 3- Zimograma

El número de proteasas extracelulares producidas por AU8 se verificó mediante un gel de actividad (zimograma). El ensayo consistió en realizar una electroforesis en un gel nativo de poliacrilamida co-polimerizada con gelatina. El gel constó de un gel concentrador y un gel separador al 8 y 5%, respectivamente, conteniendo 0,1% de gelatina previamente disuelta en agua destilada. Se sembraron 15 µL de muestra por

pocillo, preparada en búfer de muestra sin dodecilsulfato de sodio (SDS), ni β -mercaptoetanol. La electroforesis se realizó a 180 V en búfer Tris-Glicina (pH 8,3), a temperatura ambiente, hasta que el frente de corrida se ubicó a un centímetro del final del gel. El gel se enjuagó en Tritón al 1% durante una hora, seguido de dos enjuagues de 5 min en agua destilada. Se incubó en búfer de actividad a temperatura ambiente durante toda la noche para permitir la acción de la enzima proteolítica. Las bandas de actividad se revelaron sumergiendo el gel en Azul de Coomasie R250 al 0,1% y posterior lavado con solución decolorante. La actividad proteásica se detectó por la producción de zonas de clarificación en el gel (bandas sin color) sobre un fondo azul.

Las soluciones utilizadas en estos ensayos y las mezclas de reacción se describen en el Anexo: Electroforesis.

2. 4- SDS-PAGE e identificación de la proteasa por espectrometría de masas

El sobrenadante proteolítico se analizó procediendo con la separación de proteínas mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Para ello se utilizó un gel concentrador al 5% y separador al 12%. La separación de proteínas se realizó a un voltaje de 70 V hasta que el frente de corrida alcanzó un centímetro del final del gel. Se utilizó búfer de corrida Tris-Glicina (pH 8,3). Las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomasie R250 al 0,1% y posteriores lavados con solución decolorante. Se utilizó como marcador de peso molecular el “Protein Ladder” (10-250 kDa, Cat. No. P7703S) de BioLabs.

La identificación de las bandas proteicas lo realizó el servicio de UBYPa del Instituto Pasteur de Montevideo, por espectrometría de masas (MALDI-TOF). El mapeo peptídico de las proteínas seleccionadas se realizó mediante digestión trípica y determinación del espectro de masas en el equipo 4800 MALDI-TOF (Applied Biosystems) en modo reflector y se calibraron usando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Los péptidos obtenidos se compararon con la base de datos NCBI empleando el programa MASCOT.

2. 5- Extracciones de ADN

2. 5.1- Extracción de ADN genómico (ADNg)

Se centrifugaron 3 mL de un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche durante 2 min a 10000 rpm, a temperatura ambiente. El *pellet* celular se lavó con 1 mL de cloruro de sodio (NaCl) 1M estéril y luego con 1 mL de búfer T₁₀E₂₅ (Tris 10 mM, EDTA 25 mM). El *pellet* se resuspendió en 100 µL de solución de lisozima (2 mg/mL preparada en T₁₀E₂₅) y se agregaron 20 µL de ARNasa (10 mg/mL), se mezcló por inversión e incubó durante 30 min a 37 °C. Se agregaron 567 µL de búfer T₅₀E₂₀ (pH 8) y se mezcló suavemente. Se incubó por 1 h a 37 °C. Se agregaron 100 µL de NaCl 5 M, mezclando en forma suave, se adicionaron 80 µL de bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) 10% en NaCl 0,7 M y se incubó por 10 min a 65 °C. Trabajando en campana de gases y siguiendo las normas de bioseguridad correspondiente, se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, donde se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó 5 min a 10000 rpm. Se volvió a tomar la fase acuosa y se realizó una segunda etapa de extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. A continuación se realizó una última extracción con un volumen de cloroformo y se centrifugó por 5 min a 10000 rpm. El ADN se precipitó desde la fase acuosa con 0,6 volúmenes de isopropanol frío durante toda la noche a -20 °C. Se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm, a 4 °C. El *pellet* se lavó con etanol 70% frío. Se dejó evaporar el mismo durante 15 min a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en 30 µL agua destilada estéril.

En algunos casos el ADNg se extrajo usando el kit comercial de Zymo Resarch “ZR Bacterial DNA MiniprepTM-Classic” (Cat. No. ZRC174316).

El control de la calidad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en búfer TAE (Anexo: Búferes), durante 30 min a 100 V. Se reveló mediante el uso del agente intercalante Good View[®] (1 µL cada 25 mL de agarosa) y posterior exposición a luz UV.

2. 5.2- Extracción de ADN plasmídico

Se partió de 3 mL de un cultivo de AU8 crecido en medio LB durante toda la noche a temperatura ambiente. Las células se sedimentaron por centrifugación a 10000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente y se suspendieron, con la ayuda de una micropipeta, en 150 μ L de solución Tris.HCl 50 mM (pH 8) con EDTA 10 mM. Las células se lisaron por el agregando de 150 μ L de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 M con SDS al 1%, con agitación suave hasta que se verificó transparencia, y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 150 μ L de una solución conteniendo acetato de potasio 3 M (pH 4,5), y se verificó la formación de un precipitado blanco-transparente. Se centrifugó por 5 min a 10000 rpm, y se trasvasó el sobrenadante en un tubo limpio, donde se agregaron 900 μ L de etanol 95% y se agitó suavemente con sucesivas inversiones. Se centrifugó 20 min a 10000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de ADN se lavó con etanol 70%. Se retiró todo el etanol y se dejó evaporando durante 15 min. Finalmente, el ADN plasmídico se resuspendió en 40 μ L de agua bidestilada estéril apirógena. Para eliminar el ARN, se incubó con ARNasa a una concentración final de 100 ng/ μ L durante 15 min a 37 °C.

En algunos casos el ADN plasmídico se extrajo usando el kit comercial de Zymo Research “ZR Plasmid Miniprep™-Classic” (Cat. No. ZRC173915).

2. 6- Identificación del aislamiento AU8

A modo de confirmar la identificación del aislamiento AU8, se realizó una PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) para amplificar una región parcial correspondiente al gen ADNr 16S.

Se utilizaron dos pares de cebadores para el cual los amplicones resultantes se superponen en 124 nucleótidos, tomando como referencia el genoma de *Escherichia coli*. En la Tabla 2.2 se muestran los dos pares de cebadores utilizados.

Tabla 2.2. Cebadores utilizados en la identificación de AU8. El cebador 907R es degenerado, y la R en su secuencia corresponde a A+G. Tm – temperatura de fusión de los cebadores

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
1401R	5´ CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3´	59.1
784F	5´ AAA CAG GAT TAG ATA CCC 3´	38.3
907R	5´ CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3´	40.5
63F	5´ CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3´	49.2

Se espera que los pares de cebadores (784F y 1401R) y (63F y 907F) amplifiquen fragmentos de ADN de aproximadamente 617 y 844 pb, respectivamente.

Para un volumen final de 20 µL, se mezclaron 2 µL de Búfer Ranger 10X, 0,4 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, 0,2 µL de Taq Ranger polimerasa (polimerasa de Bioline; Cat. No. BIO-21121) y 1 µL de ADNg. El búfer Ranger contiene los dNTPs, el cloruro de magnesio (MgCl₂) y potenciadores de la amplificación de ADN a las concentraciones óptimas.

Para ambos cebadores las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 95 °C durante 5 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 58 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 1 min. Se concretó con un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min. Para la etapa de extensión se consideró un tiempo de 60 seg por cada 1000 pb a amplificar.

La presencia del amplicón se verificó realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1% con el intercalante Good View incluido en el mismo y posterior exposición a luz UV, como se describió anteriormente (punto 3. 5.1). Los productos de PCR se purificaron usando el kit comercial de QiaGen “QIAquick Gel Extraction Kit®” (Cat. No. 28704), siguiendo las instrucciones de fabricante y se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen, Corea.

Los fragmentos secuenciados se ensamblaron para dar lugar a una sola secuencia. Para

ellos se empleó el programa especializado de BLAST, BLAST 2 sequences, del NCBI. Éste permite alinear dos secuencias de ADN estableciendo similitudes entre ellas. Los parámetros establecidos fueron que por cada apareamiento correcto se otorgó un punto, y se penalizó restando dos puntos por cada apareamiento incorrecto. Para buscar secuencias con alta similitud en las bases de datos se utilizó el programa BLASTn del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la base de datos ribosomales RDB (Ribosomal Data Base; <http://rdp.cme.msu.edu/>).

2. 7- Diseño de cebadores degenerados y específicos

Luego de identificar, mediante espectrometría de masa, algunos péptidos de la proteasa extracelular producida por el aislamiento AU8, se diseñaron cebadores degenerados dirigidos a esos péptidos, utilizando el programa GeneRunner. Se eligieron cebadores con un grado de degeneración menor a 1024, y con valores positivos de ΔG para la formación de dímeros y horquillas; además, se tuvo en cuenta que la temperatura de fusión de los mismos estuviera en el entorno de 60 °C y el contenido de GC en el 55-60%.

Los cebadores específicos, dirigidos a una secuencia conocida de ADN se diseñaron utilizando los programas GeneRunner y Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

2. 8 – Identificación de una región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8

Para la identificación de una región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8, se realizó una PCR utilizando los cebadores degenerados dirigidos a los péptidos identificados por espectrometría de masas. El amplicón se clonó en el plásmido pTZ57R/T, se transformó a células competentes de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron los clones transformantes y se envió a secuenciar el inserto.

2. 8.1 – Obtención de un fragmento de amplificación correspondiente a una región parcial del gen de interés

La mezcla de reactivos de PCR, para un volumen final de 20 μL , se realizó agregando 2 μL de Búfer Ranger 10X, 0,4 μL de cada cebador a una concentración de 10 μM (Tabla 3.3; en la Sección Resultados), 0,2 μL de Taq Ranger y 1 μL de ADN. La polimerasa Ranger ADN está diseñada para amplificar regiones de ADN mayores a 10 kb con gran sensibilidad, alta procesividad y con actividad correctora de prueba. La enzima posee un anticuerpo unido al sitio catalítico, que neutraliza su actividad polimerasa, y solamente se activa (por desnaturalización del anticuerpo) cuando se alcanza la temperatura de reacción durante las etapas iniciales de la desnaturalización del ADN en estudio. Esta propiedad de la Taq Ranger permite trabajar con la mezcla a temperatura ambiente y evita amplificaciones inespecíficas.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, hibridación de cebadores a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min y extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min. Se finalizó con un ciclo de extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min.

Para confirmar la presencia del amplicón, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE (Anexo de Búfers), agregando Good View al gel, y posterior exposición a UV, como se describió anteriormente. Los productos de PCR se purificaron usando el kit comercial como se describió en el punto 2.6.

2. 8.2 Clonación del fragmento de amplificación

Obtenido el amplicón, se realizó su clonado en un vector con extremos T y resistencia al antibiótico Ampicilina (Amp). Los fragmentos se clonaron usando el kit comercial “InsT/ACLone™ PCR cloning Kit” de Thermo Scientific (Cat. No. 00136622).

El plásmido pTZ57R/T posee en sus extremos hebras simples de repeticiones de ddT, que se superponen a los extremos 3´dA generados por la U-Taq polimerasa. Estos extremos T permiten así clonar fácilmente productos de PCR en este vector. El vector

posee un gen de resistencia a ampicilina (Amp), lo que permite seleccionar aquellas transformantes que han adquirido el plásmido pTZ57R/T. El vector posee además otras características que permiten la detección de los clones que contienen el inserto de interés. El vector contiene una copia del gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, la cual cataliza la reacción de hidrólisis de lactosa en glucosa más galactosa. En el medio de cultivo, en presencia de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, sustrato alternativo para la β -galactosidasa) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido, inductor artificial del operón Lac) se observan colonias azules para aquellas células que contienen el plásmido con el gen *lacZ* intacto (hidrólisis de Xgal para dar el producto, 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, que se oxida para dar el producto de color azul insoluble, 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo). Si el producto de PCR se inserta, el gen *lacZ* se interrumpe y se vuelve no funcional. De esta manera pueden identificarse aquellas transformantes que han adquirido el inserto por ser blancas.

Una vez que la secuencia de interés se ha insertado en el plásmido pTZ57R/T, no es necesaria la utilización de cebadores que hibriden con el inserto para la secuenciación del mismo, ya que el inserto quedará flanqueado por secuencias conocidas para el fago T4 y secuencias M13. Los servicios de secuenciación proveen estos cebadores facilitando el trabajo del investigador al momento de enviar el plásmido para la secuenciación del inserto.

La reacción de ligación se realizó incubando 6 μ L de producto de PCR con 1,5 μ L del vector pTZ57R/T, 3 μ L de búfer de ligación, y 0,5 μ L de T4 ligasa, para un volumen final de 10 μ L. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente, y luego toda la noche a 4 °C.

2. 8.3 Transformación y multiplicación del vector portando el inserto de interés. Análisis de la secuencia

La mezcla de ligación se transformó a células competentes de *E. coli* DH5 α según se describe a continuación.

2. 8.3.1 Preparación de células competentes

La preparación de las células *E. coli* DH5 α competentes se realizó por tratamiento con CaCl₂ frío, según se describe en Sambrook et al. (1989). El protocolo se detalla a continuación.

Se preparó un precultivo de células creciendo *E. coli* DH5 α en medio LB, a 37 °C y agitación, durante toda la noche. Se transfirió una alícuota de este crecimiento a 250 mL de medio LB (densidad óptica inicial a 600 nm de 0.05) y se creció a 37 °C, con agitación constante a 200 rpm, hasta llegar a una densidad óptica (DO) de 0,3 a 620 nm. A continuación se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se descartó, y el *pellet* se lavó con 100 mL de cloruro de calcio (CaCl₂) 0,1M (estéril y frío). Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 50 mL de CaCl₂ 0,1 M. Se incubó en hielo durante una hora. Se centrifugó, y el *pellet* se resuspendió en 3 mL de CaCl₂ 0,1 M con 20% de glicerol, siempre en frío. Las células se fraccionaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso.

2. 8.3.2 Transformación

Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 α . La transformación se llevó a cabo mezclando 50 μ L de células competentes con 7 μ L de mezcla de ligación. Se incubó la mezcla 30 min en hielo, luego se realizó el choque térmico sometiendo las células a 42 °C por 90 seg y 2 min en hielo (el procedimiento se realizó dos veces). A continuación se agregaron 350 μ L de LB y se incubó a 37 °C durante 50 min con agitación para permitir que las células se recuperaran. Finalmente, la transformación se creció en placa, sembrando en superficie, por rastrillado de 50 y 100 μ L de la mezcla de transformación en LB sólido suplementado con Amp 100 μ g/mL, XGal (40 μ g/mL) e IPTG (150 μ g/mL). Se incubó a 37 °C durante toda la noche.

2. 8.3.3 Selección de clones y verificación de la presencia del inserto

Los clones que incorporaron el vector con el inserto, se seleccionaron en base a la coloración blanca de las colonias.

Se presencia del inserto se analizó mediante el ensayo de PCR, utilizando como templado una mini-preparación de ADN plasmídico de los clones seleccionados y los cebadores correspondientes al fragmento clonado. Las condiciones de ciclado fueron las mismas que se describen en el apartado de PCR con cebadores degenerados.

El plásmido se envió a la empresa Macrogen en Corea para la secuenciación del inserto, en ambos sentidos, con los cebadores universales M13F (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3') y M13pUCR (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3').

2. 8.3.4 Análisis de secuencia

Las secuencias nucleotídicas se editaron mediante análisis visual del cromatograma y usando el programa MEGA 5. La secuencia correspondiente al amplicón se reconstruyó a partir de las secuencias obtenidas en ambos sentidos. Finalmente se contrastaron con la base de secuencias del NCBI, utilizando el programa "BLASTx" y la base de datos de proteasas MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), para buscar secuencias de alta similitud.

2. 8.2- Confirmación de la secuencia correspondiente a una región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8

Para confirmar la secuencia nucleotídica correspondiente a la región parcial del gen de la proteasa extracelular producida por AU8, se realizó una PCR utilizando los cebadores específicos dirigidos al gen de la proteasa del aislamiento AU8. La información además nos permitirá diseñar cebadores, simplemente por el cambio de sentido de los mismos, para la reacción de PCR inversa (ver mas adelante; sección 2. 8.4).

Para un volumen final de 20 μ L, la mezclaron 2 μ L de Búfer Ranger 10X, 0,4 μ L de cada

cebador preparados a una concentración de 10 μ M, 0,2 μ L de Taq Ranger polimerasa y 1 μ L de ADN. Los cebadores fueron los siguientes: Fwd_AU10E23 (5' TTC AGC CAG TTC AAC ACC 3') y Rev_AU10E422 (5' AGT AAC TCA TGA CGC TGT AGC 3').

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 95 $^{\circ}$ C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 $^{\circ}$ C durante 40 seg, hibridación de cebadores a 51,2 $^{\circ}$ C durante 1 min y extensión a 72 $^{\circ}$ C durante 1 min. Se finalizó con un ciclo de extensión a 72 $^{\circ}$ C durante 5 min.

Para confirmar la presencia del amplicón de aproximadamente 500 pb, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE, con el Good View incluido en el gel y posterior exposición a UV.

Los productos de PCR se purificaron usando el kit comercial de QiaGen "QIAquick Gel Extraction Kit[®]", siguiendo las instrucciones de fabricante. Los productos de PCR se clonaron en vectores con extremos T, se transformaron a células competentes de DH5 α y se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen, Corea, con los cebadores tal como se indicó en el punto anterior (3. 8.3.3). Las secuencias se compararon con la base de datos de la NCBI utilizando la herramienta BLASTx y MEROPS.

2. 8.4- Obtención de la secuencia codificante del gen - PCR inversa

En base a la secuencia nucleotídica obtenida para el gen correspondiente a la proteasa, se diseñaron cebadores específicos dirigidos hacia fuera del gen, para ser utilizados en reacciones de PCR inversa (PCRi). Los mismos se diseñaron cambiando el sentido de los cebadores específicos.

2. 8.5- Digestión del ADN genómico

El ADNg de *Flavobacterium* sp. AU8 se digirió con varias enzimas de restricción, seleccionadas en base a la ausencia del sitio de reconocimiento en la secuencia parcial conocida del gen de interés. Se utilizaron las siguientes enzimas: *Bam*HI, *BC*II, *Eco*RI,

HindIII, *KpnI*, *NdeI*, *NotI*, *PagI*, *PstI*, *SacI*, *Sall*, *XbaI* y *XhoI* (todas las enzimas fueron de Fermentas). Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. En un volumen final de 15 μL , se agregaron 1,5 μL de búfer de cada enzima, 12 μL de ADN_g de AU8, y 1,5 μL de la enzima de restricción. Se incubó toda la noche a 37 °C. Las enzimas se inactivaron incubándola a 65 °C por 20 min. La eficiencia de las restricciones se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% con el Good View incluido, en búfer TAE 0,5X, a 100 V durante 50 min.

2. 8.6- Reacción de autoligación de fragmentos de restricción

A continuación se procedió a la ligación intramolecular de los fragmentos obtenidos luego de la digestión, utilizando la enzima T4 ligasa (Thermo Scientific). La reacción se preparó para un volumen final de 200 μL , de los cuáles 168 μL correspondían a agua bidestilada estéril, 20 μL al búfer 10X, 2 μL a la enzima T4 ligasa, y 10 μL de cada digestión. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, y luego durante toda la noche a 4 °C.

2. 8.7- Reacción de PCR

La mezcla de ligación intramolecular se empleó como ADN molde en una reacción de PCR en la cual la mezcla de reacción fue la siguiente (para un volumen final de reacción de 10 μL): 3,5 μL de agua bidestilada estéril, 2 μL de búfer 5x Ranger, 0,4 μL de cada cebador preparado a una concentración de 10 μM , 0,2 μL de Ranger Polimerasa y 4 μL de la mezcla de ligación. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 95 °C durante 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 60 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 5 min. Se concretó con un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, con el agregado de Good View. La banda amplificada se purificó utilizando el kit de QiaGen "QIAquick Gel Extraction Kit®" siguiendo las instrucciones del fabricante. El clonado, selección, preparación de ADN plasmídico y secuenciación fueron los mismos que los

descritos en el punto 2.8.3.3.

2. 9 - Southern Blotting

Con el fin de analizar el número de copias del gen en estudio sobre el genoma de AU8 y la presencia o ausencia de una proteasa homóloga en otros géneros bacterianos (*Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, *Flavobacterium*), se realizaron ensayos de Southern blot de ADN genómico digerido con diferentes enzimas de restricción e hibridación con una sonda del gen de interés marcada con digoxigenina. El método permite detectar la presencia de una secuencia de ADN en una mezcla compleja de ADN.

Para el marcado de la sonda de ADN y la detección de los productos de hibridación se utilizó el “DNA Labelling and Detection Kit” de Roche (Cat. No. 11 093 657 910). La síntesis de la sonda se realiza por PCR y el marcado de la misma se basa en la utilización de un nucleótido unido en forma covalente a digoxigenina (DIG; Fig 2.1), el cual forma parte de la mezcla de nucleótidos, durante la reacción de PCR. La detección del producto de hibridación se realiza por medio de un inmuno-ensayo asociado a una reacción colorimétrica enzimática, llevada a cabo por parte de la fosfatasa alcalina (PA). La sonda que hibrida se reconoce a través de los fragmentos Fab específicos para DIG, unidos en forma covalente con la enzima PA. La visualización resulta posible gracias a la reacción colorimétrica, donde la fosfatasa actúa sobre los sustratos NBT (Nitro azul de tetrazolium; compuesto oxidante) y BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato). La PA se encarga de hidrolizar el grupo fosfato del sustrato BCIP, y el producto orgánico resultante participa de una reacción de óxido-reducción, donde el NBT se oxida dando un color violeta intenso. Finalmente, el sitio de acción de la enzima se visualiza por la formación de un precipitado insoluble de intenso color violeta.

Las soluciones utilizadas durante este procedimiento se describen en el Anexo de Southern blot.

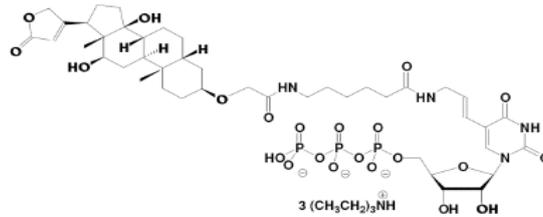


Figura 2.1: DIG-11-dUTP

2. 9.1- Digestión del ADN genómico

Se realizaron extracciones de ADNg de los aislamientos AU6, AU8, AU9, AU10, AU11, AU13 y AU23 (Tabla 3.1), y se controló la calidad del mismo según se describió en el párrafo 2. 5.1. Los mismos se digirieron utilizando la enzima *Bam*HI. La elección de la enzima de restricción se basó en el siguiente criterio: la ausencia de sitios de reconocimiento de corte dentro de la región codificante de la proteasa. Para la obtención de un volumen final de 20 μ L de mezcla, se utilizó 2 μ L de buffer de restricción 10x, 1,5 μ L de *Bam*HI 10 U/ μ L, 5 μ L de ADN 20 ng/ μ L y 8 μ L de agua bidestilada estéril apirógena.

La digestión se realizó durante toda la noche a 37 $^{\circ}$ C y se inactivó por incubación a 65 $^{\circ}$ C por 20 min. Las mismas se controlaron en geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Anexo de Búferes). La separación de fragmentos se realizó a 100V durante 1 h. La visualización de los mismos se realizó mediante el uso de Good View incluido en el gel y exposición a luz UV.

2.9.2- Transferencia

La transferencia de fragmentos de ADN a las membranas de nylon Ambition® BrightStar®-Plus AM10102, cargadas positivamente, se realizó según el siguiente protocolo (las soluciones utilizadas se describen en el Anexo Southern Blot).

Preparación del gel - el ADN se desnaturalizó sumergiendo el gel en solución desnaturalizante con agitación durante 30 min, a temperatura ambiente. Se neutralizó por 30 min en solución neutralizante y se expuso a luz ultravioleta por 15 min.

Preparación de la membrana - la membrana se humedeció primero en agua y luego en solución desnaturalizante por 5 min.

Montado del mecanismo para la transferencia por capilaridad - Se preparó un contenedor con solución de SSC 20X. Dentro del contenedor, se colocó un soporte (Figura 2.9.2), sobre la cual se ubicó un puente de papel Whatman® 3MM, sumergido por sus extremos en la solución de SSC 20x. El gel se colocó sobre el puente y se cubrió con la membrana de nylon, verificando que estén en contacto. Sobre la membrana se colocaron tres trozos de papel Whatman® 3MM y sucesivas capas de papel absorbente. El dispositivo se completó al ejercer presión sobre las capas de papel absorbente. La transferencia transcurrió durante toda la noche. Una vez realizada, el ADN transferido a la membrana se fijó mediante radiación UV a 120 mJ por 30 seg, utilizando el equipo Hoefer uvc 500 UV-Crosslinking, exponiendo la membrana sobre papel Whatman® 3MM empapada en solución SSC 10x. Finalmente, se procedió con un lavado en agua bidestilada durante un minuto y se dejó secar al aire.

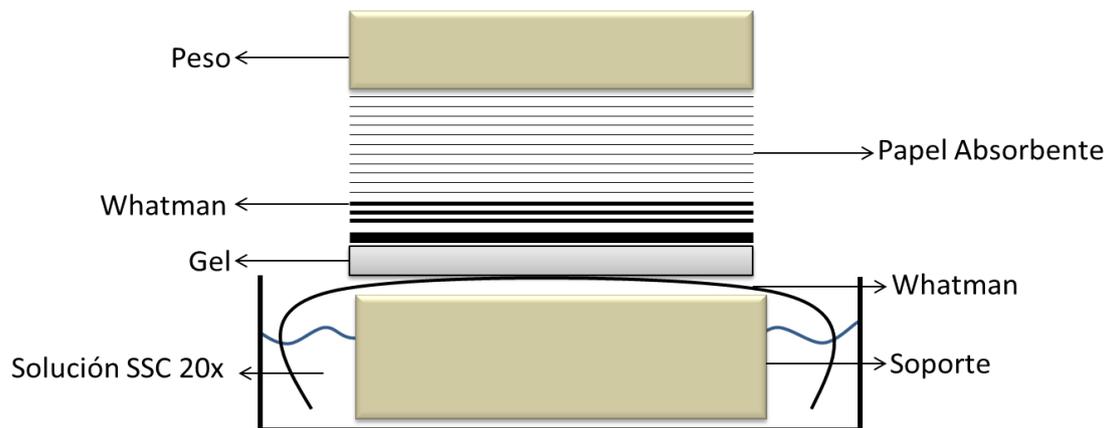


Figura 2.9.2. Diagrama del mecanismo de transferencia por capilaridad.

2. 9.3- Síntesis de la sonda y eficiencia de marcado

Síntesis de la sonda - se generó una sonda incorporando los DIG-dUTPs, usando la técnica de PCR. Para la amplificación se empleó un par de cebadores específicos dirigidos a una región parcial de 500pb del CDS de la proteasa. La mezcla de PCR utilizada fue la misma a la descrita anteriormente para los cebadores específicos (punto 2.8.2).

Determinación de la eficiencia de marcado - Se prepararon una serie de diluciones (1 ng/ μ L, 10 pg/ μ L, 3 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 0,3 pg/ μ L, 0,1 pg/ μ L, 0,03pg/ μ L y 0,01 pg/ μ L) de la sonda estándar (kit de Roche) y de la sonda sintetizada. Se aplicaron (1 μ L) gotas de ambas sondas sintetizada y sonda estándar sobre la membrana de nylon, se fijó por tratamiento bajo radiación UV, y se realizó la detección inmunológica con el conjugado anti-digoxigenina-PA y la solución de NBT/BCIP. Se procedió con la estimación de la concentración de la sonda sintetizada por comparación las diluciones, de concentración conocida, de la sonda estándar.

2. 9.4- Protocolo de hibridación

En una botella para horno de hibridación se colocó la membrana de celulosa con 20 mL de solución de prehibridación cada 100 cm² de membrana. Se incubó con agitación a 65 °C por 30 min, y se agregó una cantidad suficiente de sonda para lograr una concentración final de 25 ng/mL. La sonda se desnaturalizó previamente calentando por 5 min en ebullición y posterior enfriamiento en hielo. La reacción de hibridación transcurrió durante toda la noche a 65 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados sucesivos de 5 min en SSC 2X con SDS al 0.1% a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 minutos en SSC 0.5X, suplementado con SDS al 0.1% a 65 °C, ambos lavados manteniendo agitación constante.

2. 9.5- Detección inmunológica

Una vez finalizados los lavados, se sumergió la membrana en búfer de lavado por 5 min. La membrana se colocó sobre parafilm y se incubó agregando 20 mL de solución de bloqueo sobre la membrana durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se retiró dicha solución y se procedió con una segunda incubación durante 30 min con 20 mL de solución de anticuerpo, ambas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron dos lavados de 15 min en búfer de lavado, a temperatura ambiente.

Para la visualización, la membrana se equilibró en 20 mL de búfer de detección 5 min a 220 rpm, y se incubó en 10 mL de solución de NBT/BCIP en ausencia de luz y sin agitación para permitir el correcto desarrollo del precipitado coloreado. La reacción se detuvo al alcanzar la intensidad de banda deseada mediante un lavado en agua destilada.

3. Resultados

3.1- Verificación de la identidad del aislamiento AU8

Con la finalidad de verificar la identidad del aislamiento AU8, se realizó la amplificación y secuenciación de un fragmento de aproximadamente 1300 pb (suma de un fragmento de 800 pb y otro de 600 pb) del gen ADNr 16S. Se obtuvieron fragmentos de amplificación acorde al tamaño esperado para ambos pares de cebadores utilizados, como se describió en Materiales y Métodos.

En la Fig. 3.1 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de agarosa, donde se analizaron los productos de amplificación.

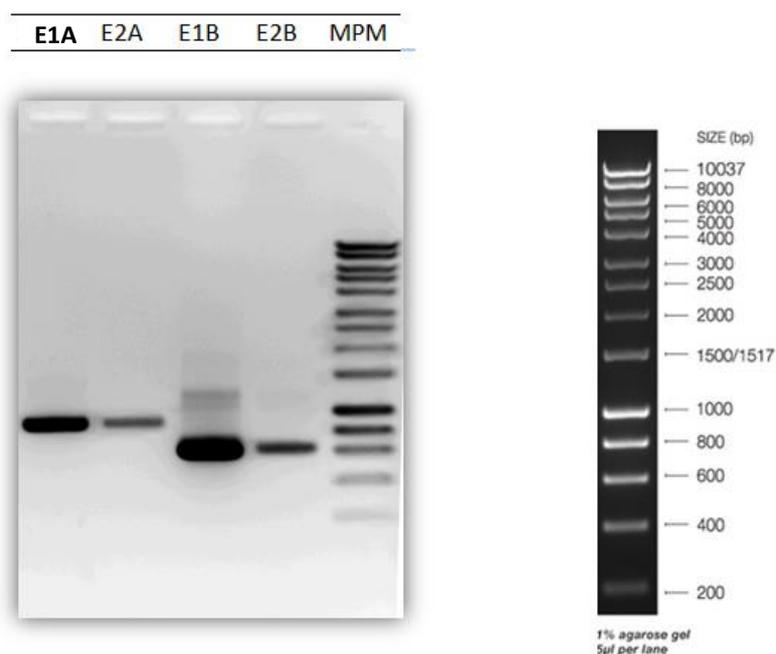


Figura 3.1. Análisis de los productos de amplificación del gen ADNr 16S de AU8. Figura izquierda - Con las letras A y B se indica el grupo de cebadores utilizados: A corresponde al par 63F-907R y B al par 784F-1401R. E1 y E2 representan a las diferentes diluciones de ADN que se utilizaron durante la PCR. Se sembraron 4 µL de mezcla de amplificación. En el carril de la derecha se muestra el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 µl). Figura derecha - Se muestra el perfil de bandas de ADN del MPM y los pares de bases característicos de cada fragmento.

Los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a Corea. Las secuencias de nucleótidos recibidas se editaron y empalmaron según se indicó en Materiales y Métodos.

El análisis de la secuencia 16S mostró que AU8 presenta alto porcentaje de similitud con secuencias publicadas para el género *Flavobacterium*. A continuación se muestran (Tabla 3.1) las secuencias que obtuvieron la mejor calificación luego del análisis por BLASTn en la NCBI y en la base de datos ribosomales (RDB).

Tabla 3.1. Análisis de la secuencias del gen 16S de AU8. Se muestran los resultados obtenidos en ambos servidores, NCBI y RDB. Se indican el porcentaje de identidad y el número de acceso correspondiente en cada servidor.

NCBI			RDB		
GENERO Y ESPECIE	ID.	N. de acceso	GENERO Y ESPECIE	ID.	N. de acceso
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	100%	NR_112814.1	<i>Flavobacterium xylanivorum</i>	98%	AJ297440
<i>Flavobacterium fryxellicola</i>	99%	NR_042332.1	<i>Antarctic bacterium</i>	96%	AJ441000
<i>Flavobacterium frigidarium</i>	99%	NR_025020.1	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	98%	AF162266
<i>Flavobacterium omnivorum</i>	98%	NR_025202.1	<i>Flavobacterium omnivorum</i>	96%	AF433174
<i>Flavobacterium psychrolimnae</i>	98%	AJ585428.1	<i>Flavobacterium fryxellicola</i>	98%	AJ811961

Los resultados confirman la identidad del aislamiento, el cual pertenece al género *Flavobacterium*. La secuencia parcial del gen 16S mostró altos porcentajes de

identidad con diferentes especies del género, dificultando la identificación definitiva del mismo. Igualmente, siempre es necesario nuevos enfoques para establecer la identidad definitiva de un aislamiento.

3.2- Determinación del número de proteasas extracelulares producidas por AU8

Con el fin de determinar si AU8 produce una o más proteasas extracelulares, se realizó el estudio de los sobrenadantes (libre de células), del cultivo de AU8 en medio ML, en geles nativos de poliacrilamida con gelatina incluida en el mismo.

El resultado se muestra en la Fig. 3.2. Se observa la presencia de una sola banda de transparencia, sugiriendo la presencia de al menos una sola proteasa extracelular capaz de hidrolizar la gelatina.



Figura 3.2. Gel de actividad (zimograma) del sobrenadante libre de células de AU8 crecida en medio ML. Se sembraron 18 μ L del sobrenadante diluido 40 veces.

3.3- Identificación de la proteasa extracelular producida por AU8, por espectrometría de masas (EM)

Mediante una aproximación proteómica, se identificaron por EM algunos péptidos de la proteasa extracelular producida por AU8. Esta información permitió el diseño de cebadores degenerados capaces de hibridar con la proteasa de interés.

En la Fig. 3.3 se muestra el gel resultante del análisis por SDS-PAGE del sobrenadante libre de células de AU8 crecido en medio ML. Se observa la presencia de una sola banda proteica, de aproximadamente 60 kDa, cuando se utilizó Coomassie como

colorante de revelado de proteínas. Esta proteína se envió para su identificación por EM en el servicio de UBYPa del Instituto Pasteur, en Montevideo.

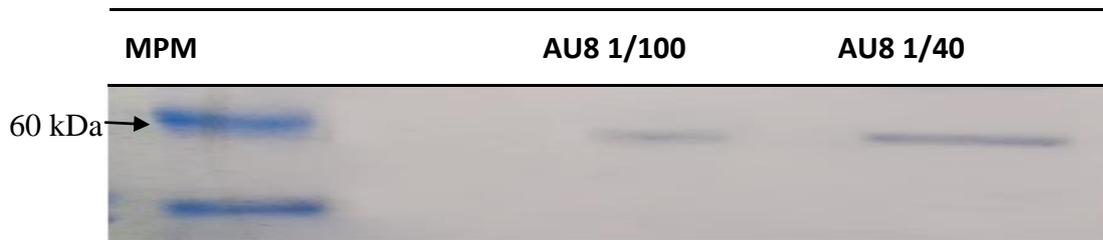


Figura 3.3. SDS-PAGE del sobrenadante libre de células de AU8 crecida en medio ML. De izquierda a derecha, se muestran el marcador de peso molecular BioLabs (MPM; 5 μ L) y los sobrenadantes de AU8 en diferentes diluciones (18 μ L por pocillo de una dilución 1/100 y 1/40, respectivamente).

En la Fig. 3.4 se muestran una captura de imagen de los resultados obtenidos del análisis de EM y en la Tabla 3.2 se presenta la lista de proteínas con péptidos identificados según este análisis. Se identificaron péptidos de una epralisina con un puntaje o impacto de 144, y dos metalo-proteasas con un puntaje de 86 y 87, las tres proteínas pertenecientes a *Pseudomonas fluorescens*.

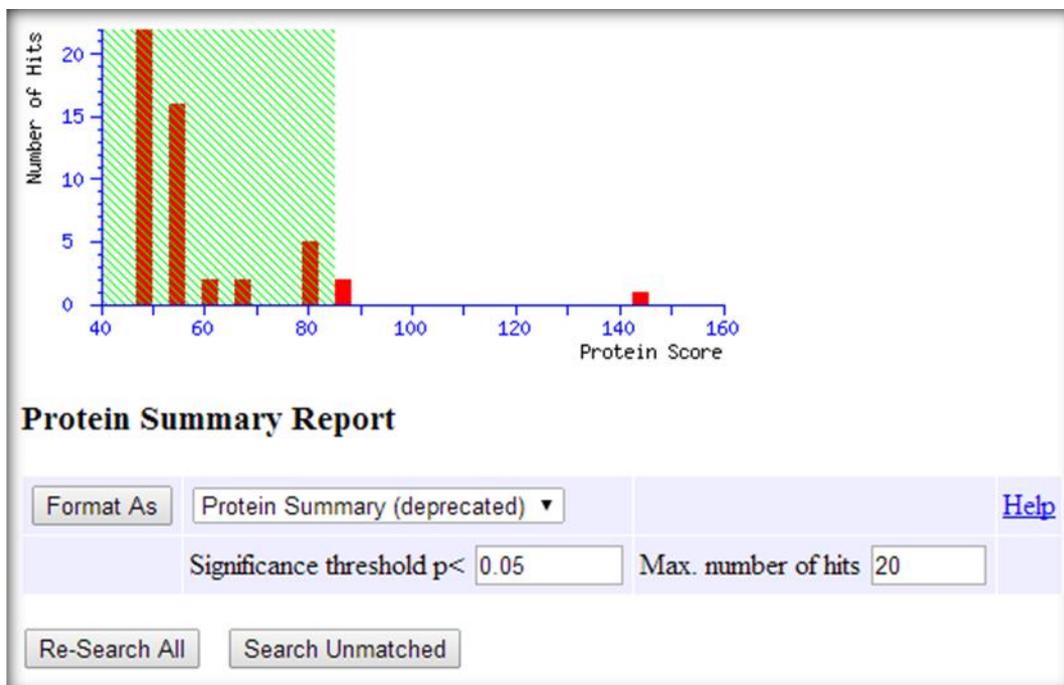


Figura 3.4. Histograma de impacto (score). El puntaje para la proteína a identificar fue - $10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de que el puntaje observado sea un evento al azar. Se considera que los puntajes mayores a 85 son significativos ($p < 0.05$).

Tabla 3.2. Proteínas identificadas por EM. Se presentan sólo las proteínas con un impacto mayor a 85.

Número de acceso	Masa (Da)	Impacto	Descripción	Porcentaje de cobertura (%)
AJ585428.1	50139	144	Epralisina [<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1]	11
AJ585428.1	49807	87	Metalo-proteasa [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	21
AJ585428.1	29286	86	Metalo-proteasa alcalina [<i>Pseudomonas fluorescens</i> bv. F]	25

Este resultado sugiere que se trata de una metalo-proteasa con similitud a la enzima producida por un microorganismo perteneciente al género y especie *Pseudomonas fluorescens*.

En la Figura 3.5 se observan resaltados en color rojo los péptidos identificados por EM, para la proteína que presentó el impacto mayor (144). Se reconocieron cinco péptidos. En general, una identificación tentativa fiable requiere al menos de cinco péptidos. Estos péptidos se utilizaron para el diseño de los cebadores degenerados, como se describió en Materiales y Métodos.

1 MSKVKANAVDTAEQAFQLNAAPLAASSAFNQINSFSHQYDR**GGNLTVNG**

51 **KPSFSVDQAATQLLR**DGAAYQDKDGSQKIELTYTFLTSASSSTMYKHGIS

101 GFSQFSTQQKAQAVLAMQSWADVAVNVTTEKASGGDGHMTFGNYSGGQDG

151 AAFAYLPGTGAGYDGTSWYLINSGYTQNKNPDLNNYGRQTLTHEIGHTL

201 GLAHPGDYNAGNGNPTYNDATYQDTRGYVMSYWSESNTSQNFSK**GGVE**

251 **AYSSGPLMDDIAAIQK**LYGANLTTR**TGDTTYGFNSNAGR**DFLSASSADK

301 LVFSVWDAGGKDTDFSGFTQNQK**INLNEASFSDVGGMVGNVSI**AKGVTI

351 ENAIGSGNDLLIGNSAANELKGGAGNDIHWGAGGADKLWGGAGSDTFV

401 AASSDSKPGAIDQILDFVSGLDKIDLTGITNGAGLHFVSAFTGAAGDAVL

451 TSSGGNSLLSVDFSGHGVADFQVSTVGQAATSDIVA

Figura 3.5. Epralisina identificada por EM. Se muestran resaltados en rojo los péptidos identificados y subrayados los aminoácidos utilizados para el diseño de los cebadores degenerados AU8Fw y AU8Rev.

3.4- Extracción de ADN genómico

Se realizaron extracciones de ADNg del aislamiento AU8 y otros, para ser utilizados en las reacciones de PCR, y se analizó la calidad de los mismos en geles de agarosa al 1% tal cual se describió en Materiales y Métodos. En la Fig. 3.6 se observa que fue posible obtener un ADNg de buena calidad (poca degradación y ausencia de ARN) y cantidad.

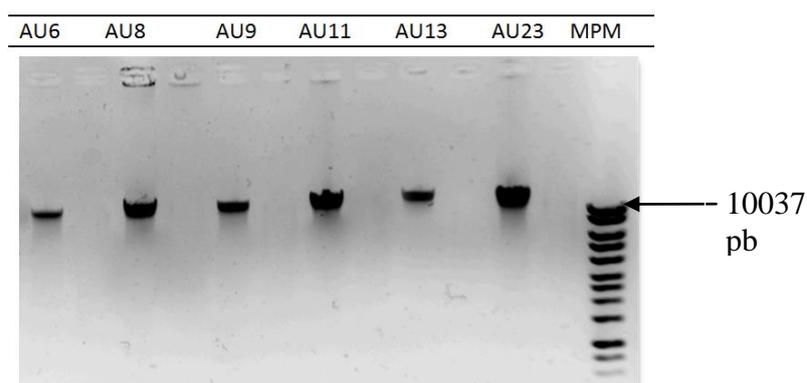


Figura 3.6. Análisis de la calidad y cantidad de ADNg. Sobre el carril se indica el aislamiento del cual proviene el ADNg en estudio. En cada caso se sembraron 5 μ L de ADNg. En el carril de la derecha se encuentran el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L).

3.5- Diseño de cebadores degenerados y obtención de la secuencia parcial del gen codificante para la proteasa extracelular producida por AU8

Obtenido el ADNg con la calidad y pureza esperada, se procedió con las reacciones de PCR utilizando cebadores degenerados diseñados según se describió en Materiales y Métodos. En la Tabla 3.3 se muestran los cebadores diseñados, el grado de degeneración y su temperatura de fusión (T_m).

Tabla 3.3. Cebadores degenerados empleados en la PCR

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tm (°C)	Grado de degeneración
Fwd_protAU101	GCN ACN ATG AAY AAR CAY GG	53,2	128
Rev_protAU102	TTY TGD ATN GCN GCD ATR TCR TC	55,7	1152
AU8Fw	GTN GAY CAR GCN GCN ACN CA	56,4	1024
AU8Rev	CCN ACC ATN CCN CCN ACR	55,5	246
Epr_Ct	RAARTC NGC NAC NCC RTG	54,5	512
Epr_Nt	GTN AAR GAY AAR GCN ATH G	47,5	384

El primer juego de cebadores utilizado fue AU8Fw y AU8Rev. Se analizaron varias temperaturas de hibridación de cebadores, desde 50 a 65 °C, utilizando un termociclador en gradiente. No fue posible obtener un perfil de amplificación de bandas definidas, pero fue posible amplificar una banda difusa del tamaño esperado de 840 pb para la temperatura correspondiente a 50 °C (Fig. 3.7). El tamaño de la banda se calculó tomando como referencia el gen codificante de la epralisina de *Pseudomonas fluorescens* Pf-01. La banda se purificó, clonó y envió a secuenciar, según se describió en Materiales y Métodos. Se secuenciaron un par de clones. El análisis por BLASTx de la secuencia obtenida coincidió con una β -Lactamasa. Este resultado no era el esperado; sin embargo, por las características del perfil de amplificación (múltiples bandas y bandas no definidas), no se esperaba obtener un buen resultado con este par de cebadores. Por lo tanto, se procedió a realizar los ensayos con otro par de cebadores.

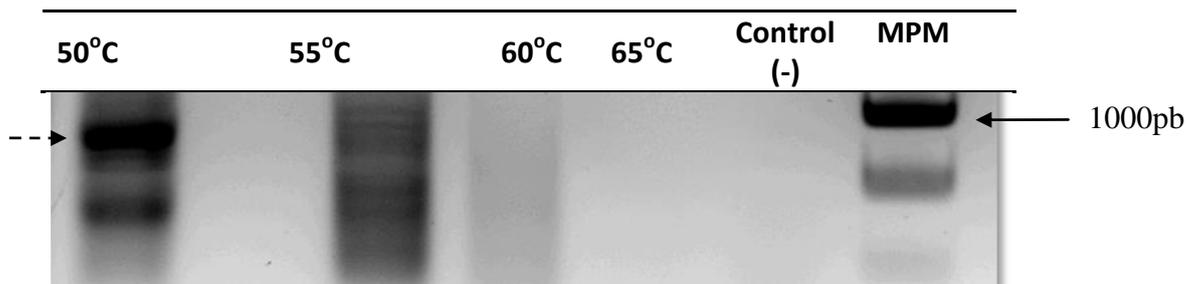


Figura 3.7. Productos de amplificación obtenidos con los cebadores AU8Fw y AU8Rev, utilizando ADN_g de AU8. Sobre el carril se indican las temperaturas usadas para la hibridación de los cebadores. En cada caso se sembraron 3 μ L de mezcla de PCR. El control negativo (-) corresponde a la mezcla de PCR sin ADN. En el carril de la derecha se encuentran el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L). La flecha de línea puntuada señala la banda que se extrajo del gel para su posterior purificación.

A continuación se procedió a realizar la PCR utilizando el par de cebadores Epr_Ct y Epr_Nt dirigidos a secuencias conservadas de epralisinas. Como se observa en la Fig. 3.8, para todas las temperaturas ensayadas fue posible la amplificación de un fragmento del tamaño esperado, correspondiente a 1000 pb. Se eligió la temperatura de hibridación de cebadores de 55 °C, donde la cantidad de productos inespecíficos de amplificación se vio reducida. Nuevamente, la banda de interés se clonó y se envió a secuenciar en Macrogen. El análisis por BLASTx del fragmento secuenciado mostró que el fragmento seleccionado presenta homología con la superfamilia de las N-acetil transferasas de *Pseudomonas fluorescens*.

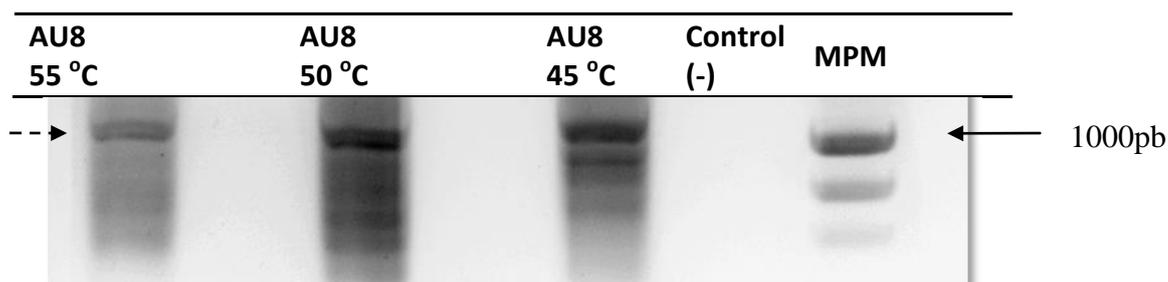


Figura 3.8. PCR con cebadores degenerados para epralisina. Se sembraron 3 μ L de cada muestra. El control negativo (-) corresponde a la mezcla de PCR sin ADN. En el carril de la derecha se encuentran el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L). La flecha de línea puntuada señala la banda que se extrajo del gel para posterior purificación.

Finalmente, se utilizó un par de cebadores degenerados presentes en la colección del laboratorio y que habían sido diseñados para hibridar con metalo-proteasas de *Pseudomonas*, denominados Fwd_protAU101 y Fwd_protAU102. Con este par de cebadores se obtuvo un producto de amplificación definido, coincidiendo en tamaño

(600pb) con el producto de amplificación del control positivo *Pseudomonas* sp. AU10. También se detectó un producto de amplificación del tamaño esperado cuando se utilizó el ADNg de otro aislamiento antártico identificado como *Pseudomonas* sp. AU1 (Fig. 3.9).

El trabajo se continuó entonces con el clonado del fragmento de amplificación obtenido y secuenciación del inserto según se describió en Materiales y Métodos.

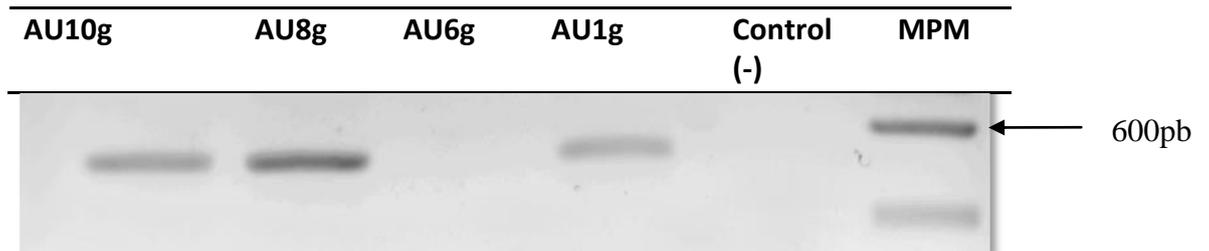


Figura 3.9. Producto de amplificación del ADNg de AU8, AU10, AU6 y AU1, utilizando los cebadores Fwd_protAU101 y Fwd_protAU102. Sobre cada carril se muestra el ADNg utilizado como templado en la PCR. El control negativo (-) corresponde a la mezcla de PCR sin ADN. En el carril de la derecha se encuentra el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L).

La comparación de la secuencia obtenida con la secuencias en la base de datos del NCBI mostró que la misma efectivamente corresponde a una proteasa. En la Fig 3.10 se observar una captura de pantalla del resultado del BLASTx, realizado en la NCBI.

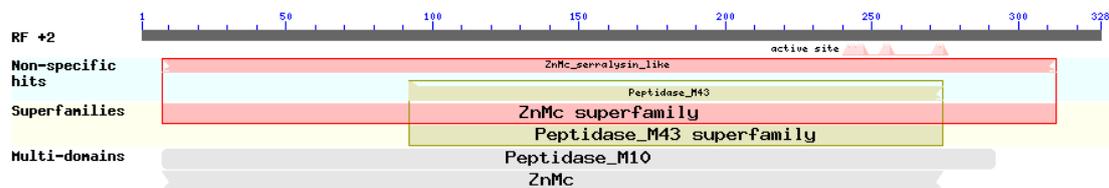


Figura 3.10. Dominios proteicos reconocidos durante el análisis por BLASTx de la secuencia parcial obtenida para el aislamiento AU8.

Tabla 3.4. Proteínas identificadas por BLASTx. Se muestran sólo las proteínas con una identidad superior al 90%.

Descripción	N de acceso	Identidad
Metalo-proteasa alcalina [<i>Pseudomonas rhodesiae</i>]	CAS06693.1	93%
Metalo-proteasa [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	AAF80994.1	93%
Metalo-proteasa alcalina [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	CAS06701.1	91%
Proteasa PrtA [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	AAD09851.1	92%
Metalo-proteasa alcalina [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	CBJ55048.1	90%

Según los resultados obtenidos (Tabla 3.4), la proteína de interés se corresponde a una metalo-proteasa extracelular dependiente de Zn, perteneciente a la subfamilia de las serralisinas.

3.6- Obtención de la secuencia codificante de la proteasa

Dado que la amplificación con los cebadores degenerados Fwd_protAU101 y Fwd_protAU102 fue exitosa, se procedió a utilizar un par de cebadores específicos, denominados Fwd_AU10E23 y Rev_AU10E422, y verificar que estos cebadores amplifican el gen de interés. La reacción de amplificación permitió obtener un segmento de ADN de un tamaño de 400 pb para AU8 y para el control positivo AU10 (Fig. 3.11).

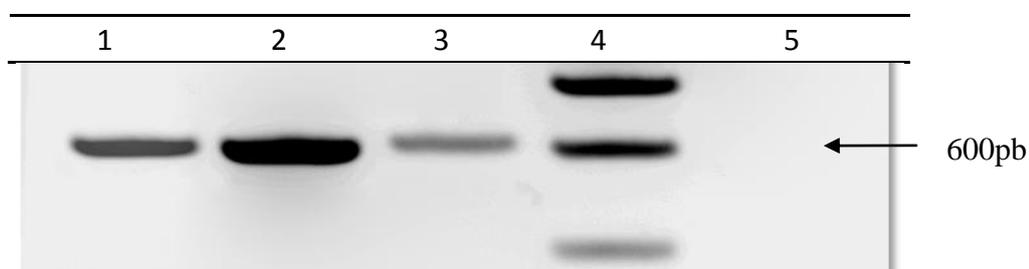


Figura 3.11. Perfil de amplificación obtenido con los cebadores específicos Fwd_AU10E23 y Rev_AU10E422. En cada carril se sembraron 3 μ L de una dilución en diez del producto de PCR. El control negativo (-) corresponde a la mezcla de PCR sin ADN (carril 5). En el carril 4 se encuentra el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L). En el carril 1 se muestra el control positivo correspondiente al ADNg de AU10. En los carriles 2 y 3 se muestran los productos de amplificación de AU8.

Los cebadores específicos amplificaron de forma eficiente un segmento del tamaño esperado. Por lo tanto, se diseñaron nuevos cebadores (inversa y complementaria de los cebadores específicos) con la finalidad de utilizarlos en la reconstrucción de la secuencia codificante completa de la proteasa por PCRi.

Como molde para la amplificación se utilizaron trece autoligaciones. En la Figura 3.12 se observa el análisis de la calidad de las digestiones realizadas con cada una de las trece enzimas de restricción. En todos los casos fue posible obtener una digestión completa, evidenciada por la estela de ADN en el gel de agarosa.

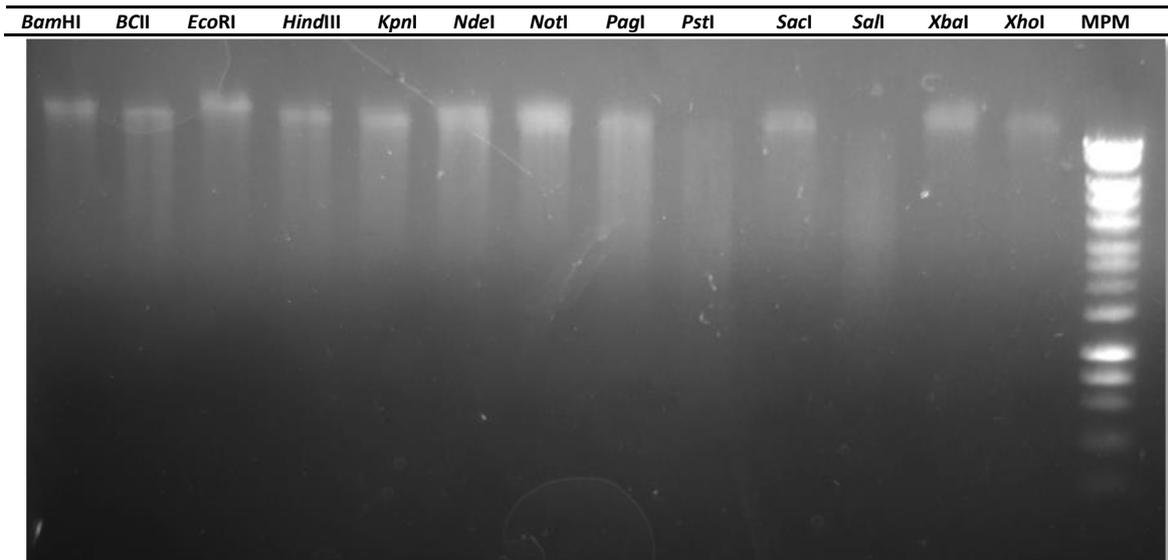


Figura 3.12. Digestiones del ADNg de AU8. Se sembraron 3 μ L de cada muestra. En el carril de la derecha se muestra el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L). Sobre los pocillos se indica la enzima de restricción que se utilizó en cada caso.

En la Figura 3.13 se muestra que fue posible la amplificación por PCR de las autoligaciones provenientes de la digestión con las enzimas de restricción *Pst*I y *Xba*I, cuando se utilizaron cebadores dirigidos hacia fuera de la secuencia parcial de la proteasa en estudio. Ambos fragmentos presentaron un tamaño aproximado de 1500 pb y 5000 pb, respectivamente. No se observaron amplicones para el resto de las autoligaciones utilizadas como molde de ADN.

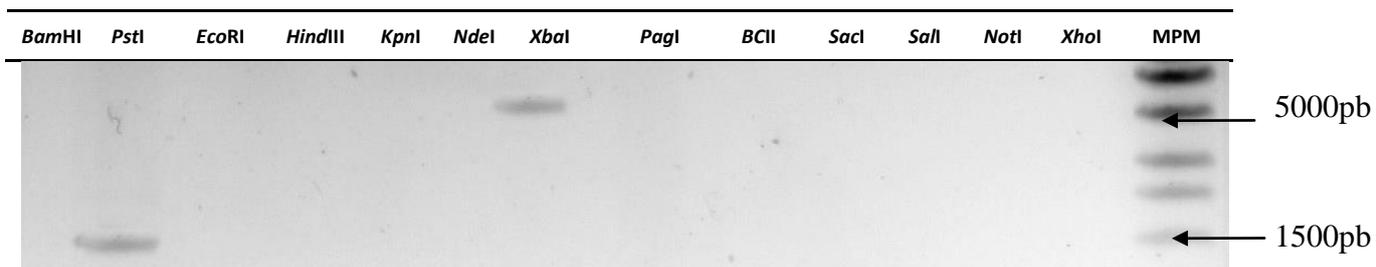


Figura 3.13. Perfil de amplificación obtenidos por la PCRi. Se sembraron 2 μ L de la mezcla de PCR. En el carril de la derecha se sembró el marcador de peso molecular (MPM) 10Kb HyperLadder (BioLine) (5 μ L). Sobre cada carril se indica la enzima utilizada para digerir el ADNg antes de la reacción de autoligación.

Dada la baja intensidad de las bandas obtenidas, se procedió a ajustar las condiciones de amplificación, variando la temperatura de hibridación de los cebadores (ver Fig 3.14A).

Se siguió el trabajo con la autoligación cuya PCRi generó un fragmento de 5000pb. Se realizó la PCRi a diferentes temperaturas de hibridación de cebadores y se determinó que la temperatura óptima para la obtención de una banda de amplificación definida fue de 60 °C (Fig. 3.14A). La banda se purificó (Fig. 3.14B), clonó y envió para su secuenciación.

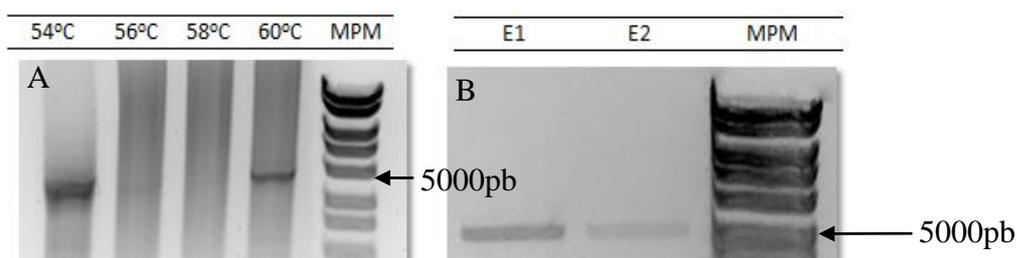


Figura 3.14. Perfil de amplificación por PCRi utilizando como molde los ADN de las autoligaciones (digestión con *Xba*I). A) Gradiente de temperaturas. Se muestra sobre cada carril la temperatura de hibridación de los cebadores. B) Análisis de la calidad de la purificación del fragmento de 5000 pb. E1 y E2 corresponden a diferentes eluciones del producto de PCR. Para ambos geles se cargaron 3 μ L de cada muestra y 5 μ L del marcador de peso molecular (MPM).

3.6- Análisis de la secuencia codificante

El fragmento clonado se secuenció en ambos sentidos. Las secuencias obtenidas se editaron y se empalmaron con la secuencia parcial del gen de la metalo-proteasa. Utilizando el programa *ORF finder* se identificó un marco abierto de lectura entero, el cual corresponde con una metalo-proteasa, según las bases de datos de la NCBI y MEROPS. En la Figura 3.15 se muestra la reconstrucción de la secuencia aminoacídica del ORF identificado.

MSKVKDKAIVSAAQASTAYSQIDSFHQYDRGGNLTVNGKPSFTVDQAADH
 LLRDGAAYKDVNHNGKIDLTYTFLASASSATMNKHGISGFSQFNTQQKAQA
 VLAMQSWADVANSFTESASGGDTHMTFGNYSGGQAGAAAFAYLPGTGA
 GYDGTSWYLTNSSYTPNKAPDLNNGRQTLT **HEIGHTLGLAHP**GDYNAGT
 GNPTYKNADYGQDTRGYSVMSYWSESNQNFYKGGVEAYASGPLIDDIA
 AIQKLYGANYNTRAGDTTYGFNSNTGRDFYSATSNADKLVFSVWDGGGND
 TLDFSGFTQNQKINLNEASFSDVGGLVGNVSIKGVTVENAFGGSGNDLIIG
 NNAANLIK **GGAGND**IYGGGGADQLW **GGAGND**TFVFGASSDSKPGAADKI
 FDFTSGSDKIDLSGITKGAGLTFVNAFTGHAGDAVLSYASGTNLGTLAVDFS
 GHGVADFLVTTVGQAVASDIVA

Figura 3.15. Secuencia primaria de la proteasa. En rojo se observa el sitio catalítico y en celeste los sitios de unión a calcio, según el análisis de la secuencia en la base de datos de proteasas, MEROPS.

EL resultado de BLAST en la base de datos de MEROPS, utilizando la secuencia completa de la posible proteasa mostró que el ORF identificado corresponde a una epralisina (metalo-proteasa extracelular) (Tabla 3.5), perteneciente al clan MA y a la familia M10. La proteína se denominó MP8.

Tabla 3.5. Proteínas identificadas por BLAST (MEROPS). Se muestran sólo las proteínas con una identidad superior al 80%.

Descripción	N de acceso	Identidad
Epralisina [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	MER493227	87%
Epralisina [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	MER493226	86%
Epralisina [<i>Pseudomonas fluorescens</i>]	MER493231	85%

Una característica común de las metalo-proteasas es que son secretadas al medio extracelular mediante un mecanismo común de bacterias Gram-negativas que no requiere de una señal N-terminal (Wandersman, 1989). Por este motivo, se estudió si MP8 presenta una secuencia señal mediante su análisis en el servidor Signal P. No se evidenció la presencia de un péptido señal (Fig. 3.16).

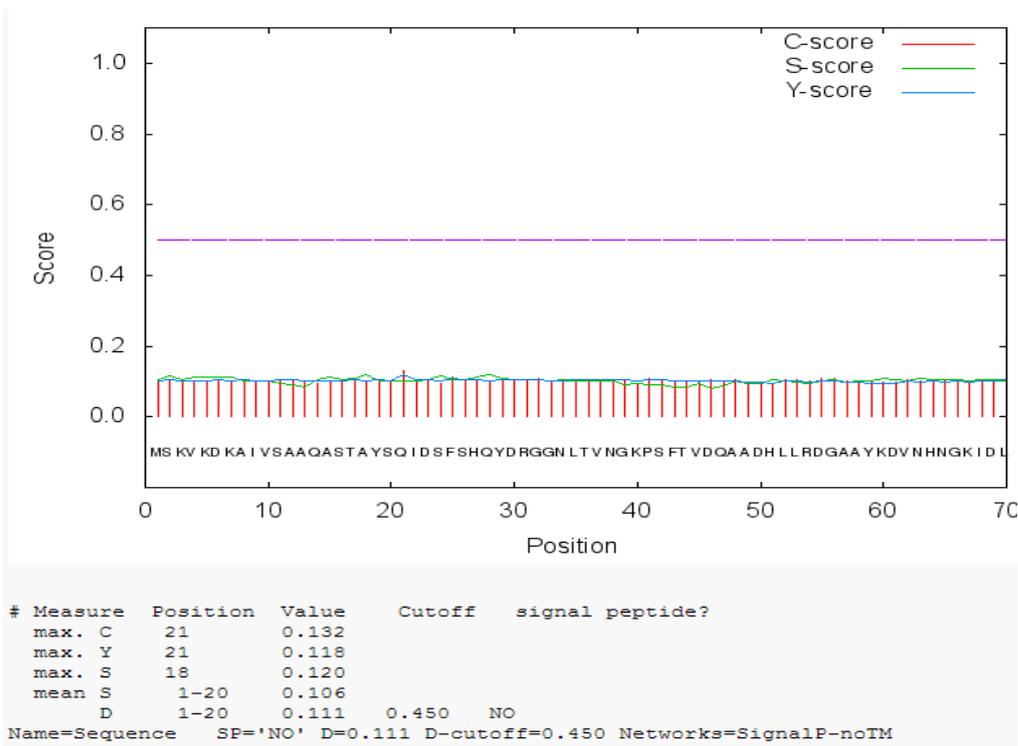


Figura 3.16. Análisis de MP8 en el servidor Signal P. C-score (puntuación de sitio de corte en bruto) distingue péptidos señal del sitio de corte de todo el resto. El C-score está diseñado para que sea de valor alto en la posición inmediata luego del sitio de corte (el primer residuo de la proteína madura). S-score (puntuación del sitio de corte) distingue posiciones con péptido señal de posiciones en las regiones maduras de las proteínas y de las proteínas sin péptido señal. Y-score (puntaje combinado de sitio de corte) combinación (media geométrica) del C-score y de la pendiente del S-score, proporciona una mejor predicción del sitio de corte. Esto es posible por el hecho de que muchos picos altos pueden encontrarse en los C-scores en una secuencia, donde sólo uno es el verdadero sitio de corte. Y-score distingue entre los picos del C-score, escogiendo para el cual la pendiente del S-score es aguzada. Mean S es el promedio del S-score de los posibles péptidos señal (desde la posición 1 a la posición inmediatamente después del máximo del Y-score). D-score (puntaje de discriminación) promedio balanceado de los puntajes de la media de S y la máxima de Y, permite discriminar péptidos señal de los que no lo son. Para proteínas no secretadas, todos los puntajes deben ser menor al valor 0,1.

A modo de identificar un posible propéptido, se procedió a realizar alineamientos de MP8 con proteasas homólogas de otros microorganismos. Entre estas últimas, se incluyó la metalo-proteasa de *Serratia marscesens* (proteasa modelo de la familia

M10), que presenta un sitio de corte del propéptido en el aminoácido 16. Del resultado del alineamiento sugiere que MP8 se produciría en la forma de un propéptido con un sitio de corte en el aminoácido 13 (Fig 3.17).

El sitio activo de las proteasas de pertenecientes a la familia M10 se caracteriza por tener un motivo conservado HEXXHXXGXXH, donde se encuentra el glutamato catalítico y el ligando de zinc. También presentan un extremo C-terminal rico en dominios Gly-Gly-Xaa-Gly-Asn-Asp responsable de la unión de iones calcio. En MP8 se identificaron tanto el motivo catalítico conservado como dos sitios de unión a calcio (Figs. 3.15 y 3.17).

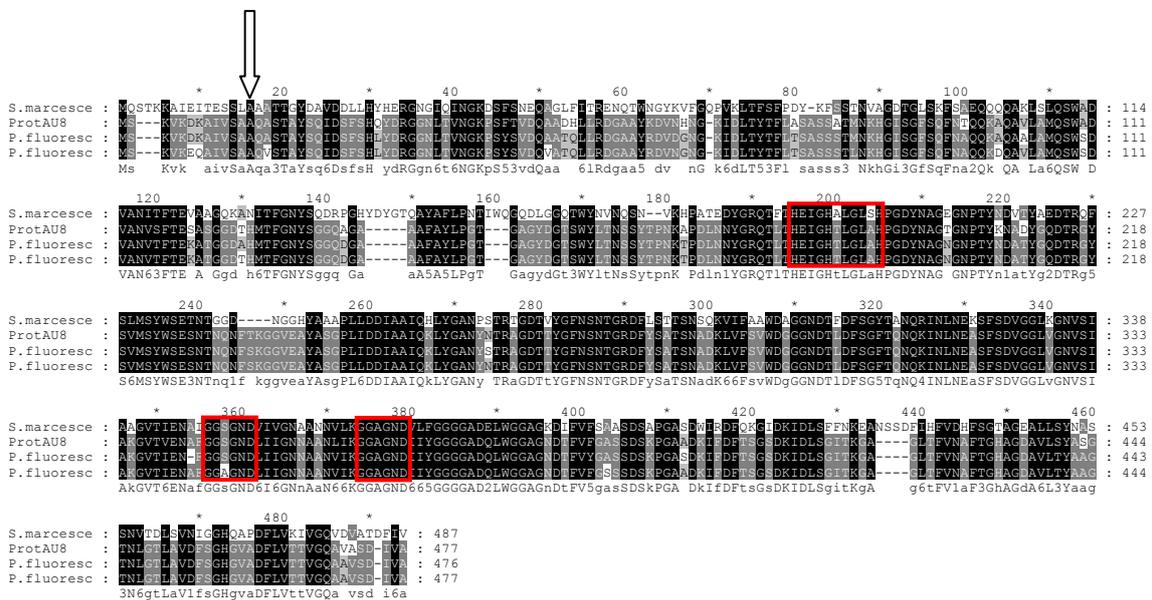


Figura 3.17. Alineamientos de MP8 con proteasas de la familia M10. Se indica con una flecha el sitio de clivaje. Se utilizaron las secuencias aminoacídicas de las siguientes proteasas producidas por los siguientes microorganismos: *S. marcescens* (MER001096), *P. fluorescens* (AAD09851), *P. fluorescens* (MER004614) y la proteasa MP8 (ProtAU8). En el recuadro de color rojo, cercano al aminoácido 200, se muestran el motivo conservado necesario para la catálisis. En los otros dos recuadros, en la posición 360 y 380 se muestran los motivos de unión a calcio.

Utilizando el programa ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/), se determinó el punto isoeléctrico y la masa teórica, 4.79 y 49368.56 Da, respectivamente.

3.7 Número de copias del gen MP8 y búsqueda de proteasas similares en otros aislamientos antárticos

La sonda de hibridación se sintetizó por PCR, utilizando los cebadores Fwd_AU10E23 y Rev_AU10E422. Como se esperaba, se obtuvo un fragmento de amplificación mayor al tamaño de 400pb debido a que el mismo presenta los nucleótidos marcados con digoxigenina, lo cual incrementa su tamaño relativo y por lo tanto retrasa su migración en el gel. La concentración de la sonda se estimó en de 42 ng/ μ L, determinado según se indica en Materiales y Métodos.

En la Fig. 3.18 se muestran las digestiones del ADNg de diferentes aislamientos realizadas con la enzima de restricción *Bam*HI. En todos los casos fue posible obtener una digestión completa, evidenciada por la estela de ADN en el gel de agarosa. El gel se utilizó posteriormente para la transferencia del ADNg digeridos a membranas de nylon.

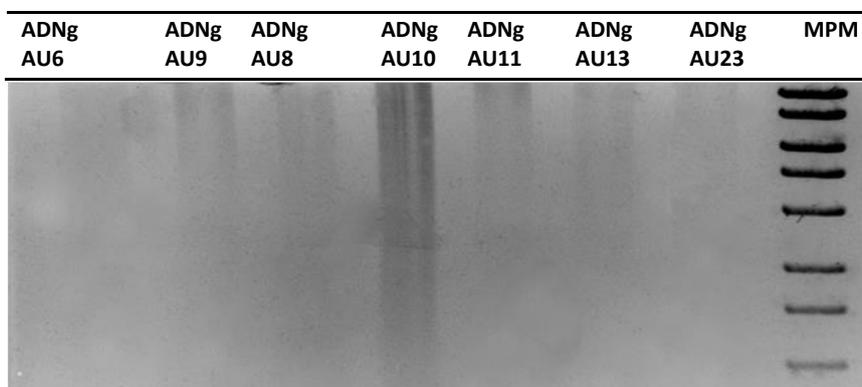


Figura 3.18. Perfil de digestión del ADNg de varios aislamientos antárticos, con la enzima *Bam*HI. Se sembraron 5 μ L de ADNg de los diferentes aislamientos. A la derecha se sembró 1 μ L del MPM.

En la Fig. 3.19 se muestra el resultado del Southern blot. Se observó el mismo número de fragmentos de ADN capaces de hibridar con la sonda de la proteasa para los aislamientos AU10 y AU8. Tres fragmentos en cada caso. Los mismos presentan un tamaño de 8000, 5000 y 3000pb aproximadamente. Se puede observar una tenue banda de hibridación para AU13, sin embargo cuando se realizó una PCR con los

cebadores específicos para la proteasa en estudio, no se obtuvo amplificación al usar el ADNg del aislamiento AU13, por lo que podría tratarse de ADN no digerido donde la sonda hibridó de forma inespecífica.

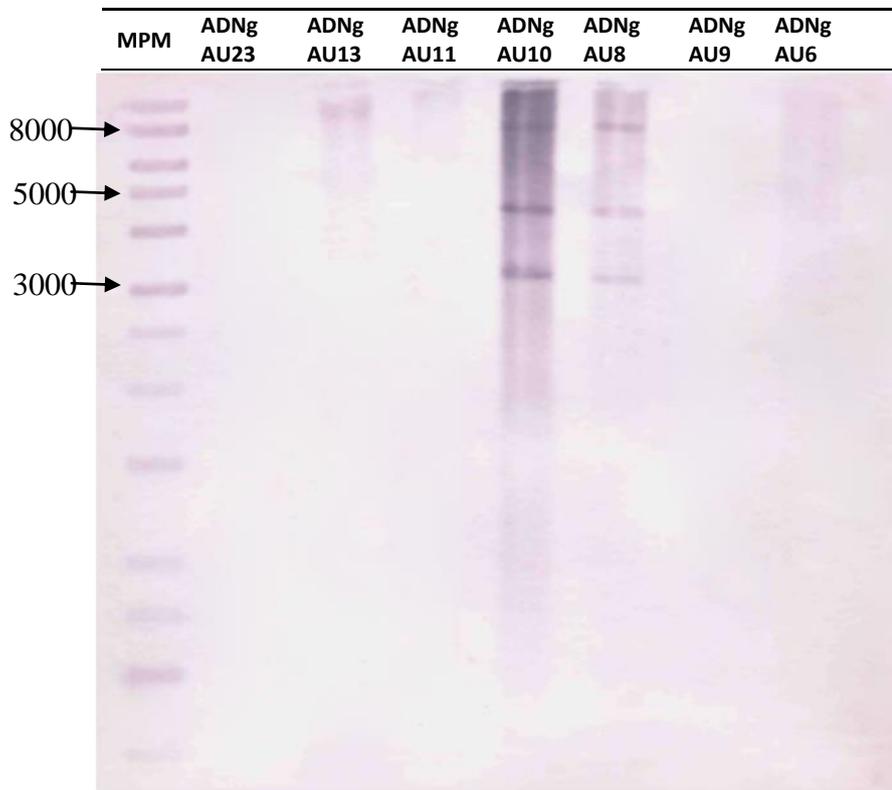


Figura 3.19. Southern Blot. Revelado de la membrana de nylon.

4. Discusión y perspectivas de futuro

4.1- Verificación de la identidad del aislamiento

La fisiología y ecología de las bacterias se encuentran estrechamente relacionadas. Las adaptaciones que llevan a la colonización de ambientes naturales, y en este caso de un hábitat polar, puede alterar dichas propiedades (Chessa *et al.*, 2000; Vazquez *et al.*, 2004). Por ejemplo, el contenido de lípidos de la membrana se modifica dependiendo de la temperatura de crecimiento de la bacteria (Margesin, 2012). Por este motivo, las propiedades fisiológicas de un aislamiento no necesariamente se ajustan a las propiedades generales descritas para un determinado microorganismo de su mismo género y especie. Es por tanto necesario incluir el análisis de características evolutivamente más conservadas para identificar un microorganismo, tal es el caso del uso de la secuenciación 16S-rDNA para la asignación de género.

Los rasgos fenotípicos de AU8 coincidieron con aquellos reportados para flavobacterias microtolerantes. Se trata de bacterias Gram-positivas en su tinción y de respiración aerobia, presentando una importante producción de biomasa entre 4 °C y 20 °C (no crece a 30 °C) (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Pero estas características no son suficientes para identificar al microorganismo. Entonces la identidad del mismo se verificó mediante la comparación de la secuencia nucleotídica de la subunidad ribosomal 16S en las bases de datos. El uso de este marcador molecular es de especial importancia durante la dilucidación de las relaciones evolutivas entre bacterias, pero también pueden usarse otros marcadores como los genes que codifican para la RNA polimerasa. Por ejemplo, el gen *rpoB* (codifica la subunidad β de la polimerasa) es de gran relevancia para definir nuevas especies y refinar el estudio de comunidades bacterianas (Adékambi *et al.*, 2009). Sin embargo, el estudio de la secuencia del gen 16S, no es suficiente para asignar una identificación definitiva, la misma debería también tomar en cuenta varias características genéticas como fueron mencionadas, ya que las características estructurales y metabólicas de los microorganismos extremófilos se encuentran bastante sesgadas por la plasticidad fenotípica. Por este

motivo, y hasta tener una identificación definitiva, el aislamiento se seguirá denominando *Flavobacterium* sp. AU8.

En un futuro resultaría conveniente realizar otros ensayos, cuyos resultados contribuyeran a una asignación definitiva de especie. En los últimos años, la identificación de microorganismos basada en el análisis de productos de amplificación por espectrometría de masa ha tomado relevancia. Por ejemplo, mediante MALDI es posible obtener información detallada del genoma, y es una alternativa a la secuenciación convencional del ADN genómico. La detección por ESI (Electro-Spray-Ionization) de productos de amplificación de loci informativos, es un procedimiento sensible que permite analizar de forma rápida un gran número de microorganismos e identificarlos en términos de género y especie. Sin embargo, la secuenciación de los genomas sigue siendo el método más fiable. Actualmente, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva y el abaratamiento de costos, el secuenciado de genomas bacterianos enteros resulta una herramienta muy útil para su identificación (Pizza *et al.*, 2000; Denner *et al.*, 2001; Sauer & Kliem, 2010).

4.2- La proteasa en estudio

El estudio sobre el número de proteasas presentes en el sobrenadante del cultivo de AU8 mediante geles de actividad, o zimograma, sugiere que AU8 produce al menos una sola proteasa capaz de hidrolizar la gelatina y que la misma sería secretada al medio, por lo cual se podría identificar como una proteasa extracelular. Como el sobrenadante analizado proviene del crecimiento de AU8 en un medio conteniendo proteínas lácteas como fuente de carbono y nitrógeno, cuando crece a baja temperatura, probablemente esa proteasa tenga la habilidad de hidrolizar ambos tipos de proteínas, lácteas y gelatina.

Por electroforesis desnaturizante se realizó el fraccionamiento proteico del sobrenadante de cultivo de AU8, y se pudo observar una sola banda proteica de aproximadamente 50 kDa. En esta muestra se identificó una proteasa por espectrometría de masa (EM) como una probable metalo-proteasa (que denominamos MP8) gracias a la similaridad con la enzima producida por un microorganismo

perteneciente al género y especie *Pseudomonas fluorescens*. La identificación de péptidos por EM permitió el diseño de cebadores degenerados que hizo posible obtener la región parcial de la secuencia codificante de la proteasa, mediante una estrategia de amplificación *in vitro*. La secuencia codificante total se obtuvo por el ensamblado de las secuencias obtenidas por PCR convencional (utilizando cebadores degenerados) y PCRI. La estrategia elegida para la identificación de la CDS responsable de la síntesis de la proteasa extracelular resultó exitosa, habiendo sido la etapa limitante la obtención de la secuencia parcial del gen a través de la PCR con cebadores degenerados.

El análisis *in silico* de la secuencia codificante permitió identificar a MP8 como una metalo-proteasa perteneciente al clan MA y a la familia M10 (subfamilia M10B), y cuya secreción se realizaría en ausencia de una señal de secreción. Se identificó en su secuencia aminoacídica un motivo conservado HEXXHXXGXXH (con el glutamato catalítico y el ligando de zinc) característico de las metzincinas y un extremo C-terminal rico en dominios Gly-Gly-Xaa-Gly-Asn-Asp responsable de la unión de iones calcio, característicos de la familia.

Aunque los resultados sugieren que MP8 es una metalo-proteasa, y los microorganismos productores de este tipo de proteasas es común en el ambiente antártico, sería necesario confirmar si MP8 es una metalo-proteasa. Para confirmarlo debería realizarse la purificación de la enzima y la determinación de su actividad frente a la presencia de quelantes de metales divalentes, como el EDTA (Mc Kevitt *et al.*, 1989; Margesin & Schinner, 1992; Hoshino *et al.*, 1997; Secades *et al.*, 2001). Además, habría que analizar el efecto de surfactantes y antioxidantes, componentes de los detergentes, sobre la actividad proteolítica, para evaluar la posibilidad del uso de esta proteasa en la industria de los detergentes. Por otro lado, el hecho de que también hidroliza proteínas de la leche, deja abierta la posibilidad de que esta proteasa tenga un potencial uso en la industria láctea.

La prevalencia de bacterias productoras de metalo-proteasas extracelulares, frente a otro tipo de proteasas, parece ser una característica en los ambientes acuáticos antárticos (Zhou *et al.* 2009). Autores como Zhang *et al.* (2011) reportaron que las flavobacterias de origen antártico producen metalo-proteasas extracelulares similares a las metalo-proteasas producida por *Serratia marscesens*. Sin embargo, en nuestro caso, la proteasa MP8 mostró altos porcentajes de similitud con metalo-proteasas extracelulares producidas por bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas*.

La producción de proteasas similares por microorganismos que incluso pertenecen a phylums diferentes (*Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, respectivamente) podría sugerir un posible evento de herencia horizontal de genes. Como se mencionó anteriormente, MP8 pertenece a la familia M10, subfamilia M10B; sin embargo, no existen reportes sobre la producción de este tipo de proteasas para el género *Flavobacteria*, según nuestra búsqueda en la base de datos de MEROPS. Curiosamente, existen muchas proteasas de esta familia descritas para *Pseudomonas*, lo cual podría estar sugiriendo un evento direccionado desde este género a las flavobacterias. Hay numerosos reportes que señalan la alta incidencia de eventos de transferencia horizontal de genes en comunidades microbianas, y que cumplen un rol significativo en la evolución e impacto ecológico de microorganismos terrestres como acuáticos (Ochman *et al.*, 2000). Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, no es posible afirmar que MP8 fue adquirida por transferencia horizontal. Para demostrar esta hipótesis, se podría secuenciar el genoma, identificar la posición de la proteasa en el mismo, y hacer un análisis de las regiones flanqueantes al gen (contenido GC, presencia de secuencias repetidas, transposones, entre otros); además, apoyar el resultado con la construcción de árboles filogenéticos que sugirieran cual es el posible origen de esta proteasa. Si bien la transferencia horizontal de genes es un evento común en bacterias, casi no se conocen casos de transferencia de genes que codifican para proteasas. Sí existen reportes asociados a islas de patogenicidad que presentan proteasas de virulencia, entre otros genes (Hacker *et al.*, 1997; Koonin *et al.*, 2001). En nuestro laboratorio se detectó un evento de transferencia horizontal de una proteasa desde cianobacterias a un aislamiento de *Janthinobacterium* sp, de origen antártico (Martínez-Rosales, comunicación personal). En bacterias antárticas, la herencia

horizontal de proteasas adaptadas al frío podría proveer una ventaja en la adaptación al ambiente oligotrófico antártico.

Finalmente, los resultados sugieren que MP8 se encontraría en más de una copia, tanto en *Flavobacterium sp.* AU8 como en *Pseudomonas sp.* AU10. Sin embargo, el estudio fue realizado utilizando el ADN genómico digerido por una sola enzima de restricción. Sería conveniente repetir los ensayos de Southern Blot realizando digestiones con otras enzimas.

5. Conclusiones

Durante esta pasantía se confirmó la identidad del aislamiento AU8 como perteneciente al género *Flavobacterium*. El mismo produciría una proteasa extracelular capaz de hidrolizar la gelatina (según los ensayos de actividad en geles de actividad) y las proteínas lácteas (debido a su capacidad de coagular las proteínas de la leche durante su crecimiento en medio ML). La proteasa se identificó por EM y su secuencia codificante se obtuvo mediante el ensamblado de secuencias obtenidas por PCR y PCR inversa. El análisis *in silico* de la proteasa sugiere que la misma tiene un tamaño molecular teórico de 49 kDa (similar al tamaño molecular aparente de 50 kDa determinado por SDS-PAGE), pI de 4,79, un dominio catalítico conservado de unión a Zinc, y probablemente se sintetice como un propéptido. Los resultados sugieren que habría más de una copia del gen en el genoma de AU8. No se identificó un péptido señal de secreción en MP8.

Anexo

Medios de cultivo

Medio LB

Triptona - 10 g/L
Extracto de levadura - 5 g/L
NaCl - 10 g/L

Medio ML

Medio LB diluido 20 veces
Leche en polvo descremada al 5%

Southern Blot

SSC 20X

NaCl - 3 M
Citrato de Sodio - 0.3 M
pH= 7.0

Solución Neutralizante

Tris Base - 1 M
NaCl - 1,5 M
pH= 7.4

Solución desnaturalizante

NaCl - 1,5 M
NaOH - 0,5 M

Solución de lavado

Ácido Maleico - 0,1 M
NaCl - 0,15 M
Tween 20 - 0,3% (v/v)
pH= 7,5

Solución de Ácido Maléico

Ácido Maleico - 0,1 M
NaCl - 0,15 M
pH= 7,5

Solución de detección

Tris-HCl - 0,1 M
NaCl - 0,1 M
pH= 9,5

Búferes

TAE 0,5X

Tris Base - 2,42 g
Ácido Acético Glacial - 0,57 mL
EDTA 0,5 M, pH 8 - 1 mL
H₂O csp 1 L

Búfer corrida proteínas con SDS 1X

Tris Base - 3 g
Glicina - 14,4 g
SDS - 1g
H₂O csp 1 L
pH= 8,3

Búfer Tris

Tris Base - 60,57 g
pH= 7,6
Diluir en 800 mL de H₂O . Ajustar el pH con HCl concentrado. Completar el volumen a 1 L.

Búfer de carga 5X

Tris 1 M, pH 6,8 - 3,75 mL
SDS 20% - 3 mL
Azul de Bromofenol - 9 mg
Glicerol - 4,5 mL
H₂O csp 10,5 mL
Al momento de usar el búfer agregarle DTT 1 M en un volumen tal que quede en una concentración total de 40 mM

Electroforesis de Proteínas

Acrilamida Mix 30%	
Acrilamida	30%
Bis-acrilamida	0,8%

Preparado en agua y filtrado

Gel separador 12% desnaturalizante
H₂O -1,6 mL
Tris Base 1,5 M, pH 8,8 - 1,3 mL
SDS 10% - 0,05
Acrilamida Mix 30% - 2,0 mL
TEMED - 0,002 mL
Persulfato de amonio (PSA) -10% 0,05 mL

Gel Concentrador 5% Desnaturalizante
H₂O - 1,5 mL
Tris HCl 1,0 M, pH 6,8 -0,65 mL
SDS 10% - 0,05 mL
Acrilamida Mix 30% - 0,35 mL
TEMED- 0,005 mL
PSA 10% - 0,01 mL

Solución de Tinción
H₂O 500 mL
EtOH 95% 400 mL
Ácido Acético Glacial 100 mL
Azul Brillante de Coomassie R250 1 g

Solución Decolorante
H₂O 500 mL
EtOH 95%- 400 mL
Ácido Acético Glacial - 100 mL

Código de bases degeneradas

Base degenerada (IUPAC)	Base equivalente
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T (o U)	Timina (o Uracilo)
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G
N	Cualquier base
. o -	gap

Referencias

Adékambi, T., Drancourt, M., & Raoult, D. (2009) The *rpo B* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol*, 17: 37-45.

Adekoya, O., Helland, R., Willassen, N. & Sylte, I. (2006) Comparative sequence and structure analysis reveal features of cold adaptation of an enzyme in the thermolysin family. *Proteins*, 62: 435-449.

Altschul, F., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Aghajari N, Van Petegem F, Villeret V, Chessa JP, Gerday C, et al. (2003) Crystal structures of a psychrophilic metalloprotease reveal new insights into catalysis by cold-adapted proteases. *Proteins Struct Funct Genet* 50: 636–647.

Ayello, E. A., & Cuddigan, J. E. (2004) Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Adv skin Wound Care*, 17: 76-78.

Bandi C., Damiani G., Magrassi L., Grigolo A., Fani R. & Sacchi L. (1994) *Flavobacteria* as Intracellular Symbionts in Cockroaches. *Proc R Soc B* 257: 43-48.

Barret, A. J., N. D. Rawlings & J. F. Woessner, eds (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London, pp. 3-542

Barrett, A. J. (2001) *Proteolytic enzymes: nomenclature and classification.*, En *Proteolytic Enzymes*. A practical approach 2nd ed. (R. Beynon & J. S. Bond, eds.), Oxford Univertisty Press, Gret Britain, pp. 1-21

Bode W, Gomis-Ruth FX, Stocker W (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins." *FEBS Lett* 331: 134–140.

Cabrera H., & Davis G. (1961) Epidemic Meningitis of the Newborn Caused by Flavobacteria: I. Epidemiology and Bacteriology. *Am J Dis Child*. 101:289-295.

Chessa, J.P., Petrescu, I., Bentahir, M., Van Beeumen, J., & Gerday, C.H. (2000) Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. *Biochem. Biophys. Acta* 1479, 265–274.

Dayanandan, A., Kanagaraj, J., Sounderraj, L., Govindaraju, R., & Rajkumar, G. S. (2003) Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. *J Clean Prod*, 11: 533-536.

Denner, E., Mark, B., Mark, B., Busse, H. J., Busse, H. J., Turkiewicz, M., & Lubitz, W. (2001) *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a Psychrotrophic, Halotolerant Bacterium Isolated from the Antarctic Krill *Euphausia superba* Dana, Excreting a Cold-Adapted Metalloprotease. *Sys Appl Microbiol*, 24: 44-53.

Feller, G. & Gerday, C. (2003) Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1: 200-208

Fornbacke M. and Clarsund M. (2013) Cold-adapted proteases as an emerging class of therapeutics. *Infect. Dis Ther.* DOI 10.1007/s40121-013-0002-x

Freddi, G., Mossotti, R., & Innocenti, R. (2003) Degumming of silk fabric with several proteases. *J Biotechnol*, 106: 101-112.

Garrett, R. & Girsham, C. (1999) Mechanism of Enzyme Action. *Biochemistry*. Harcourt Colleague Pub., 2a. ed. Disponible web.virginia.edu/Heidi.

Gianese, G., Argos, P., & Pascarella, S. (2001) Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Prot Eng*, 14: 141-148.

Ha, M., Bekhit, A. E. D., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2013) Comparison of the proteolytic activities of new commercially available bacterial and fungal proteases toward meat proteins. *J. Food Sc*, 78: C170-C177.

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., & Tschäpe, H. (1997) Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol*, 23: 1089-1097.

He, G., Wang, Z., Liu, Q., Chen, R., Hui R. & Schwarz, P. (2006) Relationship of proteinase activity, foam proteins, and head retention in unpasteurized beer, *J. Amer. Soc. Brewing Chem.* 64: 33-8.

Horan, R. L., Antle, K., Collette, A. L., Wang, Y., Huang, J., Moreau, J. E., & Altman, G. H. (2005) In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*, 26: 3385-3393.

Infante, I., Morel, M. A., Ubalde, M. C., Martínez-Rosales, C., Belvisi, S., & Castro-Sowinski, S. (2010) Wool-degrading *Bacillus* isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics. *W J Microbiol Biotech* 26: 1047-1052.

Janz, J. A. M., Pietrasik, Z., Aalhus, J. L., & Shand, P. J. (2005) The effects of enzyme and phosphate injections on the quality of beef semitendinosus. *Can J Animal Sc* 85:, 327-334.

Kakudo, S., N. Kilckuchi, K. Kitadokoro, T. Fujiwara, E. Nakamura, H. Okamoto, M. Shin, M. Tamaki, H. Teraoka & H. Tsuzuki (1992) Purification, characterization, and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580, *J. Biol. Chem.* 267: 23782-23788.

Klinman, J. P. (1972) The Mechanism of Enzyme-catalyzed Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide-dependent Reductions Substituent And Isotope Effects In The Yeast Alcohol Dehydrogenase Reaction. *J Biol Chem*, 247: 7977-7987.

Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification 1. *Ann Rev Microbiol* 55: 709-742.

Kudrya, V.A, & Simonenko, I.A. (1994) Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:505-509.

Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., & Amann, R. (1998) Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 64: 2691–2696.

Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., & Schleifer, K. H. (1996) Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology*, 142: 1097-1106.

Margesin, R. (2012) Psychrophilic microorganisms in alpine soils. En: *Plants in Alpine Regions*. Springer Vienna. (R. Margesin, ed) (pp. 187-198).

Chamba, J. & Perreand, E. (2002) Contribution of propionic acid bacteria to lipolysis of Emmental Cheese, *Lait* 82: 33-44. *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* in the natural environment. *Microbiology* 142: 1097-1106

Fox, P. & Law, J. (1991) Enzymology of cheese ripening, *Food Biotechnol.* 5: 239-62.

Hoshino, T., Ishizaki, K., Sakamoto, T., Kumeta, H., Yumoto, I., Matsuyama, H., & Ohgiya, S., (1997) Isolation of a *Pseudomonas* species from fish intestine that produces a protease active at low temperature. *Lett Appl Microbiol* 25: 70-72.

Maase, F. W. J. L., & Van Tilburg, R. (1983) The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. *J Am Oil Chem Society*, 60: 1672-1675.

Margesin, R., & Schinner, F. (1992) A comparison of extracellular proteases from three psychrotrophic strains of *Pseudomonas fluorescens*. *J Gen Appl Microbiol* 38: 209-225.

Margesin, Rosa, & Miteva, V. (2011) Diversity and ecology of psychrophilic microorganism. *Res Microbiol* 162: 346-61.

Martínez-Rosales, C., & Castro-Sowinski, S. (2011) Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Res*, 30. DOI: 10.3402/polar.v30i0.7123

Martone, C. B., Borla, O. P., & Sánchez, J. J. (2005) Fishery by-product as a nutrient source for bacteria and archaea growth media. *Biores Techn* 96: 383-387.

Marx, J. C., Collins, T., D'Amico S., Feller, G., & Gerday, C. (2007) Cold-adapted enzymes from maine Antarctic microorganism. *Marine Biotech* 9: 293-304.

Mc Kevitt, A.I., Bajaksouzian, S., Klinger, J.D., & Woods, D.E. (1989) Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infect Immun* 57: 771–778.

Moodie, P. (2001) Traditional Baking Enzymes-Proteases. *Enz Develop Corp* 212: 1-10.

Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-savitch, L., & Huner, N, P. A. (2006) Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganism to permanently cold environments. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 222-252.

Neitzel, J. J. (2010) Enzyme Catalysis: The Serine Proteases. *Nature Edu* 3:21-25

Oda, K. (2012). New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. *Journal of biochemistry*, 151(1), 13-25.

Ochman, H., & Jones, I. B. (2000) Evolutionary dynamics of full genome content in *Escherichia coli*. *The EMBO J* 19: 6637-6643.

Ohgiya, S., Hoshino, T., Okuyama, H., Tanaka, S. & Ishizaki, K. (1998) Biotechnology of enzymes from cold-adapted microorganisms. En: *Biotechnological Applications of Cold-Adapted Microorganism*. Margesin, R. & Schinner, F. (Eds). Springer, pp 17-34.

Parrado, J., Millan, F., Hernandez-Pinzon, I., Bautista, J., & Machado, A. (1993) Sunflower peptones: use as nitrogen source for the formulation of fermentation media. *Process Biochem* 28: 109-113.

Park Y., (2001) Proteolysis and Lipolysis of goat milk cheese, *J. Dairy Sci.* 84: E84-E92

Pietrasik, Z., Aalhus, J. L., Gibson, L. L., & Shand, P. J. (2010) Influence of blade tenderization, moisture enhancement and pancreatin enzyme treatment on the processing characteristics and tenderness of beef semitendinosus muscle. *Meat Sc*, 84: 512-517.

Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V., Giuliani, M. M., Arico, B., Comanducci, M., & Rappuoli, R. (2000) Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, 287: 1816-1820.

- Polgár, L. (2005) The catalytic triad of serine peptidases, *Cell. Mol. Life. Sci.* 62: 2161-2172.
- Landbo, A., Pinelo M., Vikbjerg, Let, M. & Meyer A. (2006) Protease-assisted clarification of black currant juice: Synergy with other carrying agents and effects on the phenol content, *J. Agric. Food Chem.* 54: 6654-6663
- Rahman, R. N. Z. R. A., Geok, L. P., Basri, M., & Salleh, A. B. (2006) An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. *Enz Microb Technol*, 39: 1484-1491.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V.V. (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597-635.
- Ramsak, A., Peterka, M., Tajima, K., Martin, J.C, Wood, J, Johnston, M.E.A, Aminov, R.I, Flint, H.J, & Avgustin, G (2000) Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiol Ecol* 33: 69–79.
- Rawlings, N. D. & A. J. Barrett (1993) Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.* 290: 205-218.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong & A. J. Barrett (2008) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34: D270-2
- Reichenbach, H. and Dworkin, M. (1991) The order Cytophagales. En: *The Prokaryotes* (Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H., Eds.). Springer-Verlag, New York, 356–379.
- Reissbrodt, R., Beer, W., Claus, H., & Müller, R. (1995) Characterization of casein peptones by HPLC profiles and microbiological growth parameters. *Acta Biotech* 15: 223-231.
- Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Appl Environ Microbiol* 74: 1677-1686.

- Rzychon, M., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J. (2004) Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol*, 51: 861-873
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Satomi, M, Kimura, B, Takahashi, G, & Fujii, T (1997) Microbial diversity in Kusaya gravy. *Fish. Sci.* 63, 1019–1023
- Sauer, S., & Kliem, M. (2010) Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8:, 74-82.
- Saunders, N. F. W., Thomas, T., Curmi, P. M. G., Mattick, J. S., Kucsek, E., Slade, R., & Davis, J., *et al.* (2003) Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococoides burtonii*. *Genome Res*, 13: 1580-1588.
- Secades, P., Alvarez, B., & Guijarro, L.A. (2001) Purification and characterization of a psychrophilic calcium-induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol* 67: 2436–2444.
- Shore, J. D., & Gutfreund, H. (1970) Transients in the reactions of liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry*, 9: 4655-4659.
- Sievert, S.M, Kuever, J, Muyzer, G (2000) Identification of 16S ribosomal DNA-defined bacterial populations at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ Microbiol* 66: 3102–3109.
- Smith, M.C, Bowman, J.P, Scott, F.J, & Line, M.A (2000) Sublithic bacteria associated with Antarctic quartz stones. *Antarct. Sci.* 12: 177–184.
- Studier, F. W., & Moffatt B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Mol Biol* 189:113-130.
- Tsuchiyama, S., Doukyu, N., Yasuda, M., Ishimi, K. and Ogino, H. (2007) Peptide synthesis of aspartame precursor using organic-solvent-stable PST-01 protease in monophasic aqueous-organic solvent systems. *Biotechnol Progress*, 23: 820–823.

- Van der Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes, *Curr Opin Microbiol*, 6: 785-799.
- Vasileva-Tonkova, E., Nustorova, M., & Gushterova, A. (2007) New protein hydrolysates from collagen wastes used as peptone for bacterial growth. *Curr Microbiol*, 54: 54-57.
- Vazquez, S. C., Coria, S. H., & Mac Cormack, W. P. (2004) Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains. *Microbiol Res*, 159: 157-166.
- Vázquez, S.C., Hernández, E., & Mac Cormack, W.P. (2008) Extracellular proteases from the antarctic marine *Pseudoalteromonas* sp. P96-47 strain. *Rev Argent Microbiol*, 40: 63–71.
- Wandersman, C. (1989) Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol Microbiol*, 3: 1825–1831.
- Wolf-Watz, M., Thai, V., Henzler-Wildman, K., Hadjipavlou, G., Eisenmesser, E. Z., & Kern, D. (2004) Linkage between dynamics and catalysis in a thermophilic-mesophilic enzyme pair. *Nature Struct Mol Biol*, 11: 945-949.
- Yi, H., Oh, H. M., Lee, J. H., Kim, S. J., & Chun, J. (2005) *Flavobacterium antarcticum* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the Antarctic. *Int J Sys Evol Microbiol*, 55: 637-641.
- Zhang, S. C., Sun, M., Li, T., Wang, Q. H., Hao, J. H., Han, Y. & Lin, S. X. (2011) Structure analysis of a new psychrophilic marine protease. *PloS one*, 6: e26939.
- Zhou, M.Y., Chen, X.L., Zhao, H.L., Dang, H.Y, Luan, X.W et al. (2009) Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea. *Microb Ecol* 58: 582-590.
- Zhou, M. Y., Wang, G. L., Li, D., Zhao, D. L., Qin, Q. L., Chen, X. L. & Zhang, Y. Z. (2013) Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and bacterial extracellular proteases in the coastal sediments of King George Island, Antarctica. *PloS one*, 8: e79668.